

Aus dem
Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. Ulrich Joos -

Prognostische Relevanz von p21, p27 und Cyclin D1 bei oralen Plattenepithelkarzinomen

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Mike Wolterink
aus Nordhorn

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Kleinheinz

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Horst Bürger

Tag der mündlichen Prüfung: 19.3.2008

Zusammenfassung

Aus dem
Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. Ulrich Joos -
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Kleinheinz
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Horst Bürger

ZUSAMMENFASSUNG

Prognostische Relevanz von p21, p27 und Cyclin D1 bei oralen Plattenepithelkarzinomen

Mike Wolterink

Tumore entstehen durch den unkontrollierten Ablauf der Zellteilung. Die vorliegende Studie untersucht die prognostische Relevanz der Zellzyklus-Proteine p21, p27 und Cyclin D1 bei Plattenepithelkarzinomen des Mundbodens.

MATERIAL UND METHODE: 192 Patienten mit histologisch nachgewiesenem und chirurgisch behandeltem Plattenepithelkarzinom des Mundbodens wurden in diese Untersuchung einbezogen. Mit Hilfe von tissue microarrays (TMA`s) wurde die Expression von p21, p27 und Cyclin D1 untersucht. Es fand ein immunhistochemisches Screening unter gleichen Bedingungen mit Antikörpern gegen p21, p27 und Cyclin D1 statt. Die Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und Antikörperexpressionen wurden statistisch mit Kaplan-Meier Kurven, Log-Rank- und chi-square Tests evaluiert.

ERGEBNISSE: Im Log-Rank Test ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von p21 und einer Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0.01$). Kein genereller signifikanter Zusammenhang konnte zwischen der Expression von p27 und der Überlebenswahrscheinlichkeit gefunden werden. In der multivariaten Cox Analyse konnte p27 in der Subgruppe der nodal positiven Karzinome als unabhängiger Indikator der Überlebenswahrscheinlichkeit herausgestellt werden. p27 positive Tumore zeigten in dieser Subgruppe eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0.03$). Bei Tumoren, die Cyclin D1 exprimierten, zeigte sich eine Tendenz zur Prognoseverschlechterung ($p=0.07$). Patienten mit p27 positiven PEC`s zeigten ein höheres Risiko an einem Rezidiv zu erkranken ($p=0.04$). p21 und p27 in Mundbodenkarzinomen scheinen vorhersagende Parameter zu sein, die die Prognose beeinflussen. Bei einer p21 negativen Untergruppe der Plattenepithelkarzinome könnte durch zusätzliche Bestrahlungs- bzw. Chemotherapie eine bessere Heilungschance erreicht werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2008

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis		5
<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	7
<u>1.2</u>	<u>Die orale Leukoplakie</u>	8
<u>1.2.1</u>	<u>Definition</u>	8
<u>1.2.2</u>	<u>Klinik</u>	10
<u>1.2.3</u>	<u>Leukoplakie als Präkanzerose</u>	11
<u>1.3</u>	<u>Das orale Plattenepithelkarzinom</u>	13
<u>1.3.1</u>	<u>Ursachen</u>	13
<u>1.3.2</u>	<u>Morphologie</u>	14
<u>1.3.3</u>	<u>Ausdehnung</u>	14
<u>1.3.4</u>	<u>Therapie</u>	16
<u>1.4</u>	<u>TMA-Microarrays</u>	17
<u>1.4.1</u>	<u>Historische Entwicklung</u>	17
<u>1.4.2</u>	<u>Prinzip</u>	17
<u>1.5</u>	<u>Der Zellzyklus</u>	19
<u>1.5.1</u>	<u>Ablauf des Intermitosezyklus</u>	19
<u>1.5.2</u>	<u>Die Rolle der Proteine im Zellzyklus</u>	20
<u>1.5.3</u>	<u>Der Restriction-Point als Kontrolle des Zellzyklus</u>	20
<u>1.5.4</u>	<u>Die Thesen dieser Arbeit</u>	21
<u>2</u>	<u>Material und Methode</u>	22
<u>2.1</u>	<u>Patientenkollektiv</u>	22
<u>2.2</u>	<u>Herstellung des tissue micro array</u>	22
<u>2.3</u>	<u>Immunhistochemische Färbung</u>	24
<u>2.4</u>	<u>Statistische Auswertung</u>	26
<u>3</u>	<u>Ergebnisse</u>	27
<u>3.1</u>	<u>Überlebenszeit in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus</u>	28
<u>3.2</u>	<u>Überlebenszeit in Abhängigkeit der p16, Cyclin D1, p27 Expression</u>	29

<u>3.3</u>	<u>Rezidivfreie Zeit in Abhängigkeit der Expression von Cyclin D1, p16, p27</u>	36
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	40
<u>4.1</u>	<u>Ergebnisse in Relation zu bisherigen Untersuchungen</u>	41
<u>4.1.1</u>	<u>Ergebnisvergleich</u>	41
<u>4.1.1.1</u>	<u>Cyclin D1</u>	41
<u>4.1.1.2</u>	<u>p27</u>	42
<u>4.1.1.3</u>	<u>p21</u>	44
<u>4.1.1.4</u>	<u>Fazit</u>	45
<u>5</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	47
<u>6</u>	<u>Danksagung</u>	64
<u>7</u>	<u>Lebenslauf</u>	65
<u>8</u>	<u>Anhang</u>	66

1.1 Einleitung

In Deutschland erkranken jährlich etwa 7700 Männer und 2300 Frauen an einer malignen Entartung im Bereich der Mundhöhle und des Rachens. Dies entspricht einem Anteil von 5% an allen bösartigen Neubildungen bei Männern und von etwa 1% bei Frauen (Robert Koch Institut 1999). Weltweit liegt die diagnostizierte Inzidenz von oralen und pharyngealen Tumoren bei 575.000 Fällen pro Jahr und ist somit die fünft häufigste Tumorart weltweit (WHO 1997). Bei 90 % der Tumoren der Mundhöhle handelt es sich um Plattenepithelkarzinome (Wolf et al. 1993).

Trotz erheblicher Fortschritte in der Tumorthherapie konnte die Prognose der Plattenepithelkarzinome nicht wesentlich verbessert werden. Die Mortalität stieg in den Jahren 1990 – 1995 weiter an (Robert Koch Institut 1999). In fortgeschrittenen Tumorstadien sind die therapeutischen Möglichkeiten limitiert, und die Prognose wird signifikant schlechter (Weidauer et al. 1992). Daher wird nach Parametern gesucht, die eine bessere Vorhersagekraft für Therapie und Nachsorge haben.

1.2 Die orale Leukoplakie

1.2.1 Definition

Der Begriff „Leukoplakie“ hat seinen Ursprung in der griechischen Sprache und setzt sich aus den Bestandteilen „leukos = weiß“ und „plax = Fleck“ zusammen. Bereits 1877 wurde er durch den ungarischen Dermatologen Schwimmer geprägt. Diese Bezeichnung sorgte primär für einige Verwirrung, da sie sowohl im klinischen als auch im pathologischen Sinne verwendet wurde. Heutzutage ist der Begriff ausschließlich der klinischen Diagnose zugeordnet und sollte in histologischem Zusammenhang keine Verwendung mehr finden (WHO 1978, Hornstein et al. 1979, Lind 1987, Axél et al. 1996, Kübler et al. 1998)

Gemäß der WHO (1978) wird die Leukoplakie als ein weißer nicht abwischbarer Fleck bezeichnet, den man weder klinisch noch histologisch einer anderen Krankheit zuordnen kann (Pindborg et al. 1997). Die Diagnose der Leukoplakie ist nach dieser Definition eine Ausschlussdiagnose und macht eine gute Differentialdiagnostik erforderlich (Hornstein 1977; Hornstein 1979).

Die Differentialdiagnostik der Leukoplakien umfasst wie unten aufgeführt eine Vielzahl von Erkrankungen (Bánóczy 1982, Hornstein 1979, WHO 1978, Morgenroth 1996):

- ◆ A-Hypovitaminose
- ◆ Anämische Zone nach Lokalanästhesie (Vasokonstriktor), Narbe
- ◆ Benignes Schleimhautpemphigoid
- ◆ Dyskeratosis follicularis (M. Darier), congenita (M. Zinsser-Cole-Engman)
- ◆ Erythema exsudativum multiforme
- ◆ Exfoliatio areata linguae
- ◆ Fokale epitheliale Dysplasie (M. Heck)
- ◆ Fordyce-Flecken (=ektome Talgdrüsen)
- ◆ Glossitis rhombica mediana
- ◆ Haarleukoplakie, AIDS
- ◆ Kontaktdermatitis, lichenoider Kontaktenantheme
- ◆ Leuködem
- ◆ Leukokeratosis nicotinic palati = palatinale Keratose
- ◆ Leukoplakiekarzinom

- ◆ Lingua geographica (migrans)
- ◆ Lipoidproteinose (M. Urban-Wiethe)
- ◆ Lues
- ◆ Lupus erythematoses discoides
- ◆ Melkerson-Rosenthal-Syndrom
- ◆ Morsicatio buccarum et labiorum = Pathomimia
- ◆ Naevus spongiosus albus mucosae
- ◆ Orale Candidose
- ◆ Orale submuköse Fibrose
- ◆ Oraler lichen planus (atrophischer, erosiver, bullöser, retikulärer, konfluierender Typ)
- ◆ Pemphigus vulgaris, vegetans, foliaceus, erythematosus

Der makroskopischen Leukoplakie liegen histologisch folgende Erscheinungsformen zugrunde (Lorenz et al. 1983; Morgenroth 1996):

- Akanthose = erhöhte Anzahl Keratinozyten
- Parakeratose = Verhornungsstörung der Epidermis
- Hyperplasie = Gewebevermehrung durch Erhöhung der Zellanzahl
- Lymphozytäre Infiltration des Stromas

Die weißliche Verfärbung der Schleimhaut kommt durch die abnorme Hydratation des vermehrt gebildeten Keratins und die daraus resultierende Reflexionsänderung des auftreffenden Lichtes zustande (Payne 1975).

Die Genese von Leukoplakien wird mit der Koinzidenz von Humanen Papilloma Viren (HPV) in Verbindung gebracht, da diese in vielen klinischen Formen der Leukoplakie nachgewiesen wurden (Löning et al. 1984; Miller et al. 1996).

1.2.2 Klinik

Es existieren viele Einteilungen der Leukoplakie nach klinischen und pathologischen Gesichtspunkten. Viele von diesen sind aufgrund ihrer großen Unterschiede schlecht miteinander vergleichbar. Für die klinische Beschreibung haben die Einteilungen von Sugár, Báncóczy (1972) und Pinborg et al. (1997) durchgesetzt. Diese bieten den Vorteil der Vergleichbarkeit:

Pinborg et al. 1997	Sugár, Báncóczy 1972
Homogene Leukoplakie	Leukoplakia simplex = planus
Inhomogene = gefleckte Leukoplakie	Leukoplakia verrucosa
	Leukoplakia erosiva

Bei der einfachen Form ist die Schleimhaut matt, gefaltet, etwas verdickt und auf der Oberfläche lassen sich ab und an mosaikartig verteilte, weiße Flecken erkennen.

Beim verrucösen Typ handelt es sich um einen aus einer Epithelproliferation hervorgegangenen. Dort besteht eine umschriebene, sich aus der Oberfläche der Schleimhaut stark hervorhebende, von verdicktem Epithel bedeckte Infiltration.

Bei der erosiven Art lassen sich auch Fissuren, Erosionen oder Exulzerationen im leukoplakischen Gebiet finden, die als gerötete Areale imponieren.

Die Häufigkeiten der verschiedenen Formen gibt Báncóczy (1977) wie folgt an: Leukoplakia simplex 55,4 %, Leukoplakia verrucosa 27,3 % und Leukoplakia erosiva 17,3 %.

Obwohl sich Leukoplakien in allen Bereichen der Mundhöhle befinden können, treten sie bevorzugt an den Schleimhäuten der Wange und der Mundwinkel auf (Axéll 1987; Bouquot et al. 1986; Roed-Petersen et al. 1969; Silverman et al. 1976). Desweiteren werden in absteigender Häufigkeit Lippenrot, mandibuläre Gingiva, Zunge, Mundboden, harter Gaumen maxilläre Gingiva, Lippenschleimhaut, und weicher Gaumen befallen (Bouquot et al. 1986).

1.2.3 Leukoplakie als Präkanzerose

Der Begriff der Leukoplakie bezieht sich laut der meisten Autoren lediglich auf den klinischen Befund und nicht auf das histologische Bild (Esser, Tetsch 1973; Renstrup 1961; Shklar 1965; Silverman, Ware 1960; Waldron, Shafer 1960). Dies ergibt sich daraus, dass dem klinischen Begriff „Leukoplakie“ sehr unterschiedliche pathohistologische Veränderungen zugrunde liegen können. Beginnend mit einer einfachen Epithelverdickung (Hyperplasie mit Hyperkeratose) über die Epitheldysplasie bis hin zum Carzinoma in situ oder sogar einem Übergang zum frühinvasiven Karzinom (Shklar 1965). Die Leukoplakie muss nicht mit einer Dysplasie verbunden sein (Bouquot 1991). Die meisten Leukoplakien sind benigne und häufig nach Wegfall der für die Schleimhaut schädlichen Noxen reversibel. Sie sind nur zu einem kleinen Teil prä- oder frühkanzerös (Hornstein 1977; Shafer et al. 1961).

Eine Präkanzerose ist ein morphologisch verändertes Gewebe, das statistisch mit einem höheren Entartungsrisiko behaftet ist als ein unverändertes Schleimhautareal (AFIP 1968; Pindborg 1980; van der Waal 1995; Axéll et al. 1996).

Die histologische Beschreibung muss die Beurteilung einer epithelialen Dysplasie und deren Graduierung beinhalten (Axéll et al. 1996). Der Begriff „Dysplasie“ bzw. „Atypie“ bezeichnet die Abweichung des histologisch-zytologischen Aufbaus eines Gewebes von der gewöhnlichen Entwicklung (Pindborg 1980; Burkhardt 1985; Morgenroth 1996). Der Grad der Dysplasie hat eine wichtige Bedeutung bei der Ermittlung der Prognose im Hinblick auf eine maligne Entartung und trägt auch eine klinisch-therapeutische Relevanz (Silverman et al 1984; Burkhardt 1985; Axéll et al

1996; Scheifele; Reichart 1996). Das Entartungsrisiko nimmt mit dem Dysplasiegrad zu (WHO 1978; Pindborg 1980; Burkhardt, Maerker 1981; Lind 1987; van der Waal 1995), welcher in drei Schweregrade eingeteilt wird (geringe, mittelgradig, hochgradig) (Burkhardt et al. 1978¹⁺²). Geringgradige und mittelgradige Dysplasien kommen häufig vor und können das Ergebnis einer reaktiven Epithelveränderung sein, wogegen die hochgradige Epitheldysplasie einschließlich des Carcinoma in situ in hohem Prozentsatz maligne entarten können (Burkhardt et al. 1978²). Burkhardt et al. (1977) wies z.B. in 74 % der Leukoplakien keine oder geringgradige, in 17 % mittelgradige und in 6 % hochgradige Dysplasien nach. Die zentrale Frage vieler Verlaufsstudien ist jetzt, in welchem Prozentanteil sich die hochgradigen Dysplasien einschl. des carcinoma in situ zu einem Tumor manifestieren. Silverman et al. (1976) fand eine Karzinominzidenz auf Leukoplakien, die diejenige der erwarteten Tumore auf unveränderter Schleimhaut selbst in Hoch-Risiko-Gruppen weit übersteigt. Hier wurde die präkanzeröse Natur der oralen Leukoplakie deutlich.

Durch unterschiedliche Definitionen des Leukoplakie-Begriffes weisen die von vielen Autoren aufgeführten malignen Transformationsraten erhebliche Schwankungen auf. Es traten Differenzen zwischen 0,13 % (Silverman et al. 1976) und 17,5 % (Silverman et al. 1984) auf.

Esser et al. 1973 ermittelt bei einer detaillierten Verlaufskontrolle von 953 Patienten über einen längeren Beobachtungszeitraum eine Kanzerisierungsrate von 9,3 %. Nach neueren Ergebnissen muss die intraorale Leukoplakie als Präkanzerose mit einer Entartungshäufigkeit von etwa 5 – 10 % angesehen werden.

1.3 Das orale Plattenepithelkarzinom

1.3.1 Ursachen

Bei der Entstehung eines Tumors im oberen Aerodigestivtraktes handelt es sich nach heutiger Erkenntnis um ein multifaktorielles Geschehen. Im Vordergrund stehen allerdings chronischer Tabak- und Alkoholkonsum, die für etwa 90 % der Kopf/Hals-Malignome verantwortlich gemacht werden (Maier et al. 1989; Rothman et al. 1972).

Tabak gilt als auslösender Faktor nicht nur für bösartige Entartungen des Lungengewebes, sondern ebenfalls für Tumore im Mund-Rachen-Raum. Dabei spielt die Applikationsart eine entscheidende Rolle. So erhöht Tabakrauch aus Zigarren und Pfeifen stärker das Risiko für ein Mundbodenkarzinom als Rauch aus Zigaretten. Das Risiko eines alkoholabstinenten Rauchers an einem OSCC zu erkranken liegt etwa doppelt so hoch wie das eines Nichtraucher (IARC 1986). Hierbei ist nicht eine bestimmte Chemikalie des Tabakrauches entscheidend, sondern der risikoe erhöhende Effekt entsteht erst aus dem Mix der vielen Inhaltsstoffe (Shields 2000). Um ihren carcinogenen Effekt zu entfalten, benötigen viele Inhaltsstoffe eine metabolische Aktivität durch bestimmte Enzyme (Hecht 1999).

Alkohol gilt als Kofaktor der malignen Transformation von Epithel. Er potenziert die Kanzerogenese durch Tabak (Decker et al. 1982, Jacobs 1990, Nam et al. 1992, Llewelyn et als. 1994). Alkohol ist kein karzinogener Stoff, führt aber auch zu einer Inhibition der DNA-Reparaturmechanismen (Hsu et al. 1991). Die durch Alkohol induzierten Veränderungen wie Lymphozytopenie, Granulozytopenie und T-Zell-Insuffizienz wirken hierbei möglicherweise mit.

Die die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms begünstigenden Arbeitsplatz-assoziierten Risikofaktoren sind vor allem Nickel, Holz und Textilfasern (Brown et al. 1988, Muscat et al. 1992).

In epidemiologischen Untersuchungen konnten Ergebnisse erzielt werden, die eine protektive Wirkung von Früchten und Gemüse (McLaughlin et al. 1988) und Karotenoiden (Garewal 1995) wahrscheinlich erscheinen lassen. Diese sollen das Risiko, an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken, minimieren.

1.3.2 Morphologie

Man klassifiziert das Plattenepithelkarzinom histologisch nach der Zelldifferenzierung. Hierbei wird in Anlehnung an die Grundsätze vorgegangen, die auch für Tumore anderer Körperregionen aufgestellt wurden (Seifert 1966). Folgende Einteilung wurde von der Union International Contre le Cancer (UICC) erstellt und hat heute noch Gültigkeit (Spiessel et al. 1992):

Gx : Differenzierungsgrad kann nicht ermittelt werden

G1 : gut differenziert

G2 : mäßig differenziert

G3 : schlecht differenziert

G4 : undifferenziert

1.3.3 Ausdehnung

Um eine weitere Möglichkeit der prognostischen Einschätzung zu erhalten, werden bösartige Tumore zusätzlich in Stadien ihrer Ausbreitung eingeteilt. Hierbei hat sich das TNM-System (Tumor-Node-Metastasis) bewährt, das maligne Tumore anhand ihrer Ausdehnung gruppiert (Hermanek 1987).

Nachfolgend wird die TNM-Klassifikation wiedergegeben (UICC 2005):

T= Größe des Primärtumors

Tx= Primärtumor nicht beurteilbar / unbekannt

Tis/Ta= Tumore, die noch nicht infiltriert haben

T0= keine Anzeichen eines Primärtumors

T1= Tumor misst in seiner größten Ausdehnung 2 cm oder weniger

T2= Tumor misst zwischen 2 cm und 4 cm

T3= Tumor misst in seiner größten Ausdehnung mehr als 4 cm

T4a= Tumor durchdringt den kortikalen Knochen und infiltriert in äußere Zungenmuskulatur oder Gesichtshaut.

T4b= Tumor infiltriert ins spatium masticatorium, Schädelbasis oder umschließt die carotis externa.

N= Lymphknoten

N0= keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1= Solitäre ipsilaterale Lymphknotenmetastase bis 3 cm

N2= Lymphknoten zwischen 3 cm und 6 cm

N2a= Solitäre ipsilaterale Lymphknotenmetastase

N2b= Multiple ipsilaterale Lymphknotenmetastasen

N2c= Kontralaterale Lymphknotenmetastasen

N3= Lymphknotenmetastase größer als 6 cm

M= Fernmetastasen

Mx= Fernmetastase nicht beurteilbar

M0= Keine Fernmetastasen

M1= Fernmetastase nachweisbar

C-Faktor (Zuverlässigkeit der Befundsicherung)

C1= allgemeine Untersuchungsmethoden (klinischer Befund, Standard-Rö.)

C2= spezielle Untersuchungsmethoden (CT, Szintigraphie, etc.)

C3= Ergebnisse der chirurgischen Exploration, Zytologien oder Biopsien

C4= Erkenntnisse nach chirurgischem Eingriff und histopath. Untersuchung

C5= Erkenntnisse nach Autopsie und histopath. Untersuchung

1.3.4 Therapie

Grundsätzlich lassen sich ein palliativer und ein kurativer Behandlungsansatz unterscheiden. Bei der palliativen Behandlung steht nicht die Heilung des Patienten im Vordergrund sondern die Verbesserung der Lebensqualität bzw. eine Lebensverlängerung ohne Aussicht auf Heilung. Dem steht der kurative Ansatz gegenüber, dessen Ziel die komplette Tumorentfernung ist. Um den erwünschten Erfolg der kurativen Methode zu erreichen, bildet die chirurgische Entfernung des tumorösen Gewebes in den meisten Fällen die Basis der Therapie. Neben der vollständigen Resektion des Haupttumors mit einem Sicherheitsabstand wird eine Ausräumung der lokalregionalen Lymphknoten durchgeführt, wenn das präoperative Tumor-Staging (CT, Sonographie) ein verdächtiges Resultat ergibt, oder die Tumorgröße 2 cm überschreitet. Eine beidseitige Lymphknotenausräumung wird bei Tumor-Überschreitung der Mittellinie vorgenommen (Robbins et al. 2002). Anschließend erfolgt bei histologisch gesichertem Lymphknotenbefall eine postoperative Strahlentherapie (Amdur et al. 1989, Zelefsky et al. 1992, Thornton 1996, Robins et al. 2002).

Die neoadjuvante Chemotherapie spielt bei der Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms nur zur palliativen Behandlung in Verbindung mit der Strahlentherapie eine Rolle, da die klinischen Erfolge zur kurativen Bekämpfung ausblieben (Vokes 1996).

Alternativ werden eine Vielzahl verschiedener Therapiestrategien in Tierversuchen bzw. in klinischen Studien erprobt. Im Vordergrund stehen hierbei Gen- und Immuntherapien und Ansätze zur Chemoprävention. Die immunologischen Ansätze haben ihre Basis in der Idee, durch eine Aktivierung einer spezifischen Immunantwort gegen definierte Tumorantigene, der Gabe spezifischer Antikörper, die z.B. den

Epidermal-Growth-Faktor-Rezeptor (EGF-R) blockieren (Knecht et al. 1997), den erbB2-Rezeptor besetzen und dadurch die Proteinsynthese verhindern (Werkmeister et al. 1999) oder aber einer allgemeinen systemischen Stimulierung des Immunsystems z.B. durch Zytokine (IL-2), Mistelextrakte oder proteolytische Enzyme zu erreichen. Bei Anwendung von rhIL-4 konnte allerdings kein hemmender Effekt auf das Tumorwachstum beobachtet werden (Werkmeister et al. 2005).

1.4 TMA Microarrays

1.4.1 Historische Entwicklung

Das ursprüngliche Konzept der Microarray-Technologie stammt aus dem Jahre 1986 und wurde von Hector Battifora unter dem Namen „sausage block“ veröffentlicht (Battifora 1986). Durch dieses neuartige Konzept, war es möglich, eine große Anzahl von kleinen Gewebeproben in einem einzelnen Paraffin-Block unterzubringen. Seit der genauen Beschreibung durch Kononen et al. (1998) sind viele Studien veröffentlicht worden, die die Möglichkeiten einer kostengünstigen gleichzeitigen Auswertung verschiedener Gewebeproben darstellen (Afenyi-Annan et al 2001, Moch et al. 1999, Mousses et al. 2000).

1.4.2 Prinzip

Konventionelle Techniken zu Analyse von Tumor-Proben auf molekularer Ebene sind Labor- und Zeitintensiv. Die tissue-microarray-Technologie erlaubt einen hohen Proben-Durchsatz zur Bestimmung von molekularen Profilen durch bestimmte Techniken wie Immunohistochemie, Fluorescence in situ hybridization und RNA in situ hybridization (Kononen et al. 1998).

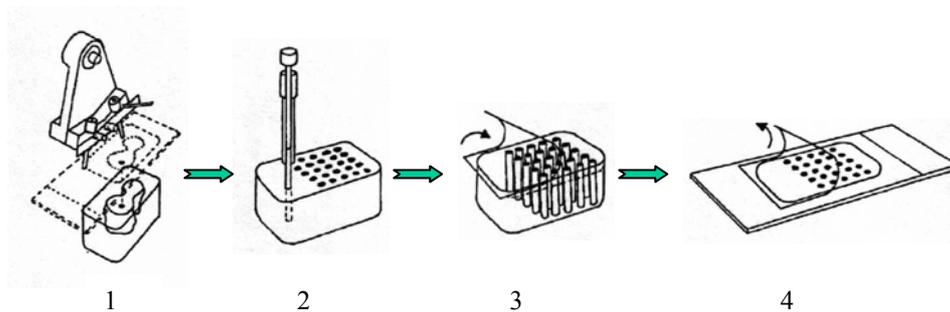


Abb.1 Herstellung eines tissue microarrays (modifiziert nach Lukas Bubendorf et al. 2001)

Um ein Tissue microarray herzustellen, werden kleine Biopsie-Stanzen aus einem morphologisch repräsentativen Abschnitt eines in Paraffin eingebetteten Tumorgewebes entnommen. Dies geschieht mit einem speziellen Präzisionsinstrument (Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland), an dem zwei Nadeln unterschiedlichen Durchmessers angebracht sind (Abb.1.1). Der Durchmesser der einzelnen Stanzen kann zwischen 3 und 0,6mm betragen. Diese Stanzen werden in einen neuen Paraffin-Block eingebracht (Abb.1.2). So können bis zu 1000 Präparat-Stanzen auf einem Paraffin-Block untergebracht werden. Dieser Block kann dann geschnitten und die Schnitte auf einem Objektträger fixiert werden (Abb. 1.3/1.4). So können bis zu 1000 Präparate in einem Schnitt molekularen Analysen unterzogen werden.

1.5 Der Zellzyklus

1.5.1 Ablauf des Intermitosezyklus

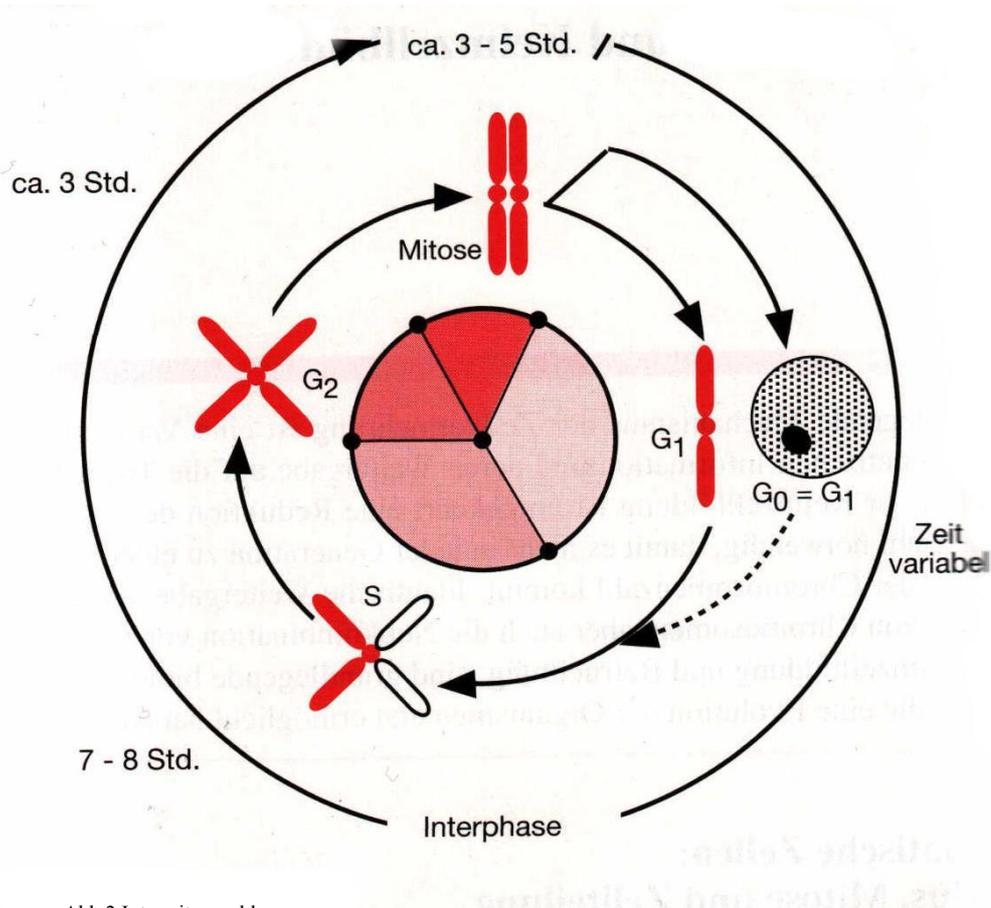


Abb.2 Intermitosezyklus
modifiziert nach Buselmaier et al. 1990

Zur Entstehung eines höheren Organismus ist die Zellvermehrung durch Teilung unumgänglich. Dabei durchläuft die wachsende Zelle bis zur Zellteilung eine Abfolge unterschiedlicher Phasen. Hierbei werden insbesondere drei Phasen unterschieden: G₁-Phase, S-Phase, G₂-Phase. In der G₁-Phase, die als Wachstumsphase bezeichnet wird, bereitet sich die Zelle auf die Zellteilung vor, indem die durch die vorhergehende Teilung reduzierte Proteinsynthese wieder aufgenommen wird. Es werden u.a. die Proteine für den Verteilungsapparat der Chromosomen, die Enzyme für die Vermehrung der DNA und die Histone und nicht basischen Proteine zur Umschließung der DNA

gebildet. In der anschließenden S-Phase findet die Replikation der DNA statt. Bevor dann die Zellteilung beginnt, verstreicht meistens noch eine kurze Zeitspanne (G_2 -Phase) in der alle Voraussetzungen der Zelle zur Teilung vorhanden sind. Es kann vorkommen, dass Zellen in der G_1 -Phase aus dem Zyklus ausscheren und sich Minuten bis Jahre in einer Ruhephase, der sogenannten G_0 -Phase befinden (Buselmaier 1990).

1.5.2 Die Rolle der Proteine im Zellzyklus

Die Zellteilung wird durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK-cyclin dependent kinases) reguliert (Sherr 2000). Die Expression der Cycline ist abhängig von den Zellzyklus-Phasen und reguliert die Transkription und Translation der DNA. Hierbei interagieren sie mit den CDKs, wobei Komplexe gebildet werden, die für bestimmte Phasen des Zellzyklus essentiell sind. D-Cycline interagieren mit CDK4 und CDK6 und werden für den Übergang G_0/G_1 benötigt. Cyclin E bindet an CDK2 und vermittelt so den Eintritt in die S-Phase. Der Cyclin A/CDK2-Komplex reguliert die Passage durch die S-Phase. Später, in Verbindung mit CDC2, führt Cyclin A ebenfalls die G_2 -Phase herbei. Cyclin B1 und CDC2 lösen die molekularen Ereignisse aus, die mit der Mitose zusammenhängen (Lundberg und Weinberg 1999).

Als weitere Proteine, die in den Zellzyklus eingreifen, sind die CKIs (cyclin dependent kinase inhibitors) wie z.B. p16, p21 und p27 zu nennen, die das Zellwachstum hemmen und zum gezielten Zelltod führen können (Vogt et al. 1998). Der genaue Zusammenhang wird noch beschrieben.

1.5.3 Der „Restriction-point“ als Kontrolle des Zellzyklus

Die Entscheidung, die Kaskade des Zellzyklus zu aktivieren, und somit die DNA-Synthese und schließlich die Zellteilung herbeizuführen, fällt am R-Punkt (Restriction-point) nach Ablauf von zwei Dritteln der G_1 -Phase. Ist dieser Punkt überschritten, spielen exogene Signale keine Rolle mehr, und die DNA-Synthese wird begonnen. Deshalb sind die Vorgänge, die an diesem Punkt ablaufen, äußerst wichtig für den

Eintritt in den Zellzyklus. Sollten dennoch Fehler der DNA aufgetreten sein, so gibt es weitere Kontrollpunkte in der S-, G₂- und M-Phase, die den Prozess der Zellteilung stoppen können (Lundberg und Weinberg 1999).

Ein wichtiges Protein am R-Punkt ist das Retinoblastom-Protein (pRB). Wird es phosphoryliert, kann die Zelle den R-Punkt passieren und tritt in das letzte Drittel der G₁-Phase ein. Somit kann die DNA-Synthese beginnen. Diese Phosphorylierung wird durch die Komplexe cyclinD1/CDK4 und cyclinD1/CDK6 vermittelt. Ebenfalls cyclinD2/CDK2 führt zur Phosphorylierung (Hinds et al. 1992, 1994; Sherr 1993). Somit spielen die D-Cycline und deren katalytischen Partnern CDK4 und CDK6 eine wichtige Rolle für die Passage durch die G₁-Phase (Sherr 1993).

Verschiedene exogene Signale können die Aktivität der CDKs hemmen, indem sie die CDKs aktivieren. So hemmen nach Aktivierung p21 und p27 die Kinase CDK2 und verhindern die Komplexbildung mit cyclin E. p15 und p16 hemmen CDK4 und CDK6 und somit den Komplex mit cyclin D. Dadurch wird der Übergang G₁/S und zwangsläufig die DNA-Synthese verhindert (Vogt et al. 1998).

1.5.4 Thesen dieser Arbeit

Die oben genannten Abläufe der Zellteilung führen zu der Annahme, dass eine erhöhte Expression von an der Apoptose beteiligten Proteine (z.B. p21 und p27) zu einem vermehrten Zellsterben falsch programmierter Zellen (Tumorzellen) führt. Ebenso müsste eine Verminderung derjenigen Proteine, die für die Einleitung der Zellteilung verantwortlich sind (z.B. Cyclin D1), eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit zur Folge haben. So müsste ein Tumorpatient mit erhöhter Expression von p21 und p27 und/oder ein Patient mit verminderter Cyclin D1-Expression eine bessere Überlebensprognose aufweisen. Dies müsste zur Konsequenz haben, dass ein Nachweis der obigen Proteine die Prognose-Abschätzung des Erkrankten und die Auswahl des geeigneten Therapiemittels erleichtert. Das zu beantworten ist Ziel dieser Arbeit.

2. Material und Methode

2.1 Patientenkollektiv

In Zusammenarbeit mit dem Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Universität Münster wurden für diese Arbeit in Formalin eingebettete Tumorproben von oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) von 192 Patienten (154 männlich und 38 weiblich) mit einem Durchschnittsalter von 59,5 Jahren (31-90) untersucht. In das Untersuchungs-Kollektiv wurden nur Patienten aufgenommen, die chirurgisch therapiert und deren Krankheitsverlauf mindestens 3-5 Jahre nach Tumorentfernung weiterverfolgt werden konnte.

Die chirurgische Therapie beinhaltete die Tumorentfernung mit einem 4mm Sicherheitsabstand im gesunden Gewebe. Eine selektive neck-dissektion der Level I, II, III und V wurde bei auffälligem präoperativen Tumorstaging-Befund (Computertomographie bzw. Sonographie) oder bei Tumorgröße über 2 cm vorgenommen. Eine bilaterale neck-dissektion fand bei Tumorüberschreitung der Mittellinie statt (nach Empfehlung von Robbins et al. 2002). Eine radiologische Ergänzungstherapie wurde bei histologisch festgestellten Lymphknoten-Metastasen eingeleitet.

2.2 Herstellung des tissue micro array

Die Tumorproben wurden mittels TMA`s untersucht. Hierbei werden kleine Ausschnitte aus den zu untersuchenden Tumoren bzw. Tumorblöcken entnommen und auf einem neuen Paraffinblock zusammengestellt. Die für unsere Untersuchungen verwendeten Tumore wurden nach Eingang und Jahr nummeriert im Archiv aufbewahrt.

Es wurden aus dem Zeitraum 1988-2000 alle resizierten T1/T2-Tumore des Mundbodens der Klinik und Poliklinik/MKG herausgesucht und nochmals histologisch beurteilt und das Tumorareal markiert.

Nach Zusammenstellung der für unsere Arbeit verwendeten Schnittpräparate und der dazugehörigen Tumor-Paraffin-Blöcke, konnte durch Abgleich der Schnitte mit den Blöcken erkannt werden, in welchem Areal des Paraffin-Blocks sich das Tumorgewebe befand. Nun wurden pro Tumor-Präparat je zwei im Durchmesser 0,6mm große Ausschnitte entnommen und auf einem separaten Paraffin-Block nebeneinander eingebracht. Dies wurde durch ein tissue microarray Instrument (Beecher Instruments, New Jersey, USA) ermöglicht, welches nach dem Standardprotokoll verwendet wurde (Kononen et al. 1998; Fillies et al. 2006)

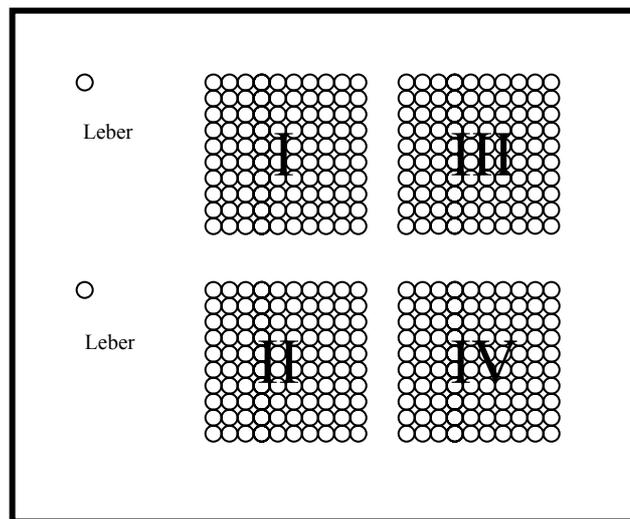


Abb.3: Skizze eines tissue micro arrays (Aufsicht von oben) mit den eingebrachten Proben

Um eine genaue Zuordnung/Orientierung (oben/unten/rechts/links) im histologischen Schnittbild zu gewährleisten, wurden im linken Abschnitt des Paraffin-Blockes zwei Ausschnitte aus Leberparenchym eingebracht, die für die Untersuchungen irrelevant waren.

Um jederzeit die Möglichkeit der Zuordnung von Proben und Patienten sicher zu stellen, wiesen wir jeder eingebrachten Tumorprobe einen Code zu. Dabei gingen wir folgendermaßen vor: Die Proben wurden in Blöcken á 10x10 Proben eingebracht. Diese Blöcke versahen wir mit den römischen Ziffern I – IV (s.Abb.3). Jede waagerechte Reihe eines Blockes wurde aufsteigend mit Buchstaben beziffert. Die erste

mit A, die zweite mit B usw. Die senkrechten Spalten wurden mit den Zahlen 1-10 benannt. So konnte jede Probe zweifelsfrei identifiziert werden.

Nach Fertigstellung des Arrays trugen wir je 4µm dicke Schichten ab und fixierten sie auf einem Objektträger. Diese konnten nun mit den folgenden Färbemethoden behandelt werden.

2.3 Immunhistochemische Färbung

- 1. Anfertigung von ca. 4µm dicken Schnitten und Aufbringen derselben auf Objektträger.**
- 2. Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin:**
 - a. Eintauchen in 0,25 M NH₄-Ac
 - b. Trocknung bei 60 °C
 - c. Inkubation in 50 mg/ml Poly-L-Lysin bei Raumtemperatur für 30 min
 - d. Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur
- 3. Entparaffinisierung der Schnitte:**
 - a. Inkubation für 2 x 10 min in Xylol
 - b. Inkubation für 2 x 5 min in 99%igem Alkohol
 - c. Inkubation für 1 x 5 min in 90%igem Alkohol
 - d. Inkubation für 1 x 5 min in 80%igem Alkohol
 - e. Inkubation für 1 x 5 min in 70%igem Alkohol
 - f. zweimalige Spülung mit Aqua dest.
- 4. Vorbehandlung:**
 - a. Inkubation für 10 min im Autoklaven im Citratpuffer bei pH 6,0
 - b. Abkühlen bei Raumtemperatur
- 5. Färbung nach APAAP-Methode:**
 - a. Primärantikörper:
 - Inkubation für 16 h bei 4 °C im Autostainer, verdünnt in RPMI-Lösung

- Antikörper:
 - CyclinD1: Transduction Labs., monoklonale Antikörper
 - p16 : Transduction Labs., monoklonale Antikörper
 - p21 : Transduction Labs., monoklonale Antikörper
 - p27 : Transduction Labs., monoklonale Antikörper
- Verdünnungen:
 - Cyclin D1 : 1:40
 - p21 : 1:500
 - p27 : 1:1000
- b. Spülung
- c. Sekundärer Antikörper:
 - Inkubation für 60 min in RAM, 1:30 verdünnt in RPMI+HuSe
- d. Spülung
- e. APAAP-Komplex:
 - Inkubation für 60 min in APAAP-Komplex, 1:100 verdünnt in RPMI
- f. Spülung
- g. Chromogen-Substratlösung
 - Neofuchsin-Lösung, 25 min auf dem Rüttler
- h. Spülung
- i. Kerngegenfärbung

6. Abdeckung aus frischem Aqua dest. mit KAISER's Glycerin Gelatine.

2.4 statistische Auswertung

Mit Hilfe von Tissue microarray`s wurde die Expression von Cyclin D1, p21 und p27 in oralen Plattenepithelkarzinomen bestimmt.

Die Expression der einzelnen Proteine wurde kategorisiert in folgende Gruppen:

Für die Überlebenszeit:

keine Expression für $x < 1\%$

positive Expression für $x \geq 1\%$

Für die rezidivfreie Zeit:

Leichte Expression für $x < 1\%$

Mittlere Expression für $1\% \leq x < 10\%$

Starke Expression für $x \geq 10\%$

x = positive Zellkernfärbung in Prozent

Die statistischen Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern (TNG, Gesamtüberlebenszeit, rezidivfreie Zeit) und Expressionsniveau wurden mittels chi-square-Test, Kaplan-Meier, log-Rank-Test und multivariate Cox-Analyse durchgeführt.

Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS 12,0 USA vorgenommen. Das Signifikanz-Niveau wurde mit $p \leq 0.05$ festgelegt.

Es wurden sowohl der Einfluss einzelner Proteine als auch deren Kombinationen getestet. Die verwertbaren Ergebnisse werden in folgenden Grafiken dargestellt:

3. Ergebnisse

Alter der Patienten	Durchschnitt 59 Jahre (31-90 Jahre)
Geschlecht	154 männlich, 38 weiblich
T-Stadium	95 T1; 82 T2; 15 T3-T4
Beobachtungszeitraum	59,5 Monate (4-181 Monate)
N-Stadium	135 negativ; 57 positiv
Grading	44 gut differenzierte Tumore 75 mäßig differenzierte Tumore 73 gering differenzierte Tumore
Rezidiv	66 erneute Tumorerkrankung 126 Rezidivfrei innerhalb Beobachtungszeitraum

3.1 Überlebenszeit in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus

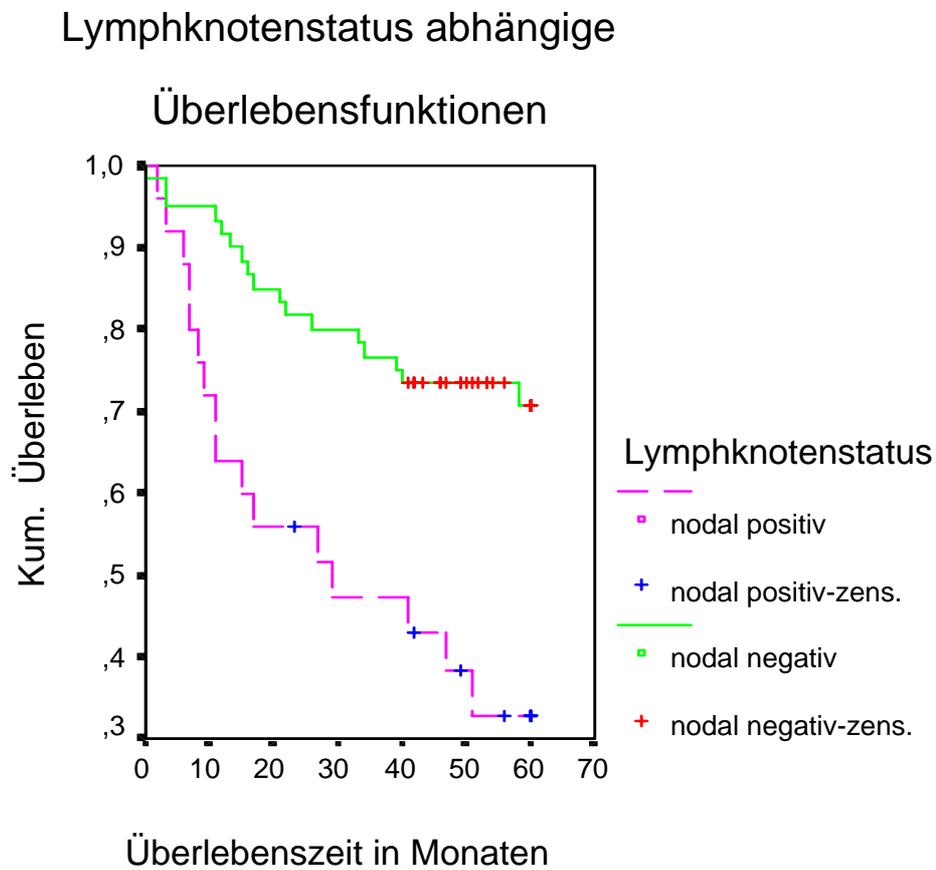


Abb.4: Darstellung der Gesamtüberlebenszeit oraler Plattenepithelkarzinome in Abhängigkeit von der Lymphknotenmetastasierung mittels Kaplan-Meier-Kurve

Abbildung 4 zeigt die Gesamt-Überlebenskurven von Patienten mit nodal positiven und negativen Tumoren. Im Log Rank Test zeigt sich ein signifikant besseres Überleben ($p=0.0005$) für nodal negative Tumore. Im Zeitraum von 20 Monaten postoperativ überlebten etwa 85 Prozent der Patienten mit negativem Lymphknotenstatus, während 55 Prozent der nodal positiven Patienten überlebten. Nach einer Zeitspanne von 60 Monaten lebten noch etwa 32 Prozent der nodal-positiven und etwa 75 Prozent der nodal-negativen Patienten.

3.2 Überlebenszeit in Abhängigkeit der p16, Cyclin D1, p21, p27 Expression

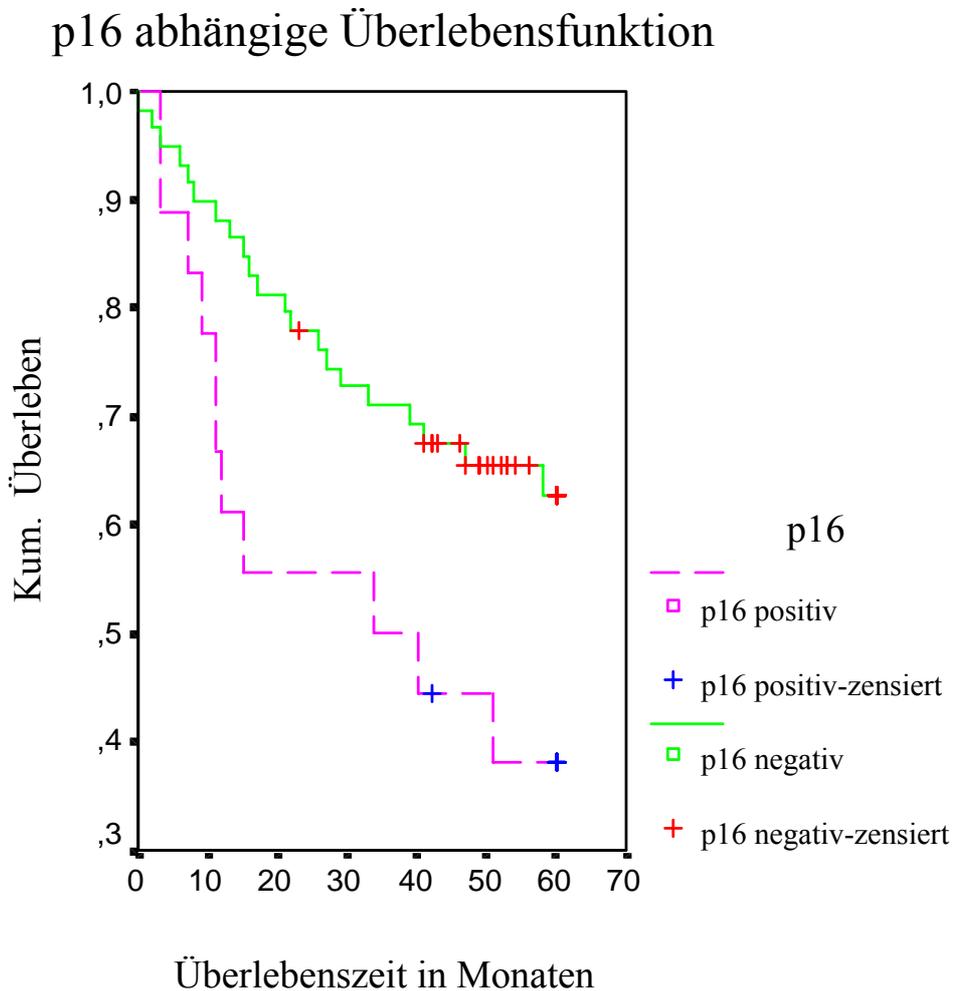


Abb. 5: Darstellung der Gesamtüberlebenszeit oraler Mundbodenkarzinome in Abhängigkeit von der p16-Expression mittels Kaplan-Meier-Kurve

Abbildung 5 zeigt die Gesamt-Überlebenskurven von Patienten mit p16 positiven und negativen Tumoren. Im Log Rank Test zeigt sich ein signifikant besseres Überleben ($p=0.04$) für p16 negative Tumore. Eine Zeit von 20 Monaten überlebten ca. 55 Prozent der Patienten, mit Expression von p16, während etwa 80 Prozent der Patienten ohne p16-Expression diesen Zeitraum überlebten. Nach 60 Monaten lebten noch etwa 62 Prozent der p16 negativen Patienten. Von den p16 positiven Patienten haben etwa 38 Prozent den 5-Jahres-Zeitraum überlebt.

p16 abhängige Überlebensfunktion

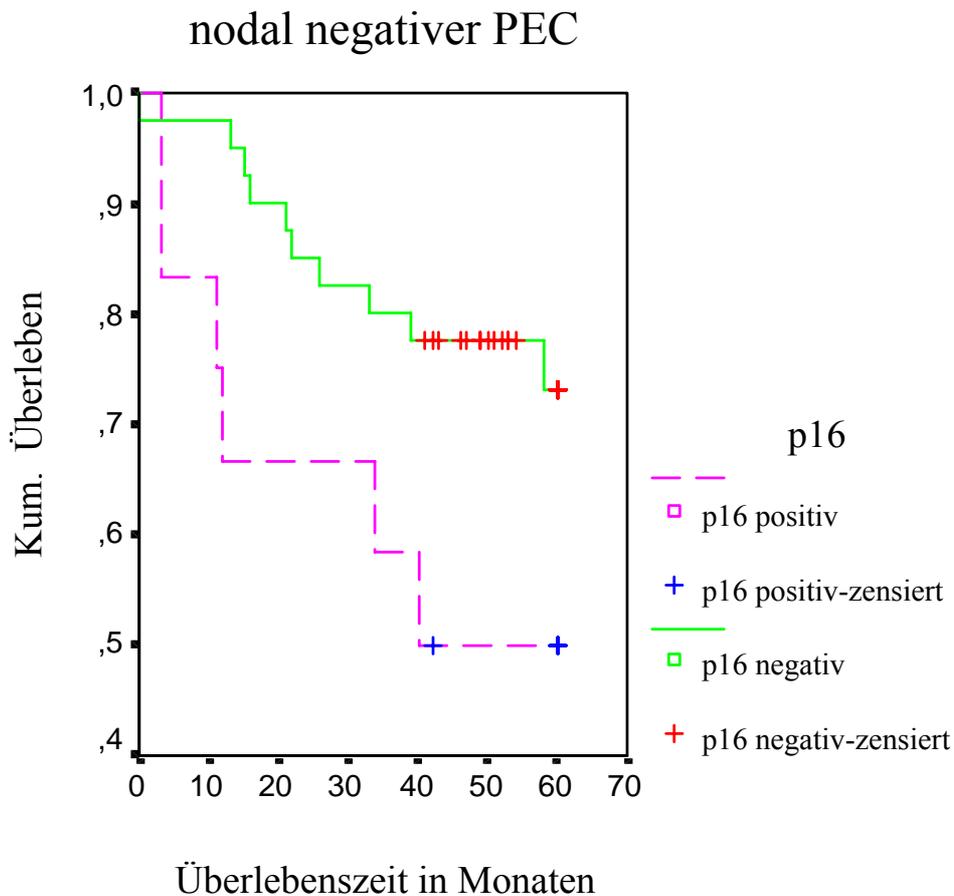


Abb.6: Darstellung der Gesamt-Überlebenszeit oraler Mundbodenkarzinome in Abhängigkeit von der p16-Expression mittels Kaplan-Meier-Kurve

Abbildung 6 zeigt die Gesamt-Überlebenskurven von Patienten mit p16 positiven und negativen Tumoren in der Untergruppe nodal negativer PEC. Im Log-Rank-Test zeigt sich ein tendenziell zur Signifikanz neigendes besseres Überleben ($p=0.07$) für p16 negative Tumoren. Nach 20 Monaten leben noch etwa 66 Prozent der p16-positiven und etwa 90 Prozent der p16-negativen Patienten. Nach 5 Jahren hat sich diese Quote auf etwa 50 Prozent der p16-positiven und etwa 73 Prozent der p16-negativen Patienten reduziert.

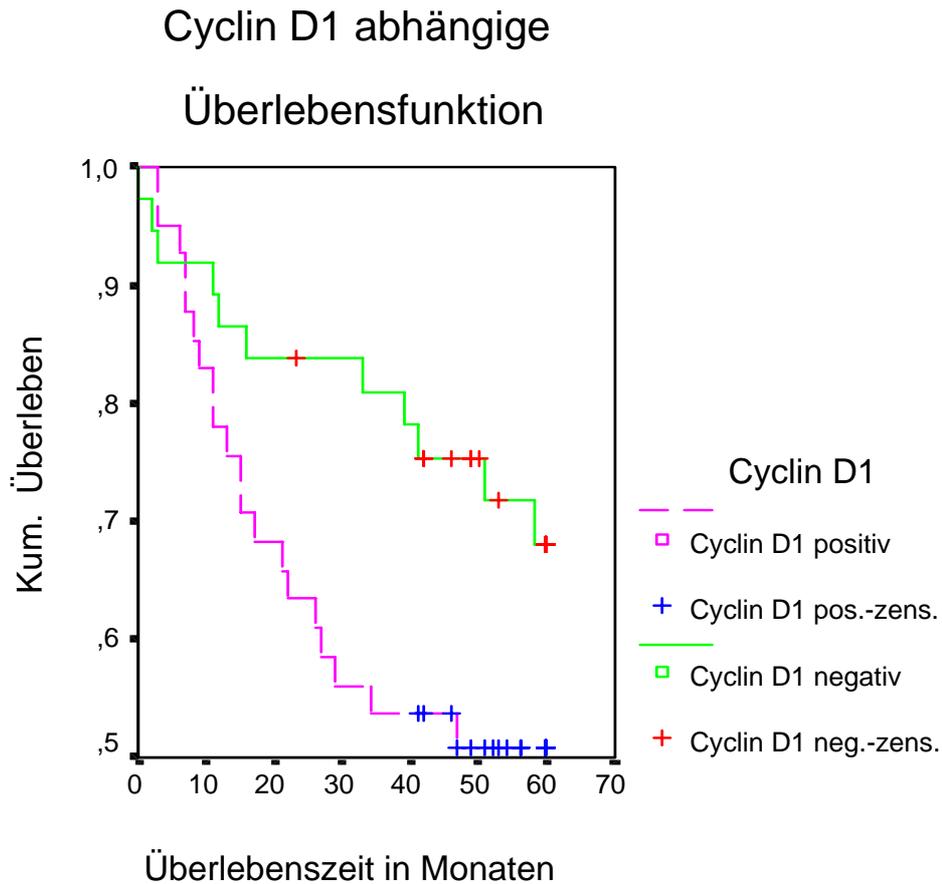


Abb.7: Darstellung der Gesamtüberlebenszeit oraler Mundbodenkarzinome in Abhängigkeit von der Cyclin D1-Expression mittels Kaplan-Meier-Kurve

Abbildung 7 zeigt die Gesamt-Überlebenskurven von Patienten mit Cyclin D1 positiven und negativen Tumoren. Im Log Rank Test zeigt sich ein tendenziell besseres Überleben ($p=0.07$) für Cyclin D1 negative Tumore. Nach 20 Monaten leben noch etwa 78 Prozent der Cyclin D1-exprimierenden Patienten und etwa 85 Prozent der Cyclin D1-negativen Patienten. Nach einer Zeitspanne von 40 Monaten haben noch etwa 55 Prozent der Cyclin D1 positiven Patienten und etwa 80 Prozent der Cyclin D1-negativen Patienten überlebt.

Cyclin D1 abhängige Überlebensfunktion

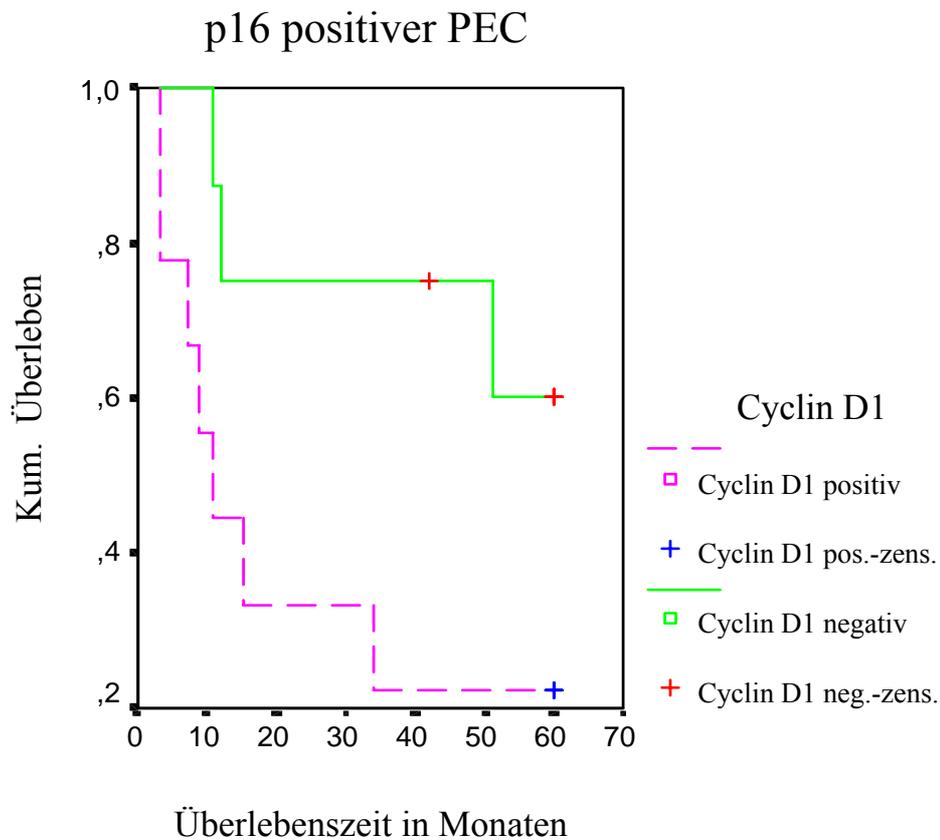


Abb.8: Darstellung der Gesamt-Überlebenszeit oraler Mundbodenkarzinome in Abhängigkeit von der Cyclin D1-Expression mittels Kaplan-Meier-Kurve

Abbildung 8 zeigt die Gesamt-Überlebenskurven von Patienten mit Cyclin D1 positiven und negativen Tumoren in der Untergruppe mit p16-Expression. Im Log Rank Test zeigt sich ein tendenziell besseres Überleben ($p=0.06$) für Cyclin D1 negative Tumore. Die Zeit von 20 Monaten überlebten etwa 75 Prozent der Cyclin D1 negativen und etwa 35 Prozent der Cyclin D1 positiven Patienten. Nach 5 Jahren hat sich die Anzahl der Überlebenden auf etwa 60 Prozent der Cyclin D1-negativen und etwa 22 Prozent der Cyclin D1-positiven Patienten reduziert.

Cyclin D1 abhängige Überlebensfunktion

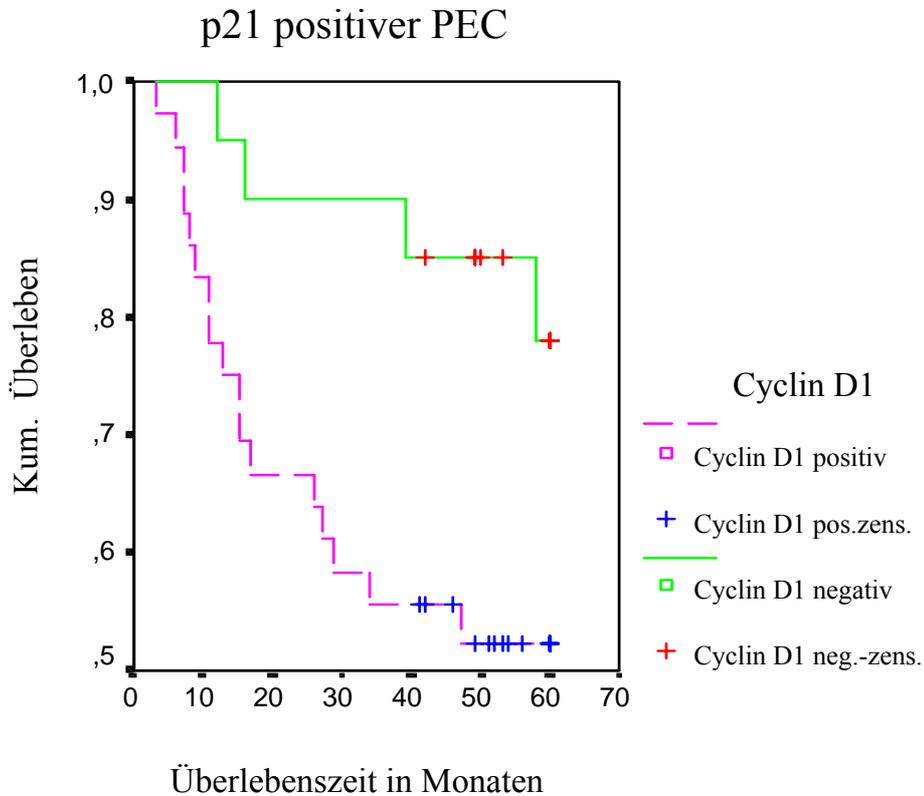


Abb.9 : Darstellung der Gesamt-Überlebenszeit oraler Mundbodenkarzinome in Abhängigkeit von der Cyclin D1-Expression mittels Kaplan-Meier-Kurve

Abbildung 9 zeigt die Gesamt-Überlebenskurven von Patienten mit Cyclin D1 positiven und negativen Tumoren in der Untergruppe mit p21-Expression. Im Log-Rank-Test zeigt sich ein signifikant besseres Überleben ($p=0.03$) für Cyclin D1 negative Tumoren. Nach 20 Monaten leben noch etwa 68 Prozent der Patienten, die Cyclin D1 exprimierten, während bei Patienten, die kein Cyclin D1 exprimierten, die Überlebensrate bei etwa 90 Prozent liegt. Nach einem Zeitraum von 60 Monaten lebten noch etwa 78 Prozent der Cyclin D1-negativen und etwa 52 Prozent der Cyclin D1-positiven Patienten.

p27 abhängige Überlebensfunktion

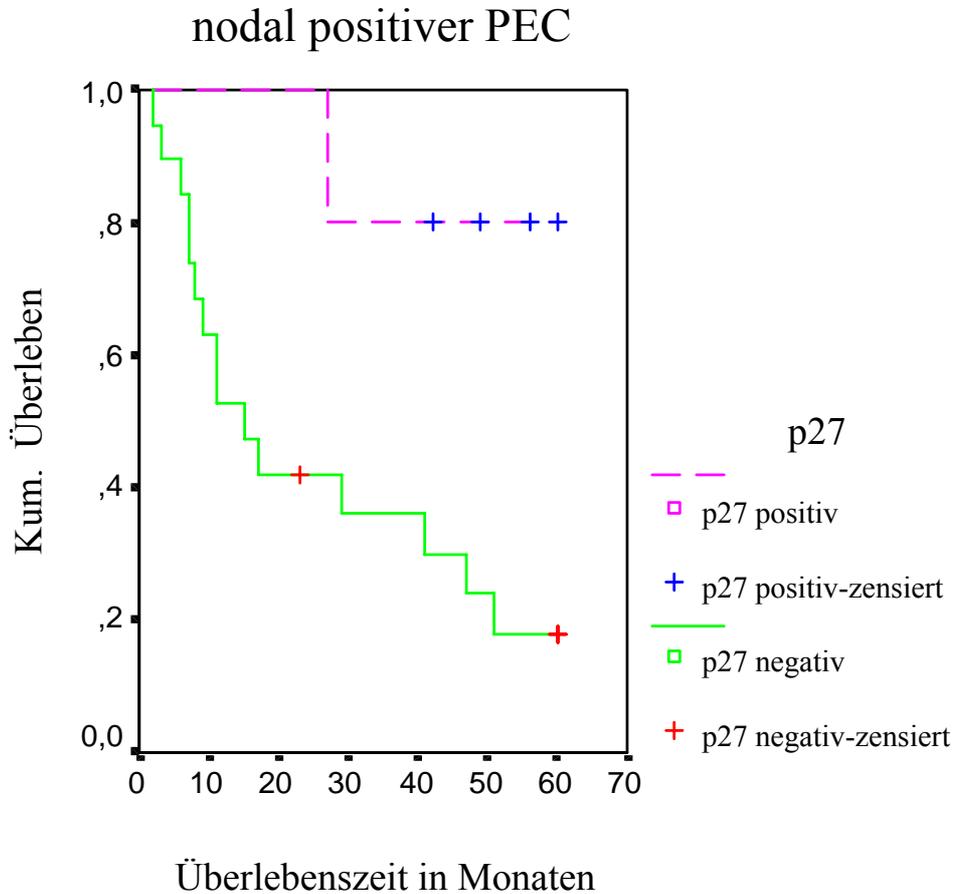


Abb.10: Darstellung der Gesamt-Überlebenszeit oraler Mundbodenkarzinome in Abhängigkeit von der p27-Expression mittels Kaplan-Meier-Kurve

Abbildung 10 zeigt die Gesamt-Überlebenskurven von Patienten mit p27 positiven und negativen Tumoren in der Untergruppe nodal positiver PEC. Im Log-Rank-Test zeigt sich ein signifikant besseres Überleben ($p=0.03$) für p27 positive Tumoren. 20 Monate überlebten etwa 40 Prozent der Patienten mit nicht nachweisbarer p27-Expression, während 100 Prozent Patienten, die p27 freisetzen, überlebten. Nach 60 Monaten reduzierte sich die Anzahl der Überlebenden auf etwa 18 Prozent der p27-negativen und etwa 80 Prozent der p27-positiven Patienten.

p21 abhängige Überlebensfunktion

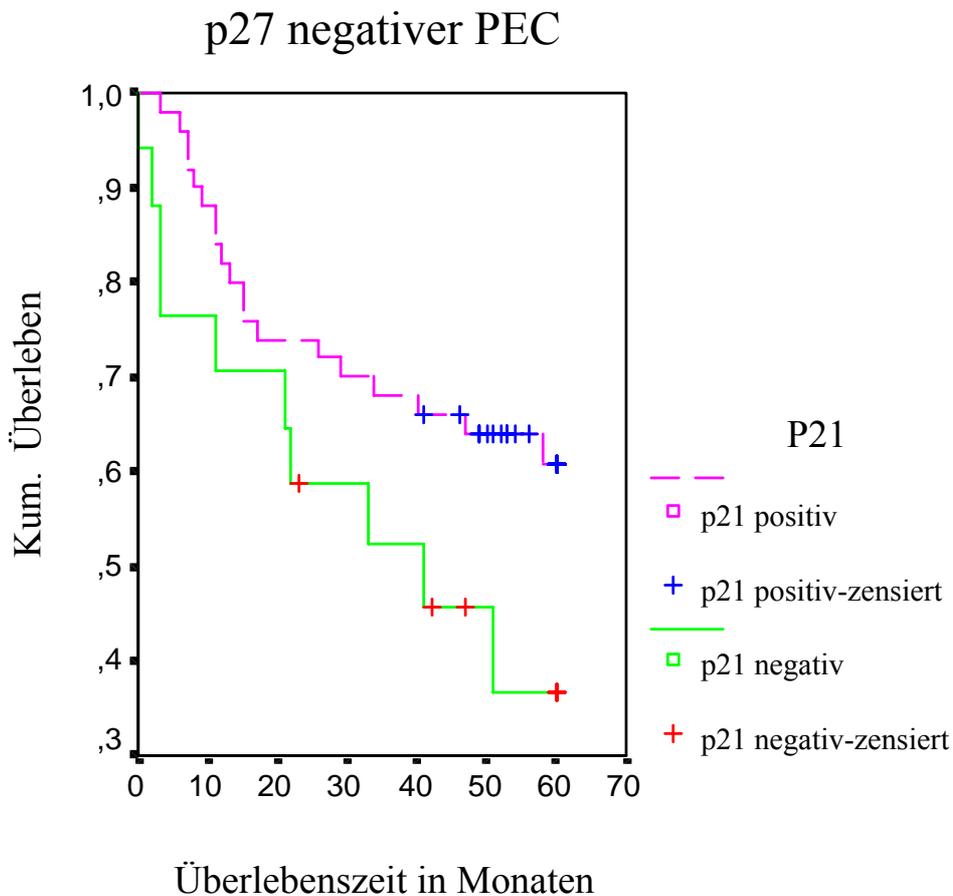


Abb.11: Darstellung der Gesamt-Überlebenszeit oraler Mundbodenkarzinome in Abhängigkeit von der p27-Expression mittels Kaplan-Meier-Kurve

Abbildung 11 zeigt die Gesamt-Überlebenskurven von Patienten mit p21 positiven und negativen Tumoren in der Untergruppe p21 negativer PEC. Im Log-Rank-Test zeigt sich ein tendenziell besseres Überleben ($p=0.09$) für p21 positive Tumoren. Nach 20 Monaten lebten noch etwa 70 Prozent der p21 negativen und etwa 75 Prozent der p21 positiven Patienten. Nach 60 Monaten hat sich die Zahl der Überlebenden auf etwa 36 Prozent der p21 negativen und etwa 60 Prozent der p21 positiven reduziert.

3.3 Rezidivfreie Zeit in Abhängigkeit der Expression von CyclinD1, p16, p21, p27

Cyclin D1 abhängige Rezidivfunktion

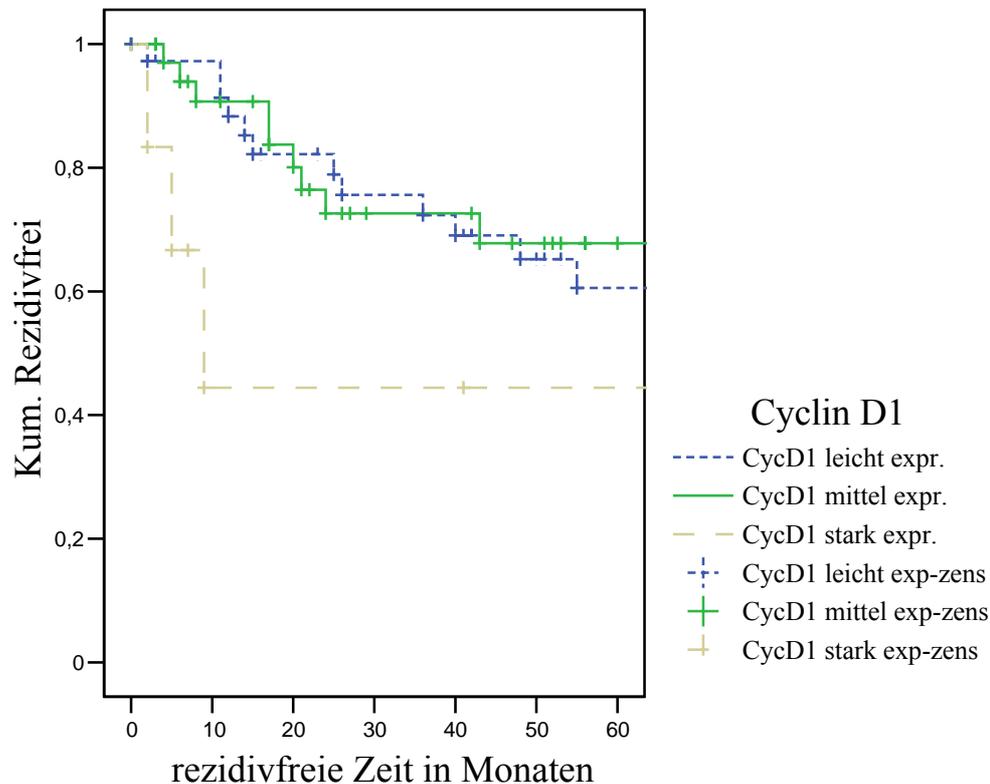


Abb.12: Abhängigkeit der Rezidivenstehung von der Cyclin D1-Expression

Die Abbildung 12 zeigt eine signifikante Abhängigkeit ($p=0.04$) beim Auftreten von Rezidiven und der Stärke der Cyclin D1-Expression. Nach 20 Monaten waren etwa 80 Prozent der Patienten rezidivfrei, die Cyclin D1 in mittlerer Stärke exprimierten. Etwa 85 Prozent der leicht Cyclin D1-exprimierenden Patienten und etwa 45 Prozent der stark Cyclin D1-exprimierenden Patienten waren rezidivfrei. Nach 50 Monaten waren etwa 70 Prozent der mittel CyclinD1 freisetzenden und etwa 65 Prozent der leicht Cyclin D1 exprimierenden Patienten ohne Rezidiv. Von den Patienten, die Cyclin D1 stark exprimierten haben 45 Prozent die 50 Monats-Grenze ohne Rezidiv erreicht.

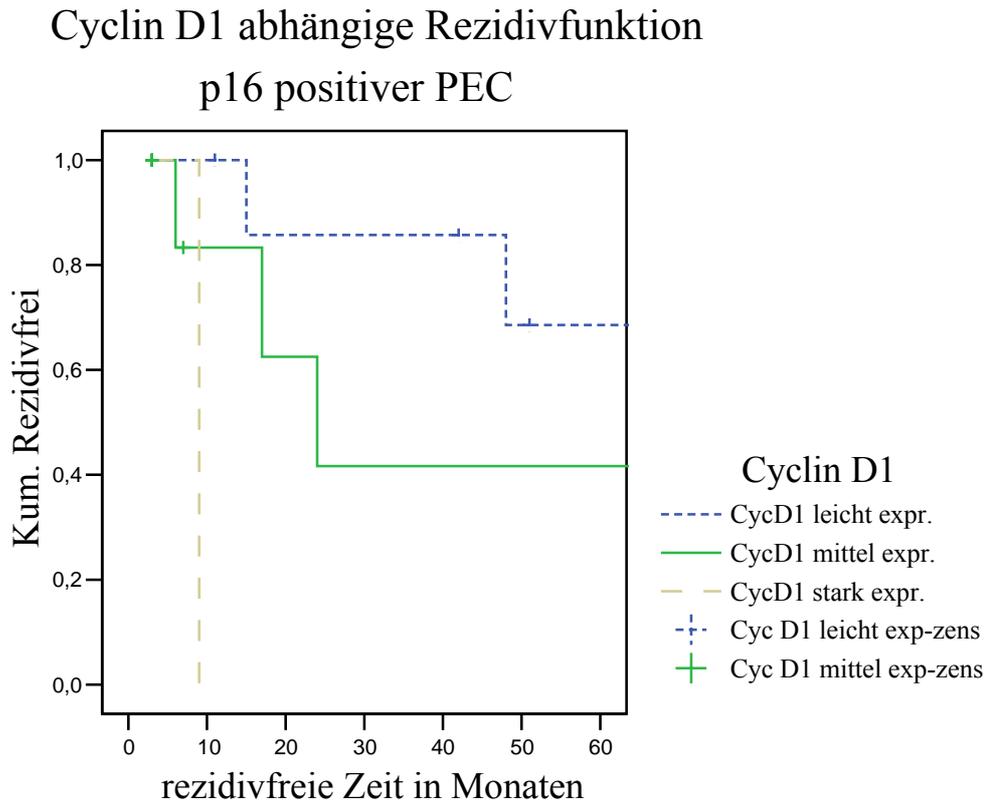


Abb.13: Abhängigkeit der Rezidiventstehung von der Cyclin D1-Expression bei bestehender p16-Positivität

In obiger Abbildung 13 ist zu erkennen, dass eine signifikante Abhängigkeit ($p=0.05$) zwischen der Entstehung von Rezidiven und der Cyclin D1-Expression bei gleichzeitiger p16 Freisetzung besteht. Nach 40 Monaten sind etwa 85 Prozent der leicht Cyclin D1 exprimierenden und etwa 40 Prozent der mittel Cyclin D1 exprimierenden Patienten rezidivfrei. Von den stark Cyclin D1 exprimierenden Patienten hat niemand den 40 Monats-Zeitraum ohne Rezidiv-Diagnose überstanden. Nach 60 Monaten sind etwa 70 Prozent der leicht Cyclin D1 exprimierenden Patienten und etwa 40 Prozent der mittel Cyclin D1 freisetzenden Patienten ohne Rezidivvorkommen.

Cyclin D1 abhängige Rezidivfunktion

p21 positiver PEC

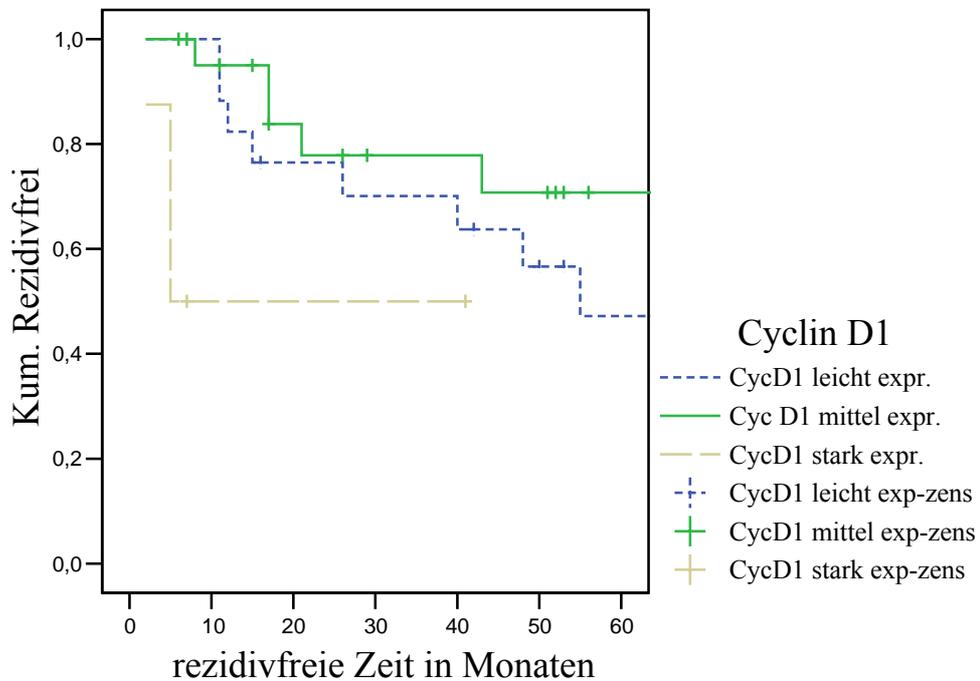


Abb.14: Abhängigkeit der Rezidiventstehung von der Cyclin D1-Expression bei bestehender p21 Freisetzung

In der Abbildung 14 ist zu erkennen, dass eine signifikante Abhängigkeit ($p=0.04$) der Rezidiventstehung von der Cyclin D1-Expression bei gleichzeitiger p21 Freisetzung besteht. Nach 20 Monaten waren etwa 82 Prozent der mittel Cyclin D1 exprimierenden, 78 Prozent der leicht Cyclin D1 exprimierenden und 50 Prozent der stark Cyclin D1 exprimierenden Patienten rezidivfrei. Nach 40 Monaten waren es etwa 78 Prozent der mittel Cyclin D1 freisetzenden und etwa 70 Prozent der leicht Cyclin D1 freisetzenden Patienten. Bei den Patienten, die Cyclin D1 stark exprimierten, traten nach 40 Monaten bei etwa 50 Prozent Rezidive auf.

Cyclin D1 abhängige Rezidivfunktion p27 negativer PEC

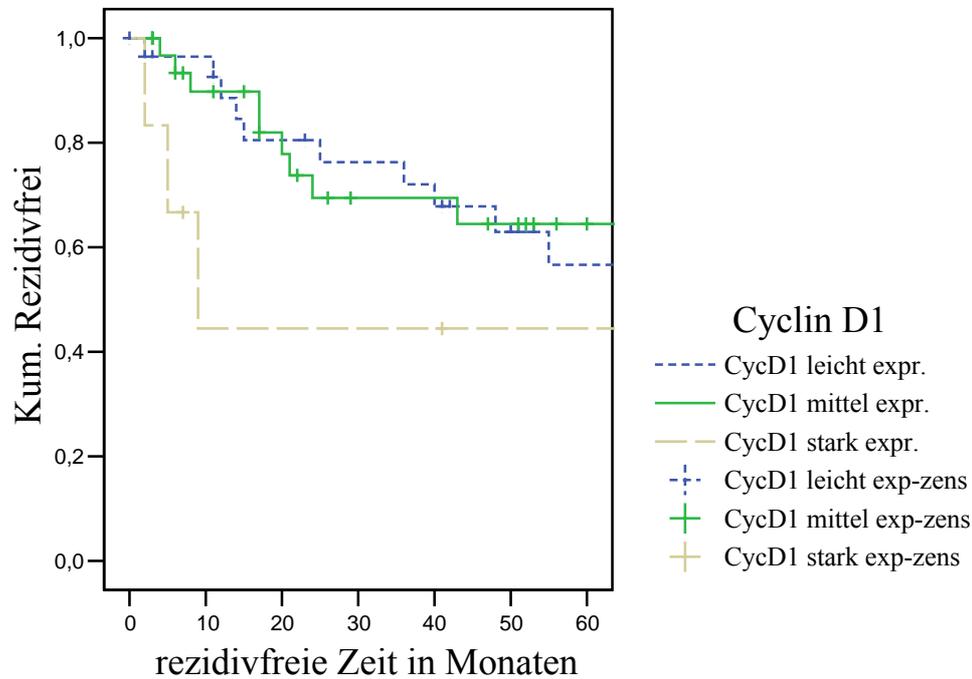


Abb.15: Abhängigkeit der Rezidiventstehung von der Cyclin D1-Expression bei p27 negativen PEC

Die Abbildung 15 zeigt einen tendenziell zu Signifikanz neigende Abhängigkeit ($p=0.07$) der Rezidiventstehung von der Cyclin D1-Expression bei gleichzeitiger p27 Freiheit. Nach 20 Monaten waren etwa 82 Prozent der mittel Cyclin D1 exprimierenden, 81 Prozent der leicht Cyclin D1 exprimierenden und 45 Prozent der stark Cyclin D1 exprimierenden Patienten rezidivfrei. Nach 50 Monaten waren etwa 70 Prozent der mittel Cyclin D1 freisetzenen und etwa 68 Prozent der leicht Cyclin D1 freisetzenen Patienten. Bei den Patienten, die Cyclin D1 stark exprimierten traten nach 50 Monaten bei etwa 45 Prozent Rezidive auf.

4 Diskussion

Die prognostische Beurteilung und die Festlegung des therapeutischen Vorgehens bei der Therapie des Plattenepithelkarzinoms richtet sich gegenwärtig nach dem TNM-System und der Lokalisation. Die Einschätzung des individuellen Erkrankungsverlaufs ist jedoch schwierig, da sich trotz übereinstimmender klinischer Merkmale tumoröse Erkrankungen durchaus unterschiedlich verhalten.

Die individuelle Voraussage über den Erfolg einer chirurgischen Therapie bei lokalen und metastasierenden Tumoren stellt somit ein ungelöstes Problem dar. In der großen Gruppe der HNSCC zeigen nicht nur Tumore unterschiedlicher Größe, sondern auch diejenigen gleicher Größe und Lokalisation, einen Unterschied im biologischen Verhalten und der klinischen Prognose. Histopathologische Eigenschaften oraler Karzinome können daher eine wertvolle Hilfe sein, diejenigen biologischen Parameter zu finden, die diese klinischen Diskrepanzen erklären. Es werden zuverlässige Parameter benötigt, die das Tumorverhalten nach einer standardisierten Behandlung vorhersagen, um die Therapiestrategien zu verbessern.

Die Zellzyklus Regulatoren und deren Gene stellen mögliche Marker dar, um prognostisch relevante Faktoren zu finden, die es ermöglichen, die Therapiestrategien gegen HNSCC zu verbessern.

In dieser Arbeit werden die Proteine p21, p27 und Cyclin D1 auf ihre prognostische Relevanz überprüft.

4.1 Ergebnisse in Relation zu bisherigen Untersuchungen

4.1.1 Ergebnisvergleich

4.1.1.1 Cyclin D1

Cyclin dependent kinases (CDK) und ihre Interaktions-Partner, die Cycline, formen heterodimere Komplexe, die während der vorbestimmten Schritte des Zellzyklus entstehen (Murray et al. 1993, Nurse P 1990, Reed S.I. 1992). Diese Proteinkomplexe sorgen für den geordneten Verlauf des Zellzyklus und führen zu der Phosphorylierung fundamentaler Zellzyklus-Proteine wie etwa des retinoblastom Proteins (pRb) (Draeta G. et al. 1988, Morla A.O. et al. 1989, Buchkovic K. et al. 1989, Decaprio J.A. et al. 1989). Die Phosphorylierung des pRb während der G1-Phase des Zellzyklus ermöglicht den Übergang von der G1 zur S-Phase (Cordon-Cardo C. 1995, Goodger N.M. et al. 1997, Oswald F. 1994, Weinberg R. 1995, Nevins 1992). Cyclin D1 ist ein instabiles, für den Verlauf der G1-Phase essentielles Protein, welches einen Komplex mit CDK4 bildet und sich an pRb bindet (Cordon-Cardo C. 1995). Eine Überexpression von Cyclin D1 wurde sowohl in Brustkrebs als auch in OSCC nachgewiesen (Kyomoto R. et al. 1997, Meredith S.D. et al. 1995, Callender T. et al. 1994, Simpson J.F. et al. 1997, Fantl V. et al. 1990, Lammie G.A. et al. 1991)

In dieser Arbeit konnte eine zur Signifikanz neigende Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit von der Cyclin D1-Expression in OSCC's gezeigt werden. Dies bedeutet eine mögliche klinisch prognostische Relevanz des Cyclin D1-Proteins bei der Bestimmung der Überlebensmöglichkeit bei Erkrankung an einem OSCC, welche bei Vorliegen einer erhöhten Cyclin D1-Expression als vermindert angesehen werden kann. Dieses Ergebnis kann durch weitere Arbeiten untermauert werden. So konnten Kuo et al. 1999 an 88 OSCC, die auf ihre Cyclin D1-Expression und die Auswirkung auf die Überlebensprognose hin untersucht wurden, zeigen, dass Tumore, bei denen über 10% der Zellen Cyclin D1 exprimierten, eine schlechtere Prognose für den Patienten mit sich brachten ($p < 0,05$). Michalides et al. 1995 untersuchten 47 Patienten mit operativ zu behandelndem HNSCC auf ihre Cyclin D1-

Expression und auf deren Aussagenkraft bezüglich der Überlebensprognose. So wiesen 30 Proben eine erhöhte Expression auf, was signifikant mit einem schnelleren Fortschreiten der Erkrankung assoziiert werden konnte. 47% der Cyclin D1-exprimierenden Patienten blieben den 5-Jahreszeitraum rezidivfrei, während bei Cyclin D1 freien Patienten diese Rate 80% betrug. Ebenfalls lag die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Cyclin D1 exprimierenden Patienten mit 60% signifikant unter der Cyclin D1 freien Patientengruppe, von denen 83% diesen Zeitraum überlebten. Auch Akervall et al. 1997 konnten in zwei Serien an 98 Patienten (Serie 1: 75, Serie 2: 23) zeigen, dass eine Cyclin D1-Expression mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht. In Serie 1 konnte hierbei Signifikanz erreicht werden ($p=0,047$). Untersucht wurde die Cyclin D1-Expression und die DNA-Aberation an 11q13 und deren Auswirkung auf die Überlebenszeit.

Nicht nur die Überlebensprognose scheint vom Vorhandensein von Cyclin D1 abhängig zu sein. Auch in der Früherkennung bösartiger Prozesse scheint sich dieser Marker als diagnostisches Mittel zu etablieren. Rousseau et al. 2001 untersuchten 59 epitheliale Dysplasien und 25 SCC vom Mundboden auf ihre Cyclin D1 Gene und deren Protein Expression. Hierbei wurde gezeigt, dass ein abnormaler Cyclin D1-Spiegel einen frühen Marker eines später bösartigen Prozesses darstellt. Ebenfalls konnten Schoelch et al. 1998 bei ihren Untersuchungen an 90 Proben von 25 Patienten mit OSCC bzw. dessen Vorstufen einen direkten Zusammenhang zwischen der Cyclin D1-Expression von Präcancerosen und dem Fortschreiten des Krankheitsverlaufs (Entwicklung eines manifesten OSCC) herstellen.

4.1.1.2 p27

Ein wichtiger Aspekt in der Tumorthherapie ist es, Tumore anhand spezifischer Merkmale in Kombination mit ihrer Prognose zu klassifizieren. Die Expression von p27 stellt ein mögliches Unterscheidungskriterium aufgrund der exponierten Stellung in der Zellzyklus-Regulation dar: Das aktivierte p27 hemmt im Zellzyklus die Kinase CDK2 und verhindert somit die Komplexbildung mit Cyclin E. Dadurch wird der Übergang von der G1- in die S-Phase verhindert, wodurch der Beginn der DNA-Synthese

blockiert wird. So wird - der Theorie nach - ein weiteres Zellwachstum und die Zellvermehrung unterbunden.

In dieser Arbeit gelang der Nachweis der prognostischen Relevanz nur bedingt, da eine Abhängigkeit nicht uneingeschränkt gezeigt werden konnte. In der Gesamtüberlebensbetrachtung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen p27 positiven und negativen Tumoren. Es konnte jedoch in der Gruppe der nodal positiven Tumorerkrankungen dargelegt werden, dass eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit besteht, wenn eine p27-Expression nachgewiesen werden kann ($p=0.03$).

Andere Studien konnten das in unserer Arbeit in der Tendenz erkennbare Ergebnis (Zusammenhang zwischen p27-Expression und besserer Überlebenswahrscheinlichkeit) deutlicher darstellen. So konnten Venkatesan TK et al. 1999 in einer retrospektiven Studie mit 35 an PEC erkrankten Patienten und 15 Kontrollpatienten eine signifikant geringere Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0.0001$), eine höhere Therapieresistenz ($p<0.0001$) und eine kürzere Rezidivfreiheit ($p=0.003$) bei gleichzeitig geringer p27 Expression der PEC's nachweisen. Kudo Yasusei et al. 1997 untersuchten 20 gesunde Plattenepithelien, 22 epitheliale Dysplasien und 70 Plattenepithelkarzinome (OSCC) auf p27-Expression und deren Aussagekraft bezüglich klinisch-pathologischer Parameter. Dabei konnte herausgestellt werden, dass alle gesunden und 73 % der Dysplasien einen hohen Level p27 aufwiesen, während 83 % der OSCC eine reduzierte Expression von p27 zeigten. Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen niedriger Expression und Metastasierung des Tumors herausgestellt werden. In einer späteren Arbeit gelangen Kudo Yasusei et al. 2000 bei 17 Fällen von gleichzeitig vorliegenden Dysplasien und invasiven Plattenepithelkarzinomen der Nachweis, dass eine geringe p27-Expression mit der frühzeitigen Invasion in das umliegende Gewebe korreliert.

Mineta H et al. 1999 untersuchten 94 Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Zunge und stellten fest, dass bei geringem p27-Spiegel signifikant häufiger T3 bzw. T4 Tumore und Lymphknotenmetastasen auftraten. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit lag in der Gruppe der geringen p27-Expression bei 44 % und bei hoher Expression bei 68 %. Somit konnte eine signifikante Abhängigkeit von geringer p27-Expression und negativer Prognose für das Überleben hergestellt werden.

In der retrospektiven Studie von Ricardo V. Lloyd et al. 1999 wurden verschiedene Arbeiten gegenübergestellt, die sich mit der Thematik der p27-Expression bei unterschiedlichen Tumorarten beschäftigten. Eine geringe p27-Expression korrelierte mit einer klinisch ungünstigen Prognose für den Patienten, wobei Tumore der Mundhöhle je nach Grading/Differenzierung verschiedene Level von p27-Expression zeigten.

4.1.1.3 p21

Auch das aktivierte p21 hemmt wie p27 im Zellzyklus die Kinase CDK2 und verhindert somit die Komplexbildung mit Cyclin E. Dadurch wird ebenfalls der Übergang von der G1- in die S-Phase verhindert, wodurch der Beginn der DNA-Synthese blockiert wird.

Diese Arbeit konnte in der Untergruppe der p27 negativen Patienten eine Tendenz in der Abhängigkeit ($p=0.09$) der besseren Überlebensprognose von der p21-Expression darstellen. Somit wird die prognostische Relevanz des p21-Proteins beim OSCC wahrscheinlicher.

Allerdings sind die Ergebnisse anderer Studien nicht eindeutig und widersprechen sich zum Teil. So untersuchten Kuropkat et al. 2002 Proben von 35 Patienten mit vorliegendem OSCC und konnten eine Expression des Protein p21 sowie dessen Intensität nachweisen. Jedoch konnte kein Zusammenhang zu klinisch-pathologischen Vorgängen dargelegt werden.

Zudem gibt es Arbeiten, die wie z.B. King Y et al. 1998 ebenfalls die p21-Expression untersuchten, bei Ihren 153 chinesischen Patienten jedoch ein Fehlen von p21 mit einer signifikant besseren Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0.025$) assoziierten.

Andererseits wurde in einer Studie von Xie et al 2002 ein Zusammenhang zwischen hoher p21-Expression von 80 Patienten mit PEC der Zunge und der Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit gezeigt. Zudem wurde eine Korrelation zwischen dem Expressions-Level und der T-Klassifikation beschrieben.

Letztere Studie bestätigt nun die in unserer Arbeit in der Tendenz beschriebenen Ergebnisse. Ebenfalls kommen Kapranos et al. 2001 zu dem Schluss, dass eine p21-Expression mit einem signifikanten Ansprechen des Tumors auf Chemotherapie

($p=0.02$) und einer längeren Überlebenszeit ($p=0.02$) korreliert. Dies konnte an 62 Patienten mit Larynx- und 31 Patienten mit OSCC nachgewiesen werden. Somit scheint die Chemotherapie bei Patienten mit p21-Expression erfolgreicher zu sein.

Pruneri et al. 1999 untersuchten die prognostische Relevanz der Tumormarker p21 und p27 bei 132 Patienten mit PEC's des Larynx. Hierbei wurde eruiert, dass die erniedrigte Expression von p21 mit einer schlechteren Differenzierung des Tumors und Metastasierung einhergeht. Dies hat ebenfalls eine schlechtere Überlebensprognose zur Folge.

4.1.1.4 Fazit

Die prognostische Relevanz von p21, p27 wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Es bestehen zahlreiche Unterschiede der verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten.

Für Cyclin D1 konnten wir eine Tendenz zur Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit bei negativer Expression nachweisen ($p=0.07$).

Für p27 konnten wir in der Untergruppe der nodal positiven Patienten eine signifikante Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit bei positiver Expression nachweisen ($P=0.03$).

Für p21 wurde eine tendenziell zur Signifikanz neigende Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit bei positiver Expression nachgewiesen ($p=0.09$).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei p21 und p27 trotz unterschiedlicher Literatur um prognostisch relevante Marker handelt, wobei aufgrund der relativ geringen Anzahl untersuchter Proben dies nur als Anstoß für weitere Forschungen gelten sollte. Werden die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt, könnten fehlende p21 und p27-Expressionen zur Konsequenz haben, dass eine Verkürzung der Nachkontrollintervalle nach chirurgischer Therapie notwendig würde. Gegebenenfalls

könnte eine Lymphknoten-Ausräumung auch bei unauffälligem präoperativen Tumorstaging oder Unterschreitung der Größe von 2 cm des Primärtumors vorgenommen, oder eine Strahlen und/oder Chemotherapie als zusätzliches Therapiemittel eingesetzt werden.

Im Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Marker-Proteine erscheint das Cyclin D1 ein sicherer prognostischer Faktor in der Erkennung und Behandlung von kanzerösen Erkrankungen der Mundhöhle und deren Vorstufen. So könnte durch frühzeitiges und ausgedehntes Handeln bei Auftreten Cyclin D1 exprimierender Präcancerosen eine Tumorerkrankung des Patienten verhindert werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Afenyi-Annan A., Mucci N.R., Rubin M.A. et al. Evaluation of biomarkers in Ewing`s sarcoma using tissue microarrays. *Mod Pathol* 14:11A (2001)
2. AFIP Armed Forced Institute of Pathology 1968, zit. von Mittermayer, C.: *Oralpathologie: Erkrankungen der Mundregion*. 3.Aufl., Schattauer S.7 (1993)
3. Akervall J.A., Michalides R.J., Mineta H., Balm A., Borg A., Dictor M.R., Jin Y., Loftus B., Mertens F., Wennerberg J.P.: Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer*. Jan15;79(2):380-9 (1997)
4. Amdur R.J., Parsons J.T., Mendenhall D.E. et al. : Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the head and neck: an analysis of treatment results and complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16:25-36 (1989)
5. Axéll T., Pindborg J.J., Smith C.J., van der Waal I.: International collaborative Group on oral white lesions: Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. *J. Oral Pathol Med* 25:39-54 (1996)

6. Axéll, T.: Occurrence of leukoplakia and some other oral white lesion among 20333 adult Swedish people. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 15:46-51 (1987)
7. Bánóczy, J.: Follow-up studies in oral leukoplakia. *J. maxillofac. Surg.* 5:69-75 (1977)
8. Bánóczy, J.: Oral leukoplakia. Akadémiai Kiadó, Budapest (1982)
9. Battifora H.: The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 55:244-8 (1986)
10. Bouquot, J.E.: Reviewing oral leukoplakia: Clinical concepts for the 1990s. *J. Am. Dent. Assoc.* 122:80-82 (1991)
11. Bouquot, J.E., Gorlin, R.J.: leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 61:373-381 (1986)
12. Bouquot, J.E., Weiland, L.H., Kurland, L.T.: Leukoplakia and carcinoma in situ synchronously associated with invasive oral/oropharyngeal carcinoma in Rochester, Minn., 1935-1984; *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 65:199-207 (1988)
13. Brown L.M.; Mason T.J.; Pickle L.W.: Occupational risk factors for laryngeal cancer on the Texaen Gulf Coast. *Cancer Res* 48:1960-1964 (1988)

14. Buchkovic K., Duffy L.A., Harlow E.: The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58(6):1097–1105 (1989)
15. Burkhardt, A.: Advanced methods in the evaluation of premalignant lesions and carcinomas of the oral mucosa. *J. Oral Pathol* 14:751-778 (1985)
16. Burkhardt A., Maerker R.: Dysplasieklassifikation oraler Leukoplakien und Präkanzerosen. Bedeutung für Prognose und Therapie. *Dtsch. Z. Mund Kiefer Gesichtschir.* 2:199-205 (1978a)
17. Burkhardt, A., Maerker, R., Löning, T., Seifert, G.: Dysplasieklassifikation oraler Leukoplakien und Präkanzerosen. Definition und praktische Anwendung. *Dtsch. Z. Mund Kiefer Gesichtschir.* 2:221-231 (1978b)
18. Burkhardt, A., Seifert, G.: Morphologische Klassifikation der oralen Leukoplakien. *Dtsch. Med Wochenschr.* 102:223-229 (1977)
19. Buselmaier W.: *Biologie für Mediziner*, Springer Verlag 215-218 (1990)
20. Callender T., El-Naggar A.K., Lee M.S., Frankenthaler R., Luna M.A., Batsakis J.G. : PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 74(1):152–158 (1994)
21. Cordon-Cardo C.: Mutation of cell cycle regulators: biological and clinical implications for human neoplasia. *Am. J. Pathol.* 147(3):547 (1995)

22. Decaprio J.A., Ludlow J.W., Lynch D. et al.: Retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 58(6):1085–1095 (1989)
23. Decker J.; Goldstein J.C.: Risk factors in head and neck cancer. *N Engl J Med* 306:1151-1155 (1982)
24. Draetta G., Beach D.: Activation of cdk2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle dependent phosphorylation and subunit arrangement. *Cell* 54:17 (1988)
25. Esser, E.; Tetsch, P.: Klinik und Therapie der intraoralen Leukoplakie. *Dtsch. Zahn Mund Kieferheilkunde. Zentralbl.* 60:378-391 (1973)
26. Fantl V., Richards M.A., Smith R. et al. : Gene amplification on chromosome band 11q13 and oestrogen receptor status in breast cancer. *Eur. J. Cancer* 26(4):423–429 (1990)
27. Farber, E.: the multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 44 : 4217-4223 (1984)
28. Fillies T., Werkmeister R., Packeisen J., Brandt B., Morin P., Weingart D., Joos U., Buerger H.: Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer* 13; 6:10 (2006)
29. Hecht S.S.: Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 1194-1210 (1999)
30. Garewal H.: Antioxidants in oral cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 62:1410-1416 (1995)

31. Goodger N.M., Gannon J., Hunt T., Morgan P.R.: Cell cycle regulatory proteins: an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncol.* 33(2):61–73 (1997)
32. Hermanek P.: Bedeutung der TNM-Klassifikation für die Prognose. *Münch Med Wschr* 129:300-302 (1987)
33. Hinds P.W., Mittnacht S., Dulic V., Arnold A., Reed S.I., Weinberg R.A.: Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70:993-1006 (1992)
34. Hinds P.W., Dowdy S.F., Eaton E.N., Arnold A., Weinberg R.A.: Function of human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:709-713 (1994)
35. Hogewind, W.F.; Waal, I. van der; Kwast, W.A. van der; Snow, G.B.: The association of white lesions with oral squamous cell carcinoma. A retrospective study of 212 patients. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 18:163-164 (1989)
36. Holthusen H.: Erfahrungen über die Verträglichkeitsgrenze für Röntgenstrahlen und deren Nutzenanwendung. *Strahlentherapie* 57:254-269 (1936)
37. Hornstein, O.P.: Klinik, Ätiologie und Therapie der oralen Leukoplakie 30: 40-50 (1979)
38. Hornstein, O.P.: Orale Leukoplakien. I. Klassifikation, Differentialdiagnose, ätiologische Bedingungen der Kanzerisierung, Prognose.; *Dtsch Zahnärztl.Z.* 32:497-505 (1977)

39. Hsu T.C., Furlong C.: The role of ethanol in oncogenesis of the upper aerodigestive tract; inhibition of DNA repair. *Anticancer Res* 11:1995-1998 (1991)
40. IARC : Tobacco Smoking (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 38), Lyon, IARCPress (1986)
41. Jacobs C.D.: Etiologic considerations for head and neck squamous cancer. In: Jacobs C.,ed *Carcinomas of the head and neck: evaluation and management*. Bosten Kluwer Academic (1990)
42. Kapranos N., Stathopoulos G.P., Manolopoulos L., Kokka E., Papadimitriou C., Bibas A., Yiotakis J., Adamopoulos G.: p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value. *Anticancer Res.* Jan- Feb ;21(1B):521-8 (2001)
43. King Y. Lam M.B.B.S., F.R.C.P.A., Simon Law, M.B.B.Chir.,R.C.S.Ed., Lo Tin, M.Med.Sci., Peter H. M. Tung M.B.B.S., F.R.C.S.Ed. and John, Wong Ph.D., F.R.A.C.S., F.R.C.S.Ed.: The clinicopathological significance of p21 and p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma: an analysis of 153 patients. *The American Journal of Gastroenterology* Volume 94, Issue 8, Pages 2060-2068 (1999)
44. Knecht R., Stegmüller M., von Ilberg C.: Effekt von EGF-Antikörpern auf das Wachstum von HNO-Plattenepithelkarzinomen. *HNO: 4*, 266, Abstrakt 90 (1997)

45. Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A., Barlund M., Schraml P., Leighton S., Torhorst J., Mihatsch M.J., Sauter G., Kallioniemi O.P.: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4:844-847 (1998)
46. Kudo Y, Takata T, Yasui W, et al: Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27_{Kip1} is an indicator of malignant behavior of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 83: 2447-2455 (1998)
47. Kudo Y, Takata T, Ogawa I, et al: Reduced expression of p27(Kip1) correlates with an early stage of cancer invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 151: 217-222 (2000)
48. Kübler A., Mühling J.: Leitlinie für die Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie, Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1998)
49. Kuo MY, Lin CY, Hahn LJ, Cheng SJ, Chiang CP.: Expression of cyclin D1 is correlated with poor prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med.* Apr;28(4):165-9 (1999)
50. Kuropkat C., Venkatesan T.K., Caldarellib D.D., PanjebW.R., Hutchinson J., Preislerc H.D., Coon J.S., and Wernera J.A.: Abnormalities of molecular regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Auris Nasus Larynx* Volume 29, Issue 2 , 1 April, Pages 165-174 (2002)

51. Kyomoto R., Kumazawa H., Toda Y. et al. : Cyclin D1 gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein over-expression in human head and neck squamous cell carcinoma. *Internat. J. Cancer* 74:576–581 (1997)
52. Lammie G.A., Fantl V., Smith R.J.: D11S287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to Bcl-1. *Oncogene* 6:439–444 (1991)
53. Lind P.O.: Malignant transformation in oral leukoplakia; *Scand J dent res* 95:449-455 (1987)
54. Llewelyn J., Mitchell R.: Smoking, alcohol and oral cancer in South East Scotland: A 10-year experience. *Brit J of Maxillofac* 32:146-152 (1994)
55. Löning, T., Reichart, P., Staquet, M.J., Becker, J., Thivolet, J.: Occurens of papillomavirus structural antigens in oral papillomas and leukoplakias. *J Oral Path* 13:155-165 (1984)
56. Lorenz G., Schönberger A, Meyer F.U.: Orale Leukoplakien; *Medizin aktuell*; 9:176-278; (1983)
57. Lundberg A.S., Weinberg R.A.: Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 35:1886-1894 (1999)
58. Maerker R., Burkhardt A.: Klinik oraler Leukoplakien und Präkanzerosen. Retrospektive Studie an 200 Patienten. *Deutsche Z Mund Kiefer GesichtsChir* 2:206-220 (1978)

59. Maier H., Dietz A., Heller W-D, Jünemann K-H: The role of tobacco, ethanol consumption, and occupation as risk factors for laryngeal carcinoma. Proc. Of the XIV. World Congress of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Madrid (1989)
60. Maier H., Sennwald E.: Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich. Ergebnisse der Heidelberger Fallkontrollstudie. Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (1994)
61. McLaughlin J.K., Gridley G., Block G.: Dietary factors in oral and pharyngeal cancer. J Natl Cancer Inst 80:1237-1243 (1988)
62. Meredith S.D., Levine P.A., Burns J.A. et al. : Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma: association with poor prognosis. Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery 121(7):790–794 (1995)
63. Michalides R., van Veelen N., Hart A., Loftus B., Wientjens E., Balm A.: Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res. Mar 1;55(5):975-8 (1995)
64. Miller C.S., White D.K.: Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 82:57-68 (1996)
65. Mineta H., Miura K., Suzuki I., et al: Low p27 expression correlates

- with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer* 85: 1011-1017 (1999)
66. Miracca E.C., Kowalski L.P., Nagai M.A.: High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumours. *Br J Cancer* 81: 677–683 (1989)
67. Moch H., Schraml P., Bubendorf L., et al. : High-throughput tissue microarrays analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 154:981-6 (1999)
68. Morgenroth, K.: Mundhöhle, Zähne und Kiefer, Waldeyer Rachenring, Oro-und Hypopharynx. In: Remmele W (Hrsg): *Pathologie*, Band 2, 2. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York S. 1-83 (1996)
69. Morla A.O., Draette G., Beach D. et al.: Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. *Cell* 58:193 (1989)
70. Mousse S., Bubendorf L., Kononen J., et al. : Gene expression profiles associated with androgen deprivation response and therapy failure in human prostate cancer: high-throughput cDNA and tissue microarray studies. *J Urol* 163:101A (2000)
71. Murray A.W., Hunt T.: *The Cell Cycle. An Introduction*. Freeman, New York (1993)
72. Muscat J.E., Wynder E.L: Tobacco, alcohol, asbestos and occupational risk factors for laryngeal cancer. *Cancer* 69:2244-2251 (1992)

73. Nam J., McLaughlin J.K., Blot W.J.: Cigarette smoking, alcohol and nasopharyngeal carcinoma: a case control study among U.S. whites. *J Natl Cancer Inst* 84:619-622 (1992)
74. Nevins J. : E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258:424–429 (1992)
75. Nurse P.: Universal control mechanism in regulating onset of M-Phase. *Nature* 344:503-508 (1990)
76. Oswald F., Lovec H., Moroy T., Lipp M.: E2F-dependent regulation of human myc: trans-activation by cyclins D1 and A overrides tumour suppressor protein functions. *Oncogene* 9:2029–2036 (1994)
77. Payne T.F.: Why are white lesions white? Observation on keratin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 40:652-658 (1975)
78. Pindborg J.J.: Oral cancer and precancer. J.Wright & sons, bristol (1980)
79. Pindborg J.J., Renstrup G., Poulsen, H.E., Silverman, S.: Studies in oral leukoplakias. V. Clinical and histological signs of malignancy. *Acta odont scand* 21:407-414 (1963)
80. Pindborg J.J., Reichardt P.A., Smith C.J., van der Waal I.: Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. 2nd edit, Springer Berlin (1997)
81. Pruneri G., Lorenzo Pignataro, Nadia Carboni, Roberto Buffa, Devrim Di Finizio, Bruno Mario Cesana, Antonino Neri: Clinical Relevance of Expression of the CIP/KIP Cell-Cycle Inhibitors p21 and p27 in Laryngeal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 17, Issue 10 (October): 3150-3159 (1999)

82. Reed S.I.: The role of p34 kinases in the G1 to S-Phase transition. Annual Review of Cell Biologie 8:529-561 (1992)
83. Reichart P.A., Kohn H.: Prevalence of oral leukoplakia in 1000 Berliners. Oral Dis 2:291-294 (1996)
84. Renstrup G.: Histopathology of oral leukoplakia. Acta Pathol. Microbiol. Scand 51(Suppl.144):113-114 (1961)
85. Ricardo V. Lloyd, Lori A. Erickson, Long Jin, Elzbieta Kulig, Xiang Qian, John C. Cheville and Bernd W. Scheithauer: p27kip1: A Multifunctional Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor with Prognostic Significance in Human Cancers. American Journal of Pathology. 154:313-323 (1999)
86. Robbins K.T., Clayman G., Levine P.A., Medina J., Sessions R., Shaha A., Som P., Wolf G.T., American Head and Neck Society, American Academy of Otolaryngology- Head and Neck Surgery: Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 128(7):751-8 (2002)
87. Roed-Petersen B., Renstrup G.: Atopographical classification of the oral mucosa suitable for electronic data processing. Ist application to 560 leukoplakias. Acta Odontol. Scand. 27:681-695 (1969)
88. Rothman K., Keller A.Z.: The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. J Chron Dis 25:711-716 (1972)

89. Rousseau A., Lim M.S., Lin Z. and Jordan R. C. K. : Frequent cyclin D1 gene amplification and protein overexpression in oral epithelial dysplasias. *Oral Oncology* Volume 37, Issue 3 , April, Pages 268-275 (2001)
90. Scheifele C., Reichart P.A: Orale Leukoplakien bei manifestem Plattenepithelkarzinom. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2:326-330 (1998)
91. Schoelch Michael L., Joseph A. Regezi, Nusi P. Dekker, Irene O. L. Ng, Alex McMillan, Barry L. Ziober, Quynh Thu Le, Sol Silverman and Karen K. Fu: Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* Volume 35, Issue 3 , May, Pages 333-342 (1999)
92. Shafer W.G., Waldron C.A.: A clinical and histopathologic study of oral leukoplakia. *Surg. Gynecol. Obstet.* 112:411-420 (1961)
93. Sherr C.J.: Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73:1059-1065 (1993)
94. Sherr C.J.: The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60:3689-3695 (2000)
95. Shklar G.: The precancerous oral lesion. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*20:58-70 (1965)
96. Shields P.G.: Epidemiology of tobacco carcinogenesis. *Curr Oncol Rep.* 2:257-262 (2000)
97. Silverman S., Gorsky M., Lozada F.: Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 53:563-568 (1984)

98. Silverman S., Bhargava K., Mani N.J., Smith L.W., Malaowalla A.M.:
Malignant transformation and natural history of oral leukoplakia in 57,518
industrial workers of Gujarat, India. *Cancer* 38:1790-1795 (1976)
99. Silverman S., Ware W.H.: Comparisons of histologic, cytologic and clinical
findings in intraoral leukoplakia and associated carcinoma. *Oral Surg. Oral Med.
Oral Pathol.* 13:412-422 (1960)
100. Simpson J.F., Quan D.E., O'Malley F., Odom-Maryon T., Clarke P.E.:
Amplification of CCND1 and expression of its protein product, cyclin D1, in
ductal carcinoma in situ of the breast. *Am. J. Pathol.* 151(1):161–168 (1997)
101. Spiessel B., Bears O.H., Hermanek P. et al.: UICC: Union International Contre
le Cancer, International Union Against Cancer. *TNM-Atlas: Illustrated Guide to
the TNM/pTNM Classifications of Malignant Tumors.* Springer, Berlin-
Heidelberg-New York, 3. Auflage (1992)
102. Strupp R., Volkes E.: Kopf- und Halstumoren In: *Therapiekonzepte Onkologie.*
Seebers S.; J. Schütte. Springer Berlin-Heidelberg-New York (1995)
103. Sugár, L., Báncóczy, J.: Untersuchungen bei Präkanzerose der
Mundschleimhaut. *Deutsche Zahn Mund Kieferheilkunde* 30:132-140 (1959)
104. Sugár L., Báncóczy J.: Longitudinal studies in oral leukoplakias. *J Oral Path*
1:265-272 (1972)
105. Thornton A.F.: Updating technical advances in irradiation of head and neck
neoplasia. *Proceedings 4th International Conference on Head and Neck Cancer,*
Toronto (1996)

106. UICC (Wittekind Ch, Klimpfinger M, Sobin LH, Hrsg): TNM-Atlas, Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren. Springer Medizin Heidelberg (2005)
107. Van der Waal I.: The diagnosis and treatment of precancerous lesions. FDI World 4:6-9 (1995)
108. Venkatesan T.K., Kuropkat C., Caldarelli D.D., et al: Prognostic significance of p27 expression in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Laryngoscope 109: 1329-1333, (1999).
109. Vogelstein B., Fearson E.R., Hamilton S.R. et al.: Genetic alterations during colorectal tumor development. N Engl J Med 319:525–532 (1988)
110. Vogt P.K.; Reed S.E.: CDK-Inhibitors. Current topics in microbiology and immunology. Springer (1998)
111. Vokes E.: Induction chemotherapy: Where next? Proceedings 4th International Conference on Head and Neck Cancer, Toronto (1996)
112. Waldron C.A., Shafer W.G.: Current concepts of leukoplakia. Int. Dent. J. 10:350-367 (1960)
113. Weidauer H., Maier H. : Maligne Tumoren des Larynx. 25-29. In: Herfarth, Ch.; Schlag, P.: Richtlinien operativer Therapie maligner Tumoren Demeter-Verlag München (1992)

114. Weidauer H., Maier H. : Maligne Tumoren des Larynx. 30-38. In: Herfarth, Ch.; Schlag, P.: Richtlinien operativer Therapie maligner Tumoren Demeter-Verlag München (1992)
115. Weinberg R.: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323–330 (1995)
116. Werkmeister R., Fillies T., Gaertner C., Joos U., Berdel W.E.: A clinical Phase I/II trial of rhIL-4 applied topically in patients with oral squamous cell carcinomas to assess safety and therapeutic activity. *Oncol Rep.* März; 13(3):449-52 (2005)
117. Werkmeister R., Fillies T., Brandt B., Groner B., Weis W., Joos U.: Chemosensitivity testing of oral cancer cells treated with a p185neu-specific agent. *Eur J Oral Sci.* Oct;107(5):338-43 (1999)
118. WHO Collaborating Center for Oral Precancerous Lesions: Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 46:518-539 (1978)
119. WHO World Health Organisation The World Health Report Geneva. WHO (1997)
120. Wolf G., Lippman S., Laramore G., Hong W.K.: Head and neck cancer. In: Holland J., Frei E., Brast R., Kufe D., Morton D., Weichselbaum R. (eds) *Cancer Medicine*, 3 rd ed. Lea&Febiger 1211-1275 (1993)
121. Xie X., Clausen O.P., Boysen M.: Prognostic significance of p21WAF1/CIP1 expression in tongue squamous cell carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* Aug;128(8):897-902 (2002)

122. Zelfsky M.J., Harrison L.B., Fass D.E. et al. : Postoperative radiation therapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx: impact of therapy on patients with positive surgical margins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25:17-21 (1992)

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die es mir erst ermöglicht haben, mich dieser Arbeit zu widmen.

Als erstes sei Prof. Dr. Dr. Kleinheinz ganz herzlich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung gedankt.

Ebenfalls ein großer Dank gebührt Prof. Dr. Bürger für die Hilfe und die Betreuung insbesondere während der praktischen Phase im pathologischen Institut.

Eine große Hilfe und jederzeit für mich ansprechbar war Dr. Dr. Fillies. Obwohl beruflich sehr gefordert fand er Zeit, mich bei Korrekturen jederzeit sehr stark zu unterstützen. Dafür möchte mich ebenfalls an dieser Stelle ganz herzlich bedanken.

In meinem privaten Umfeld gibt es ebenfalls einige Menschen, die mir während der Durchführung dieser Arbeit den Rücken gestärkt haben. Zum einen meine Eltern, die mich während des Studiums finanziell und moralisch unterstützt haben, so dass ich erst die Zeit finden konnte, mich dieser Arbeit zuzuwenden. Und zum anderen meine Lebensgefährtin Jutta Rönne, die mich für einige Zeit entbehren musste, jederzeit für mich Verständnis zeigte und mir den Rücken frei hielt, indem sie mir viele Dinge des Alltags abgenommen hat. Herzlichen Dank für alles!

7 Lebenslauf

Name: Mike Wolterink
Geburtstag: 19.11.1976
Geburtsort: Nordhorn
Konfession: evangelisch-lutherisch
Staatsangehörigkeit: deutsch
Vater: Manfred Wolterink (*1952)
Beruf: Altenpfleger
Mutter: Antje Rüdiger (*1956)
Beruf: Sekretärin

1982-1986 Grundschole, Nordhorn (Süd-Blanke)
 1986-1988 Orientierungsstufe, Nordhorn (Blanke)
 1988-1996 Gymnasium Nordhorn
 1996-1997 Zivildienst im Rettungsdienst des DRK Nordhorn
 1997-2003 Studium der Zahnmedizin am UKM Münster
 19. Januar 2004 erfolgreicher Abschluss der Prüfungsperiode
 Januar 2004 Antrag auf Approbation als Zahnarzt
 Febr. 2004 - Juni 2005 Assistenz-Zahnarzt (Praxis Dr. Lucas in Schüttorf)
 Juni 2005 –März 2006 Assistenz-Zahnarzt (Praxis Dr. Lüdtker in Uelsen)
 März 2006- Okt. 2006 Assistenz-Zahnarzt (Praxis Dr. Bomfleur in Schüttorf)
 Seit 01. Oktober 2006 Gemeinschaftspraxis mit Dr. Bomfleur

8 Anhang

Reagenzien

Citratpuffer

- Stammlösung A = 0,1 M Citronensäure
10,5 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$ auf 500 ml Aqua dest.
- Stammlösung B = 0,1 M Natriumcitrat
29,41 g $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ auf 1000 ml Aqua dest.
- Gebrauchslösung = 18 ml Lsg. A + 82 ml Lsg. B mischen
pH 6,0 einstellen

Spülpuffer

- Stammlösung = 9,0 g Tris
68,5 g Tris-HCl
87,8 g NaCl
in 1000 ml Aqua dest. gelöst
pH 7,4 – 7,6
- Gebrauchslösung = 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

Neofuchsin-Lösung

- Stammlösung = 5 % Neofuchsinlösung in 2 N HCl
- Puffer = 17,4 g NaCl
3,0 g Tris-HCl
9,8 g Tris
in 2000 ml Aqua bidest. gelöst
- Propandiol = 21 g Propandiol in 1000 ml Aqua bidest. gelöst
- Gebrauchslösung = a) 0,125 ml Stammlösung
0,313 ml 4 % Na-Nitrit
unter Abzug 60 sec reagieren lassen
- b) 0,025 g Levamisol
43,75 ml Entwicklungspuffer

15,60 ml Propandiol

c) 0,0315 g Naphtol-AS-Bi-Phosphat

0,375 ml N,N-Dimethylformamid

Lösung a), Lösung b) und Lösung c) mischen

pH mit 2 N HCl auf 8,8 einstellen und filtrieren

Schnitte 25 min auf dem Rüttler inkubieren

Abkürzungen:

bidest.	bidestillata
CDK	cyclin dependent kinases
CKI	cyclin dependent kinase inhibitors
dest.	destillata
DNA	Desoxy Ribonuclein Acid
dt.	deutsch
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
HE	Hämatoxin-Eosin
HPV	Human Papilloma Virus
IHC	Immunohistochemistry
OSCC	oral squamous cell carcinoma
PE	Probeentnahme
pRB	Protein, welches durch das Retinoblastom(RB)Gen codiert wird
RNA	Ribo Nuclein Acid
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumorsize Nodus Metastasis