

**Analyse der Expression von
Tenascin-C-Spleißdomänen im
oralen Plattenepithelkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Susann Bock
geboren am 15.06.1981 in Jena

Gutachter

1.

2.

3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AgNOR	<i>argyrophilic nuclear organizer-region associated protein</i>
Ak	Antikörper
bp	Basenpaare
Ca	Karzinom
CT	Computertomografie
DC	<i>dendritic cells</i> (= dendritische Zellen)
DÖSAK	Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich
EGF	<i>epithelial growth factor</i>
EKG	Elektrokardiogramm
EZM	Extrazelluläre Matrix
G	<i>Grading</i>
GAGs	Glykosaminoglykane
ggf.	gegebenenfalls
HPV	Humanes Papillomavirus
HSP	Hitzeschockprotein
HSV	Herpes simplex Virus
kDa	Kilodalton
Lk	Lymphknoten
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MRT	Magnetresonanztomografie
MSH	Mundschleimhaut
MT-MMP	<i>membrane type MMP</i>
MTS	Metastase(n)
MVD	<i>microvessel density</i>
n.bek.	nicht bekannt
OSCC	orales Plattenepithelkarzinom
P53	Tumorsuppressorprotein p53
pEZM	provisorische Extrazelluläre Matrix

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
S100	Oberflächenmarker
Skp-2	<i>S-Phase kinase-interacting protein 2</i>
Tab.	Tabelle
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of MMPs</i>
Tn	Tenascin
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Das orale Plattenepithelkarzinom.....	3
2.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	3
2.1.2	Klinische Symptomatik	4
2.1.3	Präoperative Diagnostik	5
2.1.4	Therapeutische Optionen.....	6
2.1.5	Prognosemarker für das OSCC	7
2.2	Die Extrazelluläre Matrix.....	10
2.2.1	Bestandteile der EZM.....	11
2.2.2	Adhäsionsproteine.....	12
2.3	Tumorassoziierte Modulation der Extrazellulären Matrix	13
2.4	Tenascin.....	16
2.4.1	Die Tenascinfamilie	16
2.4.2	Struktur von Tenascin-C.....	17
2.4.3	Gewebeverteilung und Funktion von Tenascin-C und seinen Varianten.....	18
2.4.4	Tenascin-C in Tumoren.....	20
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Gewebematerial.....	23
3.1.1	Paraffineinbettung und konventionelle Histologie.....	23
3.1.2	Kryokonservierung	25
3.1.3	TNM-Klassifikation der Mundhöhlenkarzinome	25

3.2	Immunhistochemie.....	27
3.2.1	Indirekte Streptavidin-Biotin-Methode zum Nachweis der Bindung monoklonaler anti-Tenascin-C-Antikörper	28
3.2.2	Nachweis der Bindung humaner rekombinanter Antikörper	28
3.2.3	Lichtmikroskopische Auswertung	29
3.2.4	Semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Verteilungsmuster von Tenascin-C	29
3.2.5	Statistik.....	30
3.3	RT-PCR.....	30
3.3.1	RNA-Extraktion aus kryokonservierten Gewebeproben	30
3.3.1.1	Homogenisierung des Gewebematerials aus Gefrierschnitten.....	30
3.3.1.2	RNA-Extraktion.....	30
3.3.2	RT-PCR.....	31
3.3.3	Agarose-Gel-Elektrophorese	32
3.3.4	Primer.....	32
3.4	Verzeichnis für verwendete Puffer-, Farb- und Fixierungssysteme	35
4	ERGEBNISSE	37
4.1.	Immunhistochemische Expressionsanalyse der Tenascin-C-Spleißdomänen.....	37
4.2.	Beschreibung der immunhistochemischen Markierungsmuster	37
4.2.1	Immunhistochemisches Verteilungsmuster von Tenascin-C-Spleißdomänen in oralen Hyperplasien.....	37
4.2.2	Immunhistochemisches Verteilungsmuster von Tenascin-C-Spleißdomänen in dysplastischer Mundschleimhaut.....	40
4.2.3	Verteilungsmuster von Tenascin-C-Spleißdomänen in gut differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen	42

4.2.4	Immunhistochemisches Verteilungsmuster von Tenascin-C-Spleißdomänen in mäßig differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen... 44
4.2.5	Immunhistochemisches Verteilungsmuster von Tenascin-C-Spleißdomänen in schlecht differenzierten Plattenepithelkarzinomen..... 46
4.3.	Semiquantitative Bewertung der Tenascin-C_L-Deposition 48
4.4.	Resultate der RT-PCR 56
4.5.	Vergleich der immunhistochemischen und der RT-PCR-Resultate 59
5	DISKUSSION.....63
5.1.	Immunhistochemische Expression von Tenascin-C-Spleißdomänen im OSCC64
5.2.	Expression von Tenascin-C-Spleißdomänen in weiteren Tumorentitäten – ein Vergleich66
5.3.	Expression von Tenascin-C in benignen Läsionen.....70
5.4.	Die immunhistochemische Expression von Tenascin-C-Spleißvarianten im OSCC – Korrelation zum Grading und mögliche biologische Bedeutung.....71
5.5.	RT-PCR-Analyse der differentiellen Expression der Tenascin-C-Spleißdomänen.....74
5.6.	Vergleichende Analyse der mRNA-Expression und der immunhistochemischen Verteilung der Tenascin-C-Spleißdomänen...76
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN78
7	LITERATURVERZEICHNIS.....81

1 Zusammenfassung

Trotz intensiver Bemühungen um Fortschritte in der Diagnostik und Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms (OSCC) sind die Heilungsaussichten nach wie vor unbefriedigend. Wesentlich für die Suche nach neuen diagnostischen und therapeutischen Targets ist ein Verständnis der Tumor-Stroma-Wechselwirkung in der Invasionsfront. Neben der Aktivierung verschiedener Zelltypen kommt es hier zu einem Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) mit Herausbildung eines embryonalen Matrixmilieus. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die de novo Synthese onkofetaler Varianten der Adhäsionsproteine Fibronectin, Laminin und Tenascin. Tenascin-C (Tn-C) ist als Modulator der zellulären Adhäsion bekannt und kann aufgrund alternativen Spleißens der neun konsekutiven Fibronectin-Typ-III-*Repeats* A1/A2/A3/A4/B/AD2/AD1/C/D in verschiedenen Isoformen exprimiert werden. Unter den dabei entstehenden Isoformen sind vor allem die wenig gespleißten Tn-C-Varianten (Tn-C_L) von besonderem Interesse, da sie vorwiegend im Rahmen von Gewebsumbauprozessen auftreten. Tn-C_L konnte als typischer Bestandteil der provisorischen EZM in der Invasionsfront verschiedener Karzinom-Entitäten definiert werden – Untersuchungen für das OSCC sind allerdings selten.

Ziel der vorliegenden Promotion war eine Untersuchung der differentiellen Expression von Tn-C-Spleißdomänen im OSCC mit möglicher diagnostischer oder therapeutischer Signifikanz. Dazu wurden Präparate hyperplastischer und dysplastischer Mundschleimhaut sowie oraler Plattenepithelkarzinome unterschiedlichen Malignitätsgrades (G1-G3) einer immunhistochemischen Untersuchung unter Verwendung monoklonaler und rekombinanter Antikörper gegen die Tn-C-Spleißdomänen A1, A1/A4, B, C und D sowie gegen gesamt-Tn-C zugeführt. Es erfolgte eine qualitative und semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Ergebnisse und eine Korrelation zum Malignitäts-*Grading*. Anschließend wurde mittels RT-PCR unter Verwendung Spleißingdomänen-spezifischer Primerkombinationen an zehn ausgewählten Fällen (3xG1, 4xG2 und 3xG3) die mRNA-Expression überprüft und mit der Proteindeposition verglichen.

Die immunhistochemische Untersuchung der Domänenverteilung von Tn-C erbrachte innerhalb der ausgewerteten Präparate und Malignitätsgrade keine

qualitativen Unterschiede. Während die Tn-C-Lokalisationen in den Fällen hyperplastischer Mundschleimhaut nur auf die Basalmembran beschränkt waren, konnte mit Übergang zu den Karzinomen eine stetige Zunahme der stromalen als auch der zytoplasmatischen Deposition verzeichnet werden. Bei den schlecht differenzierten Tumoren waren die stromalen Markierungen wieder rückläufig. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gradingstufen bzw. eine differentielle Expression von Tn-C-Spleißdomänen mit Bezug zu tumorbiologischen Parametern konnten nicht belegt werden. Der Nachweis der C-Domäne, mit Hilfe eines rekombinanten Antikörpers (G-11), gelang in der Immunhistochemie lediglich in zwei Fällen, während sie sich in der RT-PCR durchgängig darstellte.

Bei der Betrachtung der RT-PCR-Resultate war erkennbar, dass die mRNA der Domänen A1-B unabhängig vom Malignitätsgrad immer exprimiert werden. Im Bereich der B- bis D-Domäne zeigte sich eine deutlich größere Variabilität bei der Expression von Tn-C-Spleißdomänen mit zum Teil paralleler Existenz verschiedener Tn-C-Spleißvarianten. Weiterhin waren bei zwei Primerkombinationen zusätzliche Amplifikationsprodukte sichtbar, die keinen der bisher bekannten Domänen entsprachen. Die Existenz bisher unbekannter Domänen von Tn-C wird postuliert. Desweiteren war eine Tendenz der verstärkten Expression der AD2-Domäne in schlecht differenzierten Karzinomen feststellbar.

In der Zusammenfassung zeigt sich, dass die neoplastische Transformation und Tumorprogression im OSCC mit einer Zunahme der Expression wenig gespleißter onkofetaler Tn-C-Varianten verbunden ist. Eine differentielle Expression von Tn-C-Spleißdomänen in Korrelation zum Malignitätsgrad bzw. mit Bezug zu histologischen Parametern der Invasivität war mittels Immunhistochemie und domänenspezifischer Antikörper für das OSCC nicht zu belegen. RT-PCR-Untersuchungen offenbaren eine größere Variabilität in der mRNA-Expression der Domänen B bis D. Die molekulare Basis und tumorbiologische Bedeutung dieses Phänomens ist gegenwärtig ungeklärt.

2 Einleitung

2.1 Das orale Plattenepithelkarzinom

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

In den letzten Jahren haben die Tumoren der Mund-, Kiefer- und Gesichtsregion stark an Häufigkeit zugenommen. Das Plattenepithel der Mundhöhle gehört mit über 90% zu den häufigsten malignen Neubildungen in diesem Bereich. Weltweit ist mit einer Neuerkrankungsrate von 220.000 Fällen pro Jahr bei der männlichen Bevölkerung (5% aller Krebserkrankungen) und 90.000 Neuerkrankungen innerhalb der weiblichen Population (2% aller Krebserkrankungen) zu rechnen (Parkin et al. 1999).

Das zentrale Tumorregister des Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreises (DÖSAK) kann aufgrund einer unbekanntenen Dunkelziffer keine zuverlässigen Angaben über die Inzidenz verschiedener Tumorentitäten liefern. Jedoch kann festgestellt werden, dass die Inzidenzraten für das orale Plattenepithelkarzinom (OSCC) weltweit variieren, von zum Beispiel 2 - 4% in den USA bis zu 50% in einigen asiatischen Ländern (Tab.1). In Deutschland geht man von einer Inzidenzrate von 10,4 Fällen für Männer und 1,8 Fällen für Frauen aus.

Nach vielen Jahren der Abnahme ist in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten in vielen industriellen Ländern, besonders in Süd- und Osteuropa, ein Anstieg der Inzidenz bzw. der Mortalität für Karzinome des Oropharynx und der Mundhöhle zu verzeichnen. Als Ursache hierfür werden vor allem der steigende Alkohol- und Tabakkonsum als auch der Einfluss diätischer Faktoren, sowie eine chronische Entzündung mit dem Herpes-simplex-Virus (HSV) und dem humanen Papillomavirus (HPV) diskutiert. Insbesondere die HPV-Typen 16 und 18 werden dabei als karzinogen angesehen. Es wurde nachgewiesen, dass polyklonale Infektionen mit High-risk- und Low-risk-HPV-Typen innerhalb oraler Läsionen mit einer hohen Inzidenz einhergehen und dass es somit sehr wahrscheinlich ist, dass das karzinogene Potential eines einzelnen Virustypen in Zusammenhang mit der Exposition gegenüber anderen Karzinogenen angesehen werden muss (Balaram et al. 1995).

Dagegen ist über die Inzidenz des oralen Karzinoms außerhalb Europas relativ wenig bekannt. So könnte in den südamerikanischen Ländern das Betelnusskauen oder möglicherweise auch Mangelernährung eine wichtige Rolle bei der Entstehung dieser Malignome spielen.

Der kausale Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und Kopf-Hals-Tumoren wurde bereits 1956 beschrieben (Wynder et al. 1956). Damit verwundert es nicht, dass die Prävalenz von Tabakkonsum innerhalb von Patienten mit Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches ungefähr 80-90% beträgt (Schottenfeld et al. 1992; Spitz et al. 1994).

Tabelle 1. Geschätzte Anzahl der Neuerkrankungen (Tausend) nach Lokalisation, Geschlecht und geografischer Region, 1985 (n. Parkin et al. 1993)

Region	Mundhöhle		Larynx	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Westafrika	1,5	1,4	0,5	0,1
Südamerika	12,9	3,7	7,3	0,9
Nordamerika	21,4	9,4	11,5	2,4
Ostasien (China)	37,9	26,7	11,6	4,8
Südasien (inkl. Indien)	90,5	52,4	26,7	4,5
Westeuropa	16,1	4,3	8,5	0,8
Australien/Neuseeland	1,6	0,6	0,6	0,1

2.1.2 Klinische Symptomatik

Leider ist die Früherkennung der Mundhöhlenkarzinome auch weiterhin sehr schlecht, sodass bei klinisch manifesten Symptomen in der Regel bereits fortgeschrittene Stadien der Tumorerkrankung vorliegen. Einen nicht unwesentlichen Beitrag dazu leisten auch die Medien, in denen das Karzinom der Mundhöhle als Thema deutlich unterrepräsentiert ist. So verwundert es nicht, dass eine Sensibilisierung der Bevölkerung im Hinblick auf die Erkennung von frühen Veränderungen innerhalb der Mundhöhle ausbleibt. Die häufigste prä-maligne Veränderung der Mundschleimhaut ist die Leukoplakie. Sie tritt bei Rauchern etwa sechsmal häufiger auf als bei Nichtrauchern. Ihre maligne Transformation variiert und liegt zwischen 0 und 20% (Reichart 2000). Nichtraucher mit Leu-

koplkien haben ein deutlich höheres Risiko zur malignen Transformation. Bedeutsam ist auch die Tatsache, dass die Mehrzahl der Mundhöhlenkarzinome aus normal erscheinender Schleimhaut hervorgeht. So sind klinische Symptome in frühen Erkrankungsstadien oft uncharakteristisch und führen selten zu einem Arztbesuch. Die Mehrzahl der Patienten stellt sich in fortgeschrittenen Stadien (III und IV) vor. Neben allgemeinen tumorbedingten Symptomen, wie Leistungsknick und Gewichtsverlust, können auch spezifische lokale Symptome auftreten, zum Beispiel Schleimhautulzerationen, durch Tumorzerfall bedingten Foetor ex ore oder eine ausgeprägte Dysphagie bei infiltrativem Tumorwachstum. Klinisch finden sich bei Diagnosestellung in 50% bereits Lymphknotenmetastasen, die sich bei Palpation als derbe, häufig kaum gegen die Umgebung abgrenzbare solitäre bzw. multiple Lymphknoten darstellen. Ihr Vorhandensein ist mit der Größe des Primärtumors einer der wichtigsten prognostischen Faktoren, der die 5-Jahres-Überlebensrate wesentlich beeinflusst. So sinkt diese beispielsweise von 86% ohne Hinweis auf Metastasierung auf 44% bei Patienten, bei denen ein Befall der Halslymphknoten festgestellt wurde.

2.1.3 Präoperative Diagnostik

Die klinische Einteilung der Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome erfolgt anhand der TNM-Klassifikation bzw. der UICC-Stadieneinteilung. Die prognostische Aussagefähigkeit dieser beiden Systeme ist allerdings unzureichend, so dass eine rein deskriptive Verwendung im Vordergrund steht. Zunächst erfolgt eine Basisdiagnostik zu der ein klinischer Untersuchungsbefund mit Labor (Blutbild, Gerinnung, Nieren- und Leberfunktion, Elektrolyte, Blutzucker) ebenso gehört wie eine erste apparative Diagnostik mit Elektrokardiogramm (EKG), Röntgen Thorax, ggf. einer Computertomografie (CT) vom Thorax, ggf. Bronchoskopie mit Biopsie/Lavage und einer Lungenfunktionsprüfung/Blutgasanalyse vor der Operation. Daran schließen sich speziellere Verfahren an, die beispielsweise die Sonografie des Halses, ggf. CT/MRT (Magnetresonanztomografie) der Primärtumorregion und der Halsweichteile, eine sogenannte Panendoskopie mit Biopsie und ggf. eine Angiografie der Halsgefäße z.B. bei geplanter *neck dissection* (operatives Verfahren) beinhaltet.

2.1.4 Therapeutische Optionen

Als klassische Therapie bedient man sich beim oralen Plattenepithelkarzinom der operativen, radiologischen oder kombiniert chirurgisch-radiologischen Behandlung. Dabei hängt das therapeutische Vorgehen sowohl vom Ausgangsbefund des Tumors als auch von den individuellen Gegebenheiten jedes Patienten ab. Wenn möglich, strebt man immer die operative und damit einzig kurative Therapie an.

Bei der operativen Therapie existieren im Wesentlichen zwei Konzepte, die durch die Ausdehnung, die Lokalisation und die Biologie des Tumors bestimmt werden. Es handelt sich dabei zum einen um das kurative und zum anderen um das palliative Behandlungskonzept. Während bei dem kurativen Therapieansatz die R0-Resektion und damit die vollständige Entfernung der Tumormasse mit angestrebter Heilung des Patienten im Vordergrund steht, zielt das palliative Konzept vor allem auf eine Verbesserung der Lebensqualität ab, wenn eine Heilung nicht mehr möglich erscheint.

Alternativ zur operativen Therapie besteht die Möglichkeit, die Patienten einer Bestrahlung zu unterziehen. Dies kann sowohl in einem frühen Tumorstadium als auch im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes prä- bzw. postoperativ erfolgen (Eckardt et al. 2002).

Als dritte Behandlungssäule steht für die Therapie des OSCC auch die Chemotherapie zur Verfügung. Da unter alleiniger chemotherapeutischer Behandlung keine befriedigenden Behandlungsergebnisse für Plattenepithelkarzinome erreicht werden konnten, ist diese immer in ein multimodales Therapiekonzept integriert. Dabei sind insgesamt vier Strategien möglich: 1. die palliative Chemotherapie, 2. die adjuvante Chemotherapie, 3. die neoadjuvante Chemotherapie und 4. die kombinierte Radio-Chemotherapie. Aufgrund der oft starken Nebenwirkungen, die eine systemische zytostatische Therapie mit sich bringt, wuchs zunehmend das Interesse an einer lokalen Bekämpfung von Kopf-Hals-Tumoren. Eine solche lokalisierte Therapiemöglichkeit besteht in der regionalen Chemotherapie. Besonders in Situationen der Inoperabilität scheint der Einsatz einer intraarteriellen Chemotherapie als palliative Maßnahme sinnvoll. Experimentelle Thera-

pieansätze beruhen auf dem Einsatz von Tumor gerichteten Antikörpern als Träger für pharmakologisch wirksame Substanzen.

Insbesondere für individualisierte und zielgerichtete Therapiestrategien (*targeted therapy*) sind detaillierte Kenntnisse zu molekularen Prognosemarkern und möglichen therapeutischen zellulären Zielstrukturen von entscheidender Bedeutung. Weiterhin ist bekannt, dass bestimmte individuelle biochemische Signaturen des Tumors (z.B. Aktivierung bestimmter Signalwege) Einfluss auf das Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie hat. Im Folgenden soll ein Überblick über potentielle Prognosemarker für das OSCC gegeben werden.

2.1.5 Prognosemarker für das OSCC

Insbesondere auf der Basis zellbiologischer und molekularpathologischer Untersuchungen konnten in den letzten Jahren eine Reihe von zellulären Marker-molekülen mit potentieller prognostischer Bedeutung identifiziert und klassifiziert werden (Schliephake 2003), die in vier Gruppen eingeteilt werden können: 1. Tumorwachstums-assoziierte Marker, 2. Proteine der Tumorsuppression (Immunantwort und Apoptose), 3. Angiogenesemarker und 4. Tumorinvasionsmarker.

In der Gruppe 1 scheint sich AgNOR (*argyrophilic nuclear organizer-region associated proteins*) als einziger signifikanter Parameter hinsichtlich prognostischer Kriterien in der Mehrzahl der Studien zu bestätigen. AgNOR soll in Verbindung mit anderen Proteinen stehen, die für die RNA-Transkription essentiell sind und einen Indikator für proliferierende Zellen darstellen (Bankfalvi et al. 2000). Desweiteren konnte sowohl für EGF-R (*epithelial growth factor receptor*) als auch für Skp2 (*S-phase kinase-interacting protein 2*) (Kudo et al. 2001) ein Bezug entweder zu Prognose (Skp2 und EGF-R) oder zum Tumorstadium (EGF-R) (Ibrahim et al. 1997; Werkmeister et al. 2000; Xia et al. 1997, 1999) hergestellt werden. Der Großteil der anderen Markerproteine dieser Gruppe ist durch die Interaktion mit Proteinen des Zellzyklus und Apoptoseinhibitoren am ehesten mit Karzinogenese und Progression des OSCC assoziiert (z.B. Telomerase, Hitzeschockprotein 27 (HSP) bzw. HSP70, Ki 67 und MIB).

In der zweiten Gruppe (Tumorsuppression durch Immunantwort und Apoptose) war wiederholt das Tumorsuppressorprotein p53 der Mittelpunkt vieler Studien (Scully et al. 2000). Darin ergaben sich vielfach Hinweise über dessen Rolle bezüglich der Tumorentstehung beim oralen Plattenepithelkarzinom, allerdings scheint p53 allein kein valider Parameter im Hinblick auf die Prognose zu sein. Neben p53 existieren weitere Marker, die entweder als dessen Kofaktoren (Bax; geringe Expression wurde mit einer schlechten Prognose korreliert; Xie et al. 1999) oder Mediatoren der Apoptose (Fas und FasL (Fas-Ligand)) fungieren und deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf als signifikant eingeschätzt wurde (Schliephake 2003). Weiterhin scheinen immunologische Mechanismen Einfluss auf den individuellen Krankheitsverlauf zu nehmen. So konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel inkomplette T-Zell-Rezeptorproteinketten und eine Reduktion der intratumoralen S100⁺ DCs (DC = *dendritic cells* = Antigenpräsentierende Zellen; S100 = Oberflächenmarker) signifikant mit einer schlechteren Prognose korrelieren (Wei et al. 1998; Reichert et al. 2001).

In den letzten fünf Jahren ist auch das Thema der Angiogenese (Gruppe 3) verstärkt in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses geraten. Dabei wurde z.B. der Einfluss von VEGF auf das Tumorstadium und Gefäßneubildung untersucht, der sich, nach Ausbleiben einer signifikanten Relation zwischen VEGF Expression und Tumorgefäßdichte (= „*microvessel density*“ = MVD), als fraglich herausstellte, obwohl VEGF die Expression proangiogenetischer Zytokine wie Interleukin 8 erhöht (Nor et al. 2001). Im Gegensatz dazu konnten allerdings Lopez-Graniel und Mitarbeiter (2001) die MVD als unabhängigen Prognosefaktor im Sinne einer Korrelation zum Wiederauftreten des Tumors, gefolgt von Lymphknotenmetastasen und Tumorgroße nachweisen.

Zur vierten Gruppe an Markern, die die Tumordinvasion beinhaltet, gehören sowohl Adhäsionsmoleküle wie die Familie der Integrine und Cadherine als auch matrixdegradierende Enzyme wie die Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Die Rolle der Integrine erschließt sich bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig. Sicher ist aber, dass Interaktionen mit Metalloproteinasen bestehen (z.B. wird die Expression von MMP-9 von $\alpha\beta 6$ induziert) und nach Binden an Fibronectin damit möglicherweise die Tumordinvasion verstärkt wird.

Matrixmetalloproteinasen sind ihrerseits beim Remodelling der EZM beteiligt und können in zwei Gruppen eingeteilt werden: zum einen in MMPs, die in den Extrazellularraum sezerniert werden und zum anderen in Transmembranmoleküle, welche an der Zelloberfläche lokalisiert sind (= MT-MMPs = *membrane type MMPs*). Zudem wurde für maligne Zellen die Fähigkeit nachgewiesen, MMPs stromaler Zellen zu benutzen (besonders MMP2), dadurch die Basalmembran zu zerstören und das interstitielle Stroma zu degradieren, was die Tumorinvasion und die Metastasierung erleichtert. Eine Korrelation von Tumorstadium und Expression von MMPs im OSCC konnte dabei bestätigt werden (Ikebe et al. 1999; Hong et al. 2000).

Bei den Cadherinen handelt es sich um integrale Membranproteine, die wie die Integrine zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle gehören und mit intrazellulär bindenden Proteinen wie β - und γ -Cateninen Komplexe bilden. Ihre Expression soll umgekehrt proportional mit dem Differenzierungsgrad eines Tumors in Beziehung stehen (Lo Muzio et al. 1999; Sakaki et al. 1999).

Zur Risikoabschätzung für das Auftreten zervikaler Lymphknotenmetastasen beim oralen Plattenepithelkarzinom haben Nagata und Mitarbeiter (2003) ihrerseits eine Reihe von Biomarkern vorgeschlagen, die vor allem MMP-1 und Integrin-alpha-3 beinhalten.

Wie gezeigt, existiert bereits eine Vielzahl an molekularen Markern, bei denen möglicherweise eher die histopathologische Verteilung als deren Quantität im Tumor von biologischer Bedeutung zu sein scheint. Da es sich bei der Tumorgenese ebenso wie bei der Progression von Karzinomen um ein multifaktorielles molekulares Geschehen handelt, kann möglicherweise auch nur das Zusammenspiel der einzelnen sogenannten Prognosemarker über den Verlauf einer Krankheit entscheiden. Trotz zahlreicher Bemühungen haben molekulare Marker bisher noch nicht den Weg in die klinische Routine gefunden, sodass bislang die T-, N-, pN- und R-Klassifikation nach der Tumorresektion sowie das Erreichen einer kompletten Remission nach Chemotherapie die wichtigsten prognostischen Faktoren bleiben.

2.2 Die Extrazelluläre Matrix

Der oben geschilderte Zusammenhang von Prognose, Struktur der Invasionsfront und Umbau der extrazellulären Matrix lässt einzelne Matrixmoleküle in den Mittelpunkt des tumorbiologischen Interesses rücken.

Die Extrazelluläre Matrix an sich ist die Gesamtheit der Makromoleküle, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen und Geweben befinden und von tierischen Zellen in den Interzellularraum sezerniert werden. Man findet eine Extrazelluläre Matrix grundsätzlich in allen vier Grundgewebetypen, also gleichermaßen in Epithel-, Muskel-, Nerven-, Binde- und Stützgewebe. Allerdings ist sie besonders im Binde- und Stützgewebe bestimmend für die Eigenschaften der jeweiligen Gewebeart.

Die Extrazelluläre Matrix ist nicht nur eine statische Fixierungsmöglichkeit für Zellen, sondern stellt vielmehr ein Fließgleichgewicht dar, in dem sich Zellen und die Komponenten der EZM wechselseitig beeinflussen. So resultieren Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation, sowie der Aufbau, Umbau und Abbau von Gewebe aus diesem Zusammenspiel. Die Bestandteile der EZM werden von Zellen zum einen synthetisiert und sezerniert, aber auch ebenso abgebaut, was extra- und intrazellulär geschehen kann. Darüber hinaus regulieren bestimmte Komponenten durch Bindung an Zellrezeptoren die Expression von Genen in den Zellen. So können beispielsweise Moleküle, die als strukturgebende Proteine vorliegen, unter anderen Bedingungen als Botenstoffe fungieren.

Makroskopische Beispiele für die EZM sind die mineralisierte Matrix des Knorpels, genauso wie die druckelastische Substanz des Knorpels oder die straffen Fasern der Sehnen. Auch mikroskopisch ist die EZM allgegenwärtig, so wird fast jedes Gewebe durch sie zusammengehalten. Sei es eine Muskelfaser oder Fettzelle, die von retikulären Fasern umspinnen werden oder das Epithel, welches einer Basalmembran aufsitzt, beides sind Bestandteile der EZM.

Aus den oben dargelegten Eigenschaften der EZM resultieren Formgebung, Wassergehalt, Elastizität und Zugfestigkeit von Geweben und Organen ebenso wie deren Cytokinreservoir, Signaltransduktionen oder Verankerung und Polaritätsvorgabe für Zellen. Damit spielt die EZM auch eine wesentliche Rolle bei

der Beeinflussung von Wundheilungsprozessen oder bei der Filterleistung der Niere, die erst durch spezielle Basalmembranen möglich wird.

Die EZM unterliegt im Rahmen gewebsmodulierender Prozesse einem Umbau, der vornehmlich durch sogenannte Matrix Metalloproteinasen (MMPs) erfolgt, von denen bislang über 20 Subtypen identifiziert wurden, welche unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. Diese Zink-haltigen Enzyme werden entweder in die EZM durch entsprechende Zellen sezerniert oder befinden sich bereits an der Zellmembran (MT-MMP, *membrane type MMP*), wobei jedoch das katalytische Zentrum des Enzyms in den extrazellulären Raum ragt. Die MMPs besitzen vielfältige biologische Bedeutungen, so ist zum Beispiel bekannt, dass Tumorgewebe, die MMP-2, MMP-9 und MMP-14 sezernieren, besonders zur Metastasierung neigen, da diese exprimierten MMPs den Abbau von Basalmembranen und zugleich den Aufbau tumoreigener Blutgefäße unterstützen.

Korrespondierend zu den MMPs existieren die so genannten *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* (TIMP). Durch spezifische Bindung an das katalytische Zentrum der MMPs hemmen diese Proteine deren Aktivität. Dadurch kann der Ab- und Umbau des Gewebes durch MMPs moduliert werden. Bislang ist die Existenz von 4 verschiedenen TIMPs bekannt. Sie werden als lösliche Proteine in die EZM durch entsprechende Zellen sezerniert. Dabei bildet TIMP-3 eine Ausnahme. Dieses Protein wird in der EZM vornehmlich an Heparansulfat-Proteoglykane gebunden und dauerhaft in der EZM sequestriert (z.B. in der Bruch-Membran des Auges)

2.2.1 Bestandteile der EZM

Die EZM besteht aus einer Vielzahl an verschiedenen Proteinen und Glykoproteinen bzw. bestimmten Polysacchariden. Es werden zwei Hauptklassen unterschieden: 1. die Glykosaminoglykane (GAG), welche zu den Polysacchariden gezählt werden und zumeist an Proteine gebunden als Proteoglykane vorliegen und 2. die Faserproteine, die man wiederum a) in Strukturproteine (z.B: Kollagen und Elastin) und b) in Adhäsionsproteine unterteilen kann.

Aus der Vielfalt und den Interaktionen von Proteinen, Glykosaminoglykanen und

Proteoglykanen ergeben sich die spezifischen Eigenschaften der EZM. Im Folgenden soll die Gruppe der Adhäsionsproteine näher beschrieben werden.

2.2.2 Adhäsionsproteine

Die zu den fibrillären Matrixproteinen zählenden Adhäsionsproteine vermitteln die Interaktion von Zellen mit dem extrazellulären Milieu. Wichtige Vertreter von Adhäsionsproteinen sind Tenascine, Laminin und Fibronectin. Laminin stellt ein makromolekulares nichtkollagenes Glykoprotein der extrazellulären Matrix dar, das dank seiner Bindungsfähigkeit an Integrine zu zahlreichen Zell-Matrix-Interaktionen befähigt ist, was sowohl im Zuge der Embryonalentwicklung als auch bei der Gewebshomöostase zur Geltung kommt. Laminin ist ein heterotrimeres Protein, das aus drei Ketten (α , β und γ) besteht, deren Austausch zu verschiedenen Isoformen führt. Bisher wurden 15 dieser Varianten in der Literatur beschrieben. Die Expression der Lamininisoformen ist im Wesentlichen von der Differenzierungsrichtung und der Zellreife eines Gewebes abhängig, so wird beispielsweise Laminin-2 vorwiegend in den Basalmembranen von Nerven oder Skelettmuskel nachgewiesen, während Laminin-5 regelmäßig in epithelialen Basalmembranen gefunden wird. Dabei kommt der letzteren Isoform insofern eine besondere Bedeutung zu, als dass der Verlust ihres Rezeptors ($\alpha 6\beta 4$) in der Invasionszone des OSCC signifikant mit dessen Malignitätsgrad korreliert (Kosmehl et al.1995).

Während Laminin bevorzugt in der Basallamina und der Basalmembran exprimiert wird, ist Fibronectin ein eher ubiquitär vorkommendes Glykoprotein. Durch alternatives Spleißen dieses Proteins oder posttranslationale Modifikation entstehen zwei grundsätzlich unterschiedliche Formen, zum einen die lösliche niedermolekulare Form, die in Blut und anderen Körperflüssigkeiten zu finden ist, und zum anderen die unlösliche, höhermolekulare Variante, die auch als zelluläres Fibronectin bezeichnet wird und einen Teil der EZM darstellt. Bestimmte Spleiß- bzw. Glykosylierungsvarianten von Fibronectin werden nur in der Embryonalphase bzw. im Rahmen des tumorassoziierten Remodellings der EZM exprimiert und werden deshalb auch als onkofetale Fibronektine bezeichnet.

So gut wie alle Zellen besitzen Rezeptoren, mit denen sie mit den Adhäsions-

proteinen der EZM in Kontakt treten können. Die wesentlichen Rezeptoren, die für die Zelladhäsion von Bedeutung sind, stellen die Integrine dar. Hierbei erkennen die Alpha- und Beta-Untereinheiten des Integrins stets gemeinsam eine entsprechende Aminosäure-Bindungssequenz im Proteinanteil der EZM-Komponenten. Die wohl bekannteste Erkennungssequenz, die auf Matrixproteinen durch die Integrine zur Zellbindung genutzt wird, ist die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartat). Darüber hinaus sind eine Vielzahl von weiteren Zellbindungssequenzen in der EZM identifiziert worden. Ebenso konnten auch diverse Alpha- und Beta-Integrine, die weitere spezifische Zellbindungen an EZM-Komponenten vermitteln, beschrieben werden.

2.3 Tumorassoziierte Modulation der extrazellulären Matrix

Infiltratives Wachstum gilt als ein wesentliches Kriterium für maligne Erkrankungen. Damit dieser Prozeß möglich wird, sind verschiedene Schritte auf molekularer Ebene notwendig. So müssen zunächst Zellkontakte gelöst, die EZM degradiert, parallel dazu eine provisorische Matrix geschaffen, sowie die Migration der Tumorzellen ermöglicht werden.

Bei der Auflösung der Zell-Zell-Kontakte steht der Verlust der interzellulären Haftstrukturen im Vordergrund. Hierbei spielen der Funktionszustand bzw. das Vorhandensein des Bindungsproteins Cadherin oder auch der Fleckdesmosomen eine wichtige Rolle. Da die Vermittlung von Zell-Matrix-Adhäsion vor allem durch die Integrine übernommen wird, schlagen sich Veränderungen in deren Expression auch in unterschiedlichen Verhaltensweisen/Eigenschaften von Karzinomen nieder (Aplin et al. 1996; Knox et al.1994). Im oralen Plattenepithelkarzinom wurde von Kosmehl und Mitarbeitern (1995) beispielsweise ein Verlust von Integrinrezeptoren in der tiefen Invasionszone gezeigt, der in zentralen Tumoranteilen nicht nachgewiesen werden konnte. Weitere Änderungen der Verteilungsmuster von Integrinen im OSCC sind von Thomas und Mitarbeitern beschrieben worden (1997). Darüber hinaus werden während der malignen Transformation auch die Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle der einzelnen Gewebe verändert. Da diese Expressionsmuster häufig mit der Graduierung bestimmter Tumore korrelieren, können oftmals sogar Rückschlüsse auf

das Metastasierungsrisiko und Invasionsverhalten der Karzinome gezogen werden (Terpe und Böcker 1997).

Eine weitere Voraussetzung für die Infiltration in ein Gewebe ist der enzymatische Abbau der vorbestehenden Matrixstruktur. Als bedeutender Bestandteil der extrazellulären Matrix spielt hierbei die Basalmembran im Hinblick auf die Tumorentwicklung eine zentrale Rolle und stellt für den Prozeß der Invasion zunächst eine wichtige Barriere dar, indem sie eine natürliche Grenze zwischen Epithel, dem darunterliegenden Bindegewebe und dem Gefäßendothel schafft. Das Durchbrechen der Basalmembran wird durch das Mobilisieren und Hochregulieren spezieller Proteinasen, vorallem den Matrixmetalloproteinasen (MMPs), der Urokinase, den Cathepsinen oder auch den Hyaluronidasen, möglich. Diese Enzyme werden von den Tumorzellen selbst, aber auch von Fibroblasten, den Entzündungszellen oder den endothelialen Zellen, welche den Tumor umgeben, synthetisiert und sind ihrerseits in der Lage, die Basalmembran zu degradieren und somit das Invadieren der Tumorzellen zu erleichtern. Die MMPs sind je nach Subtyp in der Lage, sowohl Bestandteile der Basalmembran, als auch des Interstitiums, wie Kollagene oder Fibronectin, sowie Adhäsionsproteine, wie Cadherine und Integrine, proteolytisch abzubauen (Ray and Stetler-Stevenson 1995). Unter physiologischen Verhältnissen können diese Matrixmetalloproteasen unspezifisch durch das α 2-Makroglobulin und spezifisch durch sogenannte TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) gehemmt werden. Die Degradation setzt weitere Moleküle und Fragmente der Matrixkomponente frei, die durch ihre Aktivität das Tumorzellwachstum, die Metastasierung und die Angiogenese fördern. Zu diesen Faktoren gehört unter anderem auch das Laminin, das Tenascin, das Kollagen IV und verschiedene Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel TGF β , deren Gehalt oder Form/Typ vom Entwicklungsstand und dem Gewebetyp abhängig sind. Viele Wachstumsfaktoren sind in der Basalmembran fest eingelagert oder liegen in inaktiver Form vor, die dann durch die Auflösung dieser Matrix entweder freigesetzt oder aktiviert werden und somit beispielsweise den Prozeß der Gefäßneuformierung fördern können. Der Verlust oder das Remodelling der Basalmembran sowie das Auflösen von Zell-Zell-Kontakten sind für das Erreichen von Blutgefäßen und damit auch für die Verbreitung von Tumorzellen eine unentbehrliche Voraussetzung.

Die zur Migration notwendigen Interaktionen zwischen Tumorzellen und der extrazellulären Matrix erfolgen gewöhnlich über die Integrine-Rezeptoren.

Parallel zur Auflösung vorbestehender Strukturen der EZM findet deren Neusynthese statt, die mit der Schaffung eines migrationsfördernden Milieus verbunden ist. Diese neuentstandene und tumortypische Matrix unterscheidet sich in ihrem Informationsgehalt und ihrer biochemischen Zusammensetzung deutlich von der vorbestehenden und wird auch als provisorische extrazelluläre Matrix bezeichnet (pEZM). Sie stellt eine Art Leitschiene für die Tumorinvasion dar und kann als Voraussetzung für tumoröse Migration, Differenzierung und Proliferation verstanden werden. Im Gegensatz zur vorhergehenden Matrix weist die pEZM eine erhöhte Sensitivität gegenüber matrixdegradierenden Enzymen und einen hohen Gehalt an onkofetalen Isoformen von Proteinen wie Tenascin oder Fibronectin auf (Siri et al. 1995). Diese Eigenschaften können ursächlich mit der hohen Variabilität der involvierten Matrixproteine erklärt werden. Posttranslationale Modifikationen (Adams and Watt 1993; Matsuura et al. 1989), alternatives Spleißen (beispielsweise von Tenascin und Fibronectin) (Bell et al. 1999; Borsi et al. 1994) und ein alternativer Kettenzusammenbau bei mehrkettigen Proteinen (Laminin) führt zu Proteinisofomen, die in Molekülfamilien zusammengefasst werden können (Kosmehl et al. 1996; Mandel et al. 1994).

Ein weiteres Kriterium der Malignität ist die Fähigkeit der Tumore, Tochtergeschwülste zu bilden. Während des Vorganges der Metastasierung treffen die Tumorzellen dabei auf unterschiedliche Arten von Matrices, an die sie sich durch die Verwendung verschiedenster Rezeptoren und Proteasen dennoch hervorragend anpassen können. Generell sind Proteasen und Wachstumsfaktoren regelmäßig mit der Beweglichkeit der malignen Zellen assoziiert. Darüber hinaus sind Tumorzellen durch eine erstaunliche Plastizität in der Lage, die Gewebematrix amöbenartig zu durchqueren. Zudem ist Metastasierung nicht nur durch den Einbruch in das Gefäßsystem möglich, sondern gelingt zum Beispiel auch durch das Entlangwandern der Tumorzellen an der Außenseite von Gefäßen, vergleichbar mit der Migration der Gliome entlang der Nervenfasern. Bei der Etablierung einer Tochtergeschwulst spielt nach der Absiedlung der einzelnen Tumorzellen in das Blut- und/oder Lymphsystem, die Adhäsion an Matrixstrukturen des Zielorgans eine weitere bedeutende Rolle. Diese wird über

vielfältige Anheftungsproteine, zu denen Tenascin ebenso gehört wie Laminin, realisiert. Einen wesentlichen Beitrag leisten auch hier wiederum die Integrine.

2.4 Tenascin

2.4.1 Die Tenascinfamilie

Das Wort Tenascin lässt sich von zwei lateinischen Begriffen ableiten, dies ist zum einen „tenere“ (lat. halten) und zum anderen „nasci“ (lat. geboren werden), beide geben erste Hinweise auf die Rolle, die dieses vielfältige Protein spielt, denn es ist sowohl in Sehnen (haltende Funktion) als auch in embryonalen Gewebe (im weitesten Sinne geboren werden) zu finden.

Tenascin gehört zu einer Gruppe von oligomeren Glykoproteinen, die in der extrazellulären Matrix von vertebraten Organismen gefunden werden. Vor etwa 20 Jahren gehörte Tenascin-C zu den ersten Proteinen, für die eine adhäsionsmodulierende Rolle nachgewiesen werden konnte – es antagonisiert insbesondere die Bindung von Zellen an Fibronectin (Chiquet-Ehrismann et al. 1988). Tenascin-C moduliert desweiteren auch Zell-Matrix-Interaktionen, vermittelt den Zustand von Matrixbindungen, die einerseits die Motilität fördern sowie gleichzeitig auch andere Zellfunktionen beeinflussen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, spielt Tenascin nicht nur eine Rolle bei embryonalen Entwicklungsprozessen, sondern ist auch während physiologischer Vorgänge wie der Wundheilung oder pathologischer Prozesse wie Tumorgenese zugegen (MacKie et al. 1999). Seine physiologische Rolle beinhaltet mesenchymal-epitheliale Interaktionen während des Gewebsremodellings sowie der Differenzierung des Darms, der Niere und der Brustdrüse. Überdies spielt Tenascin eine entscheidende Rolle bei der Verbreitung, Adhäsion und Proliferation von Zellen (Fischer et al. 1997). Die Expression von Tenascin-C variiert in den verschiedenen Gewebearten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand des jeweiligen Organismus. Unter unterschiedlichen pathologischen Bedingungen kann sich diese Expression abrupt verändern. Zu diesen Bedingungen gehören Tumore (kolorektales Karzinom, Kolonadenom, OSCC) ebenso wie verschiedene entzündliche Erkrankungen wie z.B. die interstitielle Pneumonie oder die Kolitis (Erickson&

Bourdon, 1989; Kaarteenaho-Wiik et al. 1996; McCachren&Lightner, 1992; Riedl et al. 1992; Soini et al. 1993). Während Tenascin in normalem Skelettmuskel nicht exprimiert wird (außer in der Nähe von Blutgefäßen), erhöht sich dessen Expression beispielsweise an Stellen, wo eine erhöhte mechanische Belastung erfolgt (Chiquet-Ehrismann, 1995; Jones&Jones, 2000).

Außer Tenascin-C sind bisher noch vier weitere Mitglieder der Tenascin-Familie bekannt: Tenascin-R, welches in Oligodendrozyten erscheint, Tenascin-W, das bei der Wanderung neuraler Zellen eine Rolle spielt, Tenascin-X, welches mit dem Ehler-Danlos-Syndrom im Zusammenhang steht und Tenascin-Y, welches ebenfalls im Bindegewebe exprimiert wird. Von diesen Isoformen ist teilweise eine Koexistenz mit Tenascin-C in einigen Geweben beschrieben worden. Zum Beispiel ist Tenascin-X ebenso wie Tn-C in der Dermis, dem Herz, in den glatten Muskelzellen der Gefäße oder auch im Nierengewebe nachweisbar (Hasegawa et al. 1997). Gleiches gilt für Tenascin-Y, welches ebenfalls in Zellen der Lunge, der Haut oder auch der Niere zu finden ist (Hagios et al. 1999). Obwohl sich die Expressionen der verschiedenen Tenascinisoformen häufig überlappen, erscheinen sie aber auch zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten. So erscheinen Tenascin-C und Tenascin-R, die beide im Entwicklungsprozess von Gliazellen im ZNS (zentrales Nervensystem) involviert sind, jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten (Jones et al.2000).

2.4.2 Struktur von Tenascin-C

Humanes Tenascin-C ist ein großes Glykoprotein, das aus sechs Untereinheiten besteht, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Untereinheit setzt sich ihrerseits aus drei Struktureinheiten zusammen: 14,5 EGF-like repeats, 17 dem Fibronectin III ähnliche repeats und ein C-terminales Ende, das Ähnlichkeit mit den β und γ Ketten des humanen Fibrinogen hat. Als Multi-domänenmolekül unterliegt auch Tenascin dem alternativen Spleißen, wodurch eine unterschiedliche Expression der dabei entstehenden Tn-Isoformen nachgewiesen werden konnte (Carnemolla et al. 1989, 1999, Borsi et al. 1992). Das Spleißen kann im Bereich von neun Fibronectin Typ - III –Repeats (A1- D, siehe Abb.1) erfolgen, wodurch die Bildung von mindestens neun verschiedenen Te-

nascinvarianten möglich ist (Mighell et al. 1997). Quantitativ können mittels Westernblot zunächst zwei Hauptisoformen von Tenascin-C unterschieden werden, zum einen die höhermolekulare, ungespleißte Form (Tn-C_L, 280 kDa) und zum anderen die niedermolekulare, gespleißte Form (Tn-C_S, 190 kDa). Beide unterscheiden sich in ihrem Depositionsmuster, in der biologischen Funktion und ihrem Rezeptorbindungsverhalten voneinander. Die höhermolekulare Form (Tn-C_L) wird bevorzugt bei der Zellmigration, der Proliferation oder dem Gewebsremodelling während des Vorganges tumoröser Entartung (Borsi et al. 1992), im Zuge der embryonalen Entwicklung (auch in fetalen Membranen an sich) (Prieto et al. 1990) sowie zum Beispiel bei blasenbildenden Erkrankungen der Haut (Schenk et al. 1995) exprimiert. Desweiteren ist es mit einer erhöhten Mitoserate und dem Verlust fokaler Adhäsionen in Geweben assoziiert. Im Gegensatz dazu ist die niedermolekulare Form eher in stabilen Matrices wie zum Beispiel Sehnen oder Knorpel zu finden.

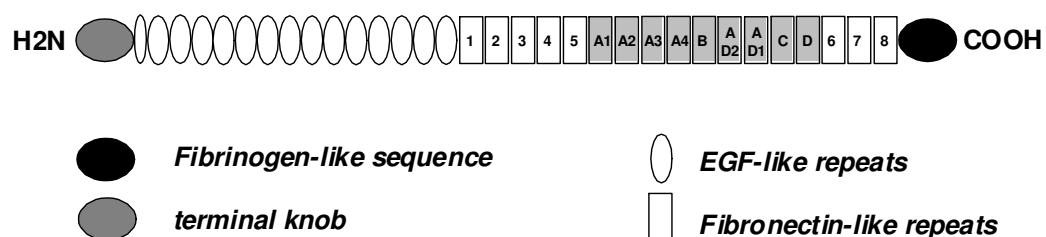


Abbildung1: Proteinstruktur von Tn-C. Grau unterlegt stellen sich diejenigen Fn-Repeats dar, innerhalb welcher der Vorgang des alternativen Spleißens möglich ist (A1- bis D-Domäne).

2.4.3 Gewebeverteilung und Funktion von Tenascin-C und seinen Varianten

Tenascin-C als Glykoprotein der EZM wird vor allem in den Geweben exprimiert, in denen ein struktureller Umbau stattfindet. Dies lässt sich anhand seiner Eigenschaften als Adhäsionsmolekül, in Verbindung mit den Integrinen, und Wachstumsfaktor, bedingt durch homologe Domänen zu Fibrinogen, Fibronectin und EGF, leicht nachvollziehen. Dadurch spielt es eine Schlüsselrolle als Modulator zellulärer Adhäsionen und ist mit dem Vorgang des Gewebsremodel-

lings sowohl in physiologischen als auch pathologischen Prozessen assoziiert. Da es besonders in Gebieten mit einem verstärkten Zellumsatz und Zellwanderung repräsentiert ist, gelang beispielsweise der Nachweis von Tenascin-C in Gebieten chronischer Entzündung, im Bereich von heilenden Wunden, hyperproliferativen Erkrankungen oder auch im Zusammenhang mit maligner Transformation und Invasion (Chiquet-Ehrismann (1995); Mackie et al. 1987; Borsi et al. 1992; Crossin 1996; Latijnhouwers et al. 1996; Chuong and Chen 1991). Zudem wird angenommen, dass Tenascin-C morphogenetische Ereignisse wie Zellproliferation, Zellmigration und gewebsspezifische Genexpression vermittelt. Auch während der normalen Embryogenese ist eine erhöhte Expression von Tenascin-C zum Beispiel im sich entwickelnden Nervensystem oder in der Umgebung epithelial-mesenchymaler Interaktionen in Organen zu verzeichnen (Jones et al. 2000). In verschiedenen adulten Geweben, wie zum Beispiel Haut oder Mundschleimhaut oder zentrales Nervensystem, findet sich eine eher restriktive Verteilung von Tenascin-C und dort bevorzugt im papillären Bindegewebe nahe der Basalmembran (Crossin 1996; Lukinmaa et al. 1996; Erickson and Bourdon, 1989).

Tenascin-C unterliegt wie Fibronectin dem Vorgang des alternativen Spleißens. Dies wurde erstmalig in den 80er Jahren vermutet, als Gulcher und seine Mitarbeiter in menschlichen Zellen unterschiedliche mRNA-Species identifizierten (Gulcher et al. 1989).

Um nun die Gewebsverteilung der einzelnen Spleißvarianten besser charakterisieren zu können, stehen eine Vielzahl domänenspezifischer Antikörper zur Verfügung (Balza et al. 1993). Die dabei quantitativ am häufigsten auftretenden Isoformen Tn-C_L und Tn-C_S sind hierbei am besten beschrieben worden (Borsi et al. 1992; Carnemolla et al. 1999). Während die „kleine“ gespleißte Form (Tn-C_S) auch in normalem reifen Gewebe wie Sehne oder Knorpel nachgewiesen werden kann (Chiquet-Ehrismann et al. 1991), findet man die „große“ ungespleißte Form überwiegend in provisorischen extrazellulären Matrices von im Umbau befindlichen Geweben, wie es beispielsweise bei der Regeneration, der Entzündung oder auch der Tumorgenese der Fall ist (Murphy-Ullrich et al. 1991; Prieto et al. 1990; Tucker et al. 1994). Diese spezifischen Verteilungsmuster werden verständlich, wenn man sich die unterschiedlichen Eigenschaften bei-

der Isoformen verdeutlicht. So verschafft Tn-C_L der extrazellulären Matrix durch eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber matrixdegradierenden Enzymen die für migratorische Prozesse notwendige Flexibilität. Dagegen ist Tn-C_S in der Lage wesentlich fester an Fibronectin zu binden als Tn-C_L, was ihr stärker adhäsive Fähigkeiten und somit auch stabilisierende Eigenschaften verleiht (Chung et al. 1995). Interessant ist auch die unterschiedliche Empfindlichkeit der zwei Isoformen gegenüber der Matrixmetalloproteinasen. Während die „kleine“ Isoform vor allem von MMP7 gespalten wird, sind es für die „große“ Isoform MMP2, MMP3 und MMP7. Dagegen wurde von Siri und Mitarbeitern (1995) eine Resistenz der „großen“ Tenascin-C-Isoform gegenüber MMP9 angegeben.

2.4.4 Tenascin-C in Tumoren

Tenascin-C ist sowohl in mesenchymalen Tumoren als auch in Karzinomen zu finden. Zu diesen Tumoren gehören z.B. Gliome (v.a. Glioma multiforme), Fibrosarkome, Osteosarkome, Wilmstumore, Mammakarzinome und Plattenepithelkarzinome (Bourdon et al. 1983; Chiquet-Ehrismann et al. 1986; Mackie et al. 1987; Lightner et al. 1989). Dabei konnte gezeigt werden, dass Tenascin-C eine signifikante Rolle bei der Zellverbreitung, der Zellproliferation und bei der Modulation von Adhäsionsvorgängen spielt (Fischer et al. 1997).

Da Tenascin-C die Tumorgenese in vielerlei Hinsicht beeinflusst, ist es auch im Rahmen anderer maligner Erkrankungen in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen getreten. So wurden tumorassoziierte Veränderungen bei der Expression von Tenascin-C wie zum Beispiel alternatives Spleißen, de novo Expression und Degradation an einer Vielzahl von Tumoren jenseits des oralen Plattenepithelkarzinoms untersucht. Dabei konnten beispielsweise Veränderungen der Tn-C-Expression als prognostische Parameter für kolorektale Karzinome (Emoto et al. 2001), für das Magenkarzinom (Wiksten et al. 2003), für Osteosarkome (Tanaka et al. 2000) und für zervikale Läsionen (Buyukbayram und Arslan 2002) beschrieben werden.

Im Gegensatz zu allgemeinen Untersuchungen bezüglich unterschiedlicher Verteilungsmuster von Tenascin-C in verschiedenen Malignomen, sind die Betracht-

tungen der differentiellen Expression von Tenascin-C-Spleißvarianten eher selten. Dennoch lassen derartige allgemeine Untersuchungen auf entitätstypische und invasionsabhängige Spleißingmuster schließen. Beispiele hierfür wären die wissenschaftlichen Arbeiten von Mighell et al. (1997) zum oralen Plattenepithelkarzinom, die Arbeit von Vollmer et al. (1997) zum Endometriumkarzinom oder auch der Beitrag von Adams et al. (2002) zum Mammakarzinom. Adams et al. (2002) konnte in seiner Arbeit nachweisen, dass die Tenascin-C-Isoformen, welche die B-Domäne enthalten, sehr stark mit dem Auftreten des invasiven Mammakarzinoms assoziiert sind. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Expression von Tenascin-C an der Invasionsfront des frühen Mammakarzinoms mit einem erhöhten Risiko einer Fernmetastasierung in Verbindung steht (Jahkola et al. 1996).

Für das orale Plattenepithelkarzinom existieren bislang nur wenige Informationen zur differentiellen Expression von unterschiedlichen Tenascin-C-Spleißvarianten und deren tumorbiologischer Bedeutung.

Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung der Hypothese, dass Spleißvarianten von Tenascin-C im oralen Plattenepithelkarzinom differentiell exprimiert werden und damit einen diagnostischen bzw. prognostischen Beitrag leisten können. Dazu erfolgte eine umfassende Analyse der histologischen Verteilung und der mRNA-Expression von Tenascin-C-Spleißingdomänen in oralen Plattenepithelkarzinomen unterschiedlichen Malignitätsgrades mittels Immunhistochemie und RT-PCR.

Im Einzelnen waren folgende Fragen zu beantworten:

- Lassen sich über Domänen-spezifische Antikörper tumorbiologisch relevante Depositionsmuster von Tn-C-Spleißingvarianten definieren?
- Gibt es eine differentielle Expression der mRNA von Tn-C-Spleißingdomänen im OSCC und reflektiert diese die immunhistochemischen Ergebnisse?
- Gibt es Korrelationen der Expressions- bzw. Depositionsmuster von Tn-C-Spleißingdomänen zum Malignitätsgrading der Karzinome?

3 Material und Methoden

3.1 Gewebematerial

Die 36 in dieser Arbeit untersuchten Operationspräparate oraler Plattenepithelkarzinome (OSCC) unterschiedlichen Malignitätsgrades sowie der hyperplastischen und dysplastischen Mundschleimhaut sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Das Gewebematerial stammt aus dem Eingangsgut des Institutes für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena und wurde aus diagnostischer oder therapeutischer Indikation operativ entfernt. Ein positives Votum der Ethikkommission ist vorhanden. Das mittlere Alter der Patienten betrug rund 62,5 Jahre (in einer Altersspanne von 39 bis 89 Jahren). Auch die Geschlechterverteilung geht mit der derzeitig verfügbaren Datenlage insoweit konform, als dass wesentlich mehr Männer als Frauen an Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches erkranken (Hausamen JE, 2003, Curriculum M-K-G, Band III, Berlin, Quintessenz-Verlag). In den hier vorliegenden Fällen oraler Plattenepithelkarzinome beläuft sich die Zahl der Männer auf 22 und die Zahl der Frauen auf 5. (In Westeuropa erkranken etwa 16,1% der Männer und ca. 4,3% der Frauen an einem Tumor im Bereich der Mundhöhle bzw. 8,5% der Männer und 0,8% der Frauen an einem Tumor im Bereich des Kehlkopfes.)

3.1.1 Paraffineinbettung und konventionelle Histologie

Nach der operativen Entfernung des Gewebematerials, erfolgte die Fixierung in einer 5%-igen gepufferten Formaldehydlösung für 24h, der sich die Einbettung in Paraffin (Histosec-Pastillen 56-58C, Merck, Deutschland) im Einbettautomaten (Hypercentre, Shandon, Deutschland) anschloss. Um die histologische Bewertung möglich zu machen, wurde eine HE-Färbung (Hämalaun-Eosin-Färbung) zur besseren Kern-Plasma-Differenzierung durchgeführt. Von den eingebetteten Proben wurden je 4 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt (Rotationsmikrotom RM2045, Leica, Deutschland), die im nächsten Schritt bei einer Temperatur von 60 °C für 6h im Trockenschrank (Medax, Deutschland) getrocknet wurden. Die Entparaffinierung vollzog sich in folgenden Schritten: Xylol

3x15 min, Aceton 4x2 min, Aceton/Aqua dest. (2:1) 2 min, Aqua dest./Aceton (2:1) 2 min und Spülen in Aqua dest.

Tabelle 2. Darstellung der einzelnen untersuchten Fallpräparate mit jeweiligem histopathologischen Befund sowie bei den Karzinomfällen die zusätzliche Gradingeinteilung (G1-G3). (MSH: Mundschleimhaut, Ca: Karzinom, n. bek.: nicht bekannt)

Fall	Befund	Grading
Orale MSH	Hyperplasie m. Akanthose u.ger. Entzündg.	
Orale MSH	Hyperplasie m. ger. Entzündg.	
Orale MSH	Hyperplasie mit Parakeratose	
Orale MSH	Hyperplasie m. ger. Entzündg.	
Orale MSH	Hyperplasie m. ger. Entzündg.	
Orale MSH	Hyperplasie m. Parakeratose u. ger. Entzündg.	
Orale MSH	Hyperplasie	
Orale MSH	Dysplasie	
Orale MSH	Dysplasie	
Ca 1	fokal invasives, gering verhornendes Plattenepithel-Ca (Mundboden)	G1
Ca 2	invasives verhornendes Plattenepithel-Ca (Wangenschleimhaut)	G1
Ca 3	überwiegend gut diff. invasives PE-Ca	G1
Ca 4	gut diff.gering verhornendes PE-Ca (Lippe)	G1
Ca 5	Rezidiv eines PE-Ca	G1
Ca 6	orales Plattenepithelkarzinom (seitlicher Mundboden, sublingual)	G1-G2
Ca 7	mäßig diff.verhornendes PE-Ca (Unterkiefer)	G1-G2
Ca 8	verhorntes PE-Ca	G1-G2
Ca 9	gering bis mittelgradig diff.,gering verhornendes PE-Ca (sublingual)	G1-G2
Ca 10	sehr gering verhornendes PE-Ca	G2
Ca 11	mäßig diff. verhornendes PE-Ca (Unterkiefer)	G2
Ca 12	verhornendes PE-Ca (Gaumen)	G2
Ca 13	mäßig diff.gering verhornendes PE-Ca (Zunge/Mundboden)	G2
Ca 14	gering verhornendes PE-Ca (Uvula)	G2
Ca 15	gut-mäßig diff. fokal verhornendes PE-Ca (Zunge)	G2
Ca 16	papilläres Plattenepithel-Ca der Zunge (Zunge)	G2
Ca 17	mäßig diff.gering verhornendes PE-Ca (Zunge)	G2
Ca 18	mäßig verhornendes PE-Ca (Mundboden)	G2
Ca 19	verhornendes PE-Ca (Processus alveolaris)	G2-G3
Ca 20	Infiltrate eines gut-schlecht diff. PE-Ca	G2-G3
Ca 21	verbreitertes PE-Ca (Zunge)	G2-G3
Ca 22	verhornendes PE-Ca (Mundboden)	G2-G3
Ca 23	umfangreich verhornendes PE-Ca	G2-G3
Ca 24	Plattenepitheltumor m. mittel-hochgradiger Dysplasie (Mundboden)	G2-G3
Ca 25	verhornendes PE-Ca (Unterlippe)	G2-G3
Ca 26	gering diff. PE-Ca (Mundboden)	G3
Ca 27	verhornendes, schlecht diff. Plattenepithel-Ca (Unterlippe)	G3

An die 20-minütige Kernfärbung in Hämalaun nach Meyer schloss sich nach Spülen in destilliertem Wasser das Bläuen der Kerne für 10 min unter fließendem Wasser an. In einem weiteren Schritt erfolgte die Färbung der Schnitte in alkoholischer Eosin-Y-Lösung (Sigma-Aldrich, Deutschland) für 3 min. Danach wurden die Präparate in 70%-igem Ethanol für 2x1-5 min gespült, über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol überführt und in Neutralbalsam (Dr. Hollborn&Söhne, Deutschland) eingebettet. Die Sicherung der klinischen Diagnose erfolgte mit der Hilfe konventioneller Histologie durch lichtmikroskopische Bewertung.

3.1.2 Kryokonservierung

Unmittelbar nach der Entnahme des Gewebematerials erfolgte dessen Überführung in sterile Hanks' Salzlösung bei einer Temperatur von 4°C. Die 5x5x5 mm großen Proben wurden in stickstoffgekühltem flüssigen Propan schockgefroren und bei einer Temperatur von -70°C steril gelagert (Tiefkühltruhe UF85-460T, Colora Messtechnik, Deutschland). Zuvor erfolgte die Vorbehandlung der Proben in Tissue-Tek (Sakura, Niederlande), um eine gefrierbedingte Schrumpfung des Gewebes zu verhindern.

3.1.3 TNM-Klassifikation der Mundhöhlenkarzinome

Die Einteilung der oralen Plattenepithelkarzinome bezüglich TNM-Klassifikation und dem histopathologischen Grading erfolgte in Anlehnung an die gültigen Kriterien nach der UICC (Wittekind et al. 2003).

Primärtumor (T)

TX	Primärtumor nicht untersucht
T0	kein Hinweis auf Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor \leq 2cm im größten Durchmesser
T2	Tumor $>$ 2cm, aber \leq 4cm im größten Durchmesser
T3	Tumor $>$ 4cm im größten Durchmesser
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen (Knochen, Haut, Muskulatur)

Regionäre Lymphknoten (N)

- NX Regionäre Lymphknoten nicht untersucht
- N0 keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten, $\leq 3\text{cm}$, im größten Durchmesser
- N2 Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten, $>3\text{cm}$, aber $\leq 6\text{cm}$ im größten Durchmesser; oder in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keine $> 6\text{cm}$ im größten Durchmesser; oder
- N2a Metastasen in einem ipsilateralen Lymphknoten, $> 3\text{cm}$ aber $\leq 6\text{cm}$
- N2b Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner $> 6\text{cm}$
- N2c Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner $> 6\text{cm}$
- N3 Metastase in einem Lymphknoten $> 6\text{cm}$ im größten Durchmesser

Metastasen (M)

- MX Vorkommen von Fernmetastasen nicht untersucht
- M0 kein Hinweis auf Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen vorhanden

Histopathologisches Grading

- Gx Bestimmung des Differenzierungsgrades ist nicht möglich
- G1 gut differenziert
- G2 mäßig differenziert
- G3/G4 schlecht differenziert/undifferenziert

Zusätzlich zum Gradingmodell der UICC (TNM-Klassifikation) existiert noch ein weiteres Gradingssystem, welches von Anneroth und Mitarbeitern (1984) eingeführt und im Jahre 1989 und 1992 von Bryne und Mitarbeitern modifiziert wurde. Dieses alternative Klassifikationsmodell berücksichtigt im Wesentlichen die Beurteilung der Invasionsfront, deren Struktur eine hohe prognostische Signifikanz besitzt. Folgende Parameter werden dabei im Einzelnen bewertet:

- Keratinisierungsgrad
- Zellkernpolymorphie
- Anzahl der Mitosen
- Invasionsmodus
- Invasionsstadium
- Lymphozyteninfiltration

Aufgrund der tumorbiologischen Bedeutung der Invasionsfront wurde bei der Auswertung der immunhistochemischen Markierungen unserer Präparate besonderes Augenmerk auf die Tumorrandbezirke gelegt.

3.2 Immunhistochemie

Die Analyse der histologischen Verteilung von Tenascin-Spleißvarianten erfolgte über eine immunhistochemische Erfassung von Tn-C-Spleißdomänen unter Verwendung der in Tabelle 3 aufgeführten Domänen-spezifischen monoklonalen und rekombinanten Antikörper.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Antikörper und deren Verdünnung in der Immunhistochemie

Klon	Domäne	Verdünnung	Quelle	Referenz
BC2	A1/A4	1:20	Zellkulturüberstand L. Borsi, Genua	Balza et al 1993
BC3	B	1:5000	Chemicon	Balza et al 1993
BC4	N-term.	1:20	Zellkulturüberstand L. Borsi, Genua	Balza et al 1993
F16	A1	1:5 (0,01mg/ml)	rekombinant, biotinyliert D. Neri, Zürich	
G11	C	1:20 (0,01mg/ml)	rekombinant, biotinyliert D. Neri, Zürich	
D11	D	1:10 (0,02mg/ml)	rekombinant, biotinyliert D. Neri, Zürich	

3.2.1 Indirekte Streptavidin-Biotin-Methode zum Nachweis der Bindung monoklonaler anti-Tenascin-C-Antikörper

Nachdem die ca. 8 mm dicken Gefrierschnitte bei Raumtemperatur für 10 min in Aceton fixiert wurden, erfolgte nach kurzem Lufttrocknen (ca. 10 min) die Spülung mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS). Die primären Antikörper BC2, BC3, BC4 wurden zuvor mit Antikörper-Verdünner (Zymed Laboratories inc., USA) verdünnt (siehe Tab 3). Um eine unspezifische Interaktion von endogenem Biotin mit dem Detektionssystem zu unterbinden, wurden die Schnitte mit dem DAKO® Biotin Blocking System (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) entsprechend Herstellerangaben vorbehandelt. Nach einer Inkubation der Gefrierschnitte mit den Primärantikörpern über Nacht im Kühlraum (4°C), schloß sich die Detektion der gebundenen Antikörper mittels DakoChemMate™ Detection Kit (Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse) nach Angaben des Herstellers (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) an. Dazu wurden die Schnitte zuerst mit dem ChemMate™Link/Biotinylated Secondary Antibodies 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es schloß sich die ebenfalls 30-minütige Inkubation mit ChemMate™Streptavidin Alkaline Phosphatase an, wiederum bei Raumtemperatur. Zwischen den Inkubationen erfolgte die Spülung mit TBS. Zur Visualisierung der Reaktion diente ChemMate™Chromogen RED, wobei die endogene alkalische Phosphatase zuvor mit Levamisol blockiert werden musste. Eine gründliche Spülung der Schnitte zunächst mit Leitungswasser und anschließend mit Aqua dest. schloß sich an. Zur Kerndarstellung wurde zum Abschluß mit Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt, wiederum mit Wasser gespült, gebläut und danach mit Glycerol/Gelatine eingedeckt.

3.2.2 Nachweis der Bindung humaner rekombinanter Antikörper

Die biotinylierten rekombinanten Antikörper G11, F16 und D11 wurden dankenswerter Weise von Professor Dario Neri (ETH Zürich, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um mittels Phagendisplaytechnik hergestellte scFv-Fragmente. Die Verdünnung auf die Arbeitskonzentration erfolgte auch hier mit der Antikörperverdünnungslösung (ZYMED Laboratories inc., USA) laut Tabelle 3. Im Gegensatz zu den monoklonalen Antikörpern erfolgte jedoch die Detektion der gebundenen

Antikörperkomplexe mittels des StreptABComplex/AP (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland). Danach wurde erneut mit der Entwicklungslösung des DakoChemMate™ Detection Kit wie oben beschrieben weiterverfahren. Zur Vermeidung einer Interaktion des Detektionssystems mit endogenem Biotin erfolgte auch bei diesen Antikörpern eine Vorbehandlung der Schnitte mit dem DAKO® Biotin Blocking System (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland). Als Negativkontrolle wurden die rekombinanten Antikörper durch Nichtimmun-Serum ersetzt.

3.2.3 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse und fotografische Dokumentation der histologischen, sowie immunhistochemischen Präparate erfolgte lichtmikroskopisch. Dabei wurde das Lichtmikroskop Axioskop 2 der Firma Zeiss, Deutschland, mit den Objektvergrößerungen x10 und x20 verwendet. Die fotografische Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit dem Bilddokumentationssystem AxioVision 3.0 unter Verwendung einer digitalen Kamera AxioCam HRC (alle Komponenten von der Firma Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland).

3.2.4 Semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Verteilungsmuster von Tenascin-C

Die semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Verteilungsmuster von Tenascin-C in den verschiedenen histologischen Präparaten erfolgte mit Hilfe folgenden Schemas:

Tabelle 4 Bewertungsscore der immunhistochemischen Markierung und dazugehörige semiquantitative Bedeutung

Score	Semiquantitative Bewertung
-	keine Markierung
+	auf Basalmembran begrenzt
++	Basalmembran und geringe Stromadeposition
+++	mittelgradige Stromadeposition mit Fokussierung auf die Tumorränder
++++	Stroma überwiegend (s) oder komplett (k) positiv

3.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Kreuztabellen und dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson unter Verwendung der Software SPSS 12.0. Dabei wurden das histologische Grading als Gruppenvariable definiert und Korrelationen zu den verschiedenen Expressions- und Depositionsmustern von Tenascin-C untersucht. Dabei galt eine Fehlerwahrscheinlichkeit von kleiner 5% ($p \leq 0.05$).

3.3 RT-PCR

3.3.1. RNA-Extraktion aus kryokonservierten Gewebeproben

3.3.1.1. Homogenisierung des Gewebematerials aus Gefrierschnitten

Von 9 ausgewählten Karzinomen wurden jeweils 10 Kryostatschnitte in ein 1,5ml Eppendorfröhrchen überführt und im Anschluß daran mit 350µl RLT-Lyse-Puffer (QIAGEN GmbH, 400µl RLT auf 4µl β -Mercaptoethanol, Bestandteil des RNeasy Mini-Kits, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) versetzt. Das Gewebematerial wurde mit Hilfe eines Mikropistills (Eppendorf Deutschland) homogenisiert. Um einen möglichst hohen Aufschluß des Gewebes zu ermöglichen, wurden die Proben bei -75°C über Nacht eingefroren und nachfolgend für 10 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde das Material auf eine Qiashredder-Säule (in einem 2ml Sammelröhrchen, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) überführt und 2min bei 1400rpm zentrifugiert. Das dabei entstandene Ly-sat wurde daraufhin in ein RNase-freies Tube pipettiert.

3.3.1.2. RNA-Extraktion

Die Extraktion der total-RNA (tRNA) aus den Gewebelysaten erfolgte unter der Verwendung des RNeasy Mini-Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Den Lysaten wurde dazu 350µl 70%-iges Ethanol zugesetzt und durch wiederholtes Pipettieren vermischt. 700µl dieses Gemisches wurden auf die Rneasy *mini spin column* gegeben und für 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Die RNA blieb dabei an der Säulenmatrix haften. Im Anschluß daran wurden die Säulen mit 350µl RW1-Puffer gewaschen (1min Zentrifugation). Auf diesen Schritt folgte, unter der Verwendung des Protokolls und der Komponenten des RNase Free DNase-Sets (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland), ein *On Column-DNase-*

Verdau. Dazu wurden 10µl der DNase Stammlösung auf 70µl RDD-Puffer gegeben, auf die Säule aufgetragen und 15 min inkubiert. Danach wurden 350µl des RW1-Puffers auf die Säule gegeben und anschließend bei 10000rpm zentrifugiert. Es folgte eine zweimalige Spülung mit 500µl RPE-Puffer, in deren Anschluß die Elution der tRNA mit 50µl RNase-freiem Wasser erfolgte (1-2min Inkubation bei Raumtemperatur und Abzentrifugieren). Die Proben wurden danach bei -80°C gelagert. Die Qualität und Quantität der isolierten RNA wurde nachfolgend mit Hilfe einer β-Aktin-Kontroll-RT-PCR überprüft.

3.3.2. RT-PCR

Die mRNA der Tenascin-C-Spleißdomänen wurde unter der Verwendung des OneStep RT-PCR-Kits (QIAGEN GmbH) mittels single-tube-RT-PCR amplifiziert. Die Basensequenz der Primer und die Lage bzw. Größe möglicher Amplifikate sind in Tabelle 6 und Abbildung 2 dargestellt. Eine Abschätzung der Quantität und Qualität der extrahierten mRNA erfolgte über eine Kontroll-RT-PCR für das *house keeping* Gen β-Aktin. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.

Tabelle 5

Überblick über die bei der RT-PCR verwendeten Komponenten sowie deren Volumina und Endkonzentrationen.

Komponenten	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
RNase-freies Wasser	31µl	-
5xQIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	10,0µl	1x
dNTP Mix	2,0µl	400µM von jedem dNTP
Primer A	1,5µl	0,6µM
Primer B	1,5µl	0,6µM
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzym Mix	2,0µl	-
tRNA	2,0µl	
Totales Volumen	50,0µl	

Die RT-PCR erfolgte für alle Primerkombinationen unter identischen Bedingungen:

1 Zyklus	50 °C	30 min.	
	95 °C	15 min.	
40 Zyklen	94 °C	1 min.	
	57 °C	1 min. (Tn-C)	54 °C 1 min. (β-Aktin)
	72 °C	1 min.	
1 Zyklus	72 °C	10 min	

3.3.3. Agarose-Gel-Elektrophorese

Die PCR-Fragmente wurden durch Elektrophorese in 2 %-igem Agarosegel in TAE-Puffer (3.4) bei 80V unter Sichtkontrolle aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 10 µl des PCR-Ansatzes mit 2µl 6x-Puffer versetzt und in die Geltaschen eingebracht. Eine 100 bp-DNA-Leiter (Advanced Biotechnologies Ltd., Großbritannien) wurde als Längenstandard mitgeführt.

3.3.4. Primer

Tabelle 6

Basensequenz und Lokalisation der bei der RT-PCR verwendeten Primer für Tenascin-C und β-Aktin.

Primer	Sequenz	Lokalisation	Referenz
T1	AGGCAGACACAAGAGCAAGC	HSTNAS3 3484-3503	Mighell et al. 1997
T2	AAGGCATCCACTGAACAAGC	HSTNAS3 3515-3534	Mighell et al. 1997
T3	ACTCAGGACTTCAGCACAAC	HSTNAS3 4028-4047	Mighell et al. 1997
T4	AAGAGGCTCACAATCTCACG	HSTNAS3 4203-4222	Mighell et al. 1997
T5	CTGGGAGATTTAGCCGTGTC	HSTNAS3 4361-4379	Mighell et al. 1997
T6	GCTACCCCCTAGTACTGATTTTATTGTCTA	HSTNAS3 4804-4833	Mighell et al. 1997
T7	ACCAAAGCCACAGTTGGGCA	HUMTEN 3-22	Mighell et al. 1997

3. Material und Methoden

T8	CATTGGCTATGAGGTTATGG	HSTNAS3 5089-5108	Mighell et al. 1997
T9	CTGGTCTGAGTCTTGGTTCCGTCC	HSTNAS3 5584-5607	Mighell et al. 1997
T10	TTTCCAGTGGCTCAGACTGC	HSTNAS3 5290-5309	Mighell et al. 1997
T11	GCTGTCAAAGGCATTCTCCGATGCC	HSTNAS3 4963-4987	Mighell et al. 1997
T12	TGTAATGACAAAGGCAGTGA	HUMTEN 256-276	Mighell et al. 1997
T13	AGGAGAGATTGAAGCTCTCG	HSTNAS3 4666-4685	Mighell et al. 1997
T14	CTCAGACACGGCTAAATCTC	HSTNAS3 4365-4384	Mighell et al. 1997
T15	TGAGATTGTGAGCCTCTTCC	HSTNAS3 42014220	Mighell et al. 1997
T16	GCTGCCTCTACTGTGTCAGC	HSTNAS3 3916-3936	Mighell et al. 1997
T25F	TGAACAAAATCACAGCCCAG	HSTNAS3 6495-6514	Bell et al. 1999
T27R	CAGTGAACCAGTTAACGCC	HSTNAS3 6808-6827	Bell et al. 1999
β-Aktin 1	CCTTCCTTCCTGGGCATG	NM_001101 862-880	Qiagen GmbH
β-Aktin 2	GAGCAATGATCTTGATCTTC	NM_001101 1048-1067	Qiagen GmbH

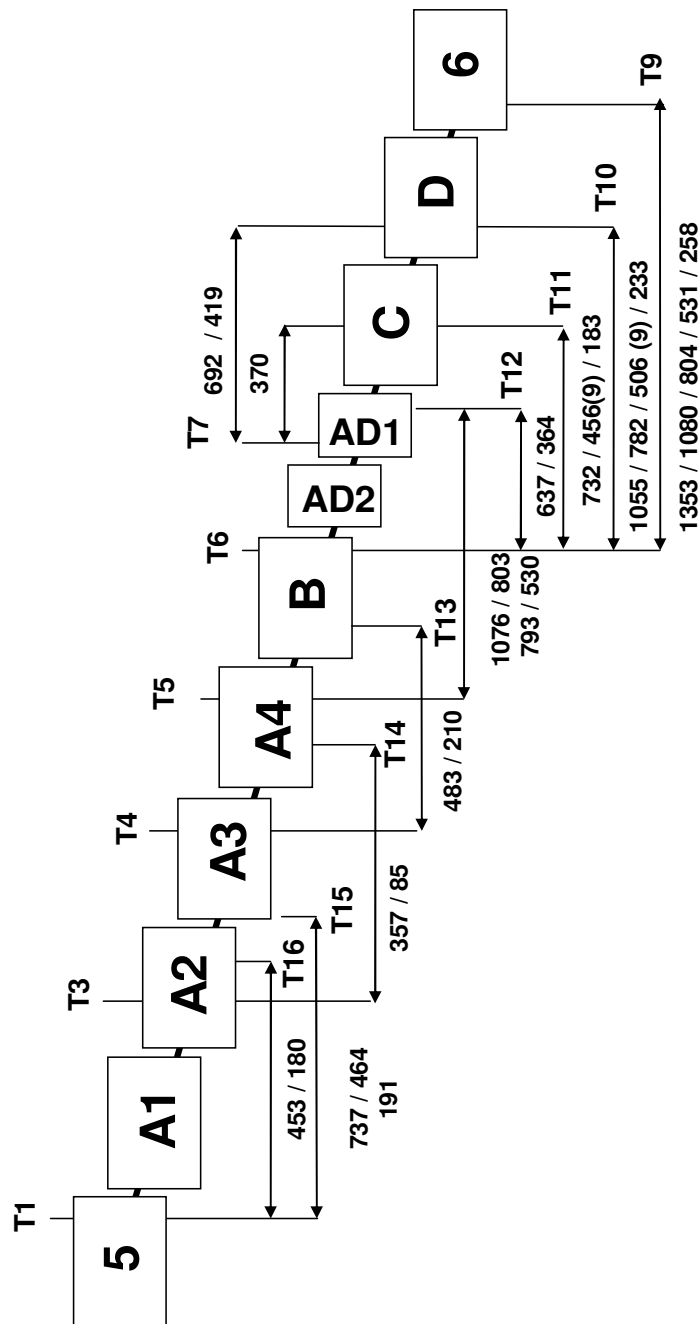


Abb.2 In dieser Abbildung kommt der Teil von Tenascin-C_L zur Darstellung, der dem Vorgang des alternativen Spleißens unterliegt. Aufgezeigt sind die Reihenfolge der Domänen dieses Abschnittes sowie die jeweiligen Ansatzstellen der im Rahmen dieser Promotion verwendeten Primerkombinationen und die Größe möglicher resultierender Amplifikate.

3.4. Verzeichnis für verwendete Puffer-,Farb-und Fixierungssysteme

Konventionelle Histologie

5% PBS-gepufferte Formaldehydlösung

5% (w/v) Formaldehyd in PBS bei 60 °C lösen

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,15 g Na₂HPO₄·2H₂O

0,2 g KH₂PO₄

ad 1000 ml Aqua dest.

Hämalaun nach Meyer

2,5 g Hämatoxylin

0,5 g Natriumjodat

125 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat

125 g Chloralhydrat

2,5 g Zitronensäure

auf 2500 ml Aqua dest. 14 Tage reifen lassen

Antikörper-Verdünerlösung

ist zur Verdünnung primärer als auch sekundärer Antikörper geeignet

PBS (pH 7,4)

BSA

0,05%NaN₃

DakoChemMate™

Kit-Bestandteile/ Reagenzien:

ChemMate™Link, Biotinylated Secondary Antibodies

ChemMate™Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)

ChemMate™Chromogen RED 1, 2, 3

ChemMate™AP Substrate Buffer

ChemMate™Levamisole

DakoCytomation

Streptavidin

1ml Streptavidin
0,01 mol/L Phosphatpuffer
0,15 mol/L NaCl
15 mmol/L NaN₃
pH 7,2

Biotinylierte Alkaline Phosphatase

1ml aus Intestinalschleimhaut des Kalbs gewonnene biotinylierte alkalische Phosphatase
0,05 mol/L Tris/HCl
0,1 mol/L NaCl
1 mmol/L MgCl₂
0,1 mmol/L ZnCl₂
15 mmol/L NaN₃
pH 7,2

Agarose-Gel-Elektrophorese

50x TAE-Puffer

2 M TRIS Base
0,1 M EDTA
1 M Essigsäure

4. Ergebnisse

4.1. Immunhistochemische Expressionsanalyse der Tenascin-C-Spleißdomänen

Mit Hilfe der Immunhistochemie und unter Verwendung domänenspezifischer, rekombinanter und monoklonaler Antikörper, konnte die Gewebsverteilung der einzelnen Spleißdomänen von Tenascin-C im oralen Plattenepithelkarzinom analysiert und anschließend ausgewertet werden. Die qualitative Bewertung erfolgte im Vergleich zu hyperplastischem, dysplastischem oralen Gewebe bzw. „normalen“ Epithelarealen aus dem Tumorrandbereich. Im Folgenden sollen die Färbemuster der einzelnen domänenspezifischen Antikörper in den verschiedenen Gewebegruppen beschreibend dargestellt werden.

4.2. Beschreibung der immunhistochemischen Markierungsmuster

Zur Beschreibung der immunhistochemischen Verteilungsmuster wurde die Reaktivität der monoklonalen Antikörper BC-2, BC-3 und BC-4, sowie der rekombinanten Antikörper F-16, D-11 und G-11 an Gefrierschnitten von insgesamt 36 Fällen in Abhängigkeit von deren Grading lichtmikroskopisch bewertet. Dabei sollte gezeigt werden, ob sich in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad eine differente histologische Verteilung möglicher unterschiedlicher Tenascinspleißvarianten nachweisen lässt. Betrachtet wurden dabei 7 Hyperplasiepräparate, 2 Dysplasiepräparate sowie 9 gut differenzierte (G1 und G1-G2 für die statistische Bewertung zusammengefasst zu G1), 9 mäßig differenzierte (G2) und 9 schlecht differenzierte (G2-G3 bzw. G3 für die statistische Bewertung zusammengefasst zu G3) orale Plattenepithelkarzinome.

4.2.1. Immunhistochemisches Verteilungsmuster von Tenascin-C-Spleißdomänen in oralen Hyperplasien

Bei der hyperplastischen oralen Mundschleimhaut können bereits mit den monoklonalen Antikörpern deutliche Depositionen von Tenascin-C nachgewiesen werden. Diese beschränken sich jedoch vorwiegend auf die Region der Basalmembran sowie des direkt angrenzenden Bindegewebes. Zunächst sollen die monoklonalen Antikörper BC-2, BC-3 und BC-4 mit ihren Markierungsmustern

besprochen werden. Bei der Betrachtung der einzelnen Antikörper fällt auf, dass die Markierung durch BC-2, der die A1/A4-Domäne des Tn-C_L detektiert, um ein Vielfaches ausgeprägter ausfällt, als vergleichsweise durch BC-3, welcher die B-Domäne der großen ungespleißten Variante von Tenascin markiert und zumeist ein zarteres und strukturierteres Markierungsmuster hervorruft. Damit stellen sich im histologischen Präparat sowohl die Basalmembran als auch die stromale Deposition von Tenascin-C quantitativ und qualitativ besser dar, werden aber beispielsweise Drüsen und Gefäße oftmals gar nicht oder nur sehr spärlich angefärbt. Eine noch stärkere Markierung als bei BC-2 erfolgt durch den Antikörper BC-4, der sämtliche Tenascinvarianten erkennt und markiert und dadurch ein noch unselektiveres Verteilungsmuster des betrachteten Matrixproteins liefert als BC-2. So werden durch BC-4 auch oftmals die Basalmembranen von Gefäßen vollständig markiert, die z.B. mittels BC-3 nur lückenhaft dargestellt werden. Es zeigt sich darüber hinaus eine ausgeprägte stromale Verteilung der durch BC-4 erkannten Tenascinvarianten.

Auch die rekombinanten Antikörper F-16 (dieser markiert die A1-Domäne von Tn-C_L), D-11 (markiert die D-Domäne) und G-11 (markiert die C-Domäne) weisen Unterschiede bezüglich ihres Markierungsmusters auf. Während F-16 die Basalmembran der hyperplastischen Mundschleimhaut nur fokal und in relativ geringer Intensität markiert sowie oftmals nur eine vereinzelte Anfärbungen im Stroma aufweist, kommt es bei D-11 wieder zu einer leichten Intensivierung der Markierung. Der Antikörper D11 zeigt zudem eine Bindung an Basalmembranen um Gefäße und Drüsen. Dennoch weisen die Basalmembranen bei beiden Antikörpern (F-16 und D-11) nur eine inkomplette Markierung auf, sodass es in keinem der betrachteten Hyperplasiepräparate zu einer vollständigen Darstellung dieser kommen konnte. Im Falle von G-11 war kein Nachweis einer Markierung möglich.

Insgesamt bleibt die Markierung des Stromas bei allen Antikörpern in den hyperplastischen Präparaten sehr beschränkt. Meist kommt es zu einer Deposition in unmittelbarer Nähe der Basalmembran oder zu einer fokalen Anreicherung im tieferen Bindegewebe. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die in der hyperplastischen Mundschleimhaut erzielten Markierungsmuster.

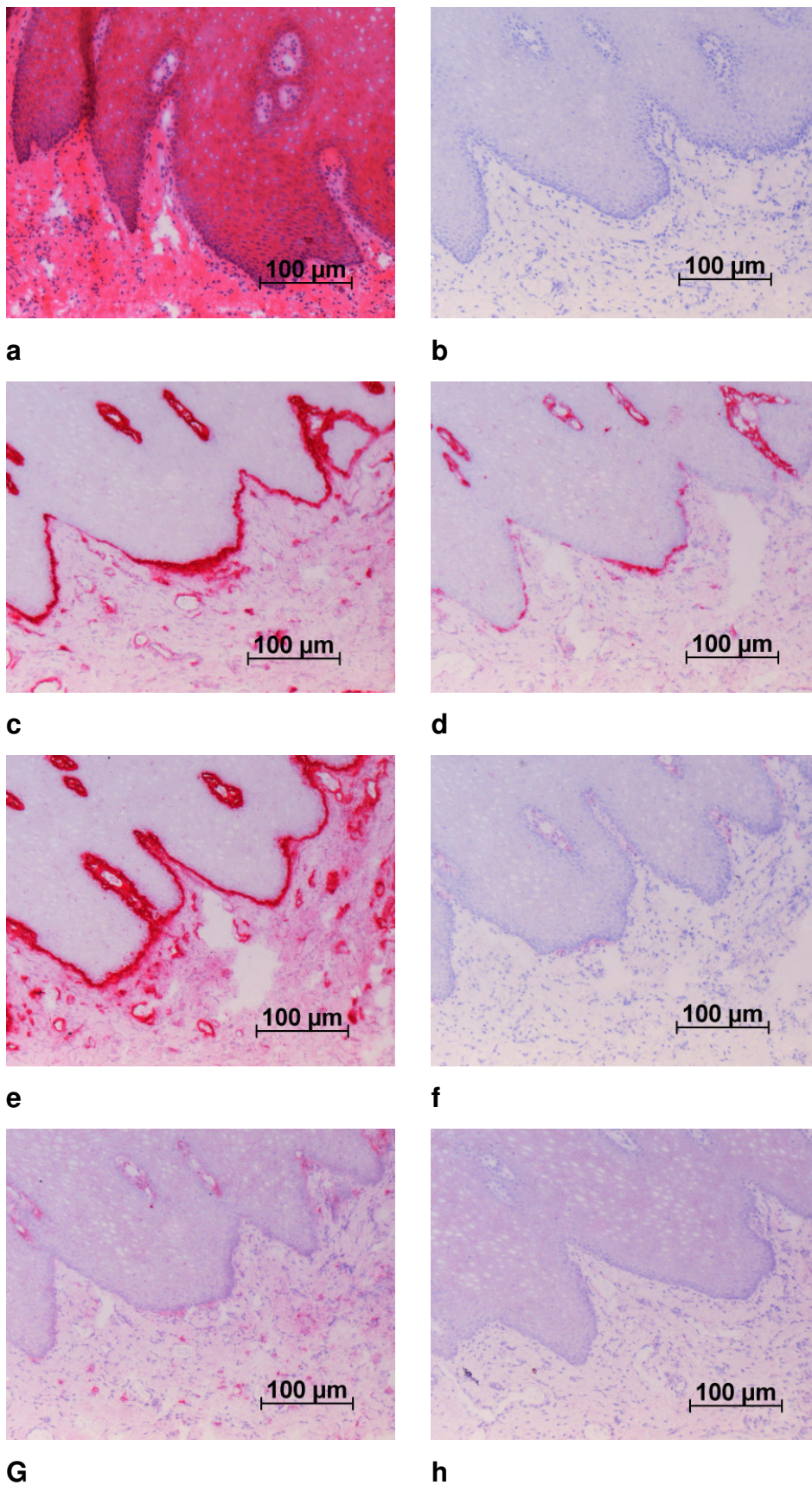
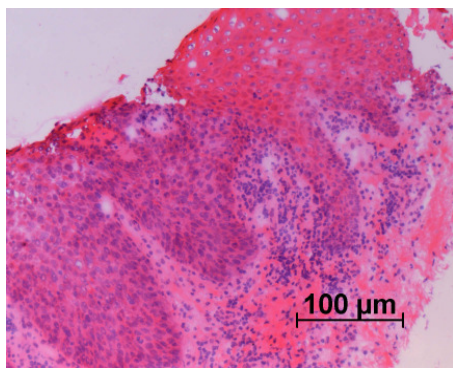


Abb. 3. Immunhistochemische Verteilungsmuster von Tn-C-Spleißdomänen in der hyperplastischen Mundschleimhaut; Abbildung (a) zeigt die lichtmikroskopische Darstel-

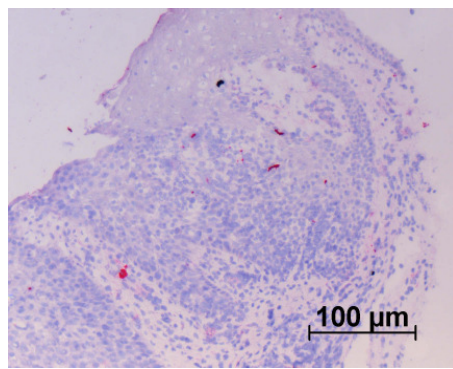
lung der hyperplastischen Mundschleimhaut mit einer deutlichen Verbreiterung des Epithels im HE-Präparat. Die Negativkontrolle zur Immunhistochemie ist in der folgenden Abbildung (b) dargestellt. Unter der Verwendung des monoklonalen Antikörpers BC-2 (c), Markierung der A1/A4-Domäne von Tn-C_L) wird das für die Hyperplasie typische Markierungsmuster mit Fokus auf die Basalmembran und nur geringer Stromadeposition sichtbar. Im Falle von BC-3 (d), welcher die B-Domäne detektiert, ist die Markierung ausschließlich auf die Basalmembran beschränkt und zeigt keine Gefäßdetektion, wohingegen BC-4 (e) durch die Detektion sämtlicher Tenascinvarianten eine deutlich massivere Markierung der Basalmembran und des angrenzenden Stromas, einschließlich enthaltener Blutgefäße, hervorruft. Durch die rekombinanten Antikörper F-16 (A1-domänenspezifisch) und G-11 (C-domänenspezifisch) werden nur geringe bzw. keine (f und h) Markierungen und durch D-11 (D-Domäne, g) eine ähnlich geringe Anfärbung wie in (d), jedoch mit einer verminderten Betonung der Basalmembran, erzielt.

4.2.2. Immunhistochemisches Verteilungsmuster von Tenascin-C-Spleißdomänen in dysplastischer Mundschleimhaut

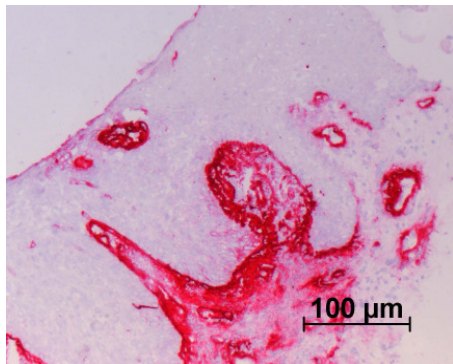
Die Verteilungsmuster der Antikörper bei den Dysplasiepräparaten waren insgesamt nahezu identisch mit denjenigen, welche für die hyperplastischen Präparate bereits vorgestellt wurden. So weisen die Antikörper BC-2 und BC-3 auch in diesen Fällen eine selektivere Darstellung von Tenascin-C auf als beispielsweise BC-4, der von den monoklonalen Antikörpern das Gewebe quantitativ am stärksten markiert. Insgesamt findet sich bei den dysplastischen Präparaten allerdings eine Tenascin-C-Expression, die sich nicht nur auf die Basalmembran beschränkt, sondern auch schon das subepitheliale Bindegewebe mit einschließt (siehe Abb.4 (e)). Interessant war die Tatsache, dass bei der Verwendung des Antikörpers F-16 und auch bei D-11 nur sehr schwache Depositionen innerhalb der Basalmembran und des Stromas auftraten und vor allem die Übergangszone von „normalem“ Epithel in Dysplasie markiert wurde. Zusätzlich treten in den dysplastischen Präparaten jetzt auch vermehrt zytoplasmatische Depositionen auf, die sich vor allem im Bereich der basalen Keratinozyten und vorwiegend durch die monoklonalen Antikörper (BC-2, BC-3 und BC-4) nachweisen lassen. Wie bei den hyperplastischen Präparaten konnten auch hier durch den rekombinanten Antikörper G-11 keine Markierungsmuster nachgewiesen werden. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die in der dysplastischen Mundschleimhaut erzielten Markierungsmuster.



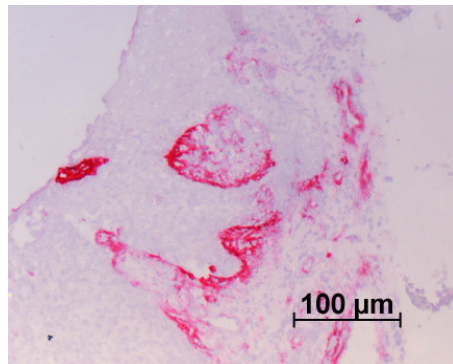
a



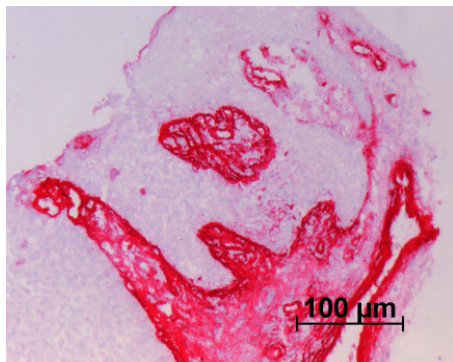
b



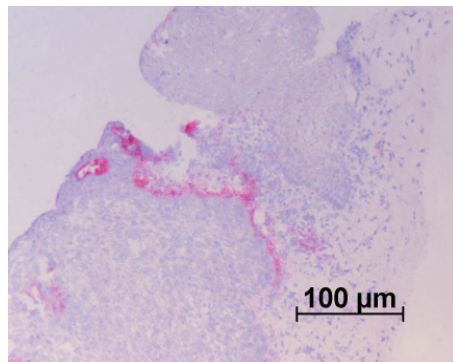
c



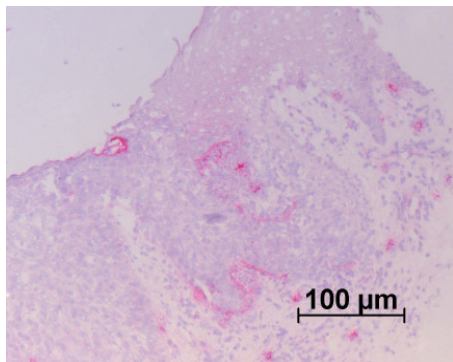
d



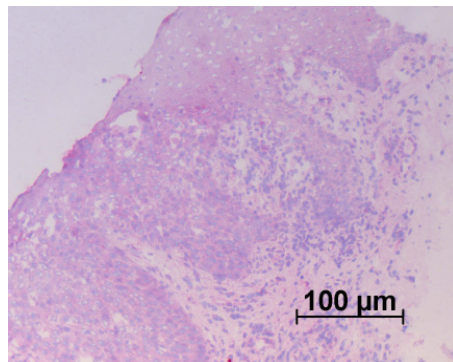
e



f



g



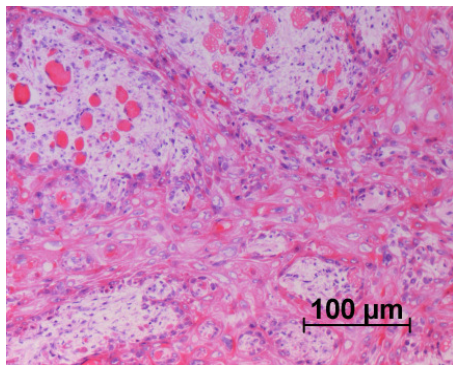
h

Abb.4. Darstellung immunohistochemischer Depositionsmuster von Tn-C-Spleißdomänen in dysplastischer Mundschleimhaut. Abb. (a) zeigt das HE-Präparat mit deutlich

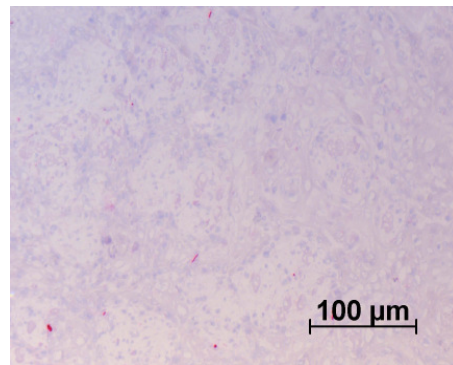
erkennbaren Schichtungsstörungen, Zellpolymorphien und Mitosefiguren innerhalb des Epithels. Die darauffolgende Abbildung (b) stellt wiederum die Negativkontrolle ohne jegliche Färbung dar. Abbildung (c) zeigt das immunhistochemische Markierungsmuster unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers BC-2, der die A1/A4-Domäne der großen ungespleißten Tenascinvariante (Tn-C_L) markiert und in dieser Präparateserie besonders eine Anreicherung im Bereich der Übergangszone von hyperplastischer in dysplastische Mundschleimhaut zeigt. In der darauffolgenden Abbildung (d) kommt durch den Antikörper BC-3 die B-Domäne von Tenascin-C zur Darstellung. Auch in diesem Bild vor allem in beschriebener Übergangszone und angrenzendem Stroma mit allerdings deutlich geringer Intensität und Ausdehnung als in Abbildung c. Die Darstellung aller Varianten von Tn-C durch den monoklonalen Antikörper BC-4 (Abb. e) erreicht auch in den Dysplasiepräparaten die intensivste und ausgedehnteste Markierung. Die Markierung durch die rekombinanten Antikörper F16, (f, markiert die A1-Domäne) und D-11 (g, markiert die D-Domäne) beschränken sich auf zarte Depositionen im Bereich der Basalmembran bzw. zeigen im Falle von G-11 (h, markiert die C-Domäne) erneut keine Markierung.

4.2.3. Verteilungsmuster von Tenascin-C-Spleißdomänen in gut differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen

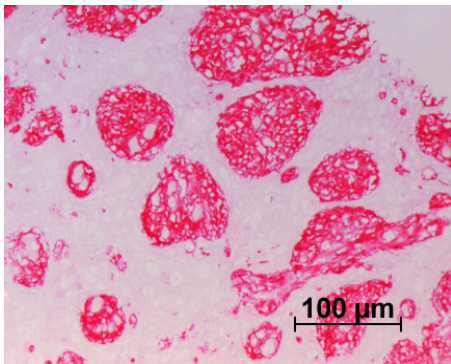
Wie in den ersten beiden beschriebenen Fallgruppen konnten auch bei den gut differenzierten Karzinomen keine auffallenden Unterschiede in der Verteilung der Tenascinspleißvarianten festgestellt werden. So waren auch bei den gut differenzierten Tumoren die Tenascin-C-Expressionen sowohl im Bereich der Basalmembran als auch im angrenzenden Bindegewebe nachweisbar. Zu verzeichnen ist eine generelle Zunahme der stromalen Deposition und fokalen zytoplasmatischen Markierungen einzelner Tumorzellen, die auch hier bei der Verwendung des BC-4 Antikörpers am deutlichsten wurde. Klare Tumor-assoziierte Änderungen der Markierungsmuster im Vergleich zu hyperplastischer und dysplastischer Mundschleimhaut lassen sich allerdings nicht aufzeigen. In der Mehrzahl der Fälle war die Markierung der subepithelialen Basalmembran durch den D-11 Antikörper deutlicher und der Nachweis der stromalen Deposition geringer als durch F-16. Zusätzlich ergab sich interessanterweise in einigen Fällen durch D-11 eine ähnlich starke oder teilweise sogar eine ausgeprägtere Markierung als sie durch Verwendung des monoklonalen Antikörpers BC-3 erzielt werden konnte (Abb.5 (d BC-3) und (g D-11)). Auch bei den gut differenzierten Tumoren war der Nachweis der C-Domäne durch den rekombinanten Antikörper G-11 negativ. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die beschriebenen Markierungsmuster in gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen.



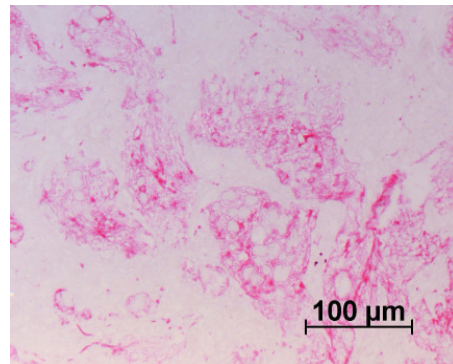
a



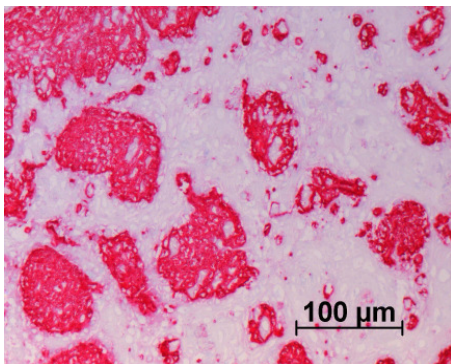
b



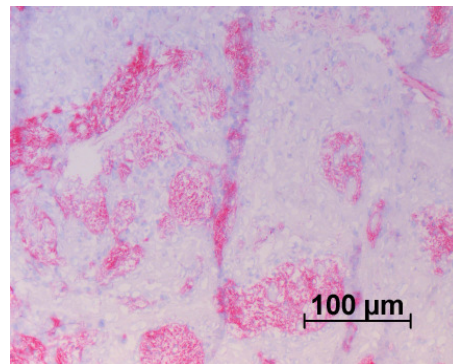
c



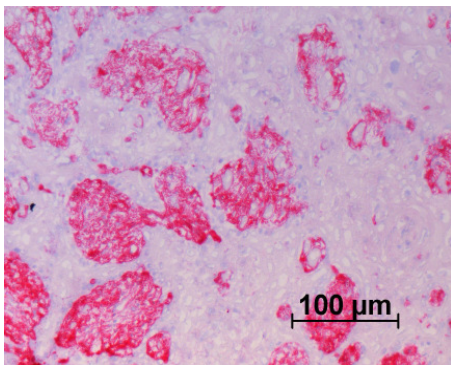
d



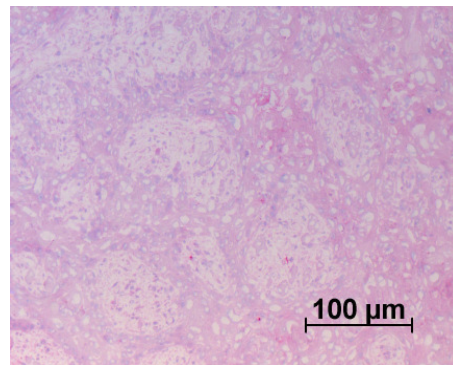
e



f



g



h

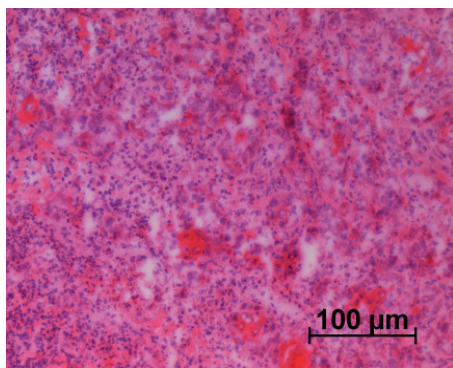
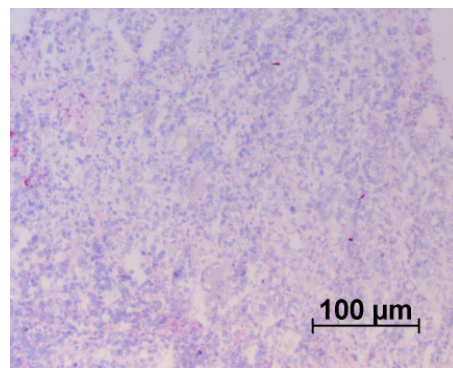
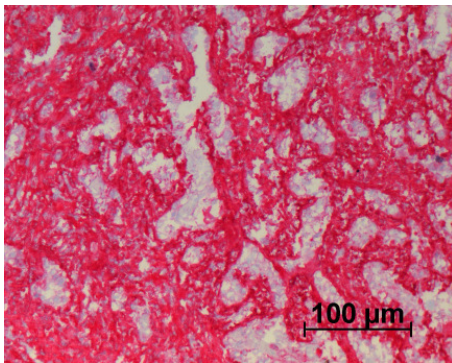
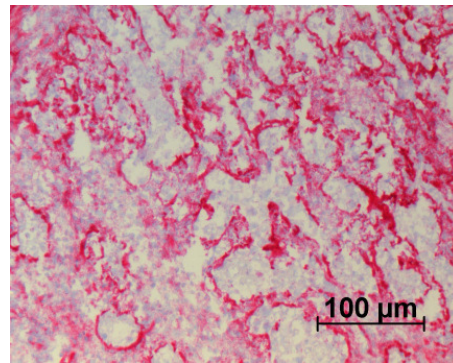
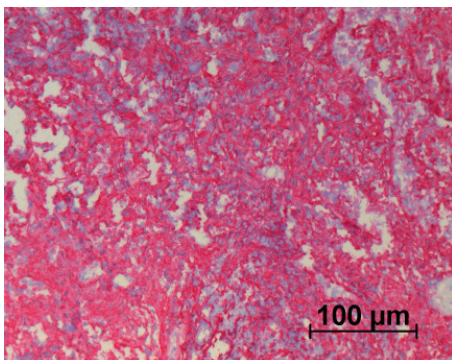
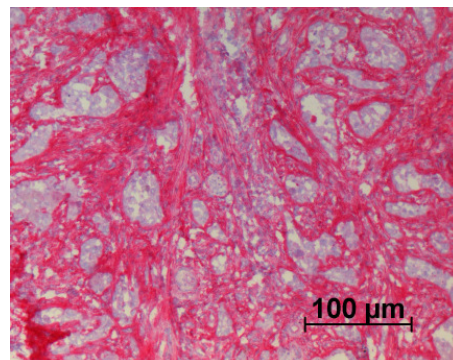
Abb.5 Darstellung der immunhistochemischen Verteilungsmuster von Tn-C-Spleißdomänen in gut differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen. Zunächst erneut mit der

Darstellung des HE-Präparates in Abbildung (a) und der Negativkontrolle in Abbildung (b). Durch die Verwendung des A1/A4-domänenspezifischen Antikörpers BC-2, kommt es in Abbildung (c) in diesem Fall zur vorwiegenden Darstellung des Tumorstromas. Die folgende Abbildung (d) zeigt das immunhistochemische Verteilungsmuster unter der Verwendung des B-domänenspezifischen Antikörpers BC-3, dessen Intensität sich sichtlich vom vorherigen Präparat unterscheidet. Auch bei den gut differenzierten Karzinomen ist die Darstellung aller Tenascin-C-Varianten durch den Antikörper BC-4 (Abb. e) am stärksten ausgeprägt. In Abbildung (f) wird die A1-Domäne von Tn-C_L durch den rekombinanten Antikörper F-16 dargestellt. Dieser zeigt ein dem in Abbildung (d) bereits erwähnten Antikörper BC-3 ähnliches Färbeverhalten. Darauf folgend wird durch D-11 die D-Domäne in Abbildung (g) dargestellt. Wie bei den Hyperplasien und den Dysplasien wurde auch bei den gut differenzierten Karzinomen durch den rekombinanten Antikörper G-11, der die C-Domäne von Tn-C_L markieren soll, keine Detektion erreicht (Abb.h).

4.2.4. Immunhistochemisches Verteilungsmuster von Tenascin-Spleißdomänen in mäßig differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen

Auch in der Gruppe der mäßig differenzierten Karzinome zeigen sich keine völlig neuen Aspekte. Die Tendenz, dass der D-11 Antikörper sowohl das Stroma als auch die subepitheliale Basalmembran deutlicher markiert als F-16, bleibt hier ebenso bestehen wie die Feststellung, dass die durch BC-4 detektierten Tenascinvarianten stets am stärksten in den Präparaten vertreten sind. Die tendenziell deutlichere Markierung durch den rekombinanten Antikörper D-11, im Vergleich zu F-16, war bei den G2-Tumoren noch ausgeprägter als in der Gruppe der gut differenzierten Karzinome, wo zwar die Mehrzahl der Fälle dieser Tendenz folgten, aber auch einige Präparate ein gegenteiliges Verhalten zeigten. Ebenso wie bei den G1-Tumoren, gab es auch bei den mäßig differenzierten Karzinomen Fälle, die diesem Trend nicht folgten (siehe Abb.6 hier zeigt F-16 eine deutlichere Markierung (f) als D-11 (g)). Auch bei den mäßig differenzierten Tumoren konnte eine weitere Zunahme der stromalen Deposition verzeichnet werden, sodass es in wenigen Fällen zur kompletten und in der Mehrzahl wenigstens zu einer mäßig bis starken Markierung des Stromas durch den monoklonalen Antikörper BC-4 kam. Auch die zellulären Depositionen waren in dieser Gruppe quantitativ stärker ausgeprägt als bei den gut differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen. Der bei den gut differenzierten Karzinomen neu aufgefallene Aspekt, dass der rekombinante Antikörper D-11 teilweise eine ähnliche oder gar stärkere Markierung hervorruft als BC-3, wird bei den mäßig differenzierten Tumoren weiter bestätigt.

In einem einzigen Fall kam es zu einer interstitiellen Positivität durch den rekombinanten Antikörper G-11 (siehe Abb.h). Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Tenascin-C-Markierungsmuster in mäßig differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen.

**a****b****c****d****e****f**

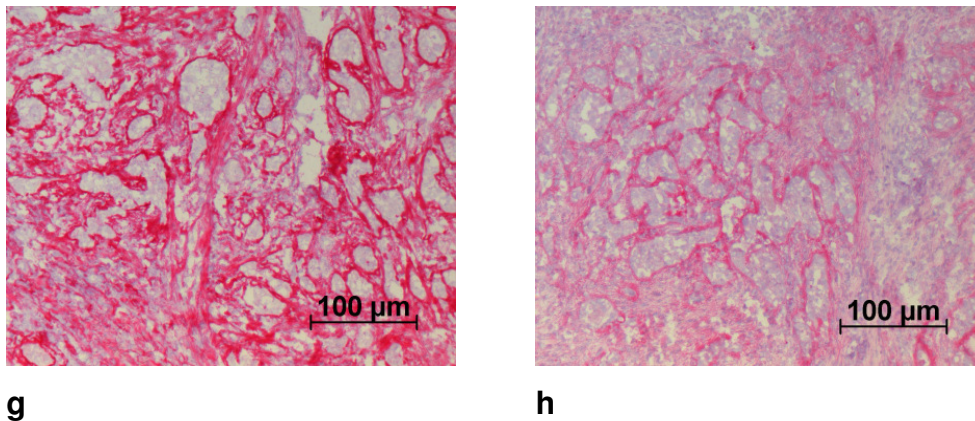


Abb.6. Die Darstellung der immunhistochemischen Verteilungsmuster von Tn-C-Spleißdomänen im mäßig differenzierten oralen Plattenepithelkarzinom zeigt in Abbildung (a) wiederum den HE-Schnitt und in der nachfolgenden Abbildung die Negativkontrolle desselben Falles (b). Abbildung (c) zeigt die Verteilung der A1/A4-Domäne des Tn-C_L durch die Verwendung des monoklonalen Antikörpers BC-2. Erkennbar wird eine ausgeprägte stromale Deposition, die eine deutliche Zunahme im Vergleich zu den gut differenzierten Tumoren oder auch den dysplastischen Präparaten zeigt. Darauf folgt in Abbildung (d) die Darstellung der B-Domäne der großen ungespleißten Form des Tenascin-C unter der Verwendung von BC-3. Hier werden vor allem die Basalmembranen sichtbar, die in der vorherigen Abbildung kaum differenzierbar waren, jedoch wird das Stroma durch BC-3 auch bei den mäßig differenzierten Karzinomen weniger markiert als beispielsweise durch BC-2. In Abbildung (e) werden abermals alle möglichen Tenascinvarianten durch den monoklonalen Antikörper BC-4 dargestellt. Dabei kommt es in diesem Präparat zu einer ähnlich starken Markierung wie in Abbildung c durch BC-2 mit Betonung der stromalen Komponente. In Abbildung (f) erfolgt die Darstellung der A1-Domäne von Tn-C_L durch Nutzung des rekombinanten Antikörpers F-16. Die nachfolgende Abbildung (g) zeigt das spezifische Verteilungsmuster der D-Domäne, das durch die Verwendung des rekombinanten Antikörpers D-11 erzielt wird und in einer mäßigen Deposition des Stromas und einer deutlichen Markierung der Basalmembranen zeigt. Die letzte Abbildung (h) zeigt die insgesamt nur in zwei Fällen (1x G2 und 1x G3) nachgewiesene inerstitielle Positivität durch den rekombinanten Antikörper G-11.

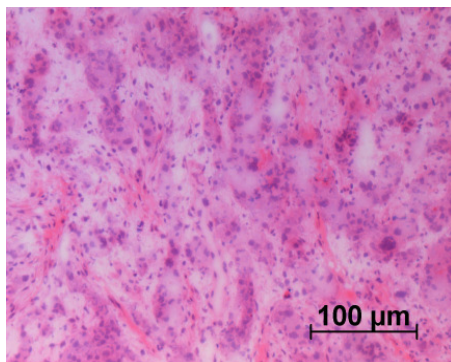
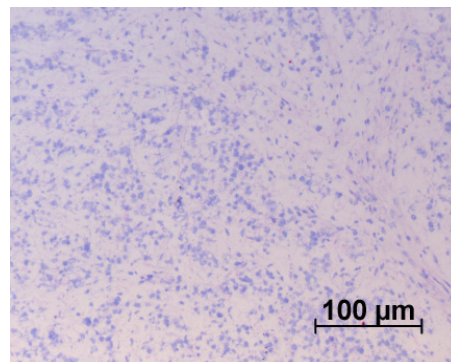
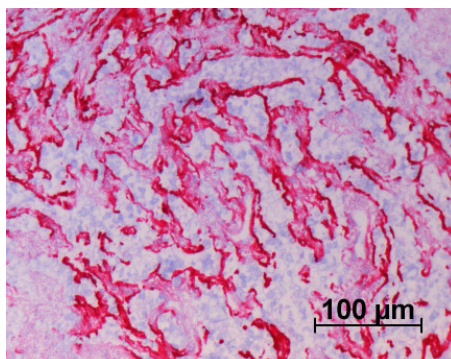
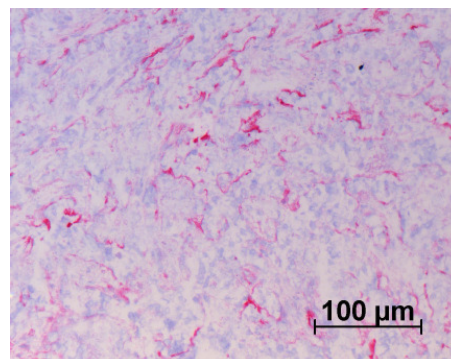
4.2.5. Immunhistochemisches Verteilungsmuster von Tenascin-C-Spleißdomänen in schlecht differenzierten Plattenepithelkarzinomen

Insgesamt zeigen die schlecht differenzierten oralen Karzinome tendenziell wieder eine etwas verminderte stromale Deposition im Vergleich zu den mäßig differenzierten Tumoren. Gleiches gilt für die zytoplasmatischen Depositionen, die in dieser Gruppe zahlenmäßig ebenfalls abnehmen. Allerdings bleiben auch bei den G3-Tumoren die „Markierungsrangfolgen“ der zuvor beschriebenen Karzinome im Großen und Ganzen erhalten, sodass der monoklonale Antikörper BC-4 stets ein stärkeres Markierungsverhalten aufweist als BC-2 und dieser Antikörper dabei wiederum eine noch intensivere Markierung erzielt als BC-3.

Für die rekombinanten Antikörper D-11 und F-16 bedeutet das, dass auch in der Gruppe der schlecht differenzierten Karzinome die Tendenz der deutlicheren Markierung durch D-11 im Vergleich zu F-16 erhalten bleibt (Rangfolge der Markierungsintensitäten: BC-4>BC-2>BC-3 und D-11>F-16). Der in der Bildtafel dargestellte Fall folgt nicht dieser Tendenz, sondern zeigt eine etwas ausgeprägtere stromale Markierung durch F-16 als durch D-11.

Zudem gab es auch in dieser Gruppe einen Einzelfall, der positiv auf den rekombinanten Antikörper G-11 reagierte und eine interstitielle Markierung aufwies (wurde nicht in der Bildtafel dargestellt). Für alle anderen Fälle konnte keine Positivität bei diesem Antikörper nachgewiesen werden.

Eine Korrelation zwischen dem Grad der Entzündung und einer Veränderung der Depositionsmuster konnte in keinem der betrachteten Fälle und Gruppen bestätigt werden. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Tenascin-C-Markierungsmuster in schlecht differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen.

**a****b****c****d**

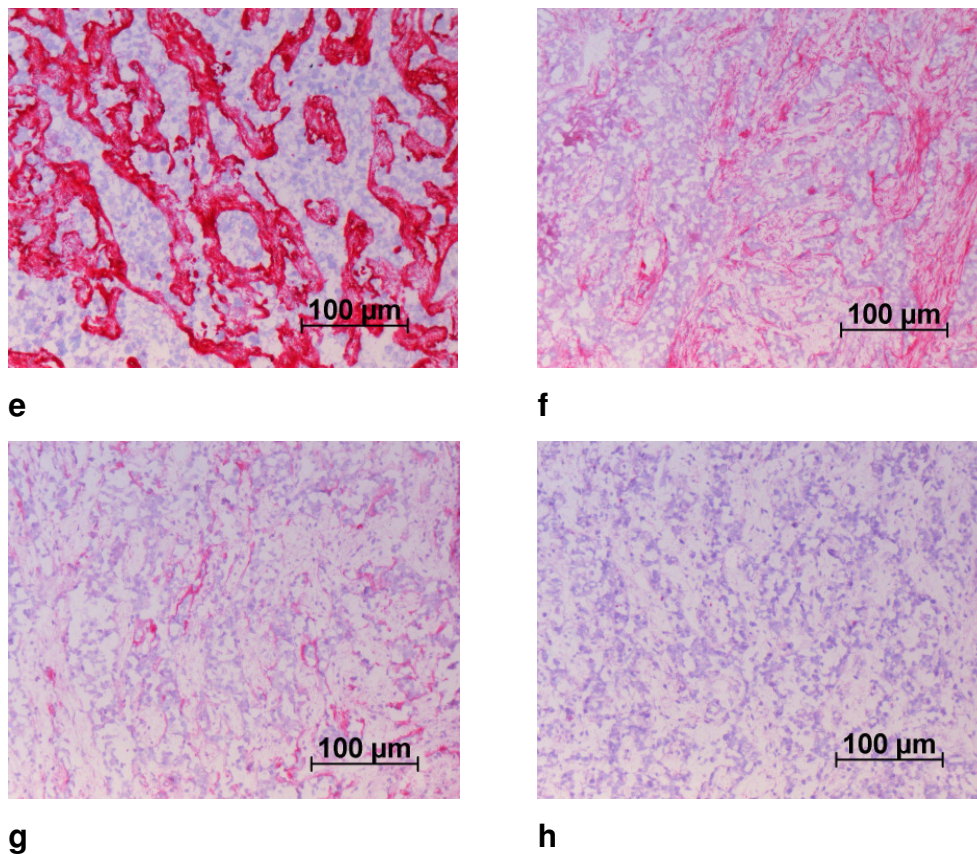


Abb.7. Darstellung der immunhistochemischen Verteilungsmuster von Tn-C-Spleißdomänen im schlecht differenzierten Plattenepithelkarzinom. In den ersten beiden Abbildungen erfolgt die Darstellung des HE-Schnittes (a) und der Negativkontrolle (b). In den nächsten drei Abbildungen werden die domänenspezifischen Verteilungsmuster der monoklonalen Antikörper BC-2 (c; A1/A4-Domäne von Tn-C_L), BC-3 (d; B-Domäne von Tn-C_L) und BC-4 (Abb. e; sämtliche Tenascinvarianten) dargestellt. Insgesamt fällt eine Abnahme der stromalen Depositionen im Vergleich zu den mäßig differenzierten Karzinomen auf. Während BC-4 (e) auch in den G3-Tumoren die ausgeprägteste Markierung erzielt, erreicht BC-3 (d) lediglich ein geringes Depositionsmuster, das dem des Antikörpers D-11 (g) sehr ähnlich ist. So werden etwaige Basalmembranen nur vereinzelt und unvollständig dargestellt und eine stromale Markierung ist fast nicht nachweisbar. Es folgen die immunhistochemischen Verteilungsmuster der rekombinanten Antikörper. Zunächst kommt die A1-Domäne unter der Verwendung von F-16 in Abbildung (f) zur Darstellung. Als vorletzte Abbildung folgt das spezifische Markierungsmuster der D-Domäne durch den Antikörper D-11 in Abbildung (g), das nur sehr schwache Markierungen aufweist, die sich vorwiegend auf die lückenhafte Darstellung der Basalmembran beziehen. Zuletzt wird in Abbildung (h) die C-Domäne durch G-11 dargestellt, die im aufgezeigten Fall allerdings keine Positivität aufweist.

4.3. Semiquantitative Bewertung der Tenascin-C_L-Deposition

Die semiquantitative Bewertung erfolgte mittels des in Material und Methoden aufgezeigten Schemas. Dabei sollte untersucht werden, ob es bei den verschiedenen Malignitätsgraden der betrachteten Karzinome Unterschiede in der Expression möglicher existierender Spleißvarianten des Tenascinmoleküls gibt.

Für alle Fälle wurde jeder der verwendeten Antikörper einzeln lichtmikroskopisch betrachtet und bewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

In der unten aufgeführten Tabelle wird deutlich, dass sich die Depositionsmuster innerhalb der betrachteten Fallgruppen nicht wesentlich unterscheiden. Wie bereits in der immunhistochemischen Auswertung angedeutet, werden durch die monoklonalen Antikörper (BC-2, BC-3 und BC-4) die stärksten Markierungen erzielt, wobei sich BC-2 (A1/A4-Domäne) und BC-4 (Gesamt-Tenascin) im Markierungsmuster zwar prinzipiell ähneln, BC-4 jedoch stets eine ausgeprägtere Deposition aufweist.

Finden sich bei den Hyperplasien vorwiegend Depositionen im Bereich der Basalmembran und mit geringer Ausprägung des unmittelbar angrenzenden Stromas, so nehmen die stromalen Markierungen in der Tendenz mit ansteigendem Malignitätsgrad zunächst zu, um dann im Fall der schlecht differenzierten Tumoren wieder eine Regredienz zu zeigen. Eine statistische Signifikanz dieser Unterschiede konnte jedoch nicht belegt werden. Dies bedeutet letztendlich, dass sich die Ausprägung bestimmter Tenascinspleißvarianten, in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad, nicht verändert.

Tabelle 7 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der semiquantitativen Bewertung der immunhistochemischen Markierungen unter Verwendung der domänenspezifischen Tenascin-C-Antikörper. Die verschiedenartige farbige Unterlegung der Fälle spiegelt die Zusammenstellung der Gradinggruppen bei der Statistik wider. Zum verwendeten Scoringsystem siehe Punkt 3.2.4.

Fall	Grading	BC-2	BC-3	BC-4	F-16	D11	G11
1	Hyperplasie	++	+	++	-	-	-
2	Hyperplasie	++	+	+++	+	+	-
3	Hyperplasie	++++S	+++	++++S	++	+++	-
4	Hyperplasie	+++	++	+++	+	++	-
5	Hyperplasie	++	++	+++	+	++	-
6	Hyperplasie	++++S	+++	++++S	++	+++	-
7	Hyperplasie	++	+	+++	-	+	-
8	Dysplasie	+++	+	+++	-	+	-
9	Dysplasie	++	++	++	-	-	-
10	G1	++++S	+++	++++S	++	++	-
11	G1	+++	++	++++S	++	+++	-
12	G1	+++	+++	++++S	++	++(>f16)	-
13	G1	+++	++	+++	+	++	-
14	G1	++++S	+++	++++S	+++	++	-
15	G1-G2	++++S	+++	++++k	+++	+++	-
16	G1-G2	++	++	++++k	++	++(>F16)	-
17	G1-G2	+++	++	++++S	++	+++	-
18	G1-G2	++++S	++	++++k	++	++(>F16)	-
19	G2	++	++	+++	+	++	-
20	G2	+++	++	+++	++	++(>F16)	-
21	G2	++++S	+++	++++k	++	+++	-
22	G2	+++	+++	++++S	++	+++	-
23	G2	++++k	++	++++k	+++	+++	++Interstit.
24	G2	+++	++	++++S	+	++	-
25	G2	+++	++	++++k	++	++	-
26	G2	++++S	+++	++++S	++	+++	-
27	G2	+++	++	++++S	++	++(>F16)	-
28	G2-G3	+++	++	++++S	++	+++	++Interstit.
29	G2-G3	++	+	+++	-	-	-
30	G2-G3	++++S	+++	++++k	+++	++	-
31	G2-G3	+++	++	++++S	+++	++	-
32	G2-G3	+++	++	++++S	++	++(>F16)	-
33	G2-G3	++	++	+++	++	++(>F16)	-
34	G2-G3	++++S	+++	++++S	++	+++	-
35	G3	++	+	+++	++	+	-
36	G3	+++	++	++++S	++	+++	-

Die Mittelwerte und Standardabweichungen für die untersuchten Antikörper sind im Folgenden graphisch dargestellt.

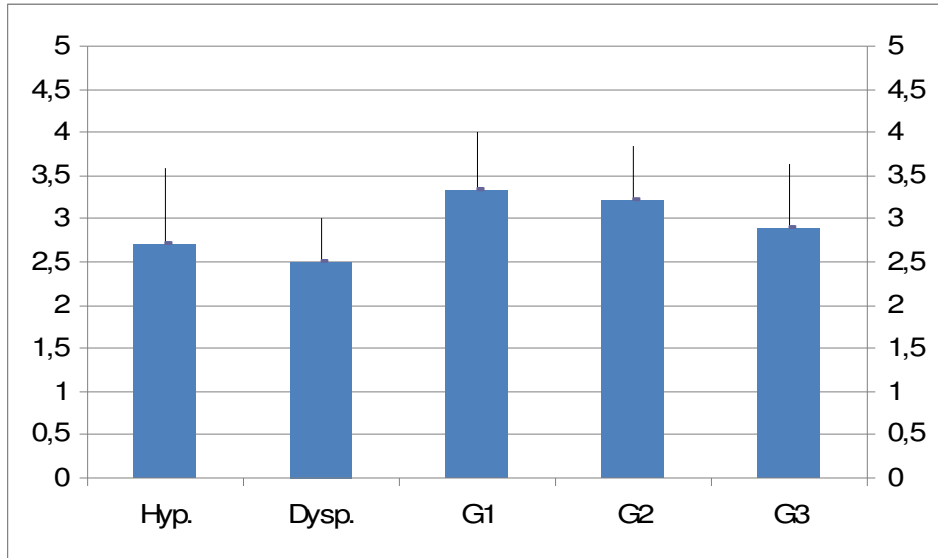


Abb.8 Graphische Darstellung der Mittelwerte (blauer Balken) und Standardabweichungen (schwarzer Balken) für den monoklonalen Antikörper BC-2. Dabei galt für die Hyperplasie eine Fallzahl von $n=7$, für die Dysplasie eine Fallzahl von $n=2$ und für G1-G3 jeweils eine Fallzahl von $n=9$. Die Fallzahlen bleiben für die folgenden Abbildungen identisch.

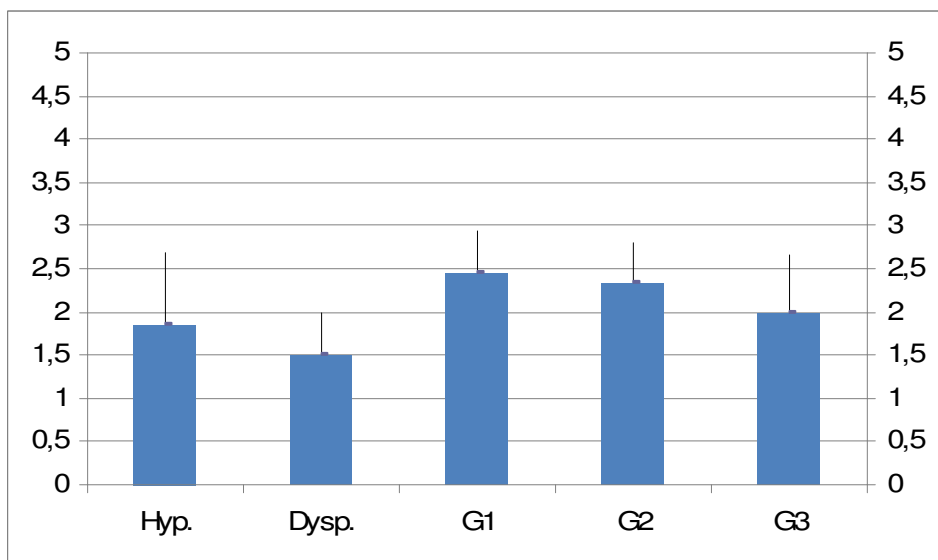


Abb.9. Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen für den monoklonalen Antikörper BC-3.

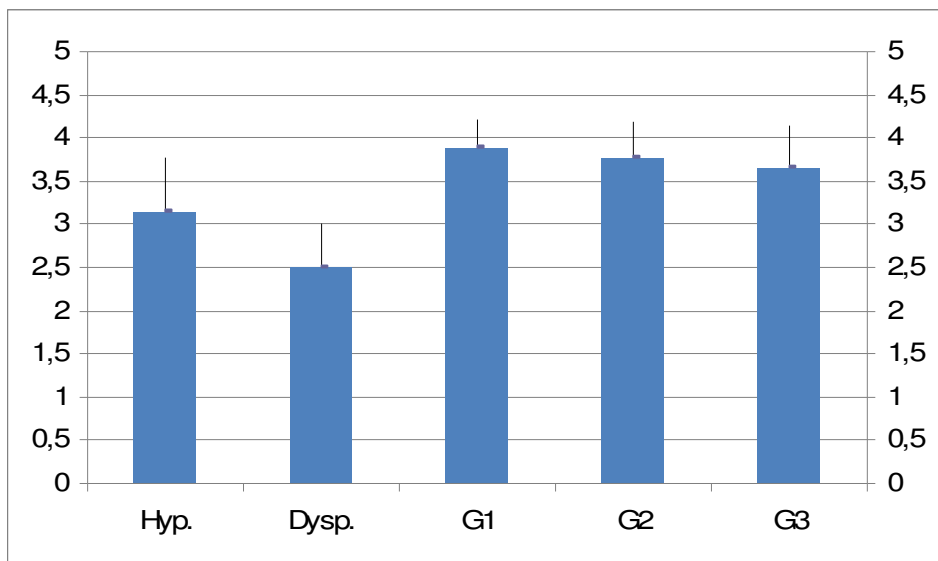


Abb.10 Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen für den monoklonalen Antikörper BC-4.

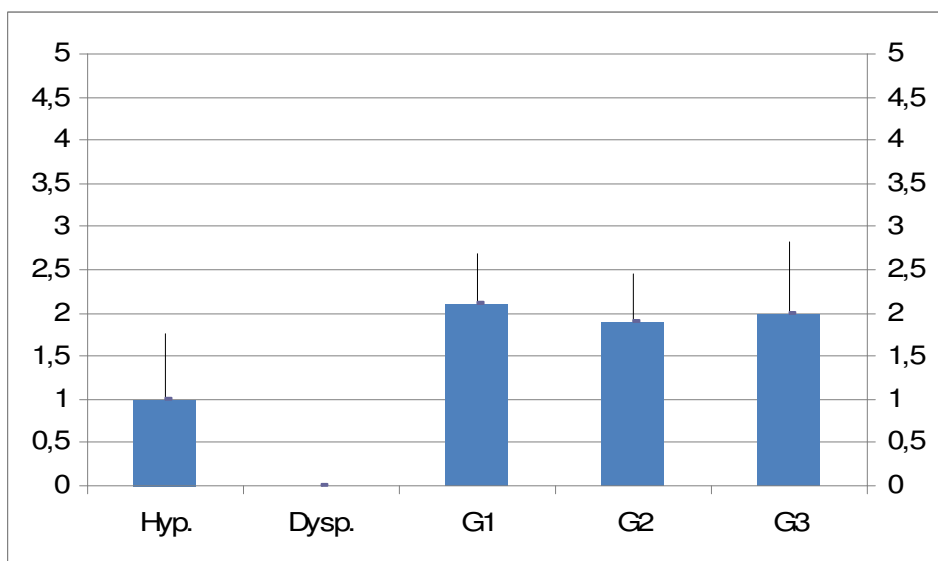


Abb.11 Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen für den rekombinanten Antikörper F-16.

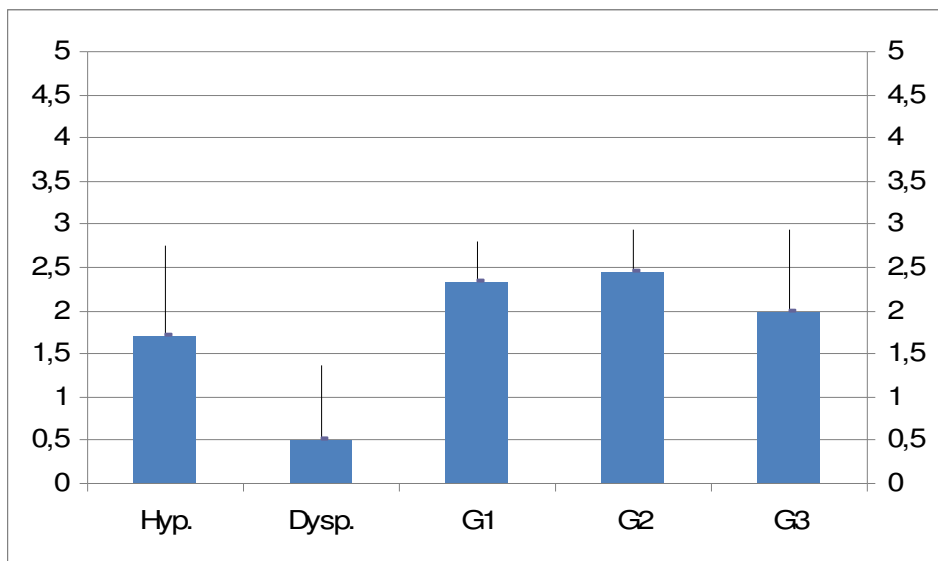


Abb.12 Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen für den rekombinanten Antikörper D-11.

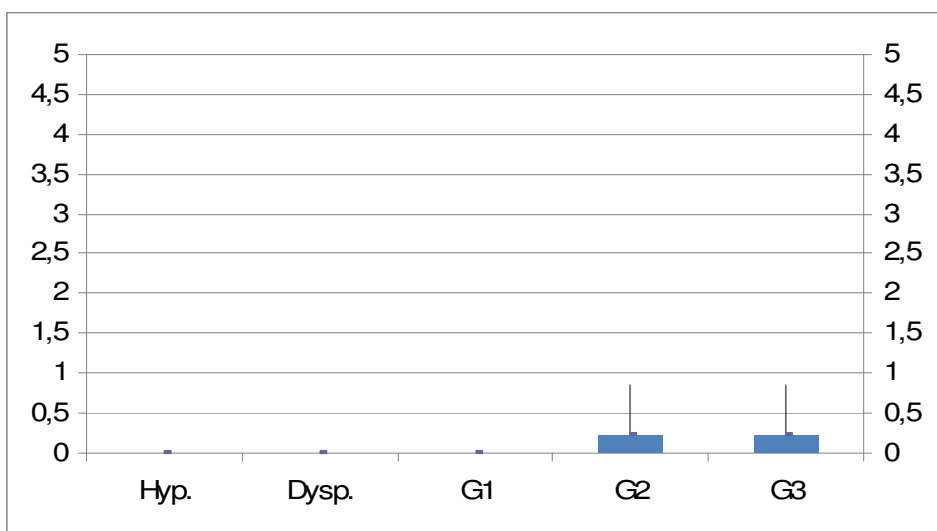


Abb.13 Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung für den rekombinanten Antikörper G-11.

Nachfolgend erfolgt die tabellarische Darstellung der statistischen Signifikanzen der einzelnen Antikörper bezogen auf die verschiedenen Malignitätsgrade. Die Präparate dysplastischer Mundschleimhaut wurden in die Betrachtung nicht mit eingeschlossen, da ihre Fallzahl mit $n=2$ zu gering und damit eine statistisch verwertbare Aussage nicht möglich war.

Bei der statistischen Auswertung mittels einfacher Kreuztabellen sowie unter Zuhilfenahme des Chi-Quadrat-Testes nach Pearson bestätigt sich der bereits in der immunhistochemischen Auswertung erkennbare Trend, dass sich die immunhistochemischen Expressionslevels der unterschiedlichen Spleißdomänen innerhalb der verschiedenen Malignitätsgrade nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Zwar differieren (wie bei der semiquantitativen Auswertung bereits beschrieben) die Markierungsmuster der einzelnen Antikörper innerhalb eines Falles voneinander; statistisch signifikante Unterschiede über alle Fälle insgesamt betrachtet im Vergleich der Gradingstufen konnten nicht belegt werden (alle p -Werte > 0.05). Einzig bei der globalen Betrachtung aller Fälle und aller Antikörper zusammen fallen statistisch signifikante Werte auf. Diese betreffen den monoklonalen Antikörper BC-4 mit einem p -Wert von 0.025 und den rekombinanten Antikörper F-16 mit einem p -Wert von 0.017. Dies lässt die Aussage zu, dass es Unterschiede bei der Ausprägung von gesamt-Tenascin-C (Antikörper BC-4) bzw. der A1-Spleißing-Domäne (Antikörper F-16) innerhalb aller betrachteten Fälle gibt. Wie sich diese Unterschiede allerdings manifestieren oder ob ein Zusammenhang zum Grading existiert, lässt sich hiervon jedoch nicht ableiten. Somit werden auch durch die statistische Auswertung die immunhistochemischen Ergebnisse sowie die Resultate der RT-PCR untermauert.

Tabelle 8 p -Werte der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Markierung der A1/A4-Domäne (Antikörper BC-2) für die einzelnen Gradingklassen (G1-G3) (χ^2 -Test).

BC-2	Hyperplasie	G1	G2	G3
Hyperplasie	-	0.205	0.139	0.462
G1	0.205	-	1.0	0.436
G2	0.139	1.0	-	0.689
G3	0.462	0.436	0.689	-

Tabelle 9 p-Werte der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Markierung der B-Domäne (Antikörper BC-3) für die einzelnen Gradingklassen (G1-G3) mittels Chi²-Test.

BC-3	Hyperplasie	G1	G2	G3
Hyperplasie	-	0.126	0.137	0.572
G1	0.126	-	1.0	0.361
G2	0.137	1.0	-	0.620
G3	0.572	0.361	0.620	-

Tabelle 10 p-Werte der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Markierung sämtlicher Tenascin-C-Spleißvarianten (Antikörper BC-4) für die einzelnen Gradingklassen (G1-G3) mittels Chi²-Test

BC-4	Hyperplasie	G1	G2	G3
Hyperplasie	-	0.053	0.126	0.212
G1	0.053	-	1.0	0.576
G2	0.126	1.0	-	1.0
G3	0.212	0.576	1.0	-

Tabelle 11 p-Werte der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Markierung der A1-Domäne (Antikörper F-16) für die einzelnen Gradingklassen (G1-G3) (Chi²-Test).

F-16	Hyperplasie	G1	G2	G3
Hyperplasie	-	0.099	0.198	0.071
G1	0.099	-	1.0	1.0
G2	0.198	0.576	-	0.576
G3	0.071	1.0	0.576	-

Tabelle 12 p-Werte der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Markierung der D-Domäne (Antikörper D-11) für die einzelnen Gradingklassen (G1-G3) mittels Chi²-Test.

D-11	Hyperplasie	G1	G2	G3
Hyperplasie	-	0.198	0.282	0.895
G1	0.198	-	1.0	0.793
G2	0.282	1.0	-	1.0
G3	0.895	0.793	1.0	-

Tabelle 13 p-Werte der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Markierung der C-Domäne (Antikörper G-11) für die einzelnen Gradingklassen (G1-G3) mittels Chi²-Test.

G-11	Hyperplasie	G1	G2	G3
Hyperplasie	-	-	1.0	1.0
G1	-	-	1.0	1.0
G2	1.0	1.0	-	1.0
G3	1.0	1.0	1.0	-

Tabelle 14 p-Werte der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Markierung aller Domänen und aller Gradingklassen mittels Chi²-Test.

Antikörper	BC-2	BC-3	BC-4	F-16	D-11	G-11
p-Wert	0.475	0.275	0.025	0.017	0.176	1.0

4.4. Resultate der RT-PCR

Nach der Extraktion von total-RNA aus zehn ausgewählten oralen Plattenepithelkarzinomen unterschiedlichen Malignitätsgrades (3xG1, 4xG2 und 3xG3) wurden diese der RT-PCR für β -Aktin, Gesamt-Tenascin-C und Tenascin-C-Spleißdomänen zugeführt und deren Ergebnis anschließend mit Hilfe der Gel-Elektrophorese ausgewertet. Dabei sollten die verschiedenen möglichen Tenascin-C-Spleißdomänen bei unterschiedlich differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden.

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Resultate für alle ausgewählten Primerkombinationen und Tumorfälle fotografisch dargestellt. Dabei kommt auf der linken Seite der Abbildungen jeweils die Basenpaarstandardleiter zur Darstellung, gefolgt von den zehn Amplifikationsprodukten der jeweiligen Tumorfälle sowie als letzte Bande die Negativkontrolle der RT-PCR unter Verwendung von Wasser. Zunächst wurde eine Kontroll-PCR mit β -actin in 1.000-facher Verdünnung der totalRNA hergestellt (Abb.14 (a)). β -actin stellt ein sogenanntes Housekeepinggen dar und ist somit in allen Zellen vorhanden, sodass seine Banden als semiquantitativer Vergleichswert zu den anderen PCR-Ergebnissen herangezogen werden können. Ebenso wie die darauffolgende Darstellung von Gesamt-Tenascin-C (Abb.14 (b) in 5.000-facher Verdünnung der totalRNA), das sämtliche Tenascin-C-Spleißvarianten erfaßt und somit auch als Bezugswert für die nachfolgenden PCR-Produkte gelten kann. Da bei den Referenz-RT-PCRs (β -aktin und gesamt-Tenascin-C) für alle zehn Tumorfälle eine etwa gleiche Bandenstärke nachweisbar ist, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass Unterschiede in den spleißdomänenspezifischen RT-PCRs tatsächliche Expressionsunterschiede innerhalb der verschiedenen Malignitätsgruppen repräsentieren und nicht möglicherweise auf unterschiedliche Mengen an zu amplifizierender RNA in den untersuchten Proben zurückzuführen sind.

Bei der Betrachtung der spleißdomänenspezifischen PCRs fällt insgesamt auf, dass sich die Amplifikationsprodukte innerhalb der verschiedenen Malignitätsgrade nicht auffallend voneinander unterscheiden, sondern in der Regel identische Banden in gleichartiger Intensität und Lokalisation abgebildet werden. Soweit dabei der experimentelle Ansatz eine derartige Aussage zulässt, wird deutlich, dass die Spleißdomänen A1, A2, A3, A4 und B in allen zehn Karzinomen immer exprimiert werden und deren Expression ebenfalls unabhängig vom Malignitätsgrad des jeweiligen Tumorfalles ist (Abbildung 14 Primerkombinationen T1-T16 (c) bis T4-T13 (f)). Somit kann man sagen, dass das RT-PCR Screening in diesem Bereich von Tenascin-C_L in der Regel immer alle hier möglichen Domänen erfasst. Eine Ausnahme stellt die Primerkombination T3-T14 dar (Abbildung 14 (e)), bei der zusätzlich bei 85bp in allen zehn Fällen andeutungsweise ein weiteres PCR-Produkt zu sehen ist. Diese Bande repräsentiert eine Spleißingvariante, bei der die A3-Domäne fehlt.

Im Gegensatz dazu kann man im Bereich der B- bis D-Domäne von Tenascin-C_L (Abbildung 14 Primerkombination T5-T12 (g) und Abbildung 15 Primerkombinationen T6-T12 (h) bis T7-T11 (l)) eine größere Variabilität in der Expression der einzelnen Spleißingdomänen feststellen. Dazu zählt unter anderem auch die parallele Existenz von Tenascin-C-Spleißvarianten, die von den Primerkombinationen T5-T12 (Abbildung 14 (g)) bis T7-T10 (Abbildung 15 (k)) erfasst werden. In diesem Bereich wird insbesondere eine differentielle Expression der AD1-, AD2-, C- und D-Domäne deutlich.

Unsere Aussagen stützen sich auf folgende PCR-Befunde: In Abbildung 15 wird beispielsweise bei der Primerkombination T7-T10 (k) bei 419 Basenpaaren für den zehnten Tumorfall keine Bande dargestellt (419bp entspräche der Spleißdomänenkombination: AD1-D). Allerdings erscheint bei einer Größe von 692 Basenpaaren für diesen Fall wieder ein Amplifikationsprodukt (entspricht der Spleißdomänenkombination: AD1-C-D), was ein Beispiel für eine differentielle Ausprägung spezieller Domänen in diesem Bereich von Tn-C_L ist. Auch bei der Primerkombination T5-T12 in Abbildung 14 (g) wird diese Aussage unterstützt, da sich hier bei 1076 Basenpaaren (entspricht der Spleißdomänenkombination: A4-B-AD2-AD1) auch nur in 6 von 10 Fällen ein PCR-Produkt darstellen lässt (was bedeutet, dass nicht alle Tumore die B- und gleichzeitig die AD2-Domäne

enthalten). Diese 6 Fälle entstammen unterschiedlichen Malignitätsgradgruppen, sodass kein Zusammenhang mit der Expression dieser Domänenkombination und dem Malignitätsgrad des Karzinoms hergestellt werden kann. Auch bei der Primerkombination T6-T12 (Abbildung 15 (h)) wird nur in sieben von zehn Tumorfällen RNA bei 637 Basenpaaren amplifiziert, was der Spleißdomänenkombination B-AD2-AD1 entspricht. Dies ist ebenfalls ein Indiz für die differentielle Expression bestimmter Domänen. Auch bei diesem Beispiel existiert kein Zusammenhang mit dem Malignitätsgrad der betreffenden Tumorfälle. Interessanterweise treten bei dieser Primerkombination (T6-T12, Abbildung 15 (h)) auch Banden bei etwa 900 Basenpaaren auf, die allerdings keiner der bisher bekannten Domänenkombination entsprechen. Aufgrund einer relativ stabilen Größe von ca. 270 Basenpaaren je Spleißdomäne sollte bei diesem Produkt die Existenz einer bislang unbekannten Domäne im Bereich des von dieser Primerkombination erfassten Molekülabschnittes von Tenascin-C in Betracht gezogen werden. Ebenso wie bei T6-T12 treten auch bei der Primerkombination T5-T12 (Abbildung 14 (g)) Banden auf, die keiner bekannten Domänenstruktur entsprechen. Diese befinden sich aber in diesem Fall außerhalb der Standardleiter und können in ihrer Größe somit nur schwer abgeschätzt werden. Zusätzlich scheinen innerhalb der Tumorfälle auch Unterschiede bezüglich der Expression dieser Domänen eine Rolle zu spielen, da sich die Banden qualitativ voneinander unterscheiden. Für eine genaue Definition der Domänenstruktur in diesem Bereich bedarf es Sequenzierungsanalysen, die Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein sollten.

Desweiteren existieren auch Primerkombinationen, bei denen man sich nicht mit eindeutiger Sicherheit auf die enthaltene Domänenstruktur festlegen kann, da sich die möglichen Amplifikationsprodukte hier nur um wenige Basenpaare (bp) voneinander unterscheiden. So zum Beispiel bei der Primerkombination T5-T12 (Abbildung 14 (g)), wo rechnerisch bei 793bp bzw. bei 803bp PCR-Produkte zu erwarten sind, welche entweder den Einschluß der B-Domäne oder der AD2-Domäne von Tn-C_L repräsentieren. Im Gel ist in diesem Bereich nur eine Bande zu erkennen, sodass es sich entweder um die eine oder um die andere Domäne handeln muss. Eine genaue Zuordnung ist aber aufgrund der zu geringen Basenpaardifferenz zwischen beiden möglichen Produkten und der

schlechten Auflösung der Standardleiter nicht möglich. Daher kann ein exaktes Festlegen auf die enthaltene Domäne (B oder AD2) im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen. Ähnlich wie eben beschrieben, verhält es sich auch bei der Primerkombination T6-T11 (Abbildung 15 (i)) wo bei 456bp bzw. bei 459bp folgende Domänenkombinationen möglich sind: B-AD2-C oder B-AD1-C (auch in diesem Fall ist nur eine Bande sichtbar, wodurch auch hier nur eine Domänenkombination möglich wird) oder bei der Primerkombination T6-T10 (Abbildung 15 (j)) bei 506 bzw. 509 Basenpaaren, die den Einschluß der C- oder der AD1-Domäne wahrscheinlich machen. Auch hier kommt nur eine Bande im Agarosegel zur Darstellung, die entweder bei 506bp oder bei 509bp zu sehen ist. Wie bereits erwähnt, ist ein genaues Festlegen auf die tatsächliche Domänenstruktur nicht möglich. Auch hier ist eine genauere Aussage über die tatsächlichen Domänenkombinationen in diesem Bereich von Tenascin nur mit Hilfe von Sequenzierungsexperimenten möglich.

In der Zusammenfassung der RT-PCR Screeningexperimente ergibt sich eine relative Konstanz der Expression aller Spleißdomänen im Bereich der Domänen A1-B. Im Bereich der Spleißdomänen B bis D zeigt sich eine größere Variabilität möglicher Tn-C-Spleißvarianten, wobei jedoch eine Korrelation zum Malignitätsgrad der untersuchten Tumoren nicht zu verzeichnen ist. Allerdings lässt sich eine Tendenz in Richtung verstärkter Expression der AD2-Domäne bei schlechter differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen beobachten. Zusätzlich auftretende, der bekannten Domänensequenz im Bereich B bis C nicht zuzuordnende, Amplifikationsprodukte führen zu der Annahme einer weiteren, bislang nicht bekannten Domäne in diesem Bereich.

4.5. Vergleich der immunhistochemischen und der RT-PCR Resultate

Beim Vergleich der Ergebnisse der Immunhistochemie und der Resultate der RT-PCR fällt auf, dass sich diese nicht wesentlich voneinander unterscheiden und insgesamt die RT-PCR die Ergebnisse der Immunhistochemie bestätigen. Dementsprechend bestätigen sich auch bei der RT-PCR die Hinweise, dass sich die Domänenstrukturen der verschiedenen möglichen Spleißvarianten von Tenascin-C_L innerhalb der unterschiedlichen Malignitätsgrade der oralen Plattenepithelkarzinome nicht voneinander unterscheiden. Für fast alle immunhisto-

chemisch nachgewiesenen Domänen konnte auch ein entsprechendes Transkript in der PCR nachgewiesen werden. So repräsentiert der monoklonale Antikörper BC-2 in der Immunhistochemie die A1/A4-Domäne, BC-3 die B-Domäne, BC-4 das Gesamt-Tenascin, die rekombinanten Antikörper F-16 die A1-Domäne und D-11 die D-Domäne. Allerdings findet sich trotz Vorhandenseins eines mRNA-Transkriptes in der RT-PCR für die C-Domäne (sie wird immunhistochemisch durch den rekombinanten Antikörper G-11 repräsentiert), kein immunhistochemisches Korrelat - der Antikörper G-11 war lediglich in zwei Tumorfällen positiv.

Weiterhin wurden auch die semiquantitativen Unterschiede in der immunhistochemischen Verteilung der unterschiedlichen Spleißdomänen nicht durch die RT-PCR-Resultate reflektiert. Hier wurden sämtliche Banden in ähnlicher Intensität und Breite im Agarosegel dargestellt, was eine gleichartige Expression der Spleißdomänen in den Fällen unterschiedlichen Malignitätsgrades impliziert. Wirkliche Expressionsunterschiede auf mRNA Ebene können allerdings nur im Rahmen einer quantitativen real-time-RT-PCR-Analyse nachgewiesen werden, da bei dieser Form der PCR die einzelnen Amplifikationszyklen in Zahl und Dauer genau definiert sind und somit Unterschiede bei den Amplifikaten im Vergleich zu *house keeping*-Genen exakt vergleichbar werden.

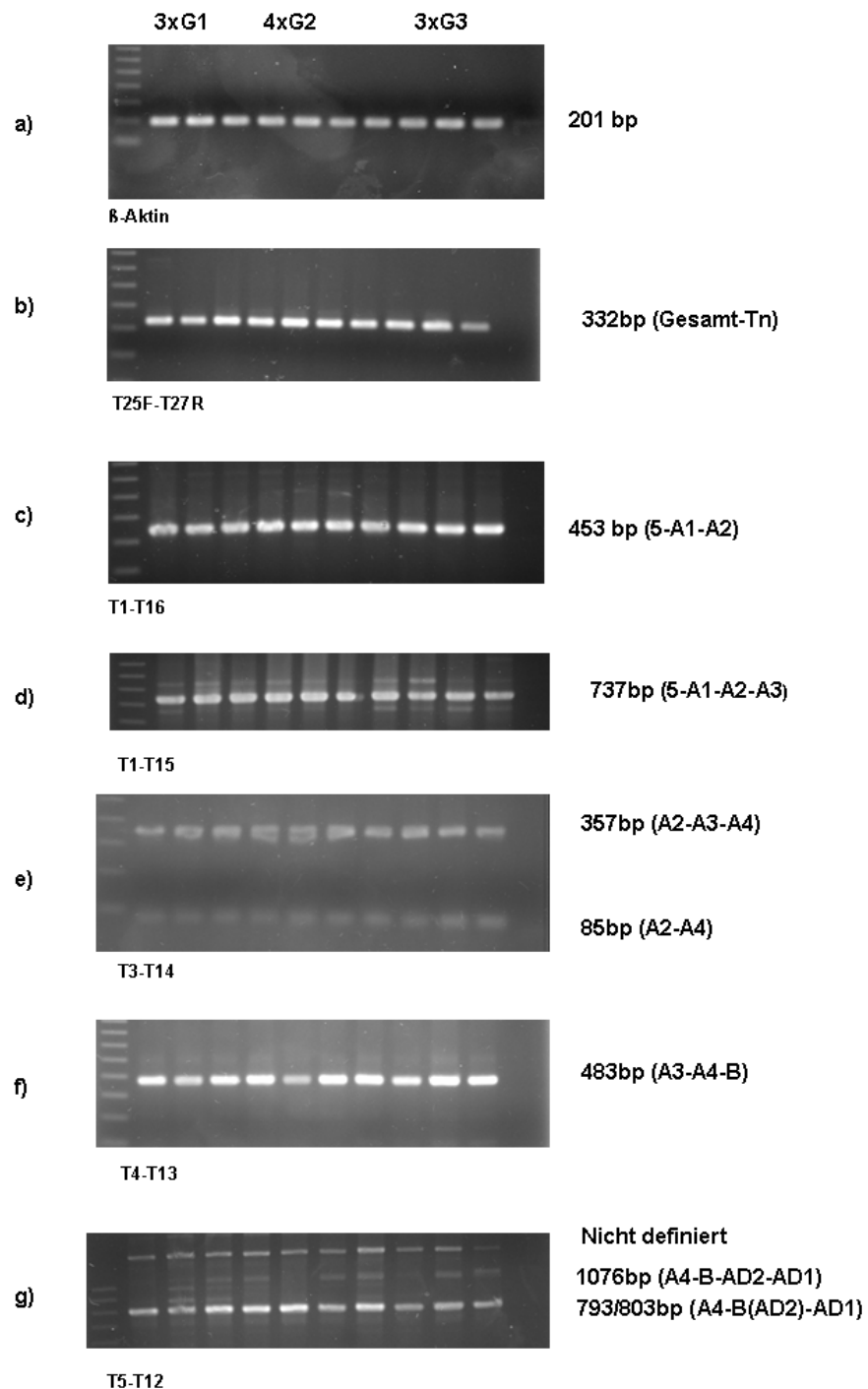


Abbildung 14 Elektrophoretische Auswertung der β-Aktin und Gesamt-Tenascin-C RT-PCRs sowie der Spleißdomänen-spezifischen RT-PCRs für Tenascin-C. Unter den jeweiligen Abbildungen befinden sich die entsprechenden Primerkombinationen sowie rechtsseitig die zugehörige Größenangabe der resultierenden Amplifikationsprodukte

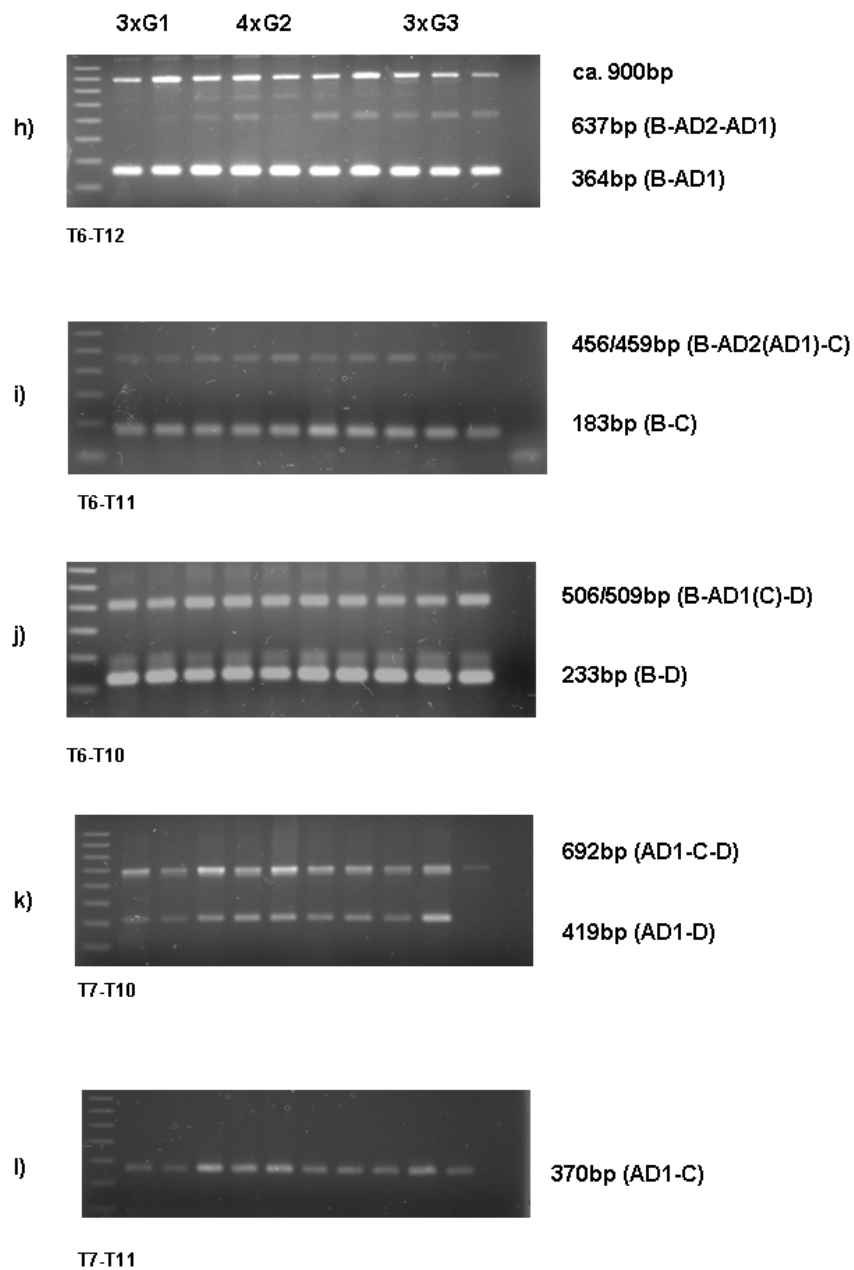


Abbildung 15 Elektrophoretische Auswertung der Spleißdomänen-spezifischen RT-PCRs für Tenascin-C. Unter den jeweiligen Abbildungen befinden sich die entsprechenden Primerkombinationen sowie rechtsseitig die zugehörige Größenangabe der resultierenden Amplifikationsprodukte

5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Promotion erfolgte eine umfassende Analyse der histologischen Verteilungsmuster verschiedener Tenascin-C-Spleißdomänen im oralen Plattenepithelkarzinom. Dabei sollte vor allem die Frage geklärt werden, ob es eine Korrelation zwischen der Verteilung möglicher spezifischer Spleißingvarianten von Tenascin-C und dem Grading der untersuchten Karzinome gibt.

Tenascin-C gehört zu einer Gruppe von oligomeren Glykoproteinen, die Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln, motilitätsfördernd agieren und in Prozesse der embryonalen Entwicklung ebenso integriert sind wie in physiologische (Wundheilung) oder pathologische Vorgänge (Tumorgenese, Mackie et al. 1999). Seine physiologische Rolle reicht von mesenchymal-epithelialen Interaktionen während des Gewebsremodellings über die Modulation von Adhäsion und Proliferation verschiedener Zellarten (Fischer et al. 1997) bis zum Beeinflussen wichtiger Signalwege (z.B. bei der Tumorentwicklung; Orend et al. 2006).

Strukturell besteht Tenascin-C aus 6 Monomeren (Hexabrachion = 6-armig) mit einem Molekulargewicht von 180-250 kDa, die an ihrem N-terminalen Ende über Disulfidbrücken verbunden sind. Jede Untereinheit besteht aus 4 Hauptbestandteilen: eine kugelförmige N-terminale Domäne, 14,5 EGF-ähnliche Wiederholungen, 9 Fibronectin Typ III ähnliche Wiederholungen und dem Carboxyl-Rest, welcher Homologien zu der kugelförmigen Domäne der β - und γ -Kette von Fibrinogen aufweist (Gulcher et al. 1991). Bisher wurden insgesamt vier Tenascin-Gene charakterisiert (Tenascin C, R, X und W), von denen Tenascin-C allerdings die bestuntersuchtete Variante darstellt (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2004). Durch den Vorgang des alternativen Spleißens innerhalb der 9 Fibronectin Typ III ähnlichen Wiederholungen bei humanem Tenascin, können durch das Enthalten oder Fehlen bestimmter Domänen (A1-D) verschiedene Spleißvarianten von Tenascin-C entstehen. Nach Häufigkeit und Vorkommen lassen sich dabei zunächst zwei Hauptformen von Tenascin-C unterscheiden. Zum einen die „kleine“ (= small) Variante Tenascin-C_S und zum anderen die „große“ (= large) Variante Tenascin-C_L. Tenascin-C_L ist vor allem mit fetalen Membranen (McParland and Bell, 1998; McParland et al. 1998), erhöhter Mito-

serate, Zellmigration, Wundheilung und Tumorgenese assoziiert. Desweiteren kann es auch bei der Verminderung von fokalen Adhäsionsvorgängen nachgewiesen werden. Die „kleine“, gespleißte Variante Tn-C_S wird dagegen überwiegend in stabilen Matrices wie zum Beispiel Sehnen oder Knorpel, aber auch in Situationen wie aktivem Gewebsremodelling z.B. Neubildungen oder in der Entwicklungsphase, exprimiert (Bell et al. 1999).

Ein Anliegen dieser Promotion war es, die differentielle Expression von Tenascin-C-Spleißdomänen im oralen Plattenepithelkarzinom nachzuweisen, da wissenschaftliche Arbeiten speziell zu diesem Gebiet bisher nur in sehr geringem Umfang zur Verfügung stehen und Tenascin-C möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression und der Metastasierung spielt. Der Nachweis der verschiedenen Spleißdomänen sollte dabei zum einen immunhistochemisch mit Hilfe domänenspezifischer Antikörper (monoklonal und rekombinant) und zum anderen mittels RT-PCR erfolgen.

5.1. Immunhistochemische Expression von Tenascin-C-Spleißdomänen im OSCC

Bei Betrachtung der immunhistochemischen Expression der einzelnen Tenascin-C-Spleißdomänen im oralen Plattenepithelkarzinom lassen sich insgesamt für alle untersuchten Fälle keine signifikanten Unterschiede bezüglich deren Verteilung feststellen. Während sich in normaler Mundschleimhaut die Verteilung von Tenascin-C auf die Strukturen der Basalmembran beschränkt und sich hier zumeist als dünne Linie mit einzelnen Kaliberschwankungen darstellt (Shrestra et al. 1994; Mori et al. 1996; Hindermann et al. 1999), kommt es bereits in den Präparaten hyperplastischer Mundschleimhaut zu einer zusätzlichen Ansammlung geringerer Mengen von Tenascin-C im subepithelialen Bindegewebe. Desweiteren lässt sich ausgehend von den Präparaten dysplastischer Mundschleimhaut bis hin zu den mäßig differenzierten Karzinomen ebenfalls eine Zunahme der stromalen Verbreitung von Tenascin-C bei allen domänenspezifischen Antikörpern verzeichnen (die schlecht differenzierten Karzinome zeigten bereits einen leichten Rückgang der stromalen Depositionen von Tn-C). Auch Ramos und Mitarbeiter (1997 und 1998) konnten mit steigendem Dyspla-

siegrad eine charakteristische Zunahme der Tenascin-Expression feststellen. Allerdings kann man in keinem der bei uns untersuchten Fälle eine für den Malignitätsgrad spezifische und damit differentielle Expression einer bestimmten Tenascin-C-Domäne nachweisen. Somit gehen unsere Ergebnisse letztendlich mit denen anderer wissenschaftlicher Arbeiten bezüglich der Immunhistochemie für Tn-C konform. Allerdings konnten wir bei unseren Präparaten keinen Zusammenhang von Entzündungsgrad und der Tenascinexpression, wie bei Tiitta und Mitarbeitern beschrieben, nachweisen. Auch das von Herold-Mende und Mitarbeitern (1999) beschriebene abrupte Abbrechen der Tenascindepotionen an der Tumorgrenze konnte von uns nicht bestätigt werden, was aber zum Teil daran liegen könnte, dass bei den von uns untersuchten Präparaten überwiegend Tumorgewebe ohne angrenzendes Epithel vorlag. Während sich Tn-C vorwiegend im Tumorstroma detektieren lässt, zeigt sich eine tendenzielle Zunahme der zytoplasmatischen Positivität der Tumorzellen selbst (bis zu den mäßig differenzierten Karzinomen). Diese Markierungen haben diagnostische Bedeutung. So konnten Driemel und Mitarbeiter 2007a,b) zeigen, dass Tn-C ein Indikator für atypische Zellen in oralen Bürstenbiopsien ist.

Einen interessanten Aspekt bezüglich der Expression von Tenascin-C_L im OSCC während der Tumorentwicklung konnten Franz und Mitarbeiter (2007) darstellen. Sie wiesen mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie eine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der Tn-C_L-Anordnung in reorganisierten Strukturen der Basalmembran und dem Malignitätsgrad von oralen Plattenepithelkarzinomen nach. Sie konnten in normaler Mundschleimhaut ebenfalls keine Tenascin-C-Depositionen nachweisen, wohingegen in Präparaten hyperplastischer Schleimhaut bereits subepitheliale Markierungen sichtbar waren. Da der Malignitätsgrad Faktoren wie die Tumorzellendifferenzierung und invasive Eigenschaften eines Tumors wiedergibt, könnte der erhöhte Tn-C-Gehalt damit auch für tumorbiologische Verhaltensweisen relevant sein, was in Zukunft aber noch genauer geprüft werden sollte (Franz et al. 2007).

Anders als zur differentiellen Expression von Tenascin-C-Spleißvarianten, wo Mighell et al. (1997) mit der ersten Arbeit auf diesem Gebiet einen bedeutenden Beitrag leisteten, existieren bereits einige Studien, die sich mit Tenascin-C und Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich allgemein befasst haben. So haben bei-

spielsweise Herold-Mende und Mitarbeiter (1999) auch untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression von Tenascin-C und der Tumorpheriferation bzw. dem TNM-Stadium von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich gibt. Hierbei konnte allerdings nur eine selektive Expression innerhalb der Karzinome nachgewiesen werden, ein Zusammenhang zwischen TNM-Klassifikation und Tenascinexpression war nicht belegbar. Desweiteren haben Pauli und Mitarbeiter (2002) mittels ELISA zeigen können, dass sich bei Patienten mit einer Rezidivkrankung oder mit einem weit fortgeschrittenem Kopf-Hals-Tumor, signifikant erhöhte Serumspiegel von Tenascin-C nachweisen lassen, dieser Umstand Tenascin-C aber nur bedingt als klinischen Verlaufsparemeter zulässt. Atula und Mitarbeiter (2003) konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Tn-C-Expression und spezifischen Chararkteristiken oraler und pharyngealer Plattenepithelkarzinome und den Eigenschaften der Patienten herstellen. Auch sie konnten Tenascin nicht als signifikanten Prognosefaktor für das Überleben bei derartigen Tumoren bestätigen. Somit erscheint es insgesamt schwierig, die exakte Rolle von Tenascin-C im OSCC zu definieren. In der Regel wurde zudem bei den benannten Arbeiten nur Gesamt-Tenascin-C untersucht und nicht im Einzelnen auf mögliche Unterschiede bei der differentiellen Expression von Tenascin-C-Spleißvarianten eingegangen. Deshalb haben wir durch die Verwendung verschiedener domänenspezifischer Antikörper versucht zu zeigen, ob sich mit steigendem Malignitätsgrad eine Änderung in der Tenascin-C-Expression nachweisen lässt und ob diese mit speziellen Tenascin-C-Spleißvarianten einhergeht.

5.2. Expression von Tenascin-C und Tenascin-C-Spleißdomänen in weiteren Tumorentitäten- ein Vergleich

Im Gegensatz zum oralen Plattenepithelkarzinom, konnte für einige andere Tumorentitäten ein Zusammenhang von klinischen Parametern und der Expression von Tenascin-C gezeigt werden. Dies gilt beispielsweise für das kolorektale Karzinom, das zervikale Karzinom, das Mammakarzinom und das Karzinom der Papilla Vateri, wo die Tenascin-C-Expression signifikant mit der Prognose der betreffenden Patienten korreliert (Juuti et al. 2004). Juuti und Mitarbeiter konnten dabei gleichzeitig nachweisen, dass es im Pankreaskarzinom

zwar zu einem erhöhten Gehalt an Tenascin-C kommt, dieser allerdings nicht in allen Fällen repräsentativ war und somit Tn-C hierfür nicht als Prognosefaktor postulierbar ist. Riedl et al. wiesen schon 1992 einen deutlich erhöhten Tenascin-C-Gehalt in kolorektalen Karzinomen (im Gegensatz zur normalen Dickdarmschleimhaut und der Schleimhaut in kolorektalen Adenomen) nach, der die Assoziation der Tenascin-C-Induktion mit einer malignen Erkrankung reflektierte. Im Jahre 2007 wiesen Takeda et al. Tn-C_L als signifikanten Biomarker für das kolorektale Karzinom nach. Sie stellten eine deutliche Signifikanz zwischen dem Plasmaspiegel von Tn-C_L und Lymphknoten-Metastasen (Lk-MTS) sowie dem TNM-Staging fest. Die Sensitivität von Tn-C_L war dabei deutlich höher als bei den üblichen Tumormarkern wie CEA und CA19-9, denn es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen operativer Kurabilität und Fehlen von Tn-C (Takeda et al. 2007). Derartige Nachweise gelangen für das orale Plattenepithelkarzinom bisher noch nicht.

Für das Magenkarzinom konnten Wiksten und Mitarbeiter (2003) keine signifikante Korrelation zwischen der Ausprägung der Tenascinexpression und dem Lymphknotenstatus, Fernmetastasen, der Laurén- oder Borrmannklassifikation, dem Geschlecht oder der Tumorgroße nachweisen. Dennoch schien die Tenascin-C-Expression dabei mit dem tumorassoziierten Überleben korreliert zu sein (vermehrtes Auftreten von Tenascin-C mit einer guten Prognose beschrieben Wiksten und Mitarbeiter 2003), brachte aber keine zusätzliche prognostische Information. Dass die Tenascin-C-Expression nicht mit der Invasionstiefe, den Lymphknotenmetastasen oder der Prognose korreliert, beschrieben 1995 Ikeda und Mitarbeiter. Sie führten Tenascin-C maximal als stromalen Marker zur frühen Detektion von Magenkrebs an.

Im Falle von Gliomen und Astrozytomen wurde nachgewiesen, dass eine starke Tenascin-C-Expression mit einem höheren Tumorgading und stärkerer Neovaskularisation einhergeht (Herold-Mende et al. 2002; Zagzag et al 1995; Higuchi et al. 1993). Zudem war eine erhöhte Tenascin-C-Expression in Gliomen mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet (Orend et al. 2006).

Eine Korrelation von Tumorneovaskularisation und Tn-C-Expression konnte für die von uns untersuchten oralen Plattenepithelkarzinome nicht nachgewiesen

werden. Hier war die quantitative Verteilung von Tenascin-C über alle Gradingstufen relativ gleichmäßig.

Für das Mammakarzinom konnte die Expression von Tenascin-C in der Invasionszone als Vorhersagewert für ein Lokal- bzw. ein Fernrezidiv bestimmt werden (Jahkola et al. 1998; Ishihara et al. 1995; Tsunoda et al. 2003). Dabei sollte insgesamt die Verteilung und die Lage der Tenascin-C-Synthese eine größere Rolle spielen als das Vorhandensein von Tn-C an sich. Ishihara et al. beschrieben bereits 1995 eine erhöhte Frequenz von Lymphknotenmetastasen bei Patientinnen, bei denen Tenascin-C im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen wurde. Zudem wiesen sie ein kürzeres Überlebensintervall für die Patienten mit Tenascin-C-positiven Karzinomzellen nach.

Leprini et al. (1994) stellten insgesamt eine im Vergleich zum jeweiligen Tumorsprungsgewebe generelle Überexpression der „großen“ Tenascin-C-Isoform im entsprechend resultierenden malignen Prozeß fest. Auch für das Schilddrüsen-Ca wiesen Tseleni et al. (2006) vor allem Tn-C_L als vorherrschende Tenascin-C-Spleißvariante nach (Ausnahme: das medulläre Schilddrüsen-Ca). In den zuvor genannten Tumorbeispielen und Studien wurde in der Mehrzahl der Fälle auf die „große“ Spleißvariante von Tenascin-C (Tn-C_L) bzw. die „große“ und „kleine“ (Tn-C_S) Spleißvariante eingegangen. Darüberhinaus existieren auch Untersuchungen, die sich im Speziellen mit einzelnen Domänen oder Spleißvarianten (über Tn-C_L und Tn-C_S hinaus) beschäftigt haben, sodass im Folgenden noch einmal auf diese Studien eingegangen werden soll.

Zu solchen Untersuchungen zählt z.B. die Arbeit von Adams et al. (2002), in der gezeigt werden konnte, dass die Tenascin-C-Isoformen, welche die B-Domäne enthielten, sehr stark mit dem Auftreten des invasiven Mammakarzinoms assoziiert waren. Berndt und Mitarbeiter konnten (2006) im Rahmen von Studien am Urothelkarzinom der Blase immunhistochemisch zeigen, dass Tenascinvarianten, die die A1-, B- und/oder D-Domäne enthielten, eine deutlich verstärkte Expression in invasiven Karzinomen, Tumorgefäßen sowie betroffenem Muskelgewebe aufwiesen. Gleichzeitig konnte von ihnen eine relative Stabilität im Bereich der A1-A3-Domäne innerhalb der verschiedenen Karzinome belegt werden, was mit unseren Ergebnissen im OSCC weitestgehend übereinstimmt. Auch das relative rare Auftreten der AD-1- und C-Domäne wies Parallelen zu

unseren Ergebnissen auf. Carnemolla et al. (1999) beschrieb in diesem Zusammenhang auch ein eher restriktives Auftreten der C-Domäne (bei Glioblastomen), sowie ein generelles Fehlen dieser Tenascindomäne in normalem adulten Gewebe sowie in Karzinomen der Mamma, der Lunge, des Magens, in Meningiomen oder auch niedrigmalignen Astrozytomen. Im Gegensatz dazu konnte eine Zunahme der C-Domänen-Expression in hochmalignen Astrozytomen vor allem in der Nähe vaskulärer Strukturen und proliferierender Zellen nachgewiesen werden (Carnemolla et al. 1999). Da wir die C-Domäne mittels des G-11-Antikörpers auch nur in lediglich zwei Fällen nachweisen konnten, können wir die Aussage von Carnemolla und Mitarbeitern (1999) bezüglich der restriktiven Verteilung der C-Domäne für das orale Plattenepithelkarzinom bestätigen. Im Gegensatz dazu konnten von Lukowicz und Mitarbeiter (2007), mit Hilfe des G-11-Antikörpers, die C-Domäne gehäuft in murinen atherosklerotischen Plaques ex vivo darstellen. Unterschiede in der Reaktivität der verwendeten Antikörper können neben einer möglichen Spezies-Spezifität auch durch eine eingeschränkte Sensitivität nach Biotinylierung des von uns verwendeten rekombinanten Antikörpers begründet sein.

Interessant ist auch die Tatsache, dass die Tenascin-C-Expression in einigen Tumoren mit deren malignem Verhalten korreliert. Dies trifft z.B. für das Kolonkarzinom, das Mammakarzinom, das Prostatakarzinom, Fibrosarkome, Bronchialkarzinome, Melanome und Gliome zu (Chiquet-Ehrismann et al. 1991; Sage & Bornstein, 1991; Erickson & Bourdon, 1989). Warum Tenascin-C in einigen Tumoren mit einer guten und zu anderen Teil aber mit einer schlechten Prognose korreliert, konnte bislang noch nicht endgültig geklärt werden.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass sich die biologische Signifikanz von Tenascin-C bzw. Tenascin-C-Spleißvarianten in den einzelnen Tumorentitäten z.T. erheblich voneinander unterscheiden. Demnach kann man davon ausgehen, dass die verschiedenen Funktionen dieses Matrixproteins nicht unwesentlich von Faktoren wie der Differenzierung des Ursprungsgewebes, der Tumorart aber auch mit dem Grad der Tumorzelledifferenzierung und weiterer Parameter beeinflusst werden. Zudem stellt Tenascin-C einen allgemeinen Parameter dar, der bei jeglichen Prozessen zugegen ist, die mit Gewebsremodelling einhergehen, wodurch dessen Nachweis mittels Immunhistochemie nicht

zwingend tumorspezifisch sein muss und eine Differenzierung zu Phänomenen wie z.B. der entzündlichen Infiltration in der Histologie schwierig ist.

5.3. Expression von Tenascin-C in benignen Läsionen

Wie bereits zu Anfang erläutert, existiert eine erhöhte Expression von Tenascin-C nicht nur in malignen Prozessen, sondern auch in benignen Veränderungen verschiedener Gewebe. Dazu gehören beispielsweise auch Veränderungen in der Lunge wie bei der idiopathischen Lungenfibrose, der Sarkoidose und dem Asthma (Kaarteenaho-Wiik et al. 1998) oder auch bei der Kolitis (Riedl et al. 1992), der Myelofibrose (Soini et al. 1993) oder der Synovitis (McCachren & Lightner et al. 1992). Bei Untersuchungen der chronischen Hepatitis C haben Elkaref und Mitarbeiter (2007) festgestellt, dass „große“ Tenascin-Spleißvarianten in der normalen Leber nicht auftreten, sondern erst ein Merkmal chronischer Hepatitiden sind und dort möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Fibrose dieses Organs spielen. Da Tn-C im Rahmen chronischer Entzündungen in verschiedensten Gewebearten nachweisbar war, erscheint auch die Tatsache interessant, dass Tenascin-C die adhäsiven Eigenschaften von Monozyten, B und T-Zellen alteriert (Ruegg et al. 1989) und befähigt ist, die T-Zell-Aktivierung zu inhibieren. Dabei konnte man belegen, dass zwei bestimmte Domänen von Tn-C (A1- und die A2-Domäne) als „minimale Region“ notwendig sind um T-Zellen zu supprimieren. Eine maximale Inhibition benötigt außerdem die A3-Domäne (in vitro) Puente Navazo et al. (2001). Die funktionelle Rolle von Tenascin-C im Rahmen der Entzündungsregulation ist bislang allerdings nicht vollständig verstanden.

Ebenso wie bei dem oralen Plattenepithelkarzinom konnten in unterschiedlichen dermalen Läsionen (von Psoriasis bis epidermale Tumoren) mittels verschiedener Antikörper (sowohl Ak, die alle Tn-C-Isoformen binden als auch Ak, die auf spezielle Domänen reagieren) keine voneinander abweichenden Verteilungsmuster nachgewiesen werden (Latijnhouwers et al. 2000). Bezüglich der differentiellen Expression von Tenascin-C-Spleißdomänen haben Wallner und Mitarbeiter (2002) nachweisen können, dass glatte Muskelzellen nach dem invasiven Eingriff der Ballonkatheterisierung vorwiegend die Tn-C-Isoformen exprimieren, welche die A1- und A2-Repeats enthalten.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass sich die biologische Signifikanz von Tenascin-C bzw. Tenascin-C-Spleißvarianten in den einzelnen Tumorentitäten z.T. erheblich voneinander unterscheiden. Demnach kann man davon ausgehen, dass die verschiedenen Funktionen dieses Matrixproteins nicht unwesentlich von Faktoren wie der Differenzierung des Ursprungsgewebes, der Tumorart aber auch mit dem Grad der Tumorzelledifferenzierung (und womöglich noch einigen anderen Parametern) beeinflusst werden. Zudem stellt Tenascin-C einen allgemeinen Parameter dar, der bei jeglichen Prozessen zugegen ist, die mit Gewebsremodelling einhergehen, wodurch dessen Nachweis in der Immunhistochemie nicht nur tumorspezifisch sein muss und damit der Methode insgesamt Grenzen gesetzt sind.

5.4. Die immunhistochemische Expression von Tenascin-C-Spleißvarianten im OSCC- Korrelation zum Grading und mögliche biologische Bedeutung

Wie im vorangehenden Text bereits erwähnt, lässt sich in den von uns untersuchten Fällen keine eindeutige Zuordnung von bestimmten Tenascin-C-Spleißdomänen zu einem entsprechenden Malignitätsgrad feststellen, denn die verschiedenen Domänen waren über alle Fälle in ähnlicher Weise vertreten. Dabei wurden die durch die monoklonalen Antikörper markierten Domänenkombinationen am stärksten hervorgehoben (BC-4: markiert alle möglichen Tenascin-C-Varianten; BC-2: markiert Tenascin-C-Varianten, die die Domänen A1-A4 enthalten). Wie schon bei Hindermann und Mitarbeitern (1999) beschrieben, konnten über die verschiedenen Gradingstufen keinerlei Unterschiede bei dem Verteilungsmuster dieser domänenspezifischen Antikörper (BC-2 und BC-4) im OSCC festgestellt werden.

Die B-Domäne (BC-3) konnte zwar auch in allen Präparaten nachgewiesen werden, allerdings in deutlich geringerer Intensität im Vergleich zu den beiden anderen monoklonalen Antikörpern BC-4 und BC-2. Wie auch Carnemolla und Mitarbeiter bereits 1999 in Glioblastomen festgestellt haben, kommt die C-Domäne von Tn-C_L, die bei uns durch den rekombinanten Antikörper G-11 erfaßt wurde, auch im oralen Plattenepithelkarzinom eher restriktiv zur Darstellung. Für eine gewebspezifische Expression der C-Domäne spricht auch der

Befund von von Lukowicz et al. (2007), die mittels des Antikörpers G-11 die C-Domäne von Tenascin-C in atherosklerotischen Plaques, allerdings von Mäusen, nachgewiesen haben. Eine besondere Bedeutung wurde der C-Domäne auch im Rahmen neuronaler Aussprossung in vitro beigemessen (Liu et al. 2005), was sich allerdings nicht mit der Aussage von Meiners et al. (1999) deckt, die die A-D-Domäne in diesem Zusammenhang nannten.

Tenascin-C-Varianten, die die A1-Domäne enthielten (dargestellt durch den rekombinanten Antikörper F-16) und Tenascin-C-Varianten, welche die D-Domäne beinhalteten (Antikörper D-11), konnten in etwa gleichem Ausmaß nachgewiesen werden, wobei die D-Domäne tendenziell etwas stärker vertreten war als die A1-Domäne. Wie bereits zu Anfang angedeutet, können somit auch Resultate wie von Dueck und Mitarbeitern (1999), die eine erhöhte Fraktion von der A1-A4-Domäne im kolorektalen Karzinom mit Relation zum Tumorstaging nachwiesen, nicht für das orale Plattenepithelkarzinom beschrieben werden.

Innerhalb der verschiedenen Gradingstufen konnten insgesamt lediglich quantitative Unterschiede nachgewiesen werden, die sich in einer vermehrten stromalen und zytoplasmatischen Tenascin-C-Expression widerspiegeln. Dies ist ausgehend von den Präparaten hyperplastischer Mundschleimhaut bis zu den Karzinomen mit mäßiger Differenzierung belegbar. In den schlecht differenzierten Tumoren konnte bereits wieder eine Abnahme der stromalen Deposition festgestellt werden. Die beschriebenen Unterschiede lassen sich aber nicht auf einzelne bestimmte Domänen der gespleißten Tenascinvariante (Tn-C_L) zurückführen, sodass es keine Präferenz einer speziellen Spleißvariante zu einem bestimmten Malignitätsgrad gibt.

Dass das Ausmaß der immunhistochemischen Verteilung von Tn-C_L im oralen Plattenepithelkarzinom nicht mit dessen Malignitätsgrad oder der Art der Invasion korreliert, wurde auch von den Kollegen Hindermann und Mitarbeitern (1999) beschrieben und steht im Einklang mit unseren Ergebnissen. Allerdings haben sie einen Zusammenhang zwischen der Anzahl von Tn-C_L mRNA-synthetisierenden Tumorzellen und deren Verteilungsmuster mit dem Malignitätsgrad oraler Plattenepithelkarzinome herstellen können.

Da sich keine malignitätsgradspezifischen Verteilungsmuster der einzelnen Domänen im OSCC aufzeigen lassen, fällt auch eine Aussage darüber schwer,

ob bestimmte Spleißvarianten von Tenascin-C auch verschiedene Aufgaben beim Prozess der malignen Entartung übernehmen. Sicher ist, dass Tenascin-C ein Marker für den Gewebsumbau darstellt und dass sich dieser Umstand vor allem in der epithelial-mesenchymalen Kontaktzone sowie bei der Reorganisation der Basalmembran bei allen Prozessen manifestiert, die mit Geweberemodelling einhergehen. Dies wird durch die Resultate von Franz und Mitarbeitern (2007) unterstützt, die mittels Laser Scanning Mikroskopie erstmalig eine signifikante Korrelation von Tn-C_L-Depositionen in der reorganisierten Basalmembran von oralen Plattenepithelkarzinomen und deren Malignitätsgrad nachweisen konnten. Dabei muss man davon ausgehen, dass mit Hilfe der Laser Scanning Technologie, basierend auf Immunfluoreszenzmarkierungen, semiquantitativ Substrukturen der extrazellulären Matrix erfasst werden können. Insofern ist zu vermuten, dass die biologische Bedeutung der differentiellen Expression und Depositionen von Tenascin-C und seiner Spleißvarianten vom Ort der Deposition im Tumor abhängig ist. Diese Aussage wird durch die Tatsache unterstützt, dass die betrachteten Regionen bei Franz et al. (2007) und unseren Tumorpräparaten verschieden waren. So wurde bei Franz und Mitarbeitern der Schwerpunkt auf die direkte Tumor-Stroma-Interaktionszone (reorganisierte Basalmembran) gelegt, während wir hauptsächlich das Tumorstroma in der nahen Invasionszone der oralen Plattenepithelkarzinome untersucht haben. Da sich unsere Ergebnisse somit vorwiegend auf die stromale Verteilung der einzelnen Tenascin-C-Spleißdomänen beziehen, werden möglicherweise auch Unterschiede zu Aussagen der Korrelation zum Malignitätsgrad erklärbar, denn die tumorbiologische Bedeutung von Tn-C mag innerhalb des Stromas von Karzinomen eine andere sein als in der reorganisierten Basalmembran. Zahlreiche Parallelen von Tumorstroma und dem Stroma heilender Wunden wurden in anderen Studien bereits aufgeführt (Ramos et al. 1997). Da Tenascin-C in mannigfaltige morphogenetische Ereignisse wie Zellmigration, Zellproliferation und gewebsspezifische Genexpression integriert ist (Ramos et al. 1997; Orend et al. 2006), muss man davon ausgehen, dass die von uns detektierten Tenascin-C-Depositionen auch eher in allgemeine Prozesse wie Stromaumbau, Fibroblastenaktivierung und Myofibroblastenentwicklung involviert sind und keinen spezifischen Vorgang der Tumorentwicklung/-progression darstellen. Zudem

wird die Tenascin-C-Expression auch durch Faktoren wie Hypoxie (Gebb et al. 2003) und mechanischen Stress (Chiquet-Ehrismann et al. 2004; Sarasa-Renedo et al. 2005) induziert, die ebenfalls im Tumorgewebe eine Rolle spielen können. Da nach unseren Erkenntnissen bisher keine Daten über eine differentielle Expression von Tenascin-C-Spleißdomänen bei der Wundheilung existieren, könnten damit auch unsere Ergebnisse der überwiegend einheitlichen Expression von Tn-C innerhalb der verschiedenen Malignitätsstufen der untersuchten OSCCs erklärt werden.

Hinzu kommt, dass bei einer hohen Sensitivität enzymbasierter Nachweismethoden in der Immunhistochemie im Gegensatz zu Immunfluoreszenzmarkierungen eine echte quantitative Bewertung der Ergebnisse nur eingeschränkt möglich ist. Die Farbintensität korreliert hier nicht mit der Quantität des detektierten Proteins, sondern ist auf enzymatische Prozesse zurückzuführen, die bei entsprechender Zeitspanne auch „mehr“ Farbe bilden). Zudem trägt auch der Faktor der Subjektivität bei Bewertungsprozessen in der Immunhistochemie zur Verminderung der Spezifität dieser Methodik bei.

5.5. RT-PCR-Analyse der differentiellen Expression der Tenascin-C-Spleißdomänen

Bei der Betrachtung der differentiellen Expression der Tenascin-C-Spleißdomänen mit Hilfe der RT-PCR anhand von 10 Tumorfällen (3x G1, 4x G2 und 3x G3) bot sich insgesamt ein ähnliches Bild wie in der zuvor beschriebenen Immunhistochemie. Um qualitative Unterschiede bezüglich verschiedener Domänenkombinationen beurteilen zu können, wurden zunächst zwei Referenz-RT-PCR durchgeführt (β -aktin und Gesamt-Tenascin). Da in beiden PCR die Amplifikationsprodukte in vergleichbarer Quantität dargestellt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass in allen zehn Tumorfällen auch der gleiche Gehalt an mRNA zu finden ist und somit sichtbare Unterschiede in der Bandenstärke der Tenascin-C-Domänen PCRs Hinweise auf „reale“ Unterschiede in der Domänenstruktur geben.

Bei der Auswertung der PCRs fand sich im Bereich der A1-B-Domäne zunächst eine relativ hohe Stabilität, d.h. es wurden bei dem PCR-Screening in diesem

Abschnitt von Tenascin-C immer alle möglichen Domänen erfasst. Unterschiede innerhalb der verschiedenen Malignitätsgruppen zeigten sich hier nicht. Eine Ausnahme bildete die Primerkombination T3-T14, bei der bei 85bp ein zusätzliches Amplifikat sichtbar war und bei dem in allen zehn untersuchten Tumorfällen die A3-Domäne fehlte.

Im Abschnitt der B- bis D-Domäne herrschte eine größere Variabilität bezüglich der Expression einzelner Domänen, was sich teilweise in der parallelen Existenz verschiedener Tenascin-Spleißvarianten widerspiegelte. Auffällig war hier beispielsweise, dass nicht alle Tumore gleichzeitig B- und die AD-2-Domäne enthielten (Primerkombination T5-T12). Die Tenascin-C-Spleißvarianten, welche die AD-2-Domäne enthielten, kamen insgesamt nur sehr schwach zur Darstellung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Varianten in ihrer Anzahl im oralen Plattenepithel auch nur sehr spärlich zu finden sind. Diese Aussage machten bereits 1997 Mighell und Mitarbeiter, die die AD-2-Domäne ebenfalls als sehr restriktiv in ihrem Vorkommen im OSCC beschrieben. Insgesamt stellten wir aber die Tendenz zur verstärkten Expression der AD-2-Domäne in Richtung schlechter differenzierter Karzinome fest. Eine vergleichbare differenzierte tumorspezifische Expression von Domänen des Abschnittes B-D konnte auch für andere Tumorentitäten beschrieben werden (Orend und Chiquet-Ehrismann 2006). So war beispielsweise die Expression der B- und D-Domäne spezifisch für das duktales in situ Karzinom der Mamma (Adams et al. 2002), während die AD1-Domäne vermehrt im duktalem Mamma-Ca und Melanom vorkam (Derr 1997). Für das Astrozytom wiesen Carnemolla und Mitarbeiter (1999) eine vermehrte Expression der C-Domäne von Tenascin-C nach.

Widersprüchlich zu den Ergebnissen der Immunhistochemie war das konsequente Auftreten der C-Domäne bzw. der Tenascinvarianten, die diese Domäne enthielten. Mögliche Ursachen für diese Diskrepanz werden unter Punkt 5.5. genauer diskutiert.

Interessanterweise fanden wir bei zwei Primerkombinationen (T5-T12 und T6-T12) zusätzliche Banden, die keinen bisher bekannten Domänenkombinationen entsprachen. Aufgrund der stabilen Größe des Amplifikates von etwa 270bp (bei der Primerkombination T6-T12) ist die Existenz einer bisher unbekannt

Domäne in diesem Bereich von Tenascin-C zu vermuten. Bei der Primerkombination T5-T12 kann die Größe des „neuen“ PCR-Produktes allerdings nur sehr schlecht abgeschätzt werden, da die Banden außerhalb der Standardleiter liegen. Zusätzlich fanden sich qualitative Unterschiede in der Bandenstärke in diesem Bereich, die auf wirkliche Differenzen bei der Domänenexpression hinweisen könnten. Da der Methode insofern Grenzen gesetzt sind, als dass sie durch die ausgewählten Primerkombinationen immer nur bestimmte Abschnitte von Tenascin-C_L erfasst und die Auflösung der Standardleiter nur begrenzt ist, war es uns bei drei Primerkombinationen nicht möglich (T5-T12, T6-T11 und T6-T10), die genaue Domänenstruktur zu erfassen. Zu diesem Zwecke sind spezielle Sequenzierungsanalysen nötig um die exakten Domänenstrukturen zu beschreiben, die im Rahmen dieser Promotion allerdings nicht angefertigt wurden.

5.6. Vergleichende Analyse der mRNA-Expression und der immunhistochemischen Verteilung der Tenascin-C-Spleißdomänen

Unser Ziel war es, zunächst über domänenspezifische Antikörper tumorbiologisch relevante Depositionsmuster von Tenascin-C-Spleißvarianten im oralen Plattenepithelkarzinom zu erfassen. Dazu wurden zuerst die immunhistochemischen Verteilungsmuster der einzelnen Tenascindomänen, die durch sechs Antikörper detektiert wurden (3x monoklonal, 3x rekombinant), semiquantitativ bewertet und anschließend ausgewertet. Dabei zeigten sich keine auffälligen Unterschiede innerhalb der verschiedenen Malignitätsklassen. Um die immunhistochemischen Ergebnisse (weiter) zu objektivieren, fertigten wir zusätzlich von 10 repräsentativen Karzinomfällen und ausgewählten Primerkombinationen Polymerasekettenreaktionen zum Nachweis der mRNA-Expression der Spleißdomänen an. Dabei bestätigte sich weitestgehend das Resultat der Immunhistochemie, allerdings zeigte die PCR auch neue Aspekte auf, wie z.B. die oben erwähnten möglichen zusätzlichen Spleißdomänen von Tenascin-C. Widersprüchlich zu unseren immunhistochemischen Ergebnissen war das konsequente Auftreten der mRNA der C-Domäne, bei der uns der Proteinnachweis mittels rekombinantem Antikörper in nur zwei Fällen gelang. Mögliche Ursachen für diese Inkongruenz könnten in der Spezifität des Antikörpers selbst bzw. in

einer gewebsspezifischen Modulation der antigenen Determinanten begründet sein. Der verwendete C-Domänenantikörper ist bereits in mehreren Studien beschrieben. Von Lukowicz et al. (2007) wiesen die C-Domäne mit dem gleichen Antikörper z.B. in atherosklerotischen Plaques von Mäusen nach. Da der Nachweis in unterschiedlichen Spezies erfolgte, könnte man annehmen, dass dies auch einen Grund für den fehlgeschlagenen Domänennachweis in unserem Untersuchungsmaterial darstellen würde. Da sich aber die Aminosäuresequenz von Tenascin-C in Mensch und Maus in 99,9% ähnelt, scheint dies eher unwahrscheinlich zu sein.

Ein weiterer möglicher Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse in PCR und Immunhistochemie kann auch darin liegen, dass die mRNA-Expression, die mittels PCR nachgewiesen wird, nicht unbedingt indikativ für eine tatsächliche Tn-C-Proteinsynthese ist. Somit muss man zwischen Proteinexpression (Immunhistochemie) und mRNA-Synthese (in situ Hybridisierung bzw. hier RT-PCR) unterscheiden. Die sichtbaren Amplifikate, welche in der RT-PCR die Sequenz der C-Domäne enthielten, könnten Zwischenprodukte darstellen, die durch den Vorgang des alternativen Spleißens entstanden sind und zum Zeitpunkt der Experimente erfasst wurden. Diese Zwischenprodukte stellen aber keine fertigen Proteine dar, sodass sie in der Immunhistochemie möglicherweise nicht sichtbar waren.

Zudem erkennen Antikörper stets nur eine bestimmte Konformation von Proteinepitopen, die in unserem Fall im Wesentlichen von der dreidimensionalen Struktur der Tenascin-C-Spleißregionen bestimmt werden. Da sich durch das Spleißen die Abfolge der Domänen ändert, ist ein Einfluss auf die dreidimensionale Struktur der verbliebenen Domänen möglich. Es ist durchaus denkbar, dass der rekombinante Antikörper G11 eine spezielle Konformation der C-Domäne erkennt, die nicht in jeder C-Domänen-enthaltenden Spleißvariante realisiert wird. Somit könnten scheinbare gewebstypspezifische Unterschiede in der Proteinexpression der C-Domäne auftreten.

Die bei der genaueren Analyse der Ergebnisse der PCR-Experimente nachweisbare tendenzielle Zunahme der AD-2-Domäne ließ sich aufgrund eines fehlenden Antikörpers gegen diese Domäne immunhistochemisch nicht bestätigen. Insgesamt wurde diese Domäne jedoch von anderen Kollegen bisher als eher

restriktiv in ihrer Verteilung im OSCC angegeben (Mighell et al.1997), sodass Untersuchungen folgen sollten, die sich mit diesem Umstand noch einmal näher befassen.

Insgesamt sind beiden Untersuchungsmethoden (RT-PCR und Immunhistochemie) in ihrer Aussagefähigkeit insoweit Grenzen gesetzt, als dass beispielsweise bei der PCR durch die Auswahl bestimmter Primerkombinationen immer nur Abschnitte des Tenascinmoleküls erfasst werden. Ähnliches gilt auch für die Immunhistochemie, wo durch die ausgewählten Antikörper zwar einzelne Domänen nachgewiesen werden, diese Domänen sich aber in den verschiedensten Tenascinvarianten befinden können, sodass keine Aussage darüber getroffen werden kann, welche Tenacinvariante letztlich im Untersuchungsgewebe vorliegt.

6. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die maligne Transformation und Tumorprogression im oralen Plattenepithelkarzinom generell mit einer Zunahme der Expression und Deposition wenig gespleißter Tenascin-C-Varianten verbunden ist. Sowohl in den immunhistochemischen Untersuchungen als auch in den RT-PCR-Experimenten zum Nachweis einzelner Spleißdomänen lassen sich keine grundsätzlichen Unterschiede in der histologischen Verteilung mit Bezug zu Kriterien der Invasivität bzw. zum Malignitätsgrad der betrachteten Tumorfälle zeigen. Vor allem in der Immunhistochemie wichen die Ergebnisse bei allen betrachteten Fällen kaum voneinander ab – Tenascin-C und seine Spleißdomänen waren in allen Karzinomen ausgeprägt vorhanden.

Die Verwendung Domänen-spezifischer Antikörper erbrachte darüber hinaus keine selektive, tumorspezifische Markierung, sodass das Auftreten tumorassoziierter Spleißingvarianten von Tenascin-C im OSCC nicht zu erwarten ist. Ähnliche Verteilungsmuster konnten auch in Gebieten mit Entzündungen oder physiologischen Umbauvorgängen detektiert werden. Da das Matrixmolekül Tenascin-C teilweise in prämaligen als auch malignen Prozessen ein ähnliches Expressionsverhalten zeigt, scheint es kein geeigneter Marker zur Erfassung der

Dignität oraler Läsionen zu sein. Andererseits zeigte sich mit Hilfe der Laser Scanning Mikroskopie eine deutliche Korrelation von Tenascin-C_L Depositionen in restrukturierten Basalmembranen und dem Malignitätsgrad oraler Karzinome (Franz et al. 2007), die unter Verwendung von Immunhistochemie und RT-PCR für die allgemeine Stromadeposition nicht nachweisbar war. Es ist zu erwarten, dass moderne Untersuchungsmethoden und die Fokussierung auf spezielle Strukturen der Matrixreorganisation im Tumorstroma in Zukunft neue Ergebnisse bringen werden.

Neben der allgemeinen Positivität von Tenascin-C_L im Tumorstroma im Rahmen der malignen Transformation zeigte sich eine Anfärbung von Gefäßstrukturen mittels der verwendeten domänenspezifischen Antikörper. Therapeutische und diagnostische Ansätze auf der Grundlage eines Antikörper-basierten Gefäß-*Targettings*, wie sie bisher zum Beispiel schon in der Tumorthherapie bei Glioblastomen und Lymphomen bestehen (radiomarkierte Antikörper gegen die A1- und D-Domäne von Tenascin-C), können somit auch für das OSCC in Betracht gezogen werden.

Die Ergebnisse der RT-PCR ergaben weitere tumorbiologisch interessante Aspekte. Insbesondere im Bereich der B- bis D-Domänen war eine erhöhte Variabilität der Domänenexpression zu erkennen. Dies spiegelte sich in der parallelen Existenz verschieden großer Amplifikate und damit unterschiedlicher Tenascin-Spleißvarianten wider. Hier zeigte sich insbesondere, dass nicht alle Tumore gleichzeitig die B- und die AD-2-Domäne enthielten. Insgesamt war die AD-2 relativ spärlich vertreten, was mit bisher veröffentlichten Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmt. Zudem zeigte sich eine tendenzielle Zunahme der Expression der AD-2-Domäne bei Tumoren mit höherem Malignitätsgrad. Dieser Umstand muss Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Das Auftreten unerwarteter Amplifikate, die keinen bisher beschriebenen Domänen im untersuchten Bereich von Tenascin-C zugeordnet werden konnten, legte den Verdacht auf bislang nichtbeschriebene Spleißingdomänen nahe. Die Natur dieser Amplifikate muss mittels Sequenzierungsanalyse abgeklärt werden.

Trotz zahlreicher Untersuchungen zu Tenascin-C im oralen Plattenepithelkarzinom ist die differentielle Expression seiner Spleißvarianten noch immer nicht vollständig verstanden und die exakte Aufgabe im Prozess der Tumorentwicklung noch nicht abschließend geklärt. Eine Aussage über den Zusammenhang der Ausprägung von Tn-C und seiner Spleißvarianten und dem tumorbiologischen Verhalten im OSCC war bislang nur eingeschränkt möglich, da die meisten der bereits publizierten Untersuchungen Antikörper gegen die gesamte Tenascin-C-Fraktion verwendeten und damit keine differentielle Betrachtung einzelner Spleißingdomänen/-varianten erfolgte. Hier besitzen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Neuigkeitswert. Da in anderen Tumorentitäten der Nachweis von spezifischen Spleißdomänen mit diagnostischer und therapeutischer Signifikanz bereits erfolgreich war sollten derartige Bemühungen auch für das orale Plattenepithelkarzinom fortgesetzt werden. Verbesserte Antikörper oder Antikörper gegen weitere Spleißdomänen (z.B. AD2) sollten hier neue Perspektiven eröffnen.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Adams M, Jones JL, Walker RA, Pringle JH, Bell SC (2002) Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res* 62: 3289-3297
- 2 Adams JC, Watt FM (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117: 1183-1198
- 3 Anneroth G, Hansen L S (1984) A methodic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma *Scand J Dent Res*, 92 (5): 448-468
- 4 Aplin J D, Dawson S, Seif M W (1996) Abnormal expression of integrin alpha 6 beta 4 in cervical intraepithelial neoplasia *Br J Cancer*,74(2): 240-245
- 5 Atula T, Hedstrom J, Finne P, Leivo I, Markkanen-Leppanen M, Haglund C (2003) Tenascin-C expression and its prognostic significance in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 3051-3056
- 6 Balaram P, Nalinakumari K R, Abraham E, Balan A, Hareendran N K, Bernard H U, Chan S Y (1995) Human papillomaviruses in 91 oral cancers from Indian betel quid chewers: High prevalence and multiplicity of infections *Int J Cancer*, 61: 450-454
- 7 Balza E, Siri A, Ponassi M, Caocci F, Linnala A, Virtanen I, Zardi L (1993) Production and characterization of monoclonal antibodies specific for different epitopes of human tenascin. *FEBS*, 332: 39-43
- 8 Bankfalvi A, Pifko J (2000) Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumor front. *J Oral Pathol Med* 29: 291-298

-
- 9 Bell SC, Pringle JH, Taylor DJ, Malak TM (1999) Alternatively spliced tenascin-C mRNA isoforms in human fetal membranes. *Molecular Human Reproduction*, 5: 1066-1076
 - 10 Berndt A, Anger K, Richter P, Borsi L, Brack S, Silacci M, Franz M, Wunderlich H, Gajda M, Zardi L, Neri D, Kosmehl H (2006) Differential expression of tenascin-C splicing domains in urothelial carcinomas of the urinary bladder. *J Cancer Res Clin Oncol*
 - 11 Borsi L, Balza E, Castellani P, Carnemolla B, Ponassi M, Querze G, Zardi L (1994) Cell-cycle dependent alternative splicing of the tenascin primary transcript. *Cell Adhes Commun* 1: 307-317
 - 12 Borsi L, Carnemolla B, Nicolo G, Spina B, Tanara G, Zardi L (1992) Expression of different tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int. J. Cancer*, 52: 688-692
 - 13 Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Matthews TJ, Bigner DD (1983) Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res*; 43: 2796-2805
 - 14 Bryne M, Koppang H S, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E (1989) New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinoma *J Oral Pathol Med*, 18: 432-437
 - 15 Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A (1992) Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value *J Pathol* 166(4): 375-381
 - 16 Buyukbayram H, Arslan A (2002) Value of tenascin-C content and association with clinicopathological parameters in uterine cervical lesions. *Int J Cancer*, 100: 719-722

- 17 Carnemolla B, Balza E, Siri A, Zardi L, Nicotra MR, Bigotti A, Natali PG A (1989) tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol*, 108: 1139-1148
- 18 Carnemolla B, Castellani P, Ponassi M, Borsi L, Urbini S, Nicolo G, Dorcaratto P, Viale G, Winter G, Neri D, Zardi L (1999) Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody. *Am J Pathol*, 154: 1345-1352
- 19 Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K, Chiquet M (1988) Tenascin interferes with fibronectin action *Cell* 53(3): 383-390
- 20 Chiquet-Ehrismann R (1995) Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia*, 51: 853-862
- 21 Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T (1986) Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47: 131-139
- 22 Chiquet-Ehrismann R, Matsuoka Y, Hofer U, Spring J, Bernasconi C, Chiquet M (1991) Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. *Cell Regul*, 2: 972-938
- 23 Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP (2004) Connective tissues: signalling by tenascins *Int J Biochem Cell Biol*, 36(6): 1085-1090
- 24 Chung CY, Zardi L, Erickson HP (1995) Binding of tenascin-C to soluble fibronectin and matrix fibrils. *J Biol Chem*, 270: 29012-29017
- 25 Chuong CM, Chen HM (1991) Enhanced expression of neural cell adhesion molecules and tenascin (cytotactin) during wound healing. *Am J Pathol* 138: 427-440

-
- 26 Crossin K L (1996) Tenascin: a multifunctional extracellular matrix protein with a restricted distribution in development and disease *J Cell Biochem*, 61(4):592-598
- 27 Derr LB, Chiquet-Ehrismann R, Gandour-Edwards R, Spence J, Tucker RP (1997) The expression of tenascin-C with the AD1 variable repeat in embryonic tissues, cell lines and tumors in various vertebrate species *Differentiation*, 62(2): 71-82
- 28 Driemel O, Dahse R, Berndt A, Pistner H, Hakim SG, Zardi L, Reichert TE, Kosmehl H (2007a) High-molecular tenascin-C as an indicator of atypical cells in oral brush biopsies. *Clin Oral Investig* 11: 93-99
- 29 Driemel O, Kosmehl H, Rosenhahn J, Berndt A, Reichert TE, Zardi L, Dahse R (2007b) Expression analysis of extracellular matrix components in brush biopsies of oral lesions. *Anticancer Res* 27:1565-1570
- 30 Dueck M, Riedl S, Hinz U, Tandara A, Moller P, Herfarth C, Faissner A (1999) Detection of tenascin-C isoforms in colorectal mucosa, ulcerative colitis, carcinomas and liver metastases. *Int J Cancer* 82: 477-483
- 31 Eckardt A, Rades D, Küttner C, Dammer R, Dietl B, Widfang I (2002) Prospektive Phase-II-Studie zur neoadjuvanten Radiochemotherapie fortgeschrittener, operabler Mundhöhlenkarzinome : 3Jahres-Ergebnisse. *Mund Kiefer GesichtsChir.* 6 : 117-121.
- 32 El-Karef A, Kaito M, Tanaka H, Ikeda K, Nishioka T, Fujita N, Inada H, Adachi Y, Kawada N, Nakajima Y, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T (2007) Expression of large tenascin-C splice variants by hepatic stellate cells/myofibroblasts in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 46: 664-673
- 33 Emoto K, Yamada Y, Sawada H, Fujimoto H, Ueno M, Takayama T, Kamada K, Naito A, Hirao S, Nakajima Y (2001) Annexin II overexpres-

- sion correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer*, 92: 1419-1426
- 34 Erickson HP, Bourdon MA (1989) Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu Rev Cell Biol* 5: 71-92
- 35 Fischer D, Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R, Adams JC (1997) Cell-adhesive responses to tenascin-c splice variants involve formation of fascin microspikes. *Mol. Biol. Cell.*, 8 (10), 2055- 2075
- 36 Franz M, Hansen T (2007) A quantitative co-localization analysis of large unspliced tenascin-C(L) and laminin-5/gamma2-chain in basement membranes of oral squamous cell carcinoma by confocal laser scanning microscopy. *J Oral Pathol Med*, 36(1): 6-11
- 37 Gebb SA, Jones PJ (2003) Hypoxia and lung branching morphogenesis *Adv Exp Med Biol*, 543: 117-125
- 38 Gulcher JR, Nies DE, Marton LS, Stefanson K (1989) An alternative spliced region of the human hexabrachion contains a repeat of potential N-glycosylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1588-1592
- 39 Gulcher JR, Nies DE, Alexakos MJ, Ravikant NA, Sturgill ME, Marton LS (1991) Structure of the human hexabrachion (tenascin) gene. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 88(21): 9838-9442
- 40 Hagios C, Brown-Luedi M, Chiquet-Ehrismann R (1999) Tenascin-Y, a component of distinctive connective tissue, supports muscle cell growth. *Exp. Cell Res* 253: 607-617

-
- 41 Hasegawa K, Yoshida T, Matsumoto K, Katsuta K, Waga S, Sakakura T (1997) Differential expression of tenascin-C and tenascin-X in human astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 93: 431-437
- 42 Hausamen JE, Becker J, Neukam FW, Reichart PA, Schliephake H, Schmelzeisen R (2003) *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Band III, Curriculum Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Band III, Quintessenz Verlag-GmbH, Berlin : 447-475*
- 43 Hindermann W, Berndt A, Boris L, Luo X, Hyckel P, Katenkamp D, Kosmehl H (1999) Synthesis and protein distribution of the unspliced large tenascin C-isoform in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 189: 475-480
- 44 Herold-Mende C, Andl T, Laemmler F, Reißer Ch, Eichhorn S (1999) Expression und Lokalisation des EZM-Moleküls Tenascin in Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs; *HNO:47 (8): 723-729*
- 45 Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH (2002) Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression *Int J Cancer*, 98: 362-369
- 46 Higuchi M, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Hayakawa T (1993) Expression of tenascin in human gliomas: its relation to histological malignancy, tumor dedifferentiation and angiogenesis *Acta Neuropathol (Berl)*, 85: 481-487
- 47 Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY (2000) Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metabolic potential. *Oral Oncol*: 36: 207-213
- 48 Ibrahim S O, Vasstrand E N, Liavaag P G, Johannessen A C, Lillehaug J R (1997) Expression of c-erbB proto-oncogene family members in
-

- squamous cell carcinoma of the head and neck *Anticancer Res*, 17: 4539-4546
- 49 Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S, Shirasuna K (1999) Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases in tumor tissue correlates with invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis*: 17: 315-323.
- 50 Ikeda Y, Oomori H, Koyanagi N, Mori M, Kamakura T, Minagawa S, Tateishi H, Sugimachi K (1995) Prognostic value of combination assays for CEA and CA 19-9 in gastric cancer *Oncology*, 52(6): 483-486
- 51 Ishihara A, Yoshida T, Tamaki H, Sakakura T (1995) Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clin Cancer Res* 1: 1035-1041
- 52 Jahkola T, Toivonen T, Nordling S, von Smitten K, Virtanen I (1998) Expression of tenascin-C in intraductal carcinoma of human breast: relationship to invasion. *Eur J Cancer* 34: 1687-1692
- 53 Jahkola T, Toivonen T, von Smitten K, Blomqvist C, Virtanen I (1996) Expression of tenascin in invasion border of early breast cancer correlates with higher risk of distant metastasis. *Int J Cancer* 69: 445-447
- 54 Jones FS, Jones PL (2000) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 218: 235-259
- 55 Juuti A, Nordling S, Louhimo J, Lundin J, Haglund C (2004) Tenascin-C expression is upregulated in pancreatic cancer and correlates with differentiation

- 56 Kaarteenaho-Wiik R, Taneli T, Sormunen R, Soini Y, Virtanen I, Pääkkö P (1996) Tenascin immunoreactivity as a prognostic marker in usual interstitial pneumonia *Am J Respir Crit Care Med*, 154: 511-518
- 57 Kaarteenaho-Wiik R, Mertaniemi P, Sajanti E, Soini Y, Pääkkö P (1998) Tenascin is increased in epithelial lining fluid in fibrotic lung disorders *Lung* 176(6): 371-380
- 58 Knox J D, Cress A E, Clark V, Manriquez L, Affinito K S, Dalkin B L, Nagle R B (1994) Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate *Am J Pathol*, 145(1): 167-174
- 59 Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D, Hyckel P, Stiller KJ, Gabler U, Langbein L, Reh T (1995) Integrin receptors and their relationship to cellular proliferation and differentiation of oral squamous cell carcinoma. A quantitative immunohistochemical study *J Oral Pathol Med* 24(8): 343-348
- 60 Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D (1996) Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch* 429: 311-322
- 61 Kudo Y, Kitajima S, Sato S, Miyauchi M, Ogwawa I, Takata T (2001) High expression of S-phase kinase interacting protein 2, human F-box protein, correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 2001: 61: 7044-7047
- 62 Latijnhouwers MA, Bergers M, van Bergen BH, Spruijt KI, Andriessen MP, Schalkwijk J (1996) Tenascin expression during wound healing in human skin *J Pathol* 178(1): 30-35

- 63 Latijnhouwers MA, de Jongh GJ, Bergers M, de Rooij MJ, Schalkwijk J (2000) Expression of tenascin-C splice variants by human skin cells. *Arch Dermatol Res* 292: 446-454
- 64 Leprini A, Querze G, Zardi L (1994) Tenascin isoforms: possible targets for diagnosis and therapy of cancer and mechanisms regulating their expression. *Perspect Dev Neurobiol* 2: 117-123
- 65 Lightner VA, Gumkowski F, Bigner DD, Erickson HP (1989) Tenascin/hexabrachion in human skin: biochemical identification and localization by light and electron microscopy
- 66 Liu HY, Nur EKA, Schachner M, Meiners S (2005) Neurite guidance by the FnC repeat of human tenascin-C: neurite attraction vs. neurite retention. *Eur J Neurosci* 22:1863-1872
- 67 Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Grieco M, Mignogna MD, Cerrato A, Testa NF, De Rosa G (1999) Beta- and gamma-catenin expression in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*: 19: 3817-3826
- 68 Lopez-Graniel C M, Tamez de Leon D, Meneses-Garcia A, Gomez-Ruiz C, Frias-Mendivil M, Granados-Garcia M, Barrera-Franco J L (2001) Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity carcinomas *Exp Clin Cancer Res*. 20(4): 463-468
- 69 Lukinmaa P L, Allemanni G, Waltimo J, Zardi L (1996) Immunoreactivity of tenascin-C in dentin matrix in dentinogenesis imperfecta associated with osteogenesis imperfecta *J Dent Res*, 75(1):581-587
- 70 Mackie EJ, Chiquet-Ehrismann R, Pearson CA, Inaguma Y, Taya K, Kawarada Y, Sakakura T (1987) Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland *Proc Natl Acad Sci USA* 84(13): 4621-4625

- 71 Mackie E and Tucker R (1999) *J. Cell Sci.* 112: 3847-3853
- 72 Mandel U, Gaggero B, Reibel J, Therkildsen MH, Dabelsteen E, Clausen H (1994) Oncofetal fibronectins in oral carcinomas: correlation of two different types. *Apmis* 102:695-702
- 73 Matsuura H, Greene T, Hakomori S (1989) An alpha-N-acetylgalactosaminylation at the threonine residue of a defined peptide sequence creates the oncofetal peptide epitope in human fibronectin. *J Biol Chem* 264:10472-10476
- 74 McCachren S S, Lightner V A (1992) Expression of human tenascin in synovitis and its regulation by interleukin-1 *Arthritis Rheum*, 35(10): 1185-1196
- 75 McParland PC and Bell SC (1998) Localization of the extracellular matrix protein tenascin-C at the materno-fetal interface during pregnancy. *Br.J. Obstet.Gynaecol.*, 105 (Suppl.17), 211
- 76 McParland PC, Pringle JH and Bell SC (1998) Tenascin and the fetal membrane wound hypothesis- programming for fetal membrane rupture? *Br.J. Obstet. Gynaecol.*, 105: 1223-1224
- 77 Meiners S, Mercado ML, Nur-e-Kamal MS, Geller HM (1999) Tenascin-C contains domains that independently regulate neurite outgrowth and neurite guidance. *J Neurosci* 19:8443-8453
- 78 Mighell AJ, Thompson J, Hume WJ, Markham AF, Robinson PA (1997) Human tenascin-C: identification of a novel type III repeat in oral cancer and of novel splice variants in normal, malignant and reactive oral mucosae. *Int J Cancer* 72: 236-240

- 79 Mori M, Muramatsu Y, Yamada K, Shrestha P, Takai Y (1996) Intracellular localization of tenascin in squamous cell carcinoma of oral cavity: an immunohistochemical study.
- 80 Murphy-Ullrich JE, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, Hook M (1991) Focal adhesion integrity is downregulated by the alternative spliced domain of human tenascin. *J Cell Biol* 115: 1127-1130
- 81 Nagata M, Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y, Ohnishi M, Ohyama T, Shingaki S, Kaji M, Saku T, Takagi R (2003) Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 106: 683-689
- 82 Nor J E, Christensen J, Liu J, Peters M, Mooney D J, Strieter R M, Polverini P J (2001) Up-regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth *Cancer Res*, 61:2183-2188
- 83 Orend G, Chiquet-Ehrismann R (2006) Tenascin-C induced signalling in cancer *Cancer Letters*, 244: 143-163
- 84 Parkin D M, Pisani P, Ferlay J (1999) Estimates of worldwide incidence of twentyfive major cancers in 1990. *Int J Cancer* 80: 827-841
- 85 Pauli C, Stieber P, Schmit UM, Andratschke M, Hoffmann K, Wollenberg B (2002) The significance of tenascin-C serum levels as tumor marker in squamous cell carcinomas of the head and the neck. *Anticancer Res* 22: 3093-3097
- 86 Prieto AL, Jones FS, Cunningham BA, Crossin KL, Edelmann GM (1990) Localization during development of alternatively spliced forms of cytotoxicin mRNA by in-situ-Hybridization. *J Cell Biol* 111: 685-698

- 87 Puente Navazo M D, Valmori D, Ruegg C (2001) The alternatively spliced domain TnFnIII A1A2 of the extracellular matrix protein tenascin-C suppresses activation-induced T lymphocyte proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* 167: 6431-6440
- 88 Ramos DM, Chen BL, Boylen K, Stern M, Kramer RH, Sheppard D, Nishimura SL, Greenspan D, Zardi L, Pytela R (1997) Stromal fibroblasts influence oral squamous-cell-carcinoma cell interactions with tenascin-C *Int J Cancer*, 72: 369-376
- 89 Ramos DM, Chen BL, Zardi L, Pytela R (1998) Tenascin-C matrix assembly in oral squamous cell carcinoma *Int J Cancer* 75: 680-687
- 90 Reichart P A, Tabak und Mundgesundheits (2000): *Dtsch.Zahnärztl. Z.* 55: 223-229.
- 91 Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL (2001). The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer*: 91: 2136-2147
- 92 Riedl S E, Faissner A, Schlag P, von Herbay A, Koretz K, Möller P (1992) Altered content and distribution of tenascin in colitis, colon adenoma and colorectal carcinoma *Gastroenterology*, 103: 400-406
- 93 Ruegg CR, Chiquet-Ehrismann R, Alkan SS (1989) Tenascin, an extracellular matrix protein, exerts immunomodulatory activities *Proc Natl Acad USA* 86(19):7437-7441
- 94 Sage EH, Bornstein P (1991) Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin and thrombospondin *J Biol Chem*, 266(23): 14831-14840

-
- 95 Sakaki T, Wato M, Tamura I, Nakajima M, Morita S, Kakudo K, Shirasu R, Tanaka A (1999) Correlation of E-cadherin and alpha-catenin expression with differentiation of oral squamous cell carcinoma. *J Osaka Dent Univ*: 33: 75-81
- 96 Sarasa-Renedo A, Chiquet M (2005) Mechanical signals regulating extracellular matrix gene expression in fibroblasts *Scand J Med Sci Sports*, 15: 223-230
- 97 Schenk S, Muser J, Vollmer G, Chiquet-Ehrismann R (1995) Tenascin-C in serum: a questionable tumor marker. *Int J Cancer* 61: 443-449
- 98 Schliephake H (2003) Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer- A review. *Int.J. Oral Maxillofac Surg* 32: 233-245
- 99 Schottenfeld D (1992) The etiology and prevention of aerodigestive tract cancers *Adv Exp Med Biol*, 320: 1-21
- 100 Scully C, Field JK, Tanzawa H (2000) Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncology* 2000: 36: 256-263
- 101 Shrestha, P., Sakamoto, F., Tagaki, H., Yamada, T., Mori, M. (1994) Enhanced tenascin immunoreactivity in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral cavity: an immunohistochemical study.
- 102 Siri A, Knäuper V, Veirana N, Caocci F, Murphy G, Zardi L (1995) Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 270: 8650-8654
- 103 Soini Y, Kamel D, Apaja-Sarkkinen M, Virtanen I, Lehto V P (1993) Tenascin immunoreactivity in normal and pathological bone marrow *J Clin Pathol*, 46(3): 218-21

- 104 Spitz M R (1994) Epidemiology and risk factors for head and neck cancer
Semin Oncol, 21: 281-288
- 105 Takeda A, Otani Y, Iseki H, Takeuchi H, Aikawa K, Tabuchi S, Shinozuka N, Saeki T, Okazaki Y, Koyama I (2007) Clinical significance of large tenascin-C spliced variant as a potential biomarker for colorectal cancer
World J Surg, 31(2): 388-394
- 106 Tanaka M, Yamazaki T, Araki N, Yoshikawa H, Yoshida T, Sakakura T, Uchida A (2000) Clinical significance of tenascin-C expression in osteosarcoma: tenascin-C promotes distant metastases of osteosarcoma.
Int J Mol Med 5: 505-510
- 107 Terpe H J, Böcker W (1997) Significance of adhesion molecules in oncology
Pathologe, 18(2): 117-123
- 108 Thomas GJ, Jones J, Speight PM (1997) Integrins and oral cancer. *Oral Oncol* 33:381-388
- 109 Tseleni-Balafouta S, Gakiopoulou H, Fanourakis G, Voutsinas G, Balafoutas D, Patsouris E (2006) Tenascin-C protein expression and mRNA splice variants in thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol* 80: 177-182
- 110 Tsunoda T, Inada H, Kalembeiyi I, Imanaka-Yoshida K, Sakakibara M, Okada R, Katsuta K, Sakakura T, Majima Y, Yoshida T (2003) Involvement of large tenascin-C splice variants in breast cancer progression. *Am J Pathol* 162: 1857-1867
- 111 Tucker RP, Brunso-Bechthold JK, Jenrath DA, Khan NA, Poss PM, Sweatt AJ, Xue Y (1994) Cellular origins of tenascin in the developing nervous system. *Perspect Dev Neurobiol* 2: 43-52

- 112 Vollmer G, Tan MI, Wünsche W, Frank K (1997) Expression of tenascin-C by human endometrial adenocarcinoma and stroma cells: heterogeneity of splice variants and induction by TGF-beta. *Biochem Cell Biol* 75: 759-769
- 113 von Lukowicz T, Silacci M, Wyss MT, Trachsel E, Lohmann C, Buck A, Luscher TF, Neri D, Matter CM (2007) Human antibody against C domain of tenascin-C visualizes murine atherosclerotic plaques ex vivo. *J Nucl Med* 48: 582-587
- 114 Wallner K, Shah PK, Sharifi BG (2002) Balloon catheterization induces arterial expression of new tenascin-C isoform *Atherosclerosis*, 161: 75-83
- 115 Wei N, Tahan SR (1998) S100+cell response to squamous cell carcinoma of the lip: inverse correlation with metastasis *J Cutan Pathol* 25(9): 463-468
- 116 Werkmeister R, Brandt B, Joos U (2000) Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas *Oral Oncol*, 36: 100-105
- 117 Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Lundin M, Kokkola A, von Boguslawski K, Haglund C (2003) Tenascin-C expression correlates with prognosis in gastric cancer. *Oncology* 64: 245-250
- 118 Wittekind C, Meyer H, Bootz F (2003) TNM - Klassifikation maligner Tumoren. Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- 119 Wynder E L, Bross I J, Day E (1956) A study of environmental factors in cancer of the larynx *Cancer*, 9: 86-110
- 120 Xia W, Lau Y K, Zhang H Z, Liu A R, Li L, Kiyokawa N, Clayman G L, Katz R L, Hung M C (1997) Strong correlation between c-erbB-2 overex-

- pression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma Clin Cancer Res, 3: 3-9
- 121 Xia W, Lau Y K, Zhang H Z, Xiao F Y, Johnston D A, Liu A R, Li L, Kiyokawa N, Clayman G L, Katz R L, Hung M C (1999) Combination of EGFR, Her-2/neu and Her-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members Clin Cancer Res, 5: 4164-4174
- 122 Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M (1999) The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue Cancer 86(6): 913-920
- 123 Zagzag D, Friedlander DR, Milller DC, Dosik J, Cangiarella M, Kostianovsky M (1995) Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis Cancer Res, 55: 907-914

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem akademischen Lehrer Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Alexander Berndt für die Überlassung des Dissertationsthemas, die hilfreichen Gespräche, die konstruktive Kritik und ständige Motivation bedanken. Seine engagierte und freundschaftliche Unterstützung waren mir während der ganzen Zeit eine große Hilfe.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Detlef Katenkamp (Leiter des Instituts für Pathologie, FSU Jena) für die Möglichkeit, am Institut für Pathologie alle für die Promotion notwendigen experimentellen Arbeiten ausführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Hartwig Kosmehl (Institut für Pathologie des HELIOS-Klinikums Erfurt GmbH) danke ich für die Unterstützung bei der histopathologischen Bewertung der Tumorpräparate.

Herrn Prof. Dario Neri, Leiter Research-Unit „Biomakromoleküle“ am Institut für Pharmazeutische Wissenschaft der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, und seinen Mitarbeitern Dr. Simon Brack und Michela Silacci sei für die Überlassung der Domänen-spezifischen rekombinanten Tenascin-C-Antikörper herzlich gedankt. Die Bereitstellung dieser Reagenzien hat die Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation erst ermöglicht. Die Herstellung der rekombinanten Antikörper und deren Charakterisierung erfolgte unter EU-Förderung (FP6: LSHC-CT-2003-5032 „STROMA“)

Gleichfalls möchte ich mich bei Frau Dr. Laura Borsi vom Nationalinstitut für Krebsforschung in Genua und Herrn Prof. Luciano Zardi vom Institut „Giannina Gaslini“ in Genua für die Überlassung monoklonaler Antikörper gegen Tenascin-C und die vielen hilfreichen Diskussionen zur Thematik bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Hyckel, Oberarzt der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie / Plastische Operationen für die Unterstützung bei klinischen Fragestellungen.

Frau Susanne Bergmann danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Erstellung der immunhistochemischen Präparate.

Besonderer Dank geht an Frau Dr. Petra Richter (wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pathologie, FSU Jena) und Dr. Marcus Franz für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft sowie die freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie, die mich stets mit aufmunternden Worten unterstützten und an mich glauben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

PD Dr. A. Berndt

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers