

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie  
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
(Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Petra Ambrosch)

**ZUSAMMENHANG ZWISCHEN  
EXPRESSION DES PROTEINS CD44V6,  
METASTASIERUNG UND ÜBERLEBEN BEI  
PATIENTEN MIT  
PLATTENEPITHELKARZINOMEN DES  
OROPHARYNX**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**BIRGIT KASPER**  
aus Bautzen

Kiel, 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gottschlich

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kalthoff

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.07.2009

gez.: Prof. Dr. Stick  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Plattenepithelkarzinome des Oropharynx .....	1
1.1.1	Epidemiologie des Oropharynxkarzinoms .....	1
1.1.2	Begünstigende Faktoren zur Entwicklung eines Oropharynxkarzinoms .....	1
1.1.3	Therapie des Oropharynxkarzinoms .....	2
1.1.4	Prognose des Oropharynxkarzinoms.....	2
1.2	Das Zelladhäsionsmolekül CD44v6.....	3
1.2.1	Aufbau und Expression der CD44-Proteine.....	3
1.2.2	Funktion der CD44-Proteine .....	5
1.2.3	Vorkommen von CD44 in Tumorgewebe.....	5
1.3	Fragestellung und Zielsetzung .....	6
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
2.1	Materialgewinnung und Datenerhebung .....	7
2.2	Klinische und histologische Daten .....	7
2.3	Methoden.....	12
2.3.1	Vorbereitung der Tumorblöcke.....	12
2.3.2	Hämalaun-Eosin-Färbung .....	12
2.3.3	Immunhistochemische Färbung und Antikörper-Testung.....	12
2.3.5	Negativ- und Positiv-Kontrollen .....	13
2.4	Mikroskopische Auswertung.....	14
2.5	Statistische Auswertung .....	14

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>16</b>
3.1	Antigenexpression.....	16
3.1.1	Färbequalität.....	16
3.1.2	Expression von CD44v6 im Tumorgewebe .....	17
3.1.3	Antigenexpression und Differenzierungsgrad.....	18
3.2	Patientenüberleben in Korrelation zur Antigenexpression.....	19
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>21</b>
4.1	Prognoseparameter des Oropharynxkarzinoms.....	21
4.2	Das Membranprotein CD44v6 .....	22
4.3	Expression von CD44v6.....	24
4.4	Expression von CD44v6 und Metastasierung .....	25
4.5	Expression von CD44v6 und Differenzierung .....	27
4.5	Korrelation der CD44v6-Expression mit dem Überleben bei PK-KH und anderen Tumorentitäten.....	29
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>33</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>35</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>45</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Plattenepithelkarzinome des Oropharynx**

#### **1.1.1 Epidemiologie des Oropharynxkarzinoms**

Jährlich erkranken etwa 350 000 Menschen in der Bundesrepublik Deutschland an bösartigen Tumorerkrankungen (Lang et al., 2002). Der Kopf-Hals-Bereich ist dabei zu einem Anteil von 6,3% betroffen, hochgerechnet nach den Inzidenzraten des Saarländischen Krebsregisters. Damit folgen diese Malignome in der Häufigkeitsverteilung mit dem Harnblasenkarzinom an vierter Stelle nach dem Prostata-, dem Lungen- und dem kolorektalen Karzinom (Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut, 2002).

Bezüglich der Verteilung innerhalb des Kopf-Hals-Bereiches lässt sich sagen, dass sich die meisten Malignome, meist Plattenepithelkarzinome (Sankaranarayanan et al., 1998), im Larynx entwickeln, gefolgt von Tumoren des Oro- und des Hypopharynx (Lang et al., 2002). Da das Tumorwachstum im Oropharynx eher spät zu Symptomen oder Beeinträchtigungen führt, liegen die Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist in einem fortgeschrittenen Stadium vor. Allerdings befinden sie sich in einem weniger weit fortgeschrittenen Stadium als im Bereich des Hypopharynx oder der Nasennebenhöhlen, was sich durch die bessere Einsicht in die Bereiche des Oropharynx erklären lässt (Remmert et al., 2001).

Die betroffenen männlichen Patienten sind bei Diagnosestellung im Mittel 58 Jahre alt, die weiblichen Patienten 62 Jahre (Lang et al., 2002).

#### **1.1.2 Begünstigende Faktoren zur Entwicklung eines Oropharynxkarzinoms**

Risikofaktoren für die Erkrankung an einem Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches (PK-KH) sind besonders das Rauchen und der Alkoholabusus. Da die Zufuhr dieser Genussmittel in den letzten Jahrzehnten insgesamt zugenommen hat, ist die epidemiologische Entwicklung mit zunehmend auch jüngeren betroffenen Patienten nachvollziehbar. Noch erkranken Männer etwa viermal häufiger als Frauen, wofür das

unterschiedliche Verhalten im Umgang mit den genannten Stoffen ursächlich ist (Tuyns et al., 1988, Rice and Becker, 1994).

Daneben können onkogene Viren wie humane Papillomaviren, besonders Typ 16 und 18 eine Zelltransformation bewirken indem ihre Gene direkt in das Zellgenom integriert werden und zu einer Inaktivierung des p53-Gens führen. Dies ist auch für die Entstehung von Karzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx beschrieben (Min et al., 1994; van Houten et al., 2001).

### **1.1.3 Therapie des Oropharynxkarzinoms**

Bei der Therapie wird eine möglichst komplette Entfernung des Tumors angestrebt. Dieses erfolgt meist chirurgisch, gegebenenfalls laserchirurgisch und wird je nach Tumorstadium, das heißt mit zunehmender Größe des Tumors und dementsprechender Geweberesektion, über unterschiedliche Zugangswege durchgeführt. So wird transoral, transzervikal mit eventuellen Defektverschlüssen und plastischen Rekonstruktionen operiert.

Bezüglich der Behandlung der Halslymphknoten kommt neben der reinen Beobachtung, bei fehlenden Halslymphknotenmetastasen, die selektive, radikale beziehungsweise modifiziert radikale Neck-Dissektion bei nachgewiesenen Metastasen in Betracht.

Bei fortgeschrittenen Tumoren kann eventuell eine Radio-Chemotherapie erwogen werden. Palliativ kann eine alleinige Chemotherapie mit Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluouracil und Taxanen diskutiert werden, wenn Fernmetastasen oder Tumorstadien ohne weitere chirurgische oder strahlentherapeutische Option vorliegen (Deutsche Krebsgesellschaft: Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien, 2002).

### **1.1.4 Prognose des Oropharynxkarzinoms**

Da Tumoren im Oropharynx lange asymptomatisch bleiben können, besteht bei einem Großteil der Patienten mit PK-KH bereits bei Stellung der Diagnose ein fortgeschrittenes Tumorstadium. So liegen bei 2/3 der Patienten bereits Lymphknotenmetastasen vor (Remmert et al., 2001), die sogar häufig das erste Symptom darstellen.

Dem Lymphknotenstatus fällt eine besondere prognostische Bedeutung zu, da mit zunehmendem Befall die 5-Jahres-Überlebenschancen von 80%, bei fehlendem

Lymphknotenbefall (N0), auf 45% bei betroffenen Lymphknoten absinkt. Daneben sind außerdem die Anzahl der befallenen Knoten, deren Lokalisation und ein eventueller Kapseldurchbruch entscheidend (Houck und Medina, 1995).

Mit abnehmendem histopathologischen Differenzierungsgrad und zunehmender Größe des Primärtumors steigt die Wahrscheinlichkeit für Metastasen (Remmert et al., 2001). Zudem sinken die Möglichkeiten einer vollständigen chirurgischen Entfernung des Tumors mit dessen Größe, da diese im Kopf-Hals-Bereich durch lebenswichtige anatomische Strukturen limitiert ist.

Mit einer unvollständigen Resektion steigt wiederum die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs, die ihren Ursprung meist aus den Randbezirken der ehemaligen Primärtumoren nehmen (Remmert et al., 2001).

Insgesamt ist die durchschnittliche Überlebenszeit der Patienten mit Oropharynx-Karzinomen länger als die der Patienten mit Hypopharynxkarzinomen, aber schlechter, als die der Patienten mit Mundhöhlen- oder Zungenkarzinomen. So beträgt die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit beim Oropharynxkarzinom 28%, beim Hypopharynxkarzinom 17%, beim Mundhöhlenkarzinom 41% (Berrino et al., 1998).

## **1.2 Das Zelladhäsionsmolekül CD44v6**

### **1.2.1 Aufbau und Expression der CD44-Proteine**

Die Proteine der CD44-Klasse sind Glykoproteine, die transmembranär bei unterschiedlichen Zellpopulationen lokalisiert sind. Andere Bezeichnungen für dieses Protein sind phagozytotisches Glykoprotein 1 (Pgp-1) (Hughes et al., 1983), extrazellulärer Matrixrezeptor II (ECMR-II) (Carter und Wayner, 1988), HUTCH-1 (Gallatin et al., 1989), HCAM (Goldstein et al., 1989) und Hermes-Antigen (Jalkanen und Jalkanen, 1992). Das CD44-Gen befindet sich auf Chromosom 11p13 und besteht aus mindestens 20 Exons. Durch gewebespezifisches alternatives Splicing und durch eventuell zusätzliche posttranslationale Modifikationen wie N- und O-Glykosylierung und Glykosaminoglykanisierung entstehen die verschiedenen Isoformen dieser Protein-Familie (Lokeshwar et al., 1991; Jalkanen und Jalkanen 1992; Sreaton et al., 1992; Bennett et al., 1995; Jackson et al., 1995). Unterteilt

man das Protein in seiner Struktur in vier Teile, eine distale extrazelluläre, eine membranproximale (extrazelluläre), eine transmembranöse und eine zytoplasmatische Region, so finden die Veränderungen durch alternatives Splicing hauptsächlich im membranproximalen Teil (Exons 6-15) und im zytoplasmatischen Ende (Exons 18-20) statt. Dahingegen scheint sowohl der transmembranöse Teil, als auch der übrige zytoplasmatische Teil aus den Exons 16 und 17 und die distale extrazelluläre Domäne, bestehend aus den Exons 1-5 konstant bei den verschiedenen Isoformen aufgebaut zu sein (Screaton et al., 1992).

Die häufigste Form dieser Proteinklasse ist die CD44-Standard-Form (CD44s, 85-95kDa), der die gesamte variable Region (Exons 6-15) fehlt (Stamenkovic et al., 1989, Brown et al., 1991). Diese Form erscheint auf den meisten normalen Zellen sowohl im adulten, wie auch im embryonalen Organismus. Dazu zählen zum Beispiel die hämatopoietischen Zellen, Endothelzellen, Keratinozyten, Chondrozyten und teilweise auch Neuralzellen (Dalchau et al., 1980; Nottenburg et al., 1989; Picker et al., 1989; Stamenkovic et al., 1989, Zhou et al., 1989). Dagegen ist die Expression der Varianten eher auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt.

So wird CD44v6, Exons 3-10 hauptsächlich auf T-Lymphozyten exprimiert und wurde schon kurz nach seiner Entdeckung, bei der es als Marker für metastasierende Tumoren der Ratte beschrieben wurde (Gruber et al., 1992), mit Lymphozytenaktivierung in Zusammenhang gebracht (Guo et al., 1996). Diese Verbindung wird auch durch das vermehrte Erscheinen des Proteins bei Autoimmunerkrankungen wie Glomerulonephritiden, Diabetes mellitus, Rheumatoider Arthritis und entzündlichen Darmerkrankungen (Günthert et al., 1991; Herrlich et al., 1993; Naujokas et al., 1993; Weiss et al., 1998) belegt.

Auf normalen Epithelzellen zeigt sich insgesamt ein hohes und gleichmäßiges Vorkommen von CD44v6 (Fox et al., 1994), besonders auch in der Mundschleimhaut und der normalen Haut, wobei die obersten Epithelschichten, also die verhornten Keratinozyten, keine Expression aufweisen (Van Hal et al., 1999).

Neben dem beschriebenen Erscheinen auf Zellmembranen unterschiedlicher Zellpopulationen konnte auch eine Freisetzung des CD44-Proteins in den normalen Blutkreislauf nachgewiesen werden (Dalchau et al., 1980; Telen et al., 1983; Lucas et al., 1989; Picker et al., 1989), so dass in der letzten Zeit verschiedene Studien zur Bewertung im Blut gelöster CD44-Proteine als potentielle Tumormarker durchgeführt wurden. Die Ergebnisse fielen allerdings bisher



sehr unterschiedlich aus. So wurden diese Proteine sowohl bei Krebspatienten, als auch bei gesunden Freiwilligen nachgewiesen (Jung et al., 1996).

### **1.2.2 Funktion der CD44-Proteine**

Bekannt ist die Rezeptorfunktion von CD44 für Hyaluronsäure (Aruffo et al., 1990; Miyake et al., 1990), für Laminin (Jalkanen und Jalkanen, 1992), für Fibronectin und Kollagen Typ I und IV (Carter und Wayner, 1988). Damit scheint es eine Rolle bei der Organentwicklung und der Entwicklung und Funktion des Immunsystems zu spielen. Dort beeinflusst es das Lymphozyten-Homing (Jalkanen et al., 1987; Haynes, 1989) und die Leukozytenaktivierung (Huet et al., 1989; Shimizu et al., 1989; Denning et al., 1990). Außerdem findet sich auch ein Effekt auf die Hämatopoese (Miyake et al., 1990).

Da die intrazelluläre Domäne von CD44 mit dem Zytoskelett verbunden ist scheint sie zwei besondere Funktionen zu besitzen. Zum einen die Regulation von Zelladhäsion über die Affinität von CD44 für seine Liganden und zum anderen die Signaltransduktion, die zur Zellaktivierung und Regulation von Zellwachstum und Zelltod führt (Morrison et al., 2001).

Der CD44v6-Variante wird eine Beteiligung bei der Leukozytenaktivierung und bei der Myelopoese zugeschrieben (Guo et al., 1996). So fördern Antikörper gegen CD44v6 die Produktion von Granulozyten-Makrophagen-Colony-stimulating factor (GM-CSF) und von Interleukin-6 (IL-6) (Khaldoyanidi et al., 2002). Auch diese Isoform findet sich während der Embryonalzeit. So verhinderten in fötalen Organkulturen Antikörper gegen CD44v6 und andere Splice-Varianten die Entwicklung der Thymozyten (Mackay et al., 1994; Terpe et al., 1994).

### **1.2.3 Vorkommen von CD44 in Tumorgewebe**

Bezüglich der Expression in Tumorgeweben konnte aus der CD44-Familie von einigen Untersuchern besonders das CD44v6-Protein in Plattenepithelkarzinomen in verstärktem Maße nachgewiesen werden. Dies gilt vor allem für PK-KH, Plattenepithelkarzinome der Lunge, des Ösophagus, der Zervix und der Haut (Schrijvers et al., 1993). Außerdem scheinen einige Isoformen, darunter CD44v6 das Potential zur Metastasierung in Karzinomzellen der Ratte zu induzieren (Günthert et al., 1991). Einige Studien zeigten, dass eine Überexpression

von CD44v6 in Magen- (Yamamichi et al., 1998), Mamma-Karzinomen (Kaufmann et al., 1995) und Non-Hodgkin-Lymphomen (Stauder et al., 1995) mit einer reduzierten Überlebenszeit einhergehen. Auch bei colorektalen Tumoren ging die CD44v6 Expression mit einem bereits fortgeschrittenen Tumorstadium und Metastasierung einher (Heider et al., 1993; Wielenga et al., 1993; Mulder et al., 1994; Tanabe et al., 1995).

Außerdem wurde ein vermindertes Auftreten von CD44v6 während der Entstehung von PK-KH beschrieben (Salmi et al., 1993; Soukka et al., 1997; Kranke et al., 2000), womit bei dem Plattenepithelkarzinom des Larynx eine zunehmende Metastasierung und ein kürzeres Überleben verbunden wurde (Spafford et al., 1996). Dahingegen beschreiben andere Autoren, dass die Expression dieser CD44-Isoform in PK-KH unverändert zu sein (Harold-Mende et al., 1996; Van Hal et al., 1999).

Weiterhin scheint die verringerte CD44v6-Präsentation mit einem geringeren Differenzierungsgrad dieser Plattenepithelkarzinomzellen einherzugehen (Spafford et al., 1996; Souka et al., 1997; Kranke et al., 2000; Rodrigo et al., 2002).

### **1.3 Fragestellungen und Zielsetzungen**

Da dem CD44v6-Protein schon nach den ersten Studien eine metastasierungsinduzierende Wirkung zugeschrieben wurde (Gruber et al., 1992) und seine Expression in verschiedenen Tumorgeweben in Verbindung mit dem Überleben und der Metastasierung steht, soll in dieser Studie der Zusammenhang zwischen der Expression von CD44v6 und der Metastasierung von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx untersucht werden. Hier könnte eine positive Korrelation zu einer besseren Therapieplanung beitragen und einen weiteren Aufschluß zur Prognose des Oropharynxkarzinoms geben.

Zudem soll die Beziehung zwischen Protein-Expression und Tumorgröße, Differenzierungsgrad und Überleben der Patienten dargestellt werden, woraus sich ebenfalls eine Angabe zur eventuell prognostischen Aussagekraft der Expression machen lässt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Materialgewinnung und Datenerhebung**

Das untersuchte Gewebe stammt von 120 Patienten, die zwischen 1994 und 2004 in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel wegen eines Oropharynxkarzinoms in Behandlung waren oder noch sind. Dabei wurden sowohl Probeexzisionen (PEs), als auch Teile vollständiger Resektate (R0 und R1) mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad (G1-3, bzw. GX) herangezogen, die im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Direktor: Prof. Dr. J. Klöppel archiviert waren.

Weiterhin wurden die Therapieformen, Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation, Geschlecht, ein eventueller Nikotin-/Alkoholabusus und das Überleben ausgewertet. Die Unterlagen wurden durch Anfragen bei Hausärzten, Angehörigen und Einwohnermeldeämtern ergänzt, so dass die Krankheitsverläufe der an der Studie teilnehmenden Patienten verfolgt werden konnten. Der Tag des Studienschlusses war der 01.01.2004.

### **2.2 Klinische und histologische Daten**

Insgesamt wurden 95 männliche und 25 weibliche Patienten in die Studie aufgenommen. Das Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme zwischen 41 und 92 Jahren. Bei den männlichen Patienten betrug der Mittelwert 59 Jahre, der Median 57 Jahre, der jüngste Patient war zum Operationszeitpunkt 41, der älteste 92 Jahre. Bei den weiblichen Patienten betrug der Mittelwert 57 Jahre, der Median 54 Jahre, die jüngste Patientin war zum Operationszeitpunkt 43, die älteste 89 Jahre.

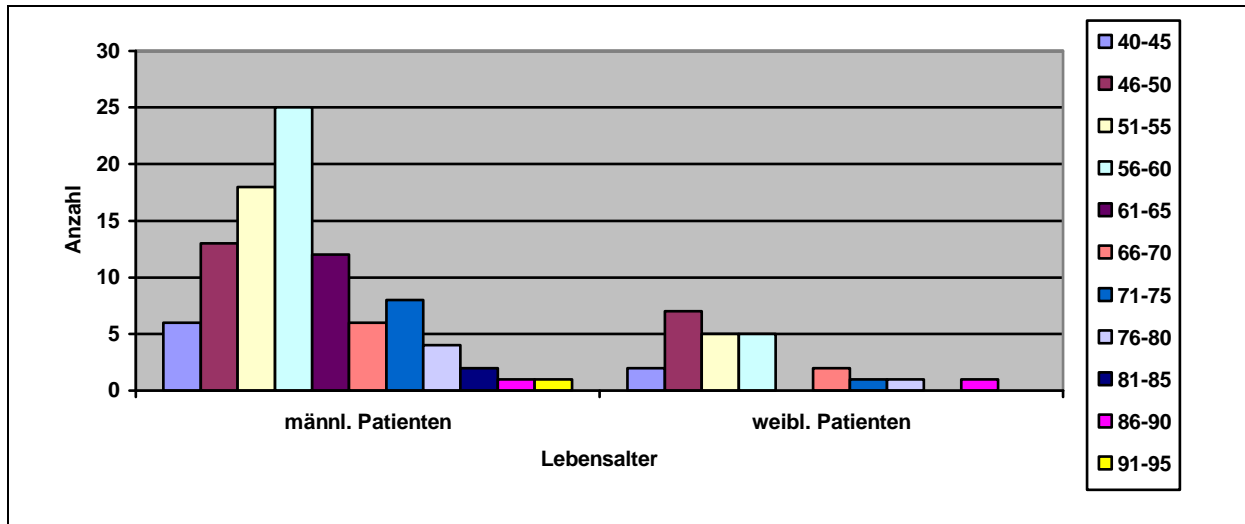


Abb.1: Altersverteilung der Patienten mit Oropharynxkarzinom (das Alter ist in Jahren angegeben)

Von den männlichen Patienten hatte die Mehrheit einen Tumor T4 nach TNM ( $n=39$ ), die Hälfte T2 bzw. T3 (T2:  $n=25$ ; T3:  $n=21$ ), 9,6% eine Tumorgroße T1 ( $n=10$ ). Bei den weiblichen Patienten zeigte sich eine gleichmäßigere Verteilung, so wurde bei je sieben Patientinnen ein T2-Tumor, T3, bzw. T4 festgestellt. Bei vier Patientinnen lag eine Tumorgroße entsprechend T1 vor.

Bei 41% der männlichen Patienten wurden keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen ( $n=39$ ), ebenso bei 36% der weiblichen Patienten ( $n=9$ ). Wurden positive Lymphknoten festgestellt, so befanden sie sich sowohl bei den männlichen, als auch den weiblichen Patienten zum größten Teil in einer Ausdehnung entsprechend N2 (männliche Patienten: 41%, weibliche 44%). Lymphknotenbefall gemäß N1 fand sich bei 17% der männlichen Patienten und 16% der weiblichen Patienten. Jeweils ein Patient, bzw. eine Patientin wies Lymphknoten entsprechend N3 auf.

Eine Fernmetastasierung wurde nur bei sieben der männlichen Studienteilnehmer und bei keiner Patientin festgestellt.

Über die Hälfte, 55,8% ( $n=53$ ) der Tumoren männlicher Patienten und 80% ( $n=20$ ) der Tumoren weiblicher Patienten wurden histologisch als G2 (mittlerer Differenzierungsgrad) eingestuft. Einen schlechten Differenzierungsgrad wiesen 37,9% der Tumoren männlicher Patienten und 16% der Karzinome der weiblichen Patienten auf. Gut differenzierte Tumoren stellten die Minderheit dar (siehe Tab.1).

	T1	T2	T3	T4	N0	N1	N2	N3	M0	M1	G1	G2	G3	GX
männlich	10	25	21	39	39	16	39	1	88	7	2	53	36	4
weiblich	4	7	7	7	9	4	11	1	25	0	0	20	4	1
Gesamt	14	32	28	46	48	20	50	2	113	7	2	73	40	5

Tabelle 1: TNM-Klassifizierung und Differenzierungsgrade der untersuchten Oropharynxkarzinome

Die meisten der Karzinome waren im Bereich der Tonsillenregion lokalisiert, inklusive Gaumenbögen mit insgesamt 47,5% und des Zungengrundes mit 10,8% (s.Tab.2).

Von den 48 Präparaten ohne Lymphknotenbefall wurden 22,9% (n=11) der Größe T1, 37,5% (n=18) T2 und 27,3% (n=18) T3 zugeordnet, lediglich 12,5% (n=6) der Tumoren waren so ausgedehnt, dass sie der Größe T4 entsprachen.

Bei 17 der 20 Tumoren der Klasse N1 fand sich keine Fernmetastasierung, davon hatten 15% (n=3) eine Größe entsprechend T1, 25% (n=5) T2, 10% (n=2) T3 und 35% (n=7) T4. Bei drei Tumoren mit regionärem Lymphknotenbefall wurden außerdem Fernmetastasen (M1) festgestellt. Von diesen Tumoren wiesen zwei eine Größe entsprechend T4 auf und einer entsprechend T3.

In der Gruppe der Karzinome mit ausgedehnterem Lymphknotenbefall finden sich vermehrt Tumoren der Klassen T3 (38 %, n= 19) und T4 (54%; n=27).

Drei Patienten wiesen einen noch ausgedehnteren Befall der Lymphknoten auf (N3), von denen ein Primärtumor mit T4, der andere mit T3 klassifiziert wurde.

<b>Lokalisation</b>	<b>Anzahl in Prozent</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>	<b>M0</b>	<b>M1</b>
Zungengrund	<b>10,8</b>	1	7	4	2	6	2	6	0	14	0
Weicher Gaumen	<b>0,8</b>	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
Uvula	<b>5</b>	3	1	2	0	5	0	1	0	6	0
Fossa tonsillaris	<b>5</b>	1	1	1	3	2	0	4	0	6	0
Gaumenbogen (vorderer/hinterer)	<b>10,8</b>	6	4	1	1	7	1	4	0	11	1
Tonsille, mehrere Teilbereiche überlappend	<b>4,2</b>	0	3	2	0	3	2	0	0	4	1
Tonsille, nicht näher bezeichnet	<b>27,5</b>	2	8	8	15	12	7	13	1	32	1
Seitenwand des Oropharynx	<b>5,8</b>	0	2	3	2	5	1	1	0	7	0
Hinterwand des Oropharynx	<b>3,3</b>	0	4	0	0	3	1	0	0	4	0
Oropharynx, mehrere Teilbereiche überlappend	<b>10</b>	0	0	2	10	2	3	6	1	10	2
Oropharynx, nicht näher bezeichnet	<b>16,7</b>	1	2	5	12	3	3	14	0	18	2

Tab.2: Übersicht über die TNM-Verteilung bezüglich der verschiedenen Lokalisationen der untersuchten Oropharynxkarzinome

UICC	TNM	Anzahl
Stadium I:	T1, N0, M0	11
Stadium II:	T2, N0, M0	18
Stadium III:	T3, N0, M0 oder T1-3, N1, M0	23
Stadium IV:	T4 oder N2-3 oder M1	68

Tab.3: Stadienverteilung nach TNM und Union internationale contre le cancer (UICC)

Von den 25 weiblichen Patienten fand sich bei 20 ein Nikotinabusus und ebenfalls bei 20 ein übermäßiger Alkoholkonsum. Dabei fanden sich bei 17 Frauen beide Risikofaktoren.

Bei den 95 männlichen Erkrankten fand sich bei 86 ein Nikotinkonsum, 82 Patienten gaben an in gesteigertem Maße Alkohol zu sich zu nehmen. Die Kombination beider Genussmittel fand sich bei 74 Personen.

	Nikotin	Alkohol	Nikotin und Alkohol
weibliche Patienten	20 (80%)	20 (80%)	17 (68%)
männliche Patienten	86 (90,5%)	82 (86,3%)	74 (77,9%)

Tab.4: Nikotin- und Alkoholabusus der 120 Patienten

Die meisten der 120 Patienten dieser Studie (n=81) wurden operativ behandelt, davon wurden 65 Patienten zusätzlich bestrahlt. Bei insgesamt 102 Patienten erfolgte eine Radiotherapie, die bei 61 Patienten mit Chemotherapie kombiniert wurde.

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Vorbereitung der Tumorblöcke**

Von den mit Formalin<sup>®</sup> fixierten und in Paraffin gebetteten Exzisaten wurden mit einem Mikrotom (2050<sup>®</sup> Supercut der Firma Reichert/ Jung, Nussloch) Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt. Diese wurden daraufhin für circa 10 min im 37°C warmen Wasserbad entspannt und schließlich auf Objektträgern (Superfrost Plus<sup>®</sup> Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig) zuerst auf dem Plattentrockner (Medax<sup>®</sup>, Medax GmbH & Co. KG, Rendsburg) angetrocknet und danach 48 Stunden im Trockenschrank aufbewahrt.

### **2.3.2 Hämalaun-Eosin-Färbung**

Zunächst 2 x 10 minütige Inkubation in Xylol (Merck, Darmstadt), darauf folgte die jeweils 5minütige Behandlung mit Ethanol (Merck, Darmstadt) in absteigender Konzentration (2x 100%, 2x 96%, 1x 80%, 1x 70%). Hieran schloss sich das 10 minütige Wässern in Aqua dest. (Ampuwa<sup>®</sup>, Fresenius Kabi, Bad Homburg), bevor die Präparate zuerst mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt) für 3 min und nach 10 minütigem Wässern in Leitungswasser für ca. 1 min mit Eosin (Sigma-Aldrich, Steinheim) gefärbt wurden. Danach wurden die Gewebeschnitte kurz mit 96% Ethanol und mit Aqua dest. abgespült, bevor sie die Alkoholreihe aufwärts durchliefen (70%, 80%, 2x96%, 2x100%), 2 x 10 min in Xylol inkubiert und schließlich mit Eukitt<sup>®</sup> (Kindler GmbH&CO, Freiburg) eingedeckt wurden.

### **2.3.3 Immunhistochemische Färbung und Antikörper-Testung**

Zur Testung der Funktion der jeweiligen Antikörper, der Spezifität der Färbung und zur Bestimmung der optimalen Antikörperverdünnung wurde das folgende immunhistochemische Färbeprotokoll nach Vorschlägen der jeweiligen Antikörper-Vertreiber entwickelt.

Zuerst wurden die Schnitte zur Entparaffinisierung 2 x 10 min in Xylol inkubiert, bevor sie kurz mit Ethanol in absteigender Konzentration (2 x 100%, 2 x 96%, 1 x 80% und 1 x 70%) und schließlich über 10 min mit TBS-Puffer bestehend aus 0,15 mol/l NaCl (J.T. Baker, Griesheim) und 0,05 mol/l Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Steinheim) behandelt wurden.

Es folgte die Demaskierung der Antigene durch Kochen der Präparate mit der Mikrowellen-Methode (Mikrowelle von Samsung, Schwalbach/ Taunus). Dazu wurden die Objektträger im



Objektträgerhalter in einer mikrowellenfesten Schale in Zitratpuffer (2,1g Zitronensäuremonohydrat von Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe pro 1l Aqua dest.) für 2 x 7 min bei 750Watt gekocht, wobei darauf zu achten war, dass die Objektträger ständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Daran schloss sich eine 15-20 minütige Inkubation in TBS-Puffer zum langsamen Abkühlen, eine 10minütige Lagerung in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol (Merck, Darmstadt) (1:100) zur Blockierung der endogenen Peroxidase und wiederum eine 5-minütige Spülung in TBS als Vorbereitung auf die Antikörperbehandlung an.

Die Präparate wurden daraufhin 20 min in TBS 3% Serum geblockt („lympholized“ Kaninchen-Serum, Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla CA) und für eine Stunde mit dem ersten Antikörper, Anti-CD44v6 (Maus IgG1 gegen humanes CD44v6, R&D Systems, Wiesbaden, Verdünnung 1:100 mit Antikörperverdünnungspuffer von BioLogo, Kronshagen), inkubiert. Während dieser Zeit, sowie während den folgenden Einwirkzeiten wurden die Gewebeschnitte in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur zur Vermeidung der Austrocknung aufbewahrt.

Vor und nach dem Einwirken des zweiten Antikörpers über 30min (Kaninchen- anti-Maus-IgG-Antikörper, Dako, Glostrup, Dänemark, Verdünnung 1:100) wurden die Objektträger mit TBS/0,5% Tween<sup>®</sup> (Tween<sup>®</sup> 20 Detergenz, Merck, Darmstadt) für 2 x 3 min gespült.

Es folgte die Behandlung mit dem Avidin-Biotin-(AB-)Komplex Vector, NovaRed <sup>™</sup>, BioLogo, Kronshagen) für 30 min, eine weitere Spülung und die Färbung mit dem Peroxidase-Substratkit über 15 min. Die Reaktion wurde durch Spülung mit Aqua dest. über 5 min gestoppt, eine Gegenfärbung mit gefiltertem Hämalaun nach Meyer (1:2 in Aqua dest.) für 10 sec und nach 10 minütiger Wässerung eine Ethanolbehandlung mit zunehmender Konzentration (1 x 70%, 1 x 80%, 2 x 96% und 2 x 100%) zur Entwässerung durchgeführt, bevor die Präparate nach 2 x 10 min Xylolinkubation mit Eukitt<sup>®</sup> eingedeckt wurden.

#### **2.3.4 Negativ- und Positiv-Kontrollen**

Als Kontrollgewebe für eventuelle Färbeprobleme lief bei jedem Färbedurchgang ein beliebiger Schnitt mit Tumorgewebe des Oropharynx mit, ohne jedoch mit dem Primärantikörper behandelt zu werden. Dieser Schritt wurde durch eine Inkubation in TBS-Puffer ersetzt, wobei auch der folgende Spülvorgang in TBS-Puffer getrennt von den anderen Schnitten verlief.

Um sicherzustellen, dass alle Färbungen die gleiche Spezifität besitzen und die Schnitte somit vergleichbar sind, wurde jeweils eine Probe des vom Antikörper-Anbieters empfohlenen Testgewebes, bei CD44v6 normales Tonsillengewebe ohne Tumor, mitbehandelt.

## **2.4 Mikroskopische Auswertung**

Die Auswertung der Gewebeschnitte und die Fotodokumentation erfolgten mit einem Lichtmikroskop (Axioplan<sup>®</sup>, Zeiss, Jena) mit integrierter digitaler Fotoeinrichtung. Dabei wurde jedes Präparat von zwei unabhängigen Untersuchern beurteilt, denen zum Zeitpunkt der Auswertung weder die klinischen Daten, noch die histopathologischen Diagnosen bekannt waren.

Jeder Gewebeschnitt wurde dabei zuerst in einer 100 fachen Übersichtsvergrößerung betrachtet, um 5 repräsentative Areale zu identifizieren. In diesen Bereichen wurden bei 400facher Vergrößerung jeweils 50 Zellen betrachtet, von denen die Karzinomzellen mit eindeutiger Membranfärbung als positiv gewertet wurden. Darauf wurde der Durchschnitt der 5 Bereiche des jeweiligen Schnittes berechnet und die Ergebnisse der beiden Auswerter arithmetisch gemittelt.

Weiterhin wurden die Präparate stichprobenartig von einem Pathologen ausgezählt und die ermittelten Werte zur Überprüfung der Spezifität verglichen.

## **2.5 Statistische Auswertung**

Die Aufarbeitung und Auswertung der mit Microsoft<sup>®</sup> Office<sup>™</sup> Excel 2003 (Microsoft<sup>®</sup>) zusammengestellten Ergebnisse erfolgte mit SPSS PC+ 3.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, USA).

Zur Darstellung der Statistik wurden als deskriptive Parameter der Median, Minimum und Maximum, die 25. und 75. Perzentile angegeben, da eine schiefe Verteilung angenommen wurde. Daher wurden auch die nicht-parametrischen Tests nach Kruskal-Wallis und nach Man-Whitney zur Bestimmung eines eventuellen signifikanten Unterschiedes zwischen Lymphknotenmetastasierung und Antigenexpression verwendet. Zur Berechnung der

Korrelation zwischen Differenzierungsgrad und Antigenexpression diente aufgrund der Gruppenanzahl der ebenfalls nicht-parametrische Withney-Man-Test. Das Signifikanzintervall wurde mit 5% festgelegt.

Das Überleben der Patienten wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, die Korrelation zwischen Überleben und Antigenexpression wurde mittels Log Rank (Mantel Cox) berechnet.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Antigenexpression**

#### **3.1.1 Färbequalität**

Insgesamt gelang eine gute Qualität der Färbung, sowohl der Präparate die kürzer, als auch der, die über einen längeren Zeitraum gelagert worden waren. Die gute Färbequalität führte zu nahezu identischen Ergebnissen der beiden Auswerter. Die in der immunhistochemischen Färbung mit dem CD44v6-Antikörper als positiv markierten Zellen konnten leicht durch ihre Membranfärbung identifiziert werden (Abb. 9-11). Die Zellen färbten sich hellbraun bis dunkelbraun, das Zytoplasma wurde nicht angefärbt. Teilweise traten unspezifische Hintergrundreaktionen auf, deren Ursache nicht eindeutig geklärt werden konnte, die jedoch die Auswertung nicht beeinflussten, da nur die eindeutigen Membranfärbungen als positiv gewertet wurden.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen waren reproduzierbar, was sich in der nahezu identischen Auswertung der beiden Untersucher und der Bewertung durch den Pathologen zeigte. Dies galt auch für eine ausschließliche Schätzung der Antigenexpression, die ebenfalls stichprobenartig durchgeführt wurde.

Die Plattenepithelkarzinome des Oropharynx zeigten ein für dieses Karzinomgewebe typisches zapfenförmiges Wachstumsmuster (Abb. 9). Bei verhornenden Plattenepithelkarzinomen erscheint die ebenfalls typische zwiebelschalenartig geschichtete Verhornung im Zentrum der jeweiligen Tumorzellnester (Abb. 10). Die antigenpräsentierenden Zellen verteilten sich homogen, wobei wie erwartet die verhornten Keratinozyten sowohl der obersten Epithelschichten, als auch in den Tumorzentren nicht angefärbt wurden (Abb. 9+10).

Die Positivkontrollen zeigten eine deutliche Membranfärbung der epithelialen Zellen. Bei den Negativkontrollen trat keine Färbung auf.

### 3.1.2 Expression von CD44v6 im Tumorgewebe

Die 48 Tumorproben von Patienten ohne Befall der Lymphknoten und ohne Fernmetastasen waren im Mittel zu 56,2% positiv gefärbt. Das Minimum betrug 2%, das Maximum 100%, die Standardabweichung betrug 32,26%. Der Median lag bei 59%.

Es wurden 20 Präparate von Patienten mit einem Lymphknotenbefall N1 nach der TNM-Einteilung ausgewertet. Das Minimum betrug 3%, das Maximum der Anfärbung 100%, der Median 53%.

Die 52 Tumoren von Patienten mit einem Lymphknotenbefall N2 und N3 wurden auf Grund der geringen Anzahl der N3-Tumoren als Gruppe zusammengefasst und statistisch gemeinsam ausgewertet. Das Minimum betrug 0%, das Maximum 100% und der Median 48%.

Insgesamt liegt keine schiefe Verteilung der Werte vor und es sind keine Extremwerte vorhanden.

Unter Zuhilfenahme des Kruskal-Wallis-Testes zeigt sich für die Gruppe der N0-Tumoren ein mittlerer Rang von 63,81%, für die Tumoren mit N1-Lymphknotenbefall 56,33% und für die Gruppe der ausgedehnter befallenen Lymphknoten mit N2 und N3 59,46%. Der p-Wert kann mit 0,665 angegeben werden, so dass kein signifikanter Unterschied gefunden werden konnte.

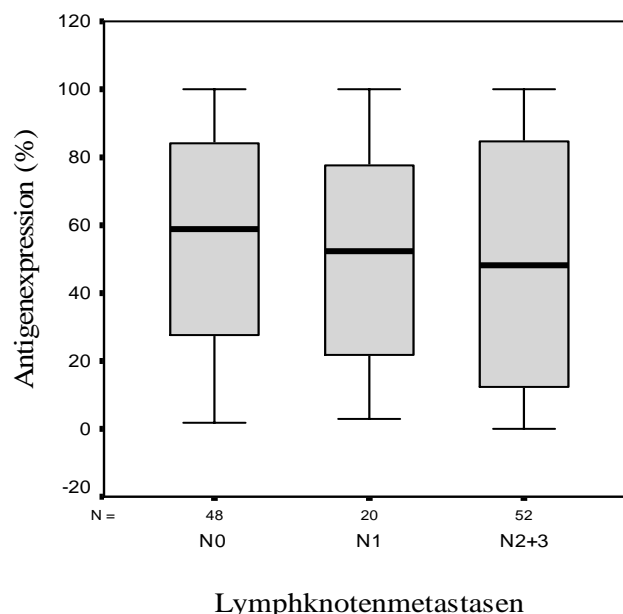


Abb.6: Darstellung der Verteilung der Färbeintensität mit Hilfe von Box plots. Angegeben sind der Median (als Balken in der Box), die 25. und 75. Perzentile (als Begrenzung der jeweiligen Box) und der Bereich der normalen Streuung (als T-Stücke).

Auch ein Vergleich der Gruppen N0 und N+ bezüglich der Antigenexpression mit Hilfe des Man-Whitney-Testes zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,395$ , mittlerer Rang N0=63,81; mittlerer Rang N+= 58,29).

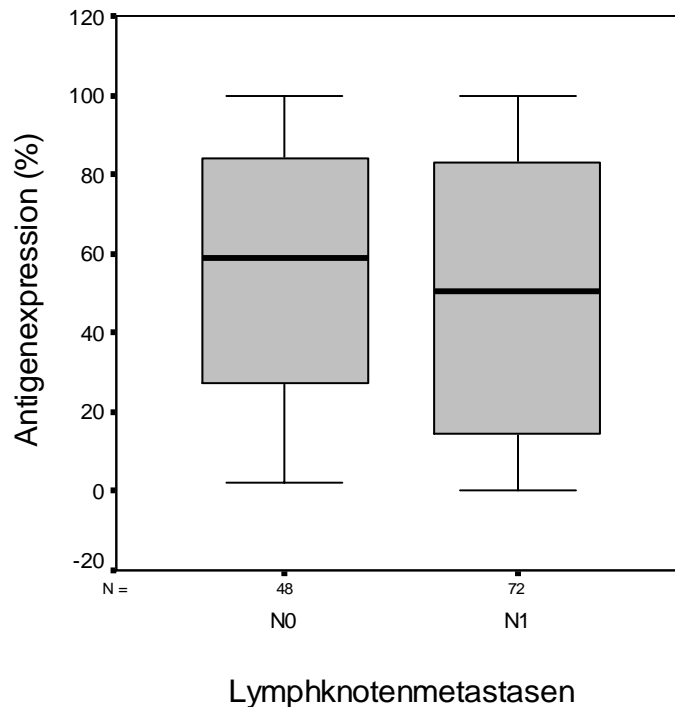


Abb.7: Darstellung der Verteilung der Färbeintensität mit Hilfe von Box plots. Angegeben sind der Median (als Balken in der Box), die 25. und 75. Perzentile (als Begrenzung der jeweiligen Box) und der Bereich der normalen Streuung (als T-Stücke).

### 3.1.3 Antigenexpression und Differenzierungsgrad

Da die Anzahl der gut differenzierten Tumoren (G1) mit  $n=2$  zu gering für einen Vergleich war, wurde diese Gruppe mit der Gruppe der mäßig differenzierten Tumoren zusammengefasst. Die bezüglich des Gradings nicht näher bezeichneten Karzinome (GX) wurden von diesem Vergleich ausgeschlossen. Keines der 120 Exzisate wurde als undifferenziert (G4) klassifiziert.

In der Gruppe der mäßig differenzierten Gewebe (G2) fanden sich 73 Malignome, die im Mittel zu 55,37% das Protein CD44v6 exprimierten. Der Median lag bei 64% ( $\pm 33,13\%$ ), das Minimum bei 2%, das Maximum bei 100%.

Bei den 40 schlecht differenzierten Tumoren fand sich im Mittel eine Expression von 47,59%. Der Median lag hier bei 37,5% ( $\pm$  35,7%), das Minimum bei 0% und das Maximum ebenfalls bei 100%.

Mit Hilfe des Mann-Whitney-Testes ließ sich für die Gruppe der G1 und G2 Tumoren ein mittlerer Rang von 60,69 und für die Gruppe der G3 Tumoren ein mittlerer Rang von 52,95 bestimmen. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Antigenexpression gefunden ( $p= 0,235$ ).

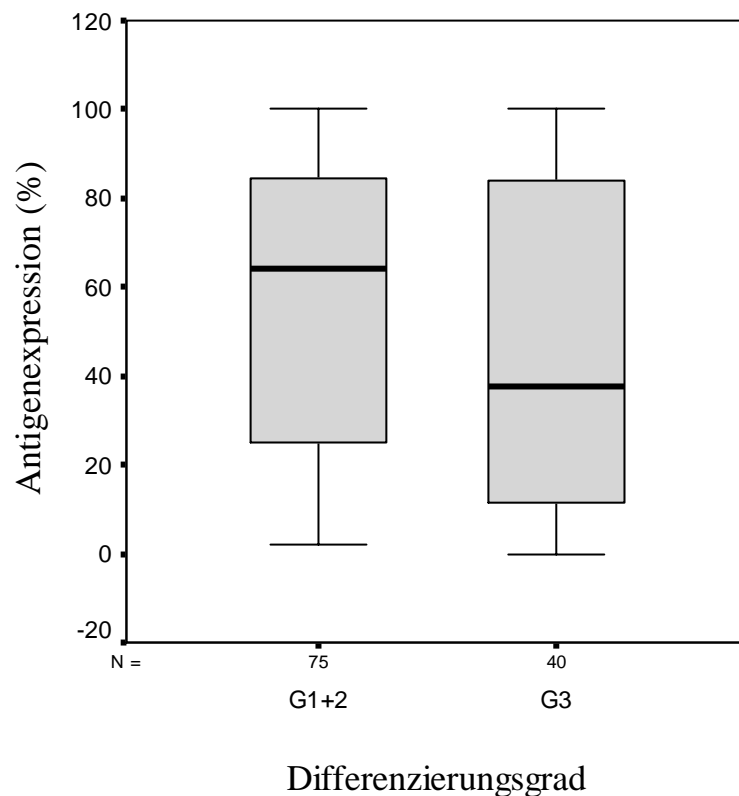


Abb.8: Box Plot-Darstellung des Differenzierungsgrades in Korrelation zur CD44v6-Expression

### 3.2 Patientenüberleben in Korrelation zur Antigenexpression

Da die Antigenexpression mit Werten von 0% bis 100% angegeben wurde, schien die Unterteilung der Ergebnisse anhand des Medians (58%) in zwei Gruppen am sinnvollsten. So verteilten sich 62 Präparate in die eine Gruppe mit einer Anfärbbarkeit, die kleiner als der Median war, während die übrigen 58 Präparate die zweite Gruppe bildete. Die Verteilung der einzelnen Ergebnisse ließ nicht vermuten, dass es sich bei den Präparaten mit 0%iger, beziehungsweise 100%iger Anfärbung um Ausreißer handelt.

Von den 62 Präparaten mit einer Antigenexpression  $< 58\%$  lebten noch 44 Patienten zum Ende der Datenerhebung am 01.01.2004. Von den Patienten, deren Tumoren eine Anfärbbarkeit  $> 58\%$  aufwiesen, lebten noch 45 Patienten.

Der Mittelwert der Überlebenszeit kann bei der Gruppe, deren Karzinome bis zu 58% angefärbt wurden mit 7,1 Jahren, der der zweiten Gruppe mit 7,6 Jahren angegeben werden. Der Standardfehler beträgt 0,57 bzw. 6,55 Jahre.

Ein Median kann nicht angegeben werden, da zum Ende der Datenerhebung ein großer Teil der Patienten lebte.

Der Vergleich der so erstellten Überlebenskurven nach Kaplan-Meier, zeigt im Log Rank (Mantel-Cox) keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,397$ ).

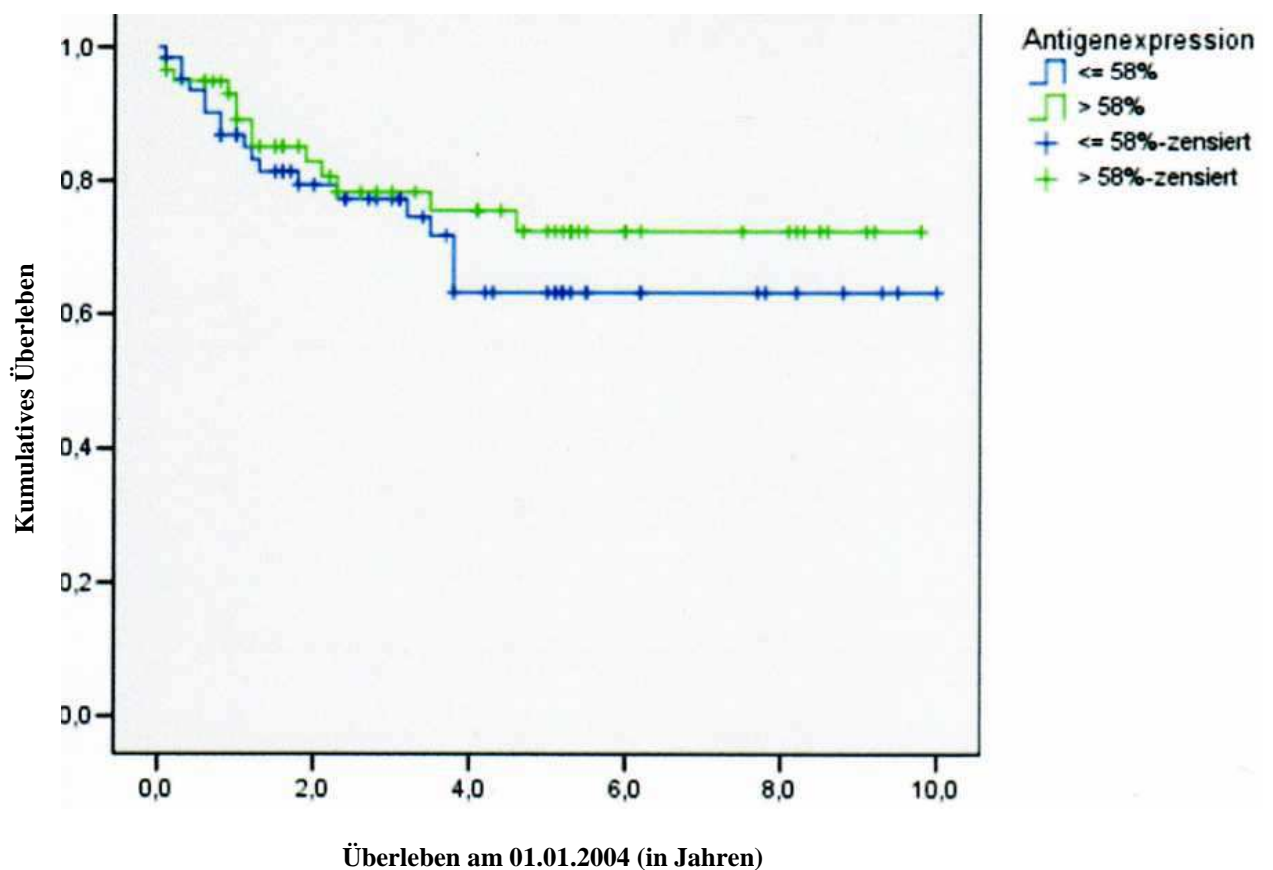


Abb.9: Überlebenskurven: Ereignisse = Todesfälle, Zensierung = Leben zum Ende der Datenerhebung am 1.1.2004



## **4. Diskussion**

### **4.1 Prognoseparameter des Oropharynxkarzinoms**

Etwa 40% der Menschen erkranken im Laufe ihres Lebens an bösartigen Neoplasien, von diesen Erkrankten sterben etwa 24% an ihrer malignen Erkrankung (Lang et al., 2002). Dabei scheint die Inzidenz der Karzinome im Kopf-Hals-Bereich weiterhin zuzunehmen, wobei sich deren Prognose trotz Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten nicht verbessert hat.

Die zunehmende Inzidenz, die zwischen 0,5 und 2 pro 100.000 liegt (Canto und Devesa, 2002), sind durch den weiterhin steigenden Konsum von Genussmitteln zu erklären, die neben Umwelt- und genetischen Einflüssen als Risikofaktoren zur Entstehung eines Oropharynxkarzinoms führen (Brennan et al., 1995; Newcomb und Carbone, 1992). So stellten Jaber und Mitarbeiter (1999), sowie van den Brekel und Mitarbeiter (2002) in ihren Untersuchungen dies für 85% der Patienten mit PK-KH als zutreffend fest.

Auch in dieser Studie stellt der Genussmittelkonsum einen prädisponierenden Faktor für ein Oropharynxkarzinom dar. Es gaben 80% der weiblichen und 90,5% der männlichen Patienten einen Nikotinkonsum an. Der Alkoholgenuss wurde ebenso von über 80% der Studienteilnehmer angegeben.

Daneben spielt das humane Papillomavirus (HPV) eine bedeutende Rolle in der Ätiologie der Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches. Dabei werden die viralen Gene in das Zellgenom integriert und scheinen für die Inaktivierung des p53-Tumorsuppressorproteins durch das HPV E6-Onkoprotein entscheidend zu sein (Min, 1994; van Houten et al., 2001).

Ein grundlegendes Problem für die relativ schlechte Prognose ist die späte Diagnose der Tumoren, die bei circa einem Drittel der Patienten erst in einem fortgeschrittenen Stadium mit zumeist schon befallenen Halslymphknoten gestellt wird (Remmert et al., 2001).

Auch die Mehrzahl der Patienten in der vorliegenden Studie befand sich in einem Stadium III (n=23) beziehungsweise IV (n=68).

Dem Tumorstadium (Esser et al., 1994) und insbesondere dem Befall der Lymphknoten wird einstimmend die größte prognostische Relevanz zugesprochen. So beschreiben Pericot und seine Mitarbeiter eine Abnahme der durchschnittlichen Überlebensraten bei entsprechender

Therapie von 90% im Stadium I auf 75% im Stadium II, hin zu 45-75% im Stadium III und schließlich kleiner als 35% im Stadium IV (Pericot et al., 2000). Diese Beobachtung wird durch weitere Studien bestätigt, die eine 5-Jahres-Überlebensrate  $\leq 30\%$  bei Patienten mit regionären Halslymphknotenmetastasen (Stadium III) berichten (Koivunen et al., 2002; Mignogna et al., 2002).

Neben dem Tumorstadium wird von einigen Autoren dem Alter bei Diagnosestellung eine prognostische Relevanz zugesprochen. So wird beschrieben, dass Patienten mit einem Alter von über 70 Jahren ein längeres krankheitsfreies Intervall und eine bessere Überlebensrate als junge Patienten haben (de Cassia Braga et al., 2003).

Auch Janot und seine Kollegen beschrieben den Einfluss des Alters und konnten außerdem eine Aussagekraft des histopathologischen Gradings darstellen (Janot et al., 1996). Darüber besteht unter verschiedenen Autoren allerdings keine Übereinstimmung. So fanden Kearsley und Mitarbeiter (1990), Zätterström und Mitarbeiter (1991) Boysen und Loven (1993), dass der histologische Differenzierungsgrad nur begrenzt aussagekräftig ist.

Als weitere Einflussgröße auf die Prognose sind zusätzliche Erkrankungen zu sehen. Dies gilt besonders für chronische Erkrankungen, die unabhängig von der Tumorerkrankung eine Rolle spielen, da sie bei der Therapieplanung beachtet werden müssen, beziehungsweise posttherapeutisch weiter bestehen und die Überlebenszeit selbst beeinflussen. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Borggreven et al., 2003).

#### **4.2 Das Membranprotein CD44v6**

Mit der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen tumorassoziierte Antigene ab den achtziger Jahren (Koprowski et al., 1979; Oosterwijk et al., 1986) konnten für einige Malignome wichtige Parameter gefunden werden, die zur Diagnostik, Therapieplanung und Nachsorge eingesetzt werden, beziehungsweise neue Therapiemöglichkeiten darstellen.

Als Beispiele für die diagnostische Bedeutung sei auf das karzinoembryonale Antigen beim Kolonkarzinom oder auf das Alpha-Fetoprotein beim primären Leberzellkarzinom verwiesen (Lamerz, 1998).

Für Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches konnte bisher kein solches Oberflächenprotein ausgemacht werden, wobei jedoch CD44v6 in mehreren Studien als sehr viel versprechendes

Antigen angesehen wird (Fox et al., 1994; Börjesson et al., 2003), das in PK-KH vermehrt exprimiert wird und so als möglicher Angriffspunkt einer immunologischen Therapie dienen könnte.

CD44v6 wurde zuerst in Zusammenhang mit metastasierenden Tumoren der Ratte beschrieben (Gruber et al., 1992). Außerdem spielt es eine Rolle bei der Lymphozytenaktivierung (Guo et al., 1996). Diese Verbindung wird auch durch das vermehrte Erscheinen des Proteins bei Autoimmunerkrankungen wie Glomerulonephritiden, Diabetes mellitus, Rheumatoider Arthritis und entzündlichen Darmerkrankungen bestätigt (Günthert et al., 1991; Herrlich et al., 1993; Naujokas et al., 1993; Weiss et al., 1998).

Aufgrund des beschriebenen Einflusses der Isoform CD44v6 auf Lymphozyten und auf metastasierende Tumoren scheint ein Zusammenhang zwischen der Antigenexpression und dem Lymphknotenstatus zu bestehen.

Dem Protein wird außerdem eine prognostische Rolle in der Tumorprogression bei Non-Hodgkin-Lymphomen, Mamma-Karzinomen und Kolon-Karzinomen zugeschrieben (Mulder et al., 1994; Stauder et al., 1995). Diese Beobachtung konnte auch für Plattenepithelkarzinome des Larynx bestätigt werden (Spafford et al., 1996). Allerdings fanden andere Autoren keine Unterschiede in der Expression bei PK-KH (Harold-Mende et al., 1996; Van Hal et al., 1999).

Da Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches jedoch keine homogene Gruppe bilden und sich zum Beispiel in ihrem biologischen Verhalten oder ihrer Beeinträchtigung des Patienten und damit dem Zeitpunkt der Diagnosestellung unterscheiden, ist es eventuell sogar fragwürdig diese Tumoren als Gruppe zusammenzufassen (Berrino und Gatta, 1998). Daher wurden in dieser Arbeit nur Plattenepithelkarzinome des Oropharynx untersucht.

In neueren Studien wurde versucht monoklonale Antikörper gegen CD44v6 als Therapiemöglichkeit bei PK-KH zu entwickeln. So untersuchten Börjesson und Mitarbeiter (2003) die Möglichkeiten einer Radioimmuntherapie mit Bivatuzumab, dem monoklonalen Antikörper BIWA 4. Die Ergebnisse dieser Phase I Therapie-Studie scheinen bisher erfolgsversprechend zu sein, wobei sich auch hier zeigt, dass ein Problem der Antikörpertherapie die Spezifität ist. So binden monoklonale Antikörper nicht nur an Tumorzellen, sondern auch an andere Gewebe und verfügen so über ein weites Nebenwirkungsprofil. In der beschriebenen Studie kam es im Verlauf unter anderem zur Knochenmarksdepression.

### 4.3 Expression von CD44v6

Betrachtet man sowohl Karzinom-, als auch normale Epithelzellen, so zeigt sich in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Anfärbung der Karzinomzellen, die zwischen den Schnitten stark schwankt und eine starke Anfärbung des normalen Epithels. Im Mittel wurden 52,8% aller betrachteten Tumorzellen als eindeutig positiv gefärbt bewertet (Median 58%), die Standardabweichung betrug allerdings 34,1%. Das bedeutet, dass die Hälfte aller betrachteten Tumorzellen angefärbt wurde, es aber Schnitte gibt in denen alle beziehungsweise auch keine Zellen angefärbt wurden.

Von anderen Autoren wurde beschrieben, dass sich auf normalen Epithelzellen ein hohes und gleichmäßiges Vorkommen von CD44v6 zeigt (Fox et al., 1994), besonders auch in der Mundschleimhaut und der normalen Haut, wobei die obersten Epithelschichten, also die verhornten Keratinozyten keine Expression aufweisen (Van Hal et al., 1999).

Normale Gewebe, die eine hohe Konzentration des CD44v6-Proteins aufweisen sind Tonsillenkrypten, Schilddrüsengewebe, Mamma, Prostata-Gewebe, Zervix, Plazenta, Zunge, Ösophagus, kardiorespiratorisches Epithel und Haut (Fox et al., 1994). Daher verwendeten wir normales Tonsillengewebe als Referenzgewebe bei jedem Färbedurchgang, bei dem wir durchweg eine hohe Anfärbbarkeit mit Anti-CD44v6 fanden.

In Plattenepithelkarzinomen, vor allem des Kopf- und Halsbereiches, Plattenepithelkarzinomen der Lunge, des Ösophagus, der Zervix und der Haut wurde CD44v6 in bisherigen Studien besonders stark exprimiert (Schrijvers et al., 1993).

Soukka und Mitarbeiter (1997) beschrieben eine starke Anfärbbarkeit normaler Epithelzellen der oberen Atemwege und die Abnahme der Antigenexpression bei abnehmendem Differenzierungsgrad der Zellen.

Harold-Mende und Mitarbeiter (1996) untersuchten sowohl Karzinome des Larynx (n=35), als auch des Pharynx (n=37) und stellten keine Unterschiede in der Expression zu normalem Epithel fest. Allerdings können die unterschiedlichen Lokalisationen Ursache dafür sein, dass ein eventuell bestehender Unterschied in der Antigenexpression ausgeglichen wird.

Wir untersuchten in unserer Studie lediglich Plattenepithelkarzinome des Oropharynx um einen Einfluss der Lokalisation auf die Expression von CD44v6 auszuschließen, wie sie bei Harold-

Mende und Mitarbeitern (1996) vorgelegen haben könnte und fanden eine starke Anfärbung des normalen Epithels, wie es von Soukka und Mitarbeitern (1997) beschrieben wurde. Daneben zeigte sich auch in unseren Färbungen ebenfalls die Abnahme der Expression von C44v6 bei zunehmender Verhornung wie es von den oben genannten Autoren beschrieben worden ist (Van Hal et al., 1999). So sind in einigen Präparaten Inseln von verhornten Plattenepithelzellen zu sehen, die kaum eine Anfärbung zeigten, während die übrigen Zellen deutlich gefärbt erscheinen (vgl. Abb. 9 und 10). Dies entspricht der Vorstellung, dass CD44v6 eine Rolle in der Zelladhäsion spielt, da bei Abnahme des Zellzusammenhaltes auch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen abnehmen sollte.

Bezüglich der starken Schwankung der Antigenexpression stellt sich die Frage, ob sich die Ergebnisse unserer Studie durch die Inhomogenität der Tumoren bezüglich ihrer Größe, Stadium und Differenzierung erklären lassen und somit eine weitere Unterteilung der Tumoren sinnvoll wäre. Dagegen spricht jedoch die dann sehr geringe Fallzahl der einzelnen Gruppen, so dass wir davon absahen.

#### **4.4 Expression von CD44v6 und Metastasierung**

Bei den von uns untersuchten Präparaten von Oropharynxtumoren fand sich bei Betrachtung der Lymphknotenstadien in Zusammenhang mit der Antigen-Expression kein signifikanter Unterschied ( $p=0,665$ , beziehungsweise  $p=0,395$ ). Dabei verglichen wir die Tumoren ohne Lymphknotenbefall einmal mit allen Tumoren mit Lymphknotenbefall (N+) und einmal mit den Tumoren mit Lymphknotenbefall N1 und N2+3. Damit sehen wir in unserer Studie keine signifikante Abnahme der Antigenexpression mit Zunahme des Lymphknotenbefalls.

Günthert und Mitarbeiter (1991) untersuchten als einer der ersten Wissenschaftler den Zusammenhang zwischen Expression von CD44-Proteinen und Metastasierung. Er schrieb einigen Isoformen, darunter CD44v6 das Potenzial zu, Metastasierung in Karzinomzellen der Ratte zu induzieren.

Mittlerweile wurden verschiedene Untersuchungen zu Veränderungen der Antigenexpression im Zusammenhang zur Metastasierung der jeweiligen Tumoren veröffentlicht. Darin werden zum Teil gegensätzliche Aussagen sowohl bezüglich der Antigenexpression selbst, als auch zu einem eventuellen Zusammenhang der beiden Parameter getroffen.

Kranke und Mitarbeiter (2000) bestätigten den Eindruck, dass die Expression des Proteins organspezifisch und abhängig von der Pathohistologie der jeweiligen Karzinome ist, indem sie mittels Polymerase-Ketten-Reaktion in Blasen-, Kolon- und Mamma-Karzinomen eine veränderte Expression von CD44v6 feststellten.

Daneben stellten sie einen positiven Zusammenhang sowohl zwischen Expression und Lymphknotenstatus, als auch Expression und Differenzierungsgrad bei PK-KH dar. Dabei beziehen sich diese Ergebnisse allerdings auf Auswertungen in denen die Karzinome der unterschiedlichen Lokalisationen des Kopf- und Halsbereiches zusammengefasst und gemeinsam ausgewertet wurden.

Matsumura und Tarin (1992) oder Wielenga und Mitarbeiter (1993) beschrieben in ihren Untersuchungen eine Abnahme der Expression mit zunehmendem Lymphknotenbefall. Salmi und Mitarbeiter (1993) erwähnten zudem, dass sich Metastasen der Plattenepithelkarzinome praktisch nicht mit Antikörpern gegen CD44v6 anfärben ließen. Bei anderen Autoren wiederum scheint sich die Expression dieser CD44-Isoform in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches während der Metastasierung nicht zu verändern (Van Hal et al., 1999).

Van Hal und Mitarbeiter (1999) verglichen normale Mundschleimhaut mit PK-KH und fanden eine homogene Anfärbung der Primärtumoren ohne und mit Metastasierung. Diese Antigenexpression entsprach sogar der des normalen Gewebes. Auffällig dabei ist, dass er dabei drei verschiedene CD44v6-Antikörper verwendete und jeweils zu ähnlichen Ergebnissen gelangte.

Rodrigo und Mitarbeiter (2002), die Plattenepithelkarzinome des supraglottischen Larynx untersuchten und damit nicht alle PK-KH als Gruppe zusammenfassten, fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Expression und Metastasierung.

Somit entsprechen unsere Ergebnisse denen der meisten der oben erwähnten Autoren, die ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Antigenexpression und Metastasierung sahen. In den Untersuchungen von Kranke und Mitarbeiter (2000) wird ein positiver Zusammenhang gesehen, dabei werden allerdings Tumoren unterschiedlicher Lokalisationen im Kopf- und Halsbereich zusammengefasst. Daneben bestätigten sie allerdings den Eindruck, dass die Antigenexpression organspezifisch zu sein scheint. Daher stellt sich die Frage, ob man den oberen Aerodigestivtrakt als Organsystem auffassen und gemeinsam betrachten kann.

Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten daneben zum einen in der Auswertung der Färbung liegen. So ist eine nicht-quantitative Beschreibung der Färbung unter anderem abhängig von der Erfahrung der Auswerter. Weitere Ursachen könnten in den Tumorgruppen liegen. Wir fassten Tumoren bezüglich einzelner Parameter, wie dem Lymphknotenbefall zusammen, konnten aber aufgrund sonst zu geringer Gruppengröße weitere Größen, wie Tumorausdehnung oder Alter der Patienten nicht weiter berücksichtigen. Daher sind die Gruppen nicht homogen und die Tumoren unterscheiden sich hinsichtlich mehrerer Einflussgrößen. So fließen zahlreiche Faktoren in die einzelnen Studien ein, die zu so unterschiedlichen Ergebnissen führen können.

Bei Betrachtung der vorhergegangenen Studien fielen allerdings einige sich scheinbar widersprechende Beobachtungen auf. So stellten wir uns die Frage, warum eine ausgeprägte Anfärbbarkeit mit Anti-CD44v6 in gesunder Haut oder Epithel des normalen oberen Aerodigestivtraktes positiv mit der Zelladhäsion korreliert (Fox et al., 1994, Van Hal et al., 1999), während Karzinome mit hohem Metastasierungspotential ebenso eine starke Anfärbbarkeit aufweisen, obwohl eine geringe Zelladhäsion im Rahmen der Metastasierung eher zu erwarten wäre. Vorstellbar wäre, dass die Zellentartung nicht nur einen Einfluss auf die Expression sondern auch auf die Funktion des Proteins bis hin zum Funktionsverlust hat. Dafür spräche eine Korrelation von Antigenexpression und abnehmendem Differenzierungsgrad.

#### **4.5 Expression von CD44v6 und Differenzierung**

Betrachtet man die von uns untersuchten Tumoren bezüglich ihres Differenzierungsgrades und vergleicht diesen mit der Expression von CD44v6, so lässt sich feststellen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Antigenexpression gefunden ( $p=0,235$ ) wurde. Wir verglichen dabei 73 Malignome, die eine mäßige Differenzierung (G2) aufwiesen und im Mittel zu 55,37% das Protein CD44v6 exprimierten mit 40 schlecht differenzierten Tumoren (G3). Daneben lagen wieder Schnitte mit Anfärbung aller Tumorzellen (Maximum 100%), beziehungsweise Schnitte mit keiner Anfärbung der Tumorzellen vor (Minimum 0%).

In verschiedenen anderen Studien ging die verringerte CD44v6-Präsentation mit einem geringeren Differenzierungsgrad dieser Plattenepithelzellen einher.

In einer Studie von Kranke und Mitarbeitern (2000) konnte ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der Expression von CD44v6 und sowohl dem Lymphknotenbefall, als auch dem Differenzierungsgrad festgestellt werden.

Dabei werteten Kranke und seine Mitarbeiter allerdings PK-KH unterschiedlicher Lokalisationen gemeinsam aus, so bezieht sich ihre Studie auf Oropharynx-, Hypopharynx, Zungen- und Mundboden-Plattenepithelkarzinome. Ein weiterer Unterschied der beiden Untersuchungen besteht in der Anzahl der in die jeweiligen Tumorstadien eingeschlossenen Patienten. So überwiegen in der vorliegenden Studie Tumoren eines fortgeschritteneren Stadiums (76% der Patienten hatten ein Stadium III oder IV, 24% ein Stadium I oder II) während bei Kranke und Mitarbeiter der Unterschied zwischen den Stadiengruppen geringer ausfiel (62% im Stadium III oder IV und 38% im Stadium I oder II).

Bei Rodrigo und Mitarbeitern (2002) zeigte sich ebenso ein Zusammenhang zwischen Expression und Differenzierungsgrad der supraglottischen Larynx-Karzinome. Ein Unterschied zu der vorliegenden Studie zeigt sich bei Betrachtung der Anzahl der Tumoren in den einzelnen Differenzierungsstadien. So schlossen wir die gut und mäßig differenzierten Tumoren aufgrund zu geringer Fallzahlen in eine Gruppe zusammen (insgesamt 62,5%), weisen daneben aber eine größere Fallzahl in der Gruppe der schlecht differenzierten Tumoren auf (33,3% im Gegensatz zu 19,8% bei Rodrigo und Mitarbeitern).

Daneben handelt es sich in den beiden Untersuchungen um unterschiedliche Lokalisationen der Primärtumore.

Auch Soukka und Mitarbeiter (1997), die eine signifikante Korrelation von Differenzierungsgrad und CD44v6-Expression beschrieben, fassten verschiedene Tumorlokalisation im gesamten Kopf- und Halsbereich zusammen. Ihre Fallzahl mit 49 Patienten war außerdem sehr viel geringer als in der vorliegenden Studie und zudem waren die Patienten präoperativ bestrahlt worden. Insgesamt fand sich bei ihnen in 19 von 49 Fällen und auch in 22% der gut differenzierten Tumoren keine Anfärbung mit CD44v6-Antikörpern.

In den Untersuchungen von Spafford und Mitarbeiter (1996) zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und Antigenexpression. Es handelt sich hier zwar um eine ältere Studie, bemerkenswert ist allerdings die große Fallzahl (n=277), die in den zuvor erwähnten Studien nicht erreicht wurde und die immunhistochemische Färbung mit drei unterschiedlichen Antikörpern gegen CD44v6, die alle ähnliche Ergebnisse erbrachten.



Neben diesen qualitativen Studien fand sich in einer quantitativen Studie von Kawano und Mitarbeitern (2005) allerdings ebenso kein signifikanter Zusammenhang zwischen verschiedenen klinischen Variablen und der Antigenexpression. Sie untersuchten dabei die Antikörperspiegel im Serum von Patienten mit PK-KH bezüglich einer Korrelation dieser zu Alter, Geschlecht, Differenzierungsgrad, Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Metastasierung und TNM-Stadium.

Zusammenfassend heißt das, dass in den Studien in denen die Antigenexpression mit dem Differenzierungsgrad korrelierte, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit verschiedene Tumorlokalisationen zusammengefasst wurden. Somit fällt ein Vergleich der Studien untereinander schwer und wird durch die unterschiedlichen Fallzahlen noch erschwert. Die Untersuchung von Spafford und Mitarbeitern (1996) mit den größten Fallzahlen und auch die Untersuchung von Kawano und Mitarbeitern (2005), mit quantitativer Auswertung Antikörperspiegeln im Patientenserum kommen zu dem gleichen Ergebnis wie wir, keiner Korrelation zwischen Antigenexpression und Differenzierungsgrad.

#### **4.4 Korrelation der CD44v6-Expression mit dem Überleben bei PK-KH und anderen Tumorentitäten**

In den meisten der oben erwähnten Studien wird eine Abnahme der CD44v6-Expression bei Entstehung der Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches beschrieben (Salmi et al., 1993; Soukka et al., 1997; Kranke et al., 2000). Neben der Frage, ob dieses Antigen eine Rolle für die Metastasierung spielt, wollten wir untersuchen, ob das CD44v6-Antigen eine direkte Rolle als Prognosefaktor spielt und betrachteten daher die Expression bezüglich Überleben auch unabhängig von Metastasierung und Differenzierungsgrad.

Wir teilten dabei die Tumoren anhand der Antigenexpression in zwei Gruppen und verglichen das Überleben der Patienten. Von den 62 Präparaten mit einer Antigenexpression, die kleiner als der Median (58%) war lebten noch 44 Patienten zum Ende der Datenerhebung. Von den Patienten, deren Tumoren eine Anfärbbarkeit  $> 58\%$  aufwiesen, lebten noch 45 Patienten.

Da im Vergleich der daraufhin erstellten Überlebenskurven nach Kaplan-Meier kein signifikanten Unterschied ( $p=0,397$ ) erkennbar ist, gehen wir nicht von einem direkten Einfluss des CD44v6-Proteins auf die Prognose bei Oropharynxkarzinomen aus.

Die Frage nach dem Einfluss des Antigens auf das Überleben wurde schon von verschiedenen Wissenschaftlern für PK-KH untersucht. Soukka und Mitarbeiter (1997) sahen dabei für PK-KH einen Zusammenhang zwischen Expression und Differenzierung, konnten diesen aber nicht für Expression und Überleben bestätigen. Sie untersuchten die CD44v6-Expression von Epithel und Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches, die sie allerdings nicht weiter differenzierten und verglichen sie mit klinisch-pathologischen Parametern und der Prognose. Sie fanden dabei keine Korrelation zu Überleben, Tumorgröße, Geschlecht, Lymphknotenstatus oder Alter der Patienten.

Rodrigo und Mitarbeiter (2002) konnten ebenso einen Zusammenhang zwischen Antigenexpression und Differenzierung für supraglottische Larynxkarzinome beschreiben, sahen daneben aber auch keine Korrelation zwischen Antigen-Expression und Tumorgröße, Invasionstiefe oder Lymphknotenbefall.

Dies wurde auch von Sikorska und Mitarbeiter (2002) bestätigt, die ebenfalls weder einen Zusammenhang zwischen Antigenexpression und Metastasierung noch zwischen Expression und Überleben bei Plattenepithelkarzinomen des Larynx sahen.

Das heißt, das Ergebnis unserer Studie bestätigt die bisherigen Untersuchungen oben genannter Wissenschaftler. Dabei ist zu beachten, dass die Überlebenskurven in der vorliegenden Studie für heterogene Gruppen von Patienten erstellt wurden, die sich lediglich bezüglich ihrer Antigenexpression unterscheiden. Unbeachtet blieben Faktoren wie Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Erkrankungsalter und eventuell bestehende Vorerkrankungen, die einen Einfluss auf das Überleben haben. Fraglich bleibt daher, ob die Betrachtung der Korrelation von Antigenexpression und Überleben in Subgruppen einen signifikanten Unterschied zeigen würde.

Weiterhin konnte die Todesursache nicht beachtet werden, da nicht zu eruieren war, ob die verstorbenen Patienten an ihrer Tumorerkrankung, Begleiterkrankungen, Unfällen oder aufgrund anderer Ursachen starben.

Daneben spielt bei Betrachtung der Überlebenskurven eine Rolle, dass ein großer Teil der Patienten zum Ende der Datenerhebung noch lebte. Damit ist der Beobachtungszeitraum zu gering um eine endgültige Aussage zur Korrelation von Antigenexpression und Überleben zu machen.

Spafford und Mitarbeiter (1996) beschrieben, dass bei Plattenepithelkarzinomen des Larynx die Abnahme der CD44v6-Expression sowohl mit einer zunehmenden Metastasierung, als auch mit einem kürzeren Überleben einhergeht. Allerdings beziehen sich diese Aussagen dabei nur auf Tumoren im Stadium IV. Bei Tumoren ohne Metastasierung ging eine starke Antigenexpression stadienunabhängig mit einem längeren Überleben einher ( $p < 0,2$ ). Für metastasierte Tumoren außerhalb des Stadium IV konnte keine signifikante Korrelation zur Antigenexpression beschrieben werden. In die Studie wurden Patienten eingeschlossen die zwischen 1979-1989 behandelt wurden. Daher stellt sich die Frage, ob es sinnvoll erscheint diese Studien zu vergleichen, da es im Laufe der Zeit zwischen den Untersuchungen zu einer Zunahme verschiedener Risikofaktoren, zum Beispiel Rauchen oder einer Infektion mit HPV gekommen sein kann. Es wäre vorstellbar, dass exogene Einflüsse die Antigenstruktur, beziehungsweise die Expression verändern und es somit bei zunehmendem Einfluss der Risikofaktoren zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann.

Andere Studien zeigten eindeutige Ergebnisse. So zum Beispiel, dass eine Überexpression von CD44v6 in Magen- (Yamamichi et al., 1998), Mamma-Karzinomen (Kaufmann et al., 1995) und Non-Hodgkin-Lymphomen (Stauder et al., 1995) mit einer reduzierten Überlebenszeit einhergehen. Auch bei colorektalen Tumoren ging die CD44v6 Expression mit einem bereits fortgeschrittenen Tumorstadium und Metastasierung einher (Heider et al., 1993; Mulder et al., 1994; Tanabe et al., 1993; Wielenga et al., 1993).

Insgesamt fand sich bei den von uns untersuchten Präparaten von Oropharynxtumoren bei Betrachtung der Lymphknotenstadien in Zusammenhang mit der Antigen-Expression kein signifikanter Unterschied, dabei entsprechen unsere Ergebnisse denen der meisten der oben erwähnten Autoren. Auch bei Betrachtung der Tumoren bezüglich ihres Differenzierungsgrades und der Expression von CD44v6, lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Antigenexpression feststellen. Ebenso können wir nach unseren Ergebnissen nicht von einem direkten Einfluss des CD44v6-Proteins auf die Prognose bei Oropharynxkarzinomen ausgehen.

Dabei stellen sich mehrere Fragen. Spielt die Expression von CD44v6 nur eine geringe Rolle für die Prognose der PK-KH? Verändert sich während der Abnahme der Differenzierung der Zellen die Struktur des Antigens, so dass Antikörper schlechter binden? Gibt es eventuell zusätzliche Faktoren, die die Antigenexpression verändern, beziehungsweise die Bindung der Antikörper an das CD44v6-Protein? Könnte zum Beispiel das Rauchen oder die Infektion mit HPV eine solche Veränderung hervorrufen?

So scheint für die Bewertung der Expression des CD44v6-Antigens die genaue Tumorlokalisation, ebenso wie das Tumorstadium nach UICC eine entscheidende Rolle zu spielen. Auch das Einwirken exogener Einflüsse sollte berücksichtigt werden. Daneben lassen sich unterschiedliche Studienergebnisse eventuell durch das Zusammenspiel verschiedener Einflussgrößen, wie den Fallzahlen in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien, die Gesamtfallzahlen, die Auswertung der Färbungen oder unterschiedliche Antikörper gegen CD44v6 erklären.

## **5. Zusammenfassung**

Das Protein CD44v6 gehört zur Familie der transmembranösen CD44-Glycoproteine. Die Varianten unterscheiden sich dabei bezüglich ihrer Expression in gesunden wie in verschiedenen Tumorgeweben und entstehen durch gewebeabhängiges alternatives Splicing und posttranslationale Modifikationen. Dabei wird die Form CD44v6 in Plattenepithelkarzinomen der Lunge, des Ösophagus und des Kopf-Hals-Bereiches stark exprimiert. Da dem Protein in bisherigen Studien eine metastasierungsinduzierende Wirkung zugeschrieben worden ist, untersuchten wir den Zusammenhang zwischen Antigen-Expression und Metastasierung von Oropharynxkarzinomen.

In dieser retrospektiven Kohortenstudie wurde die Expression des CD44v6-Proteins in Korrelation zur Metastasierung, zum Differenzierungsgrad und zum Überleben von 120 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches untersucht, die in der Zeit von 1993-2004 in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, operativ behandelt wurden. Dabei lag das Alter der Patienten zwischen 41 und 92 Jahren.

Bei 40% der insgesamt 120 Patienten wurden keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen (n=48), dementsprechend fanden sich bei 60% Metastasen in unterschiedlicher Ausdehnung (n=72). Eine Fernmetastasierung wurde nur bei sieben der männlichen Studienteilnehmer festgestellt.

Die mit Formalin behandelten und in Paraffin gebetteten Gewebeanteile wurden immunhistochemisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD44v6 angefärbt und bezüglich der Färbeintensität ausgewertet.

Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Testes wurde der Zusammenhang zwischen den Tumoren ohne Lymphknotenbefall, Tumoren mit geringgradigem und ausgedehntem Lymphknotenbefall und der Antigenexpression untersucht. Der Whitney-Man-Test diente zur Untersuchung der Korrelation von Differenzierungsgrad und Antigenexpression. In beiden Auswertungen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

Auch die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier, zeigen im Log Rank (Mantel-Cox) keinen signifikanten Unterschied im Überleben der Patienten mit starker beziehungsweise schwacher

Antigenexpression ( $p=0,397$ ), so dass wir zusammenfassend in dieser Studie weder einen Zusammenhang zwischen der Expression des Antigens CD44v6 und der Metastasierung ( $p=0,665$ ), des Differenzierungsgrades ( $p=0,235$ ) noch des Überlebens ( $p=0,397$ ) feststellen.

Nach Diskussion unserer Ergebnisse mit der aktuellen Literatur konnten wir zeigen, dass CD44v6 kein Prognosefaktor für Oropharynxkarzinome ist und es keinen Einfluss auf die Metastasierung zu haben scheint. Dabei untersuchten wir lediglich Oropharynxkarzinome, so dass ein Einfluss der Tumorlokalisation im Gegensatz zu anderen Studien ausgeschlossen werden konnte. Allerdings bleibt offen, ob die Vergleichsgruppen in ihrer Zusammenstellung zu inhomogen waren und sich daher keine signifikanten Unterschiede ergaben, von einer weiteren Unterteilung sahen wir aufgrund der dann zu kleinen Gruppengröße ab.

## **6. LITERATURVERZEICHNIS**

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut (2002): Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends. Saarbrücken

Argiris, A., Li, Y., Forastiere, A.A. (2004): Prognostic factors and long-term survivorship in patients with recurrent or metastatic carcinoma of the head and neck. *Cancer* 101, 2222 - 2229

Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., Seed, B. (1990): CD44 is the principal surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-1313

Balaram, P., Alex, S., Panikkar, T., Rajalekshmi, N. (2004): Adhesion-related proteins E-cadherin, P-cadherin, CD44 and CD44v6 and antimetastatic protein nm23h1 in complete hydatidform moles in relation to invasion potential. *Int J Gyn Canc* 14, 532-539

Bennett, K., Jackson, D., Simon, J., Tanczos, E., Peach, R., Modrell, B., Stamenkovic, I. (1995): CD44 isoforms containing exon v3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol* 128, 687-698

Berrino, F., Gatta, G. (1998): Variation in survival of patients with head and neck cancer in Europe by the site of origin of the tumors. Eurocare Working Group. *Eur J Cancer* 34, 2154-2161

Börjesson, P., Postema, E.J., Roos, J.C., Colnot, D.R., Marres, H.A., van Schie, M.H., Stehle, G., de Bree, R., Snow, G.B., Oyen, W.J., van Dongen, G.A. (2003): Phase I Therapy Study with 186-Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (Bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 9, 3961-3972

Borggreven, P.A., Kuik, D.J., Quak, J.J., Snow, G.B., Leemans, C.R. (2003): Comorbid condition as a prognostic factor for complications in major surgery of the oral cavity and oropharynx with microvascular soft tissue reconstruction. *Head Neck* 10, 808-815

Boysen, M., Loven, J.O. (1993): Second malignant neoplasms in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Oncol* 32, 283-288

van den Brekel, M.W., Bindels, E.M., Balm, A.J. (2002): Prognostic factors in head and neck cancer. *Eur J Cancer* 38, 1041-1043

Brennan, J.A., Boyle, J.O., Koch, W.M., Goodman, S.NJ., Hruban, R.H., Eby, Y.J., Couch, M.J., Forastiere, A.A., Sidransky, D. (1995): Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 332, 712-717

Brown, T.A., Bouchard, T., St. John, T., Wayner, E., Carter, W.G. (1991): Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as heparinsulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol* 113, 207-221

Canto, M.T., Devesa, S.S. (2002): Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncol* 6, 610-617

Carter, W.G., Wayner, E. A. (1988): Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J Biol Chem* 263, 4193-4201

de Cassia Braga, R.K., Kowalski, L.P., Latorre, M.R. (2003): Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2, 219-228

Dalchau, R., Kirkley, J., Fahre, J.W. (1980): Monoclonal antibody to a human brain – granulocyte-T lymphocyte antigen probably homologous to the W 3/13 antigen of the rat. *Eur J Immunol* 10, 745-749

Denning, S.M., Le, T.P., Singer, K.H., Haynes, B.F. (1990): Antibodies against the CD44 lymphocyte homing receptor molecule augment human peripheral blood T cell activation. *J Immunol* 144, 7-15

Deutsche Krebsgesellschaft: Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien (2002), 3. Auflage

Dreyfuss, A.I., Clark, J.R. (1991): Analysis of prognostic factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Hematol Oncol Clin North Am* 5, 701-712

Esser, D., Meyer, W., Wilgeroth, C., Motsch, C. (1994) : Die Feststellung prognoserelevanter Faktoren bei Patienten mit einem Hypo- oder Oropharynxkarzinom. *HNO* 42, 413-417



- Evers, P., Uylings, H.B.M. (1994): Microwave-stimulated antigen retrieval is pH and temperature dependent. *J Histochem Cytochem* 42, 1555-1563
- Fox, S.B., Fawcett, J., Jackson, D.G., Collins, I., Gatter, K.C., Harris, A.L., Gearing, A., Simmons, D.L. (1994): Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 54, 4539-4546
- Gallatin, W.M., Wayner, E.A., Hoffman, P.A., St. John, T., Butcher, E.C., Carter, W.G. (1989): Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 4654-4658
- Goldstein, L.A., Zhou, D.F., Picker, L.J., Minty, C.N., Bargatze, R.F., Ding, J.F., Butcher, E.C. (1989): A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 56, 1063-1072
- Gown, A.M., de Wever, N., Battiflora, H. (1993): Microwave-based antigenic unmasking. A revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem* 1, 256-266
- Grau, J.J., Cuchi, A., Traserra, J., Firvida, J.L., Arias, C., Blanch, J.L., Estape, J. (1997): Follow-up study in head and neck cancer: cure rate according to tumor location and stage. *Oncology* 54, 38-42
- Gruber, M.F., Webb, D. S., Gerrard, T. L. (1992): Stimulation of human monocytes via CD45, CD44 and LFA-3 triggers macrophage-colony-stimulating factor production. Synergism with lipopolysaccharide and IL-1beta. *J Immunol* 213-215
- Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., Herrlich, P. (1991): A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65, 13-24
- Guo, Y., Wu, Y., Shinde, S., Sy, M. S., Aruffo, A., Liu, Y. (1996): Identification of a costimulatory molecule rapidly induced by CD40L as CD44H. *J Exp Med* 184, 955-961
- van Hal N.L., van Dongen G.A., Stigter-van Walsum M., Snow G.B., Brakenhoff R.B. (1999): Characterization of CD44v6 isoforms in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 82, 837-845

Harold-Mende, C., Seiter, S., Born, A.I. et al. (1996): Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous carcinomas of the head and neck. *J Pathol* 179, 66-73

Haynes, B.F., Tele, M.J., Hale, L.P., Dennings, S.M. (1989): CD44, a molecule involved in leucocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 10, 423-428

Heider, K.H., Hofmann, M., Horst, E., Berg, van den, F., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S.T. (1993): A human homologue of the rat metastasis-relevant variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 120, 227-233

Hermanek, P., Scheibe, O., Spiess, B., Wagner, G. (1987): TNM-Klassifikation maligner Tumoren. UICC International Union Contre le Cancer. Springer, Berlin

Herrlich, P., Zöller, M., Pals, S. T., Ponta, H. (1993): CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* 14, 395-399

Houk, J. R., Medina, J. E. (1995): Management of cervical lymph nodes in squamous carcinomas of the head and neck. *Semin Surg Oncol* 11, 228-239

van Houten, V.M., Snijders, P.J., van den Brekel, M.W., Kummer, J.A., Meijer, C.J., van Leeuwen, B., Denkers, F., Smeele, L.E., Snow, G.B., Brakenhoff, R.H. (2001): Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Canc*, 93, 232 – 235

Huet, S., Groux, H., Caillou, B., Valentin, H., Prieur, A.-M., Berard, A. (1989): CD44 contributes to T cell activation. *J Immunol* 143, 798-801

Hughes, E.N., Colombatti, A., August, J.T. (1983): Murine cell surface glycoproteins. Purification of the polymorphic Pgp-1 antigen and analysis of its expression on macrophages and other myeloid cells. *J Biol Chem* 258, 1014-1021

Hsu, D.W., Efrid, J.T., Hedley-Whyte, E.T. (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immuno-peroxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577-580

Jaber, M.A., Porter, S.R., Gilthorpe, M.S., Bedi, R., Scully, C. (1999): Risk factors for oral epithelial dysplasia - the role of smoking and alcohol. *Oral Oncol* 2, 151-156

- Jackson, D.G., Bell, J.I., Dickinson, R., Timans, J., Shields, J., Whittle, N. (1995): Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon. *J Cell Biol* 128, 673-685
- Jalkanen, S., Jalkanen, M. (1992): Lymphocyte CD44 binds to the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116, 817-825
- Jalkanen, S., Bargatze, R. F., De Los Toyos, J., Butcher, E. C. (1987): Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95kd glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal or synovial endothelial cells. *J Cell Biol.* 105, 983-990
- Janot, F., Klijanienko, J., Russo, A., Mamet, J.P., de-Braud, F., El-Naggar, A.K., Pignon, J.P., Luboinski, B., Cvitkovic, E. (1996): Prognostic value of clinicopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective analysis. *Br J Cancer* 73, 531-538
- Jones, A.S., Stell, P.M. (1991): Squamous carcinoma of the posterior pharyngeal wall. *Clin Otolaryngol* 16, 462-465
- Jung, K., Lein, M., Weiss, S., Schnorr, D., Henke, W., Loening, S. (1996): Soluble CD44 molecules in serum of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Eur J Cancer* 324, 627-630
- Kaplan, E.L., Meier, P. (1958): Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53, 457-481
- Katz, A.E. (1983): Immunobiologic staging of patients with carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 93, 445-446
- Kaufmann, M., Heider, K.-H., Sinn, H.-P., von Minckwitz, G., Ponta, H., Herrlich, P. (1995): CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet* 345, 615-619
- Kawano, T., Yanoma, S., Nakamura, Y., Ozeki, A., Kokatsu, T., Kubota, A., Furukawa, M., Tsukuda, M. (2005): Soluble CD44 standard, CD44 variant 5 and CD44 variant 6 and their relationship to staging in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 125, 392-397

- Kearsley, J.H., Furlong, K.L., Cooke, R.A., Waters, M.J. (1990): An immunohistochemical assessment of cellular proliferation markers in head and neck squamous cell cancers. *Br J Cancer* 61, 821-827
- Khaldoyanidi, S., Karakhanova, S., Sleeman, J., Herrlich, P., Ponta, H. (2002): CD44 variant-antibodies trigger hemopoiesis by selective release of cytokines from bone marrow macrophages. *Blood* 99, 3955-3961
- Koivunen, P., Rantala, N., Hyrynkangas, K., Jokinen, K., Alho, O.P. (2002): Incidence and survival in patients with pharyngeal cancer in Northern Finland. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 10, 543-546
- Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, D., Fuhrer, P. (1979): Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet.* 5, 957-971
- Kranke, M., Fujii, M., Kameyama, K., Kanzaki, J., Tokumaru, Y., Imanish, Y., Tomita, T., Matsumara, Y. (2000): Role of CD44 variant exon 6 in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryng Head Neck Surg* 126, 1217-1223
- Lamerz R. (1998): Thomas L (Hrsg) Labor und Diagnose. 5. Aufl. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/ Main, 961-966
- Lang, S., Wollenberg, B., Dellian, M., Steuer-Vogt, M.K., Schwenzler, K., Sautier, W., Chuchulowski, M., Eckel, R., Faas, I., Wilmes, E., Ehrenfeld, M., Arnold, W., Kastenbauer, E., Holz, D. (2002): Klinische und epidemiologische Daten zu Malignomen des Kopf-Hals-Bereichs. *Laryngo-Rhino-Otologie* 81, 499-508
- Liu, B., Kong, W., Gong, S., Yang, C., Wang, G., Zhu, L. (2005): Relationship between the expression of CD44v6 and development, progress, invasion and metastasis of laryngeal carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 25, 351-353
- Lokeshwar, V.B. and Bourguignon, L.Y. (1991): Post-translational protein modification and expression of ankyrin-binding site(s) in GP85 (Pgp-1/CD44) and its biosynthetic precursors during T-lymphoma membrane biosynthesis. *J Biol Chem* 266, 27, 17983-17989
- Lucas, M.G., Green, A.M., Telen, M.J. (1989): Characterization of the serum In (Lu-)-related antigen: identification of a serum protein related to erythrocyte p80. *Blood* 73, 596-600

- Mackay, C.R., Terpe, H.J., Stauder, R., Marston, W.L., Stark, H., Günthert, U. (1994): Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 124, 71-82
- Matsumura, Y., Tarin, D. (1992): Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340, 1053-1058
- Mignogna, M.D., Fedele, S., Lo, R.L., Ruoppo, E., Lo M.L. (2002): Costs and effectiveness in the care of patients with oral and pharyngeal cancer: analysis of a paradox. *Eur J Cancer Prev* 3, 205-208
- Min, B.M., Baek, J.H., Shin, K.H., Gujuluva, C.N., Cherrick, H.M., Park, N.H. (1994): Inactivation of the p53 gene by either mutation or HPV infection is extremely frequent in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 30, 338-345
- Miyake, K., Medina, K. L., Hayashi, S.-I., Ono, S., Hamaoka, T., Kincade, P.W. (1990): Monoclonal antibodies to pgp-I/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J Exp Med* 171, 477-488
- Miyake, K., Underhill, C. G., Lesley, J., Kincade, P. W. (1990): Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med* 172, 69-75
- Morrison, H., Sherman, L. S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C.A., Gutmann, D.H., Ponta, H., Herrlich, P. (2001): The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interaction with CD44. *Genes Dev* 15, 968-980
- Mulder, J.W., Kruyt, P.M., Sewnath, M., Oosting, J., Seldenrijk, C.A., Weidema, W.F., Offerhaus, G.P., Pals, S.T. (1994): Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 344, 1470-1472
- Naujokas, M.F., Morin, M., Anderson, M.S., Peterson, M., Miller, J. (1993): The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* 74, 257-268
- Newcomb, P.A., Carbone, P.P. (1992): The health consequences of smoking. *Cancer Med Clin North Am* 2, 305-331
- Nottenburg, C., Rees, G., St. John, T. (1989): Isolation of mouse CD44 cDNA: structural features are distinct from the primate cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8521-8525

Oosterwijk E., Ruiters D.J., Wakka, J.C., Huiskens-van der Meij, J.W., Jonas, U., Fleuren, G.J., Zwartendijk, J., Hoedemaeker, P., Warnaar, S.O. (1986): Immunohistochemical analysis of monoclonal antibodies to renal antigens. Application in the diagnosis of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 123 (2), 301-309

Pericot, J., Escriba, J.M., Valdes, A., Biosca, M.J., Monner, A., Castellsague, X., Galiana, R., Piulachs, P., Escutia, E., Mari, A. (2000): Survival evaluation of treatment modality in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *J Craniomaxillofac Surg* 1, 49-55

Picker, L.J., Nakache, M., Butcher, E.C. (1989): Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J Cell Biol* 109, 927-937

Remmert, S., Rottmann, M., Reichenbach, M., Sommer, K., Friedrich, H.J. (2001): Lymphknotenmetastasierung bei Kopf-Hals-Tumoren. *Laryngo-Rhino-Otologie* 80, 27-35

Rice, D.H., Becker, T.S. (1994): The salivary glands. Radiology, surgery, pathology. In: Hanafee WN, Ward PH (eds) *Clinical correlations in the head and neck*, Bd. 2, Georg Thieme Verlag, New York, 37-54

Rodrigo, J.P., Dominguez, F., Alvarez, C., Gonzalez, M., Herrero, A., Suarez, C. (2002): Clinicopathologic significance of expression of CD44s and the CD44v6 isoforms in squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx. *Am J Clin Pathol* 118, 67-72

Roland, N.J., Caslin, A.W., Nash, J., Stell, P.M. (1992): Value of grading squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 14, 224-229

Salmi M., Grön-Virta K., Sointu P., Grenman R., Kalimo H., Jalkanen S. (1993): Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J Cell Biol* 122, 431-442

Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S (1998): Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res* 6, 4779-4786

Schrijvers, A.H., Quak, J.J., Uytendaele, A.M., Van Walsum, M., Meijer, C.J., Snow, G.B., Van Dongen, G.A. (1993): Mab U36, a novel antibody successful in immunotargeting of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 53, 4383-4390

- Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., Bell J.I. (1992): Genomic structure of DNA coding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternative spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 12160-12164
- Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L. (1991): Antigen-retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39, 741-748
- Shimizu, Y., van Seventer, G.A., Siraganian, R., Wahl, L., Shaw, S. (1989): Dual role of the CD44 molecule in T cell adhesion and activation. *J Immunol* 143, 2457-2463
- Sikorska, B., Danilewicz, M., Wagrowska-Danilewicz, M. (2002): Prognostic significance of CD44v6 and nm23 protein immunoexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pol J Pathol* 53, 17-24
- Soukka, T., Salmi, M., Joensuu, H. (1997): Regulation of CD44v6 containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells. *Cancer Res* 57, 2281-2289
- Spafford, M.F., Koeppe, J., Pan, Z. (1996): Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD44H and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 122, 627-632
- Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J. M., Seed, B. (1989): A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56, 1057-1062
- Stauder R., Eisterer W., Thaler J., Günthert U. (1995): CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* 85, 2885-2899
- Stieber, P., Wollenberg, B., Schmitt, U.M., von Jan, N., Hofmann, K., Fateh-Moghadam, A. (1996): Stellenwert von Tumormarkern bei primären und rezidivierenden Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Tumordiagnostik und Therapie* 17, 116-121
- Tanabe, K.K., Ellis, L.M., Saya, H. (1993): Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastasis. *Lancet* 341, 725-726

Telen, M.J., Eisenbarth, G. S., Haynes, B. F. (1983): Human erythrocyte antigens. Regulation of expression of a novel erythrocyte surface antigen by the inhibitor lutheran in (lu-) gene. *J Clin Investig* 71, 1878-1886

Terpe, H.J., Stark, H., Prehn, P., Günthert, U. (1994): CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelia of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry* 101, 79-89

Tuyns, A.J., Esteve, J., Raymond, L., Berrino, F., Benhamou, E., Blanchet, F., Boffetta, P., Crosignani, P., del Moral, A., Lehmann, W. (1988): Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer* 41, 483-491

Weiss, J.M., Renkl, A. C., Ahrens, T., Moll, J., Mai, B.H., Denfeld, R.W., Schopf, E., Ponta, H., Herrlich, P., Simon, J.C. (1997): An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function. *J Cell Biol* 137, 1137-1147

Wielenga, V.J., Heider, K.H., Offerhaus, G.J., Adolf, G.R., van den Berg, F.M., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S.T. (1993): Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 53, 4754-4756

Wittekind, C., Klimpfinger, M., Sobin, L. H., 2005: *TNM-Atlas*, 5.Aufl., Springer, Heidelberg

Yamamichi, K., Uehara, Y., Kitamura, N. et al. (1998): Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and poor prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer* 79, 256-262

Zätterström, U.K., Wenneberg, J., Ewers, S.B., Willén, R., Attewell, R. (1991): Prognostic factors in head and neck cancer: histological grading, DNA ploidy and nodal status. *Head Neck* 13, 477-487

Zhou, D.F., Ding, J.F., Picker, L.J., Bargatze, R.F., Butcher, E.C., Goeddel, D.V. (1989): Molecular cloning and expression of Pgp-1. The mouse homolog of the human H-Cam (Hermes) lymphocyte homing receptor. *J Immunol* 143, 3390-3395



## 7.Anhang

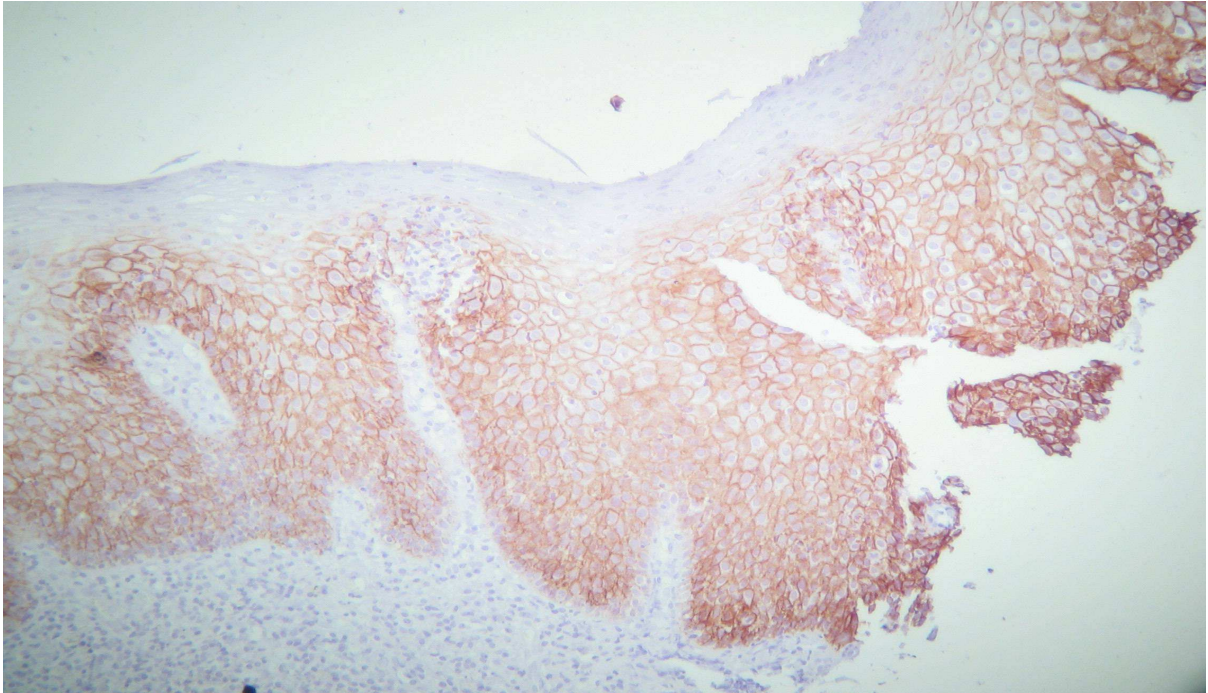


Abb. 9: Beispiel eines Oropharynxkarzinoms mit typischem zapfenförmigen Wachstumsmuster (10fach vergrößert)

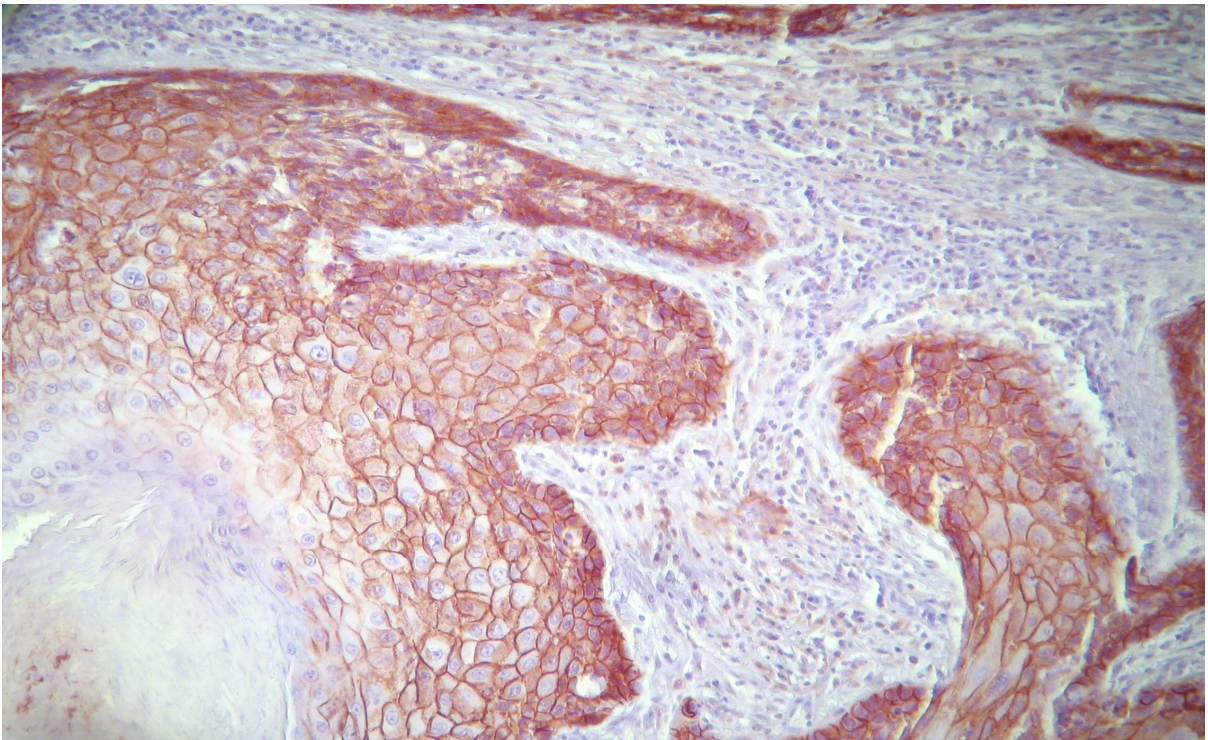


Abb. 10: Invasiv wachsendes Oropharynxkarzinom mit Hornbildung (linker unterer Bildrand), Darstellung der Zellmembranen mit Hilfe eines Anti-CD44v6-Antikörpers, Gegenfärbung der Kerne und des umgebenden Gewebes mit Hämalaun (100fach vergrößert)

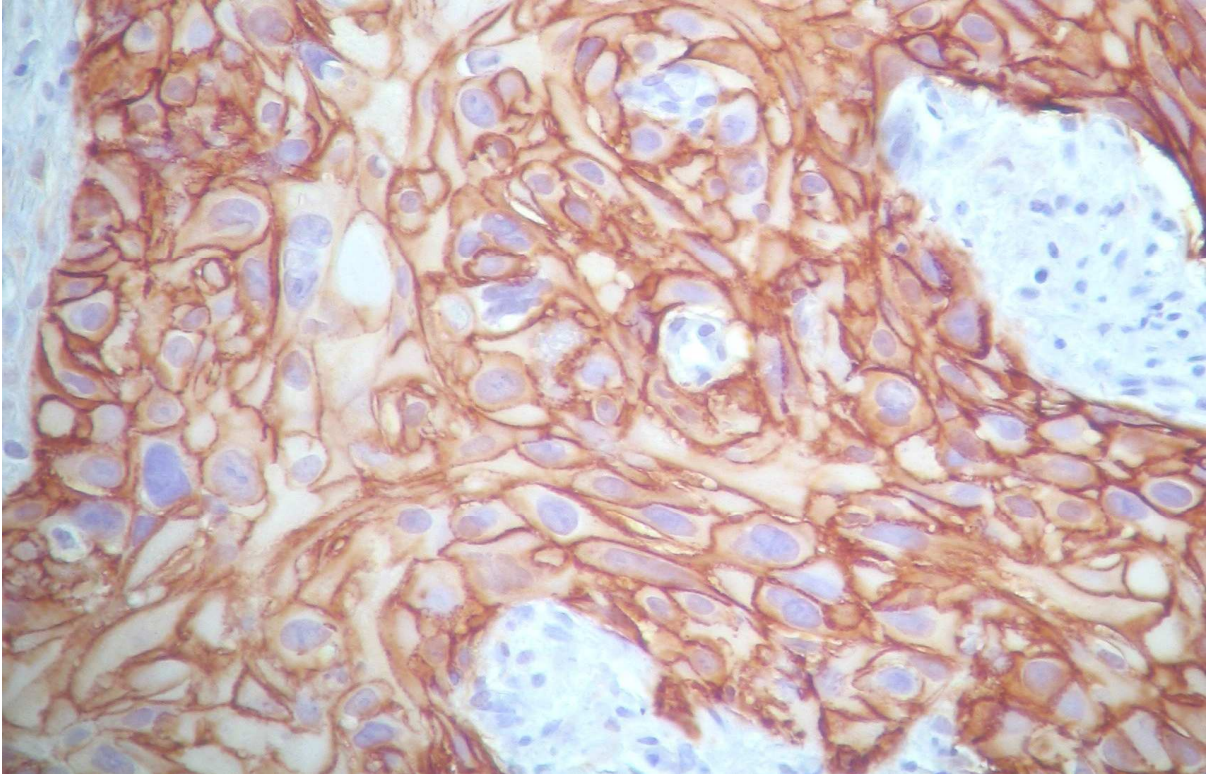


Abb. 11: 200fache Vergrößerung eines Oropharynxkarzinoms, zu erkennen sind zahlreiche Kernveränderungen der mit Anti-CD44v6 angefärbten Karzinomzellen

## **DANKSAGUNGEN**

Hiermit möchte ich mich bei all denen bedanken, die zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Frau Prof. Dr. med. Ambrosch, Direktorin der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie an der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danke ich für die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. med. Gottschlich danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für seine Unterstützung. Herrn Dr. med. Christian Cordes und Herrn Dr. med. Benedikt Luhmann danke ich für die Betreuung bei dieser Arbeit. Den Pathologen Herrn Dr. med. Janssen und Herrn Dr. med. Christian Vokuhl danke ich für die kritische und hilfreiche Beratung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Klöppel, Direktor des Institutes für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel, für die Überlassung des Tumormaterials.

Danken möchte ich Herrn PD Dr. rer. nat. Tibor Görögh und Frau Anne-Marie Roen für die stets hilfsbereite, geduldige und immer freundliche Unterstützung sowohl in praktischen, als auch in theoretischen Fragen und für die angenehme Arbeitsatmosphäre im HNO-Labor.

Ebenso dankbar bin ich für die Hilfe und Beratung bei der statistischen Auswertung durch Frau Dipl.-Mathematikerin E. Fritzer, Institut für Medizinische Informatik und Statistik.

Danken möchte ich auch den freundlichen Sekretärinnen im Tumorsekretariat, allen weiteren Mitarbeitern und Mit-Doktoranden des Labors.

Besonders danken möchte ich meiner Familie für die Unterstützung und die Aufmunterungen, Mareike Hanken und Stefan Wrobel für die Zusammenarbeit und für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Birgit Anna Berta Kasper  
Geburtsdatum: 23.07.1981  
Geburtsort: Bautzen

## Schulbildung:

1988-1989 Polytechnische Oberschule Niedergurig/ Quatitz  
1989-1992 Grundschule auf dem Asterstein/ Koblenz  
1992 Gymnasium auf dem Asterstein/ Koblenz  
1992-2001 Gymnasium Schönstätter Marienschule Vallendar,  
Abitur am 08.06.2001

## Studium:

2001-2007 Studium der Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Ärztliche Vorprüfung am 10.09.2003  
Ärztliche Prüfung am 08.11.2007  
Approbation als Ärztin am 09.11.2007

## Famulaturen:

2004 Unfallchirurgie, Gesundheitszentrum Ev. Stift St. Martin, Koblenz  
2005 Innere Medizin, Gesundheitszentrum Ev. Stift St. Martin, Koblenz  
2005 Pädiatrie, Städtisches Klinikum, Kiel  
2005 Ambulante Chirurgie und Orthopädie, Praxisklinik Kronshagen  
2005 Orthopädie, Dr. Seyda, Koblenz

## Praktisches Jahr:

1.Tertial: Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
2.Tertial: Pädiatrie, Städtisches Klinikum, Kiel  
3.Tertial: Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

## Beruf:

seit 2008 Assistenzärztin in der Kinderklinik der St. Elisabeth Kliniken Neuburg/ Donau