

**AUS DER HALS-, NASEN-, OHRENKLINIK UND
POLIKLINIK DER JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ**

Intratumorale Heterogenität von biologischen Parametern
beim Plattenepithelkarzinom des Oropharynx

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt von:

Ralf Brombacher

aus Lörrach

Mainz, 2002

Dekan:

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Tag der Promotion: 2002

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis:

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
2	EINLEITUNG	9
2.1	ENTWICKLUNGSGESCHICHTE UND ANATOMIE DES PHARYNX	9
2.2	PLATTENEPITHELKARZINOME DES OBEREN AERODIGESTIVTRAKTES	10
2.2.1	<i>Oropharynx-Tumoren</i>	11
2.3	ZELLADHÄSIONSMOLEKÜLE	11
2.3.1	<i>Die Zellmembran</i>	11
2.3.2	<i>Funktionen der Adhäsionsmoleküle</i>	11
2.4	CD44	13
2.5	E-CADHERIN	17
2.6	INTEGRINE.....	20
2.7	TUMORWACHSTUM UND METASTASIERUNG	24
2.8	DNA-ZYTOMETRIE	26
2.8.1	<i>Biologische Grundlagen:</i>	26
2.8.2	<i>Abweichungen vom normalen 2c:</i>	26
2.8.3	<i>Chromosomale Aneuploidie</i>	27
2.8.4	<i>Zytometrische Meßwerte</i>	27
2.9	TUMORFRONTMORPHOLOGIE UND ZAHL DER GEFÄßE	29
2.10	HETEROGENITÄT DER OROPHARYNXKARZINOME.....	30
3	ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN UNTERSUCHUNG	31
4	MATERIAL UND METHODEN	32
4.1	PATIENTENAUSWAHL	32
4.2	TUMORAUSDEHNUNG GEMÄß TNM (4. AUFLAGE UICC, 1987)	33
4.2.1	<i>Stadieneinteilung/Staging</i>	33
4.3	PROBENENTNAHME	36
4.3.1	<i>Die einzelnen Regionen</i>	36
4.3.2	<i>Gewebeentnahme und Aufbereitung</i>	36
4.3.3	<i>Präparategewinnung aus Kryoblöcken</i>	36
4.3.4	<i>Grundsätzliches zur Laborarbeit</i>	37
4.4	FEULGEN-FÄRBUNG	38
4.4.1	<i>Vorbereitung der Präparate</i>	38

4.4.2	<i>Färbevorgang</i>	39
4.5	HISTOMORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	40
4.5.1	<i>Hämalaun-Eosin-Färbung</i>	40
4.5.2	<i>Tumorfrontmorphologie</i>	40
4.5.3	<i>Zahl der Gefäße bzw. Gefäßdichte</i>	41
4.6	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG	41
4.6.1	<i>Grundsätzliches zur Laborarbeit</i>	41
4.6.2	<i>Avidin-Biotin-Complex-Methode</i>	42
4.6.3	<i>Verwendung monoklonaler Antikörper</i>	44
4.6.4	<i>Auswertung der Schnittpräparate</i>	44
4.7	QUANTITATIVE DNA-ANALYSE	45
4.7.1	<i>Prinzipien und Gesetze der Messung:</i>	45
4.7.2	<i>Bildanalysesystem</i>	45
4.7.3	<i>Vorgang der Messung:</i>	45
4.8	INDIZES DER DNA-ZYTOMETRIE	48
4.8.1	<i>2cDI</i>	48
4.8.2	<i>DNA-Index und Modalwert</i>	48
4.8.3	<i>5c-Exceeding-Rate</i>	48
4.9	STATISTISCHE METHODEN	49
5	ERGEBNISSE	51
5.1	DNA-ZYTOMETRIE	53
5.1.1	<i>Bilder 2cDI</i>	53
5.1.2	<i>2cDI</i>	55
5.1.3	<i>5c-Exceeding-Rate</i>	57
5.2	CD44v4/5	59
5.2.1	<i>Darstellung der Einzeldaten</i>	59
5.2.2	<i>Bilder zur CD44v4/5-Expression</i>	60
5.2.3	<i>Vergleich der CD44v4/5-Expression zwischen N(+) und N(0) -Tumoren</i>	61
5.2.4	<i>Zusammenhang der CD44v4/5-Expression mit pT und klinischem T-Stadium</i>	61
5.2.5	<i>Vergleich des CD44v4/5 zwischen Primärtumor und Metastase</i>	61
5.3	CD44v6	62
5.3.1	<i>Darstellung der Einzeldaten</i>	62
5.3.2	<i>Bilder zur CD44v6-Expression</i>	63
5.3.3	<i>Vergleich des CD44v6-Expression zwischen N(+) und N(0) -Tumoren</i>	64
5.3.4	<i>Zusammenhang der CD44v6-Expression mit dem T-Stadium</i>	64
5.3.5	<i>Vergleich der CD44v6-Expression zwischen Primärtumor und Metastase</i>	64
5.4	E-CADHERIN	65

5.4.1	<i>Darstellung der Einzeldaten</i>	65
5.4.2	<i>Bilder zur E-Cadherin-Expression</i>	66
5.4.3	<i>Vergleich der E-Cadherin-Expression zwischen N(+) und N(0) -Tumoren</i>	67
5.4.4	<i>Zusammenhang der E-Cadherin-Expression mit dem T-Stadium</i>	67
5.4.5	<i>Vergleich der E-Cadherin-Expression zwischen Primärtumoren und Metastasen</i>	67
5.5	INTEGRINKETTE α V (CD51).....	68
5.5.1	<i>Darstellung der Einzeldaten innerhalb der N(+)-Tumoren</i>	68
5.5.2	<i>Bilder der Integrinkette αv</i>	69
5.5.3	<i>Vergleich der Expression der Integrinkette αv bei N(+) und N(0) -Tumoren</i>	70
5.5.4	<i>Zusammenhang der Integrinkette αv- Expression mit dem T-Stadium</i>	70
5.5.5	<i>Vergleich der Expression der Integrinkette αv in Primärtumor und Metastase</i>	70
5.6	INTEGRINKETTE β 3 (CD61)	71
5.6.1	<i>Darstellung der Einzeldaten</i>	71
5.6.2	<i>Bilder der Integrinkette β 3</i>	72
5.6.3	<i>Vergleich der Expression der Integrinkette β3 in N(+) und N(0) -Tumoren</i>	73
5.6.4	<i>Zusammenhang der Integrinkette β3- Expression mit dem T-Stadium</i>	73
5.6.5	<i>Vergleich der Expression der Integrinkette β3 in Primärtumor und Metastase</i>	73
5.7	TUMORFRONTMORPHOLOGIE	74
5.7.1	<i>Darstellung der Einzeldaten</i>	74
5.7.2	<i>Vergleich der Tumorfrontmorphologie zwischen N(+) und N(0) -Tumoren</i>	75
5.7.3	<i>Zusammenhang der Tumorfrontmorphologie mit dem T-Stadium</i>	75
5.7.4	<i>Vergleich der Tumorfrontmorphologie zwischen Primärtumor und Metastase</i>	75
5.8	GEFÄßDICHTEN	76
5.8.1	<i>Darstellung der Einzeldaten</i>	76
5.8.2	<i>Bild zur Gefäßdichte im Primärtumor</i>	77
5.8.3	<i>Vergleich der Zahl der Gefäße zwischen N(+) und N(0) -Tumoren</i>	78
5.8.4	<i>Zusammenhang der Gefäßdichte mit dem T-Stadium</i>	78
5.8.5	<i>Vergleich der Zahl der Gefäße in Primärtumor und Metastase</i>	78
5.9	COX-REGRESSION UND KAPLAN-MEIER-SCHÄTZUNG	79
5.9.1	<i>Integrinkette β3</i>	80
5.9.2	<i>E-Cadherin</i>	82
5.10	DIE HETEROGENITÄT DER TUMORARCHITEKTUR	85
5.10.1	<i>Heterogenität der Stammzelllinie</i>	85
5.10.2	<i>Heterogenität von 2cDI und 5c-Exceeding-Rate</i>	88
5.10.3	<i>Heterogenität der Immunmarker</i>	90
5.10.4	<i>Heterogenität der histologischen Marker Gefäßdichte und Tumorfrontmorphologie</i>	93
5.10.5	<i>Vergleich der Heterogenität in N(+) und N(0)-Tumoren</i>	95

5.11	GEGENÜBERSTELLUNG VON METASTASEN UND STAMMLINIENGLEICHEN PRIMÄRTUMORREGIONEN	96
5.12	GESAMTKORRELATIONEN	98
6	DISKUSSION	103
6.1	HETEROGENITÄT DER TUMORARCHITEKTUR.....	103
6.1.1	<i>Heterogenität von DNA-Index, 2cDI und 5c-Exceeding-Rate</i>	<i>105</i>
6.1.2	<i>Heterogenität der CD44v4/5 und v6-Expression.....</i>	<i>108</i>
6.1.3	<i>Heterogenität der E-Cadherin-Expression</i>	<i>108</i>
6.1.4	<i>Heterogenität der Integrin αvβ3-Expression (CD51 und CD61).....</i>	<i>109</i>
6.1.5	<i>Heterogenität der Tumorfrontmorphologie</i>	<i>109</i>
6.1.6	<i>Heterogenität der Gefäßdichte</i>	<i>110</i>
6.2	TUMORBIOLOGISCHE PARAMETER:	112
6.2.1	<i>DNA-Zytometrie: 2cDI und 5c-Exceeding-Rate</i>	<i>112</i>
6.2.2	<i>Expression von CD44v4/5 und v6.....</i>	<i>116</i>
6.2.3	<i>E-Cadherin-Expression</i>	<i>122</i>
6.2.4	<i>Integrin αvβ3-Expression</i>	<i>125</i>
6.2.5	<i>Tumorfrontmorphologie</i>	<i>127</i>
6.2.6	<i>Zahl der Gefäße</i>	<i>129</i>
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	131
8	LITERATURVERZEICHNIS	134

1 Abkürzungsverzeichnis

2cDI	2c Deviation Index
5cER	5c-Exceeding-Rate
CD	Cluster of Designation
CD51	Integrinkette αv
CD61	Integrinkette $\beta 3$
E-Cadh	E-Cadherin
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
Met	Metastase
N(+)	Tumoren mit Lymphknotenmetastasen ($N \geq N1$)
N(0)	Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen
TF	Tumorfrontmorphologie

2 Einleitung

2.1 *Entwicklungsgeschichte und Anatomie des Pharynx*

Der Pharynx entwickelt sich aus dem Schlunddarm, dem kranialen Abschnitt des primitiven Darmkanals. Während der vierten und fünften Entwicklungswoche bildet der Schlunddarm eine Reihe von Aussackungen, die Schlundtaschen. Gleichzeitig erscheinen vier Furchen von ektodermaler Seite des Embryos. Diese Schlundfurchen verdrängen zusammen mit den entodermalen Schlundtaschen das Mesoderm zur Seite, so daß sich die Schlundbögen ausbilden. Die Schlundbögen formen sich zu Elementen des Gesichtsschädels und des Kehlkopfskeletts, aus den Schlundtaschen gehen das Mittelohr, die Tonsilla palatina, die Nebenhöhlen und der Thymus hervor (Langmann J. 1989).

Der Pharynx gliedert sich in drei Etagen: Nasopharynx (=Epipharynx), Oropharynx (=Mesopharynx) und Hypopharynx. Der Oropharynx reicht von dem Isthmus faucis bis zum Rand des Kehldeckels. Fossa tonsillaris und hintere Gaumenbögen, Gaumenmandeln, Radix linguae mit Tonsillae lingualis, Vallecula epiglottica und linguale Seite der Epiglottis sowie die mesopharyngealen Seiten und Hinterwand des Rachens gehören zu den Strukturen des Oropharynx. Der Hypopharynx schließt sich dem Oropharynx nach kaudal an und endet am Ösophagus (Boenninghaus H.G., 1993).

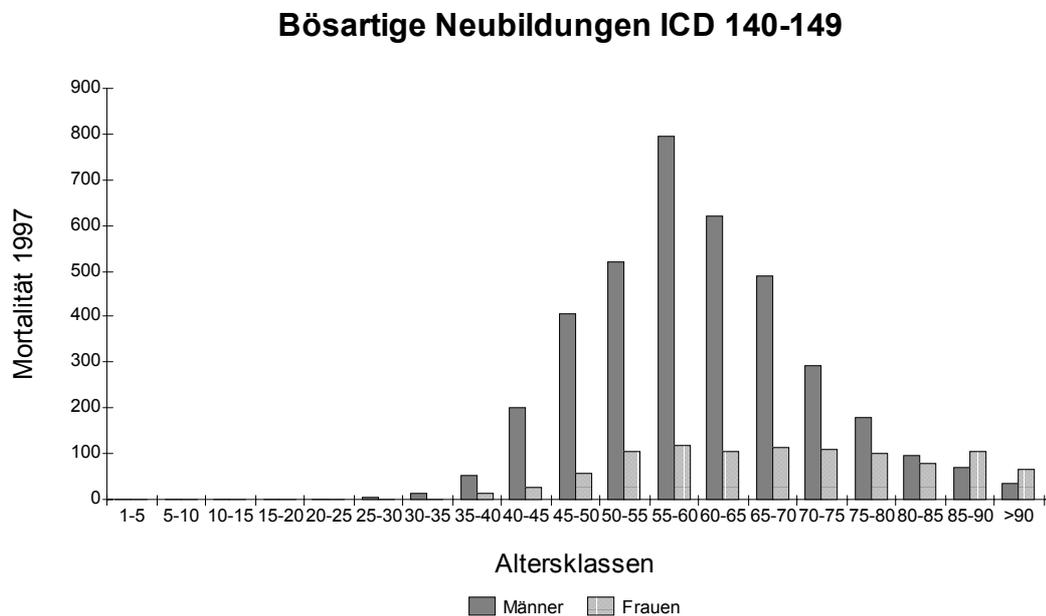
Oropharynx und Hypopharynx werden von mehrschichtigem, unverhornendem Plattenepithel ausgekleidet, was noch in den Kehlkopf hineinragt. Histologisch teilt man die Rachenwand in drei Schichten ein, die apikale Tunica mucosa, die Tunica muskularis und die Tunica adventitia. In der Rachenschleimhaut liegen, abgesehen von den großen Mandeln, zahlreiche Lymphfollikel, die überwiegend seitlich bis zur Höhe des Kehlkopfeingangs herunterreichen. Die Glandulae pharyngeae liegen mukös, sie bilden den Gleitschleim für den Rachen. Eine Lamina muscularis mucosa fehlt im Pharynx, sie beginnt erst im Ösophagus (Leonhardt H. 1990).

2.2 Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes

Das Plattenepithelkarzinom ist mit 90% aller in diesem Bereich vorkommenden Tumoren der häufigste maligne Tumor des oberen Aerodigestivtraktes. Die Inzidenz dieser Tumoren beträgt bei Männern 6% aller Krebserkrankungen, bei Frauen 3%. Diese Prozentsätze zeigen eine steigende Tendenz. Das Auftreten von Plattenepithelkarzinomen im oberen Aerodigestivtrakt steht in direktem Zusammenhang mit dem Genuß von Tabakprodukten und Alkohol. Die zwei Noxen wirken synergistisch, so daß bei gleichzeitigem Tabak- und Alkoholabusus ein mehrfach erhöhtes Risiko besteht, an einem Plattenepithelkarzinom im Oropharynx zu erkranken. Grundsätzlich können auch andere karzinogene Substanzen oder radioaktive Strahlung eine Neoplasie in diesem Bereich induzieren, dies ist jedoch selten (Clark J.R. 1992).

In Deutschland starben im Jahr 1997 insgesamt 4778 Menschen an einer bösartigen Neubildung der Lippe, dem Mundraum und des Rachens (lt. Statistischem Bundesamt in Wiesbaden). Die Daten sind in Bezug auf Altersklassen und Geschlecht in der folgenden Abbildung dargestellt:

Abbildung 2-1



Bösartige Neubildungen ICD 140-149 1997 (nach ICD9): Quelle: Statistisches Bundesamt Wiesbaden

2.2.1 Oropharynx-Tumoren

Dem Oropharynx werden zugerechnet die Tonsillen, Arcus palatopharyngealis, der weiche Gaumen, Zungengrund, laterale oder posteriore Pharynxwand. Tumoren in diesem Bereich können lange klinisch stumm sein, und in fortgeschrittenem Stadium lokale Schmerzen, Odynophagien, Dysphagien, bei Beteiligung des Kiefergelenks unter Umständen eine Kieferklemme, oder eine Otalgie verursachen. Häufig ist eine regionale Lymphknotenmetastase das erste Frühsymptom. Tonsillenkarcinome und Zungengrundkarcinome haben das größte Metastasierungsrisiko, so daß in ca. 70% der Fälle bei Diagnosestellung eine Lymphknotenmetastasierung in die Noduli lymphatici subdiaphragmatici und jugulodiaphragmatici besteht (Clark J.R. 1992).

Der Oropharynx ist reich an lymphatischem Gewebe, das anatomisch dem Waldeyerschen Rachenring zugeteilt wird. Hier können Lymphome primär entstehen, typischerweise Non-Hodgkin Lymphome.

2.3 Zelladhäsionsmoleküle

2.3.1 Die Zellmembran

Das Grundgerüst der Zellmembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht. Die Lipide haben einen polaren Aufbau. Die polaren Enden der Lipide zeigen jeweils nach extra- und intrazellulär, zur Mitte der Doppelmembran zeigen die lipophilen Enden. In dieser Lipidschicht sind Cholesterin-Moleküle gelöst. Verschiedene Arten von Proteinen sind Bestandteil der Membran, die in der Doppellipidschicht „schwimmen“. Diese Proteine übernehmen viele der elementaren Funktionen der Zellen und folglich des Gesamtorganismus. Solche Membranproteine sind z.B. auch Adhäsionsmoleküle (Löffler-Petrides 1988).

2.3.2 Funktionen der Adhäsionsmoleküle

Extrazelluläre Anteile von Plasmamembran-Glycoproteinen sind in entscheidendem Maße an Differenzierungsprozessen im Verlauf der Embryonalentwicklung und bei der räumlich funktionalen Ausbildung von Geweben und Organen beteiligt. Komplexe Regelmechanismen, die durch Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärmatrix-Bindungen eingeleitet werden, bestimmen das Schicksal der beteiligten Zellen. Mittlerweile sind über 100 Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle identifiziert. Beispiele für solche Oberflächenmoleküle, die bei Zell-Zell- oder Zell-

Extrazellulärmatrix-Interaktionen beteiligt sind, sind die Integrin-Familie, die Cadherine, Immunglobuline, das Laminin und die CD44-Molekülgruppe (Albeda S. M. 1993).

2.4 CD44

CD44 (Cluster Designation 44) gehört zur Gruppe der Glycoproteine, die in die Zellmembran integriert sind (Stauder R., Günthert U. 1995). Glycoproteine sind Proteine, die Kohlenhydratseitenketten von verschiedenster Länge tragen. Diese Seitenketten sind durch glycosidische Bindungen über die Hydroxylgruppen von Serin bzw. Threonin (O-glycosidisch) oder die Amidgruppen von Asparagin (N-glycosidisch) mit dem Protein verknüpft (Löffler G., 1993).

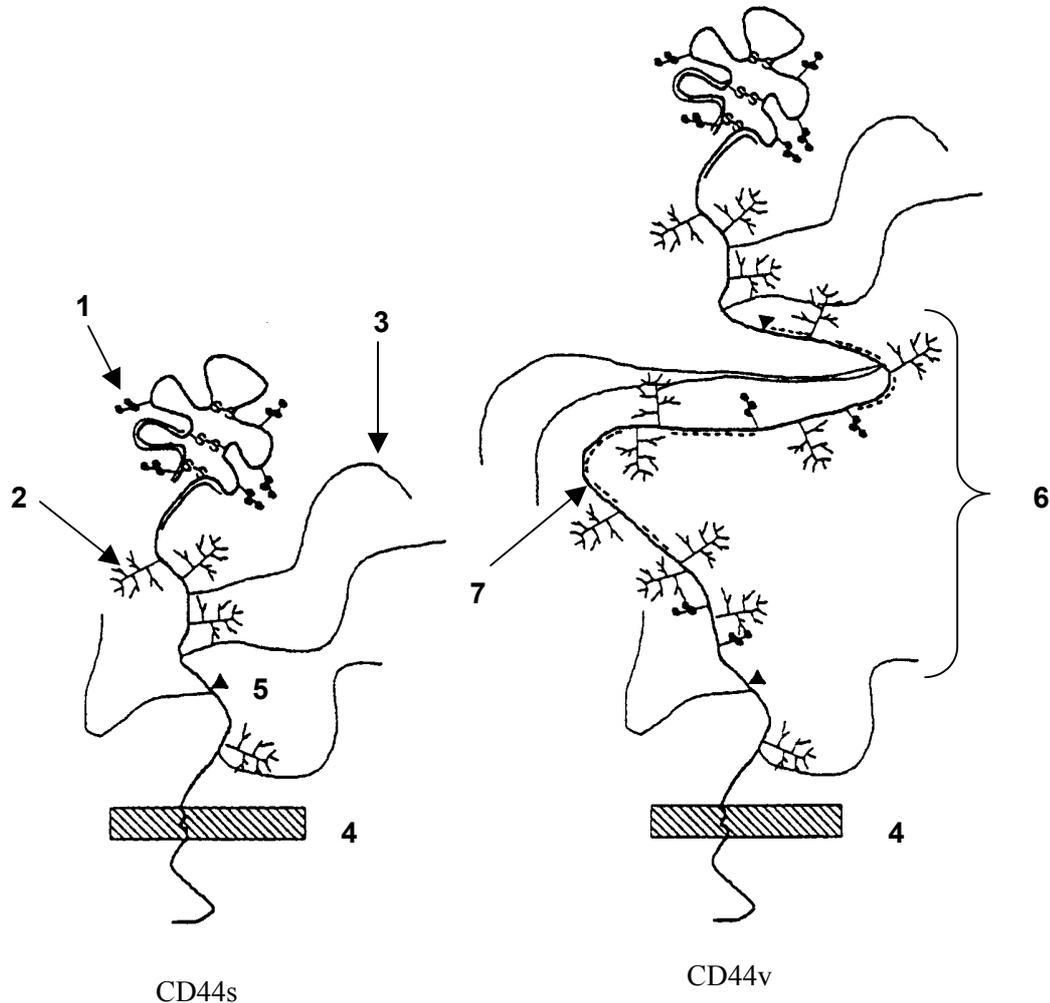
Grundsätzlich unterscheidet man das Standard-CD44, das sog. CD44s und die alternativ gespleißten Formen des CD44, die sog. CD44v. Das CD44 ist involviert in Zell-Zell- sowie in Zell-Extrazellulärmatrix-Adhäsion. Der wichtigste Ligand des Standard-CD44 ist Hyaluronat als Bestandteil der Extrazellulärmatrix (ECM). Andere Komponenten der ECM, wie Fibronectin und Kollagen, sind ebenfalls als Liganden beschrieben worden. CD44s und CD44v sind in zahlreiche Vorgänge eingeschaltet, wie z.B. in gewebespezifischer Migration von Lymphozyten, Entzündung, Geweberegeneration, Embryogenese und Tumorzell dissemination (Stauder R., Günthert U. 1995). Die Vielzahl dieser Funktionen werden aber nicht von einem Molekül geleistet. Vielmehr ist es der variable Aufbau des CD44v, der dies ermöglicht.

Der Genlokus des CD44 ist beim Menschen das Chromosom 11p13. Genomanalysen zeigen, daß das CD44-Gen aus 20 Exons mit einer Länge von ca. 60kb aufgebaut ist. Die 10 Exons der Standardform bezeichnet man mit 1s bis 10s, die 10 variablen Exons mit v1 bis v10. Exons 1s bis 7s codieren für die extrazelluläre Domäne, Exon 8s für den transmembranösen Abschnitt. Die Exons 9s und 10s werden alternativ gespleißt, wobei sie entweder für eine kurze (3 Aminosäuren, codiert durch 9s), oder eine lange zytoplasmatische Domäne (70 Aminosäuren, auf Exon 10s) codieren. Die zehn zusätzlichen Exons (v1 bis v10) werden normalerweise nicht exprimiert; durch alternatives Spleißen der Prä-m-RNA können diese zwischen Exon 5s und 6s eingebettet werden. Die Kombinationen dieser zusätzlichen 10 Exons ergeben dann die große Vielfalt der varianten Formen des CD44, den CD44v (Zöller M., Kaufmann M. 1994).

Das Proteingerüst der extrazellulären Region des CD44s ist durch ca. 250 Aminosäuren aufgebaut und ist über N- und O-verknüpfte Oligosaccharide sowie Chondroitinsulfatseitenketten hochgradig glycosyliert. Durch den Einbau varianter Exons können zusätzliche 420 Aminosäuren in den extrazellulären Teil eingefügt werden. Die varianten Exons statten die codierte Region mit weiterer Glycosylierung und Chondroitinsulfatseitenketten aus. Eine andere spezielle Eigenschaft dieser

Region ist eine außerordentliche Hydrophilie, wodurch diese zusätzliche Bindungskapazität erlangt (Günthert et al. 1995).

Abbildung 2-2 Molekularer Aufbau von CD44s und CD44v



Struktur des CD44s und CD44v:

- 1) N-Glycosylierung
- 2) O-Glycosylierung
- 3) Chondroitin-Sulfat-Ketten
- 4) Zellmembran
- 5) Insertionsstelle der varianten Regionen in das CD44s (◄)
- 6) Variante Region (durch 2 Dreiecke markierte Region (◄))
- 7) Hydrophile Regionen (gepunktete Doppellinie)

Grundsätzlich können alle dieser varianten CD44 und ihre Kombinationen exprimiert oder abgeschaltet werden, obwohl manche Kombinationen bei bestimmten Zellpopulationen häufiger nachgewiesen werden, wie z.B. die

keratinozyten-typische Form des CD44 mit den Exons v8-v10, die epitheliale Form mit Exon v3-v10 und die metastasen-typische Form mit v4 bis v7.

Das alternative Spleißen wird häufig von Zellen benutzt, die schnell ihr Programm ändern, speziell während ihrer Entwicklung. Die Zellen können so schnell und reversibel ihr Expressionsprogramm ändern und gleichzeitig verschiedene CD44v und CD44s auf ihrer Oberfläche tragen (Zöller M., Kaufmann M. 1994).

Die extrazellulären Matrixkomponenten Hyaluronsäure (HA), Kollagen, Fibronectin und sulphatierte Proteoglykane werden als Liganden für die Standardregion des CD44 (CD44s) beschrieben (Günthert U. et al. 1995). Die Bindung an HA wird durch zwei Regionen vermittelt, die von Exon 2s und 5s codiert werden. CD44s hat die Fähigkeit der Bindung und der Degradierung von Hyaluronat, was die Tumorzellen befähigen könnte, die ECM zu durchwandern. Es kann aber gezeigt werden, daß die meisten CD44s- und CD44v-positiven Zellen HA nicht binden. Das Bindungsverhalten kann jedoch so moduliert werden, so daß HA gebunden werden kann. Es ist wahrscheinlich, daß die Fähigkeit zu dieser Bindung durch Konformationsänderung der extrazellulären Domäne oder durch die Expression eines anders konformierten Moleküls erreicht wird. Es wird angenommen, daß der zytoplasmatische Teil des CD44 für die Konformationsänderung der extrazellulären Domäne verantwortlich ist (Günthert et al. 1995).

Es besteht die Annahme, daß die zytoplasmatische Domäne über Signaltransduktion und Interaktion mit dem Zytoskelett für die Regulation von Zellmigration und Zellteilung verantwortlich ist. Auch soll der zytoplasmatische Teil Signaltransduktion von außen zum Zellinneren vermitteln (Günthert et al. 1995).

CD44 ist seit langer Zeit als Lymphozyten-Homing-Receptor (gp90^{Hermes}) bekannt. Über CD44 sollen Lymphozyten an die High Endothelial Venuoles (HEV) andocken, um in lymphatisches Gewebe zu migrieren (Jalkanen et al. 1987). HEVs sind spezialisierte postkapilläre Venolen mit der Aufgabe, Lymphozyten aus dem Blutstrom aufzunehmen und in Gewebe einzuschleusen. Ihren Namen verdanken diese Gefäße ihrer cuboiden Gestalt. Sie ermöglichen den Kreislauf der Lymphozyten. Man nimmt an, daß pro Sekunde ca. 5×10^6 Lymphozyten den Blutkreislauf über die HEV verlassen. Die HEV kommen in allen sekundären lymphatischen Organen vor, mit Ausnahme der Milz, außerdem in chronisch entzündetem nicht-lymphatischem Gewebe (Girard J.P., Springer T.A. 1995).

Welchen Platz das CD44 im Vorgang des Lymphozyten-Homings einnimmt, ist noch Gegenstand der Forschung (Girard J.P., Springer T.A. 1995).

CD44v6 dient als Costimulator der T-Lymphozytenaktivierung. CD44s scheint in diesem Prozeß keine Rolle zu spielen. Über CD44v6-Ligandenbindung und -cross

linking werden Lymphozytenproliferation und -reifung initiiert. So werden Signale an antigenpräsentierende Zellen gesendet, die Wachstumsfaktoren, Interleukine, TNF- α und andere Botenstoffe ausschütten. Das Wachstum von Tumorzellen in lymphatischem Gewebe soll in ähnlicher Weise reguliert sein. Hinweis dafür ist, daß Tumorzellen in Anti-CD44v6 beschichteten Trägern eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen, was so zu erklären ist, daß durch die Bindung von CD44v6 an die korrespondierenden Antikörper das Wachstum aktiviert wird. Auch ist das Wachstum von Tumorzellen in Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen erhöht (Zöller M. 1995).

Ein möglicher Zusammenhang von CD44v und Tumorprogression wird von GÜNTHERT et al. an Zelllinien aus einem Pankreaskarzinom der Ratte gezeigt. Nach Transfektion von cDNA von Exon v4 bis v7 zeigt eine der Zelllinien nach subcutaner Injektion in syngenetische Mäuse metastasierendes Verhalten, Zelllinien ohne diese varianten CD44 zeigen hingegen ein lokales Wachstum (Günthert et al. 1991). Die varianten Formen des CD44 scheinen jedoch nicht bei allen Tumorarten eine Rolle in der Tumorprogression zu spielen, obwohl bei einigen Tumorarten eine enge Beziehung zwischen Expression von CD44v und Tumorprogression beschrieben wird: Z.B. Mammakarzinom, Blasenkarzinom, Non-Hodgkin-Lymphome, Nierenkarzinom, Glioblastom und Meningeom, Hepatozelluläres Karzinom und andere (Zöller, M. 1995).

2.5 E-Cadherin

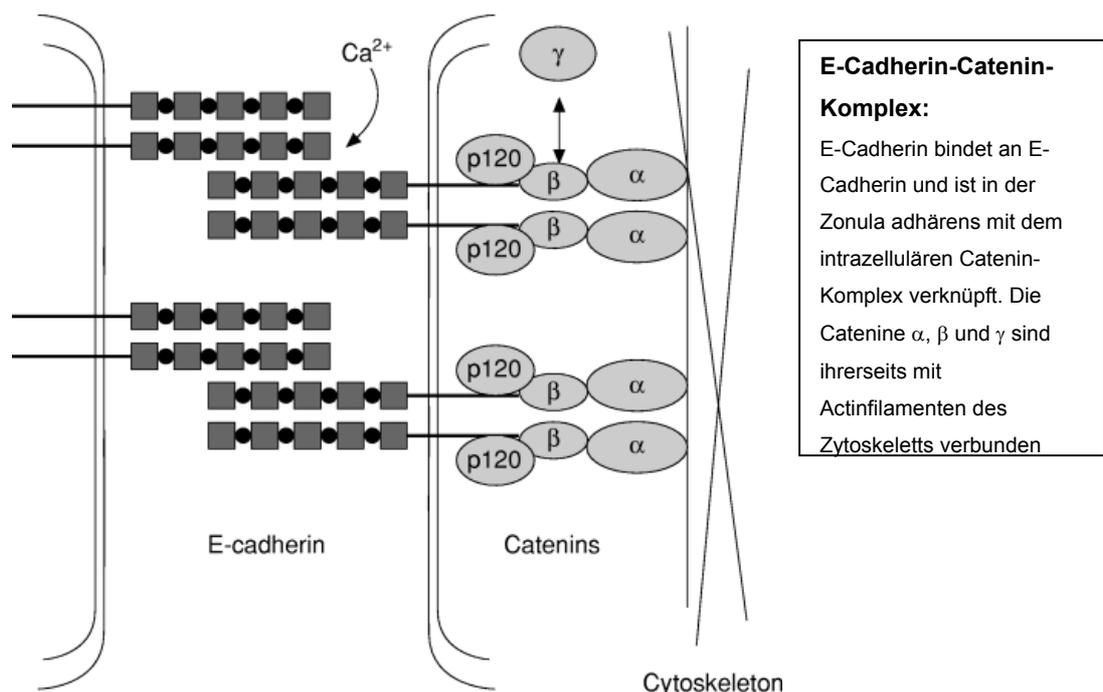
Cadherine sind transmembranöse Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, die in homophiler Interaktion Cadherin an Cadherin binden, wobei grundsätzlich identische Subtypen eine Bindung eingehen. Diese Moleküle sind involviert in Aufbau und Erhalt interzellulärer Verbindungen.

Der Genlocus des E-Cadherins befindet sich auf dem Chromosom 16q. E-Cadherin ist auch bekannt als Uvomorulin, L-CAM, cell-CAM 120/80 oder Arc-1. Das Molekulargewicht beträgt 120 kDa (Wijnhoven et al. 1999).

Bisher können über 20 verschiedene Cadherine ausgemacht werden. Die am besten untersuchten Cadherine sind E-Cadherin, N-Cadherin und P-Cadherin. E-Cadherin wird von epithelialen Zellen exprimiert, N-Cadherin von neuralem Gewebe, Linse des Auges und Muskelzellen, P-Cadherin in Plazenta, epitheliale Gewebe und vorübergehend in anderen Geweben während der Entwicklung (Furukawa et al. 1994).

Die Funktionstüchtigkeit der Cadherine ist an Interaktionen mit Elementen des Zytoskeletts gebunden. Die intrazelluläre Domäne bindet an Catenin α , β und γ . Die Catenine sind zusammen mit den Cadherinen in der Zonula Adhärens lokalisiert und sind an deren Aufbau und an der Stabilisierung von Zellen beteiligt (Furukawa et al. 1994).

Abbildung 2-3 E-Cadherin-Catenin-Komplex



Die meisten Epithelien exprimieren E-Cadherin und P-Cadherin. Der Erhalt epithelialer Strukturen ist an die Anwesenheit der Cadherine gebunden. Bei einer Alteration der Expression ist ein Verlust der normalen Zell-Zell-Integrität zu erwarten (Albeda, S.M., 1993, Wijnhoven et al. 1999).

Obwohl die Cadherine ursprünglich in entwicklungsgeschichtlichem Kontext beschrieben werden (Takeichi M. 1991), legt ihre Funktion im Erhalt epithelialer Strukturen eine mögliche Rolle im Prozeß der Tumordinvasion nahe. Mehrere Beobachtungen an Zelllinien lassen einen solchen Zusammenhang erahnen:

Eine epitheliale nichtinvasive Zelllinie (Madin Darby Nierenzelllinie = MDCK), die mit Harvey - und Maloney-Sarkoma-Virus infiziert wird, transformiert maligne und exprimiert E-Cadherin nicht mehr. Diese nichtinvasive MDCK zeigt invasives Verhalten, als die Zellen mit Anti-E-Cadherin versetzt werden (Behrens et al. 1999). FRIXEN et al. weisen nach, daß Karzinom-Zelllinien mit einem epitheloiden Phänotyp nichtinvasiv sind und E-Cadherin exprimieren, wogegen Zelllinien mit fibroblastenähnlichem Phänotyp invasives Verhalten zeigen und E-Cadherin-negativ sind (Frixen et al. 1991). NAVARRO et al. transfektieren E-Cadherin cDNA in eine hoch maligne Zelllinie, wobei sich die malignen Eigenschaften abschwächen (Navarro et al. 1991).

Die Ergebnisse aus den Experimenten mit Zellkulturen geben Anhalt dafür, daß invasive Zellen E-Cadherin nicht mehr exprimieren. Immunhistochemische Studien zur Verteilung von E-Cadherin auf Tumoren ergeben jedoch ein heterogenes Bild: SHIMOYAMA et al. färben 44 Lungenkarzinome mit Antikörpern gegen E-Cadherin und P-Cadherin. Die einzelnen Präparate zeigen ein deutlich unterschiedliches Expressionsverhalten für diese Moleküle. Es kann keine deutliche Verminderung der Cadherin-Expression in den Tumoren gegenüber normalem Gewebe beobachtet werden (Shimoyama et al. 1989). SHIMOYAMA und HIROHASHI untersuchen 54 Magenkarzinome, und sie beobachten eine erhaltene E-Cadherin-Expression in gut differenzierten Adenokarzinomen und Tumorzellen von adhärentem Typ, (d.h. mit lichtmikroskopisch intakten Zell-Zell-Bindungen). Die meisten der einzelnen und zerstreuten Tumorzellen exprimieren jedoch auch E-Cadherin, und in Metastasen ist E-Cadherin ebenfalls häufig nachweisbar. Um die Intaktheit von E-Cadherin nachzuprüfen, führen die Autoren einen Immunoblot durch, der ein normal geformtes Protein ergibt (Shimoyama Y., Hirohashi S. 1991).

SHIOZAKI et al. untersuchen 55 humane Tumoren aus Ösophagus, Magen und Brustdrüse, wobei alle normalen Gewebeabschnitte volle E-Cadherin-Expression und 73% der Ösophagus-Tumoren, 25% der Magen-Karzinome und 45% der Mamma-Karzinome heterogene und reduzierte E-Cadherin-Expression zeigen. Bei den Ösophagus-Tumoren kann hier jedoch als einzige Tumorgruppe eine positive

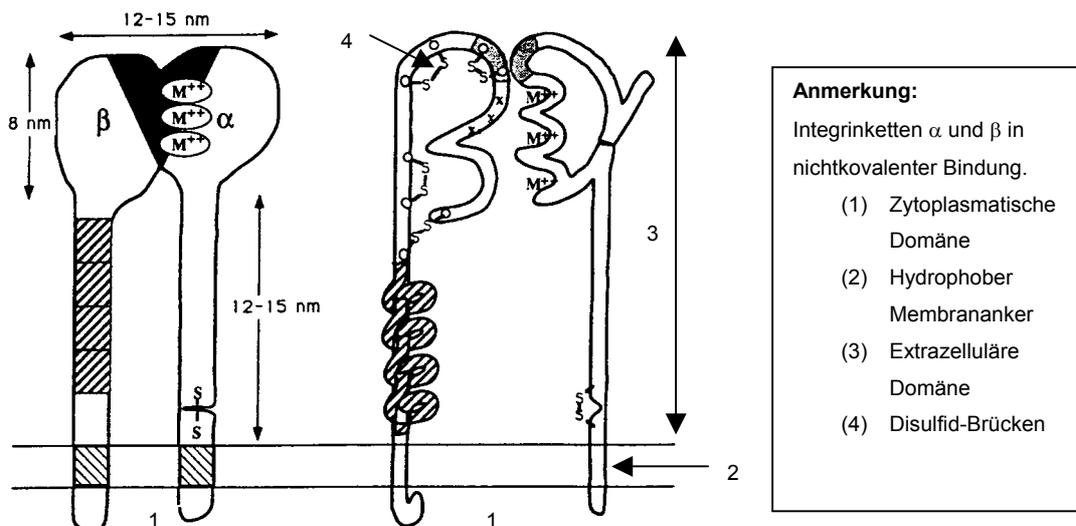
Korrelation zwischen dem Grad der Differenzierung und dem Vorhandensein von E-Cadherin hergestellt werden (Shiozaki et al. 1991).

Eine stark positive Korrelation zwischen Dedifferenzierung und Verlust von E-Cadherin weisen SCHIPPER et al. an 32 Plattenepithelkarzinomen aus dem oberen Aerodigestivtraktes nach. Alle gut differenzierten Plattenepithelkarzinome exprimieren E-Cadherin normal, die mäßig differenzierten Karzinome haben mittelmäßige Raten der Expression, und alle fünf schwach differenzierten, sowie sieben von acht Lymphknotenmetastasen sind E-Cadherin-negativ (Schipper et al. 1991).

2.6 Integrine

Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle, die aus je einer α -Kette und einer β -Kette aufgebaut sind (siehe Abb. 1.4). Beide Untereinheiten sind transmembranöse Glycoproteine und nichtkovalent miteinander verknüpft. Jedes der Proteine hat einen hydrophoben Membrananker. Die zytoplasmatische Domäne der meisten Integrine ist kurz (etwa 50 Aminosäuren oder kleiner). Es werden jedoch auch Integrine ohne zytoplasmatische und transmembranöse Domäne nachgewiesen, die ihre Funktion nicht einbüßen. In der extrazellulären Domäne sind α - und β -Kette miteinander verknüpft, sie formen das $\alpha\beta$ -Dimer und somit das spezifische Integrin. Die Größe der extrazellulären Domäne der α -Kette beträgt etwa 100 kD oder größer, die der β -Kette 75 kD oder größer. Innerhalb der extrazellulären Domäne sind beide Ketten durch Disulfid-Brücken gestützt. Alle α -Ketten beinhalten eine siebenmal gefaltete Region mit sich wiederholenden Sequenzen. Die letzten drei oder vier dieser Wiederholungen sind wahrscheinlich für die Bindung an divalente Kationen verantwortlich. Die Funktionstüchtigkeit der Rezeptorbindung ist an die Anwesenheit von divalenten Kationen gebunden. Divalente Kationen können Affinität und Spezifität für Liganden beeinflussen, und sie sind notwendig für die Assoziation bestimmter Integrine. Die Bindung an Liganden erfolgt von der ligand binding domain, an der α - und β -Kette beteiligt sind. Diese ligand binding domain liegt am N-terminalen Ende der beiden Moleküle, wo sich beide Moleküle zu einem gemeinsamen Kopf aneinanderlagern (Hynes R.O. 1992).

Abbildung 2-4 Molekularer Aufbau der Integrine



Die zytoplasmatische Domäne der Integrine interagiert mit den Zytoskelett-Proteinen Talin und α -Aktinin. Vor allem die β -Kette scheint für diese Interaktion verantwortlich zu sein.

Es ist wahrscheinlich, daß Integrine unter anderem eine Schaltstelle zwischen Zytoskelett und Zell-Zell-Adhäsion oder Zell-Substratum-Interaktion sind, und somit die Bindung an Liganden an Reaktionen mit dem Zytoskelett gekoppelt ist.

An Integrin α IIb β 3 auf Thrombozyten wird exemplarisch gezeigt, daß vor der Liganden-Bindung eine Konformationsänderung des Moleküls, eine Aktivierung der Integrine notwendig ist. Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrand Faktor, Vitronectin und Thrombospondin sind Liganden des α IIb β 3. Ruhende Thrombozyten exprimieren dieses Integrin, es findet jedoch im nichtaktivierten Stadium keine Bindung an seine löslichen Liganden des Blutes, z.B. Fibrinogen statt. Erst nach der Plättchenaktivierung, z.B. durch Thrombin, Kollagen oder andere Thrombozyten wird das α IIb β 3 zum effektiven Rezeptor. Würde dieses Integrin immerzu Liganden binden, käme es unweigerlich zu Thrombosen. Dieses Integrin, wie auch das β 2, das α L β 2 und β 2 gelten als Modelle, so daß man annehmen kann, daß wahrscheinlich bei allen anderen Integrinen eine Konformationsänderung von α - und β -Kette für eine effektive Bindung notwendig ist.

Ebenso wichtig wie eine Aktivierung der Integrine ist ihre Deaktivierung. Während der Zellmigration z.B. müssen sich die Zellen immer wieder von Liganden lösen, d.h. sie werden sozusagen ein- und ausgeschaltet. Über die Deaktivierung ist jedoch wenig bekannt.

Es gibt auch Anhaltspunkte dafür, daß Integrine Signale von außen an das Zellinnere weitergeben. Hierbei haben sie meist die Funktion eines Co-Rezeptors. Für Plättchen, Lymphozyten und Fibroblasten kann dies nachgewiesen werden. Sie senden Signale an die Second-messenger-Signalwege der Zelle, wie G-Protein- oder Thyrosin-Kinase-gekoppelte Rezeptoren. So sind sie an grundsätzlichen Vorgängen von Zellaktivierung, Zell-Proliferation, Sekretion, Veränderung der Zellmorphie oder Zellmigration beteiligt. Z.B. sind einige Integrine Co-Stimulatoren des T-Zell-Rezeptor-Komplexes und seiner assoziierten Kinasen, dessen Aktivierung zu einer Konformationsänderung dieser Integrine führt und deren Liganden-Bindung ermöglicht (Hynes R. O. 1992).

Bisher sind 8 verschiedene β -Ketten und 14 α -Ketten bekannt. Die meisten Integrine werden von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, und die meisten Zellen exprimieren mehrere Integrine gleichzeitig. Obwohl theoretisch jede α -Kette mit jeder beliebigen β -Kette verknüpft sein könnte, kommen nur bestimmte Kombinationen von α und β vor.

Integrine werden funktionell in drei Subfamilien eingeteilt, die eine grobe Einteilung der Funktionen erlauben: (1) Integrine, die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln; diese Integrine findet man vor allem auf Leukozyten (z.B. α_L/β_2 , α_4/β_1). (2) Integrine, die primär an Bestandteile der Basalmembran (Laminin und Kollagen) binden (z.B. α_1/β_1 , α_2/β_1 , α_3/β_1), und (3) Integrine, die während früherer Entwicklung, bei Entzündungsprozessen und Wundheilung Extrazellulärmatrix-Proteine binden (z.B. $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$, α_{IIb}/β_3).

Einige Integrine binden an die Extrazellulärmatrix-Proteine Kollagen, Laminin, Fibrinogen und Fibronectin. Spezifische Peptidsequenzen dieser Extrazellulärmatrix-Proteine wurden als Integrin-Binding-site identifiziert. Die am besten untersuchte Region ist die Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz (=RGD-Sequenz), die man in Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin, Typ I-Kollagen und Laminin nachweisen kann. Andere gefundene Regionen sind die KQAGDV (=LYS-Gln-Ala-Gly-Val) und GPRP (Gly-Pro-Arg-Pro) in Fibrinogen, DGEA (Gly-Glu-Ala) in Typ I-Kollagen und EILDV (Glu-Ile-Leu-Asp-Val) in alternativ gespleißtem Fibronectin (Albeda S. M., 1993).

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61) wird exprimiert von schnell migrierenden Zellen, wie Endothelzellen (Brooks et al. 1994b), Melanomzellen (Albeda, SM 1991), in Gefäßen des Granulationsgewebes von Wunden, aber nicht in Gefäßen normaler Haut (Brooks et al. 1994b). Wie auch andere Integrine kann Integrin $\alpha_v\beta_3$ an die RGD-Aminosäuresequenz binden, jedoch im Gegensatz zu den meisten anderen Integrinen auch an die RGD-Sequenz von Fibrinogen, von Willebrand-Faktor, Osteopontin, Fibronectin, Laminin und TSP-1. Die Vielfalt der möglichen Ligandenbindung von $\alpha_v\beta_3$ befähigt Zellen, die dieses Integrin exprimieren, diejenigen Gewebe des Körpers zu durchwandern, die Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen oder Osteopontin in ihre Extrazellulärmatrix eingebaut haben, also z.B. Dermis, Lymphknoten, Knochengewebe, Gehirn, Lungen- oder Leberparenchym (Cherish D. 1991).

Klinisches Charakteristikum des malignen Melanoms ist die frühe und rasche Metastasierung. Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wird mit dieser Eigenschaft der Melanome in Verbindung gebracht und es ist mittlerweile experimentell belegt, daß $\alpha_v\beta_3$ eine Rolle in Proliferation und Metastasierung der Tumoren spielt, obwohl der genaue Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Tuszynski et al. 1997). Der Effekt von $\alpha_v\beta_3$ auf die Metastasierung dieser Zellen könnte mit einer Induktion von proteolytischer Aktivität der Zellen in Zusammenhang stehen. Die Enzyme Metalloprotease 2 und Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-Rezeptor werden vom Integrin $\alpha_v\beta_3$ hochreguliert. Diesen beiden Enzyme sind wichtige Regulatoren der

Degradierung von Extrazellulärmatrix. Die Zunahme der Aktivität dieser Enzyme könnte dazu führen, daß die Basalmembran aufgelöst wird.

MONTGOMERY et al. zeigen, daß das Wachstum und Überleben einer Melanom-Zelllinie in einem Netz von dermale Kollagen nur in Anwesenheit von $\alpha v \beta 3$ möglich ist. Eine Variante dieser Zelllinie, die kein αv exprimiert, kann ohne dieses Integrin nicht überleben. Eine Transfektion von αv -cDNA in diese Zellen kann die Apoptose jedoch verhindern. Das Blocken der Ligandenbindung von $\alpha v \beta 3$ durch Inkubation mit einem Antikörper gegen $\alpha v \beta 3$ führt ebenfalls zum Zelltod (Montgomery et al. 1994)

Neben Metastasierung und Einfluß auf die Apoptose hat das Integrin $\alpha v \beta 3$ eine wichtige Funktion bei der Neubildung von Gefäßen. Die Angiogenese ist ähnlich wie die Tumorprogression durch Invasion, Migration und Proliferation von Zellen gekennzeichnet.

Die Induktion der Angiogenese und die Formation neuer Blutgefäße sind kritische Schritte in der Progression von Tumoren. Ein Tumor kann ohne Wachstum neuer Gefäße kaum größer werden als 2 mm (Penfold et al. 1996). Das Integrin $\alpha v \beta 3$ startet einen Ca^{2+} -abhängigen Signalweg, der zur Migration der Endothelzellen führt (Tuszynski G.P. et al. 1997). BROOKS et al. (1994) zeigen an einer CAM (chick allantoic membrane), daß Antikörper gegen $\alpha v \beta 3$ eine durch Wachstumsfaktoren stimulierte Neubildung von Gefäßen blocken können, auf schon bestehende Gefäße jedoch keinen Einfluß haben (Brooks et al. 1994a).

Das Integrin $\alpha v \beta 3$ scheint im Metastasierungsprozeß der malignen Melanome, sowie bei Überleben dieser Tumorzellen in einer bindegewebsähnlichen Matrix eine Rolle zu spielen. Auch die Angiogenese, die Invasion, Migration und Proliferation beinhaltet, scheint von diesem Integrin abhängig zu sein. Es bleibt aber noch weitgehend offen, inwiefern dieses Integrin bei anderen Tumoren, wie z.B. bei den Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx in den Prozeß der Tumorprogression eingebunden ist.

2.7 Tumorwachstum und Metastasierung

Schon 1829 prägt RECAMIER den Begriff Metastase, um den Prozeß der Tumordissemination zu beschreiben (Récamier, J.C.A. 1829). 1889 autopsiert PAGET 735 verstorbene Patientinnen, die an Brustkrebs erkrankt sind, entdeckt, daß die spezielle Verteilung und Lokalisation der Metastasen kein Zufall ist und stellt die Frage: „What is it, that decides what organs shall suffer in a case of disseminated cancer“ (zitiert bei Tuszynski et al. 1997). So stellt PAGET die Hypothese von „seed and soil“ auf. Tumorzellen (seed) haben eine präferentielle Affinität zu bestimmten Organen (soil), weil die Gegebenheiten in diesen Organen das Wachstum der Tumorzellen unterstützen. Erst 50 Jahre später wird PAGETS Idee ernstgenommen und heute ist sie so aktuell wie nie zuvor, denn die Entdeckung der Zell-Adhäsionsmoleküle und der spezifischen Expression von Liganden der verschiedenen Gewebe scheinen PAGETS These zu bestätigen, und beantworten wenigstens zum Teil die von PAGET aufgeworfene Frage.

Der Prozeß von malignem Tumorwachstum und Metastasierung ist eine komplexe Kaskade von Ereignissen. Viele dieser Schritte werden erst dadurch möglich, daß die Tumorzellen entweder eine verminderte oder erhöhte Fähigkeit zur Adhäsion mit Nachbarzellen und der Extrazellulärmatrix entwickeln (Albeda S.M. 1993). Im folgenden werden übersichtsartig die wichtigsten Schritte von Invasion, Lymphknotenmetastasierung und Bildung von Fernmetastasierung beschrieben:

A) Proliferation

B) Invasion:

- Loslösen aus dem Epithelverband
- Auflösen der Basalmembran
- Migration durch die Extrazellulärmatrix des subepithelialen Bindegewebes
- Verankerung an der Extrazellulärmatrix
- Induktion der Angiogenese und Kommunikation mit Zellen des Bindegewebes und Immunsystems

C) Lymphknotenmetastasierung

- Invasion und Loslösen neoplastischer Zellen vom Primärtumor
- Wanderung in die regionalen Lymphknoten
- Anhaften an extrazelluläre Strukturen der Lymphknoten
- Wachstum der Lymphknotenmetastase

D) Fernmetastasen:

- Lösen aus dem Zellverband
- Verlassen des lymphatischen Systems und Einwanderung in Blutgefäße
- Verbreitung der metastatischen Tumorzellen über die Blutbahn
- Überleben der Zellen innerhalb des Kreislaufs und Interaktion mit Thrombozyten und Gerinnungssystem
- Anhaften der Tumorzellen an Endothelien von Blutgefäßen über Oberflächenrezeptoren
- Durchwanderung der subendothelialen Basalmembran und Migration in das umliegende Gewebeparenchym
- Wachstum der Fernmetastase

2.8 DNA-Zytometrie

2.8.1 Biologische Grundlagen:

Eukaryote Zellkerne enthalten je 2 x 23 Chromosomen ($2 \times 22 + XX$ bzw. XY). Dies entspricht einem doppelten Chromosomensatz, also $2c$. Die Zellen durchlaufen mit dem Moment ihrer Entstehung eine Reihe charakteristischer Phasen, bevor ihre Existenz mit der nächsten Mitose erlischt. Die durch die Mitose neugebildete Zelle befindet sich zunächst in der G1-Phase, in der sie diploid ist. Vor der nächsten Mitose muß die DNA repliziert werden. Dies geschieht in der an die G1-Phase anschließenden S-Phase. Die häufig nur kurz dauernde Phase zwischen Abschluß der DNA-Replikation und Mitose wird als G2-Phase bezeichnet. Zellen in sich nicht teilenden Geweben werden auch als Zellen in der G0-Phase bezeichnet. Der DNA-Bestand der eukaryoten Zellkerne bleibt während der G1-Phase konstant diploid ($=2c$), infolgedessen ist auch die Geschwindigkeit der DNA-Synthese nahe 0. Die Geschwindigkeit der RNA-Biosynthese und damit auch der Proteinbiosynthese erreichen jedoch während der G1-Phase ein Maximum. Unmittelbar vor dem Eintritt der Zelle in die S-Phase (Synthesephase) nimmt die Aktivität der DNA-Polymerasen sprunghaft zu, und somit die DNA-Biosynthese. Während der S-Phase verdoppelt sich der DNA-Bestand der Zelle, so daß die Zelle zu diesem Zeitpunkt und während der G2-Phase einen Chromatin-Gehalt von $4c$ hat, um sich dann in der Mitose in zwei Tochterzellen zu teilen (Löffler-Petrides 1988).

2.8.2 Abweichungen vom normalen $2c$:

Es gibt einige Gewebe, die von dieser allgemeingültigen Regel abweichen. Z.B. kommt es bei der Hypertrophie des Herzmuskels regelmäßig zu euploider Polyploidisierung, d.h. es kommen Chromatingehalte von ganzzahligen Potenzen von $2c$ physiologischerweise vor ($4c$, $8c$, $16c$, usw.). Andere Beispiele sind Schilddrüsenepithelien, Mesothelien, Leberepithelien, Samenblasenepithelien und Urothelien, sowie als Folge von Virusinfektionen (z.B. mit Humanes Papilloma Virus). Auch bei gutartigen Tumoren, wie z.B. dem Hypophysenadenom oder dem Meningeom können polyploide Chromosomensätze auftreten (Böcking A. 1990).

Als Aneuploidie bezeichnet man strukturelle oder numerische Abweichungen des normalen Chromosomensatzes. Numerische Abweichungen sind für den Gesamtorganismus meist nicht lebensfähig; eine Ausnahme ist z.B. die Trisomie 21. Isolierte numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen treten ansonsten in euploiden Organismen nur bei (meist malignen) Tumoren auf (Böcking A. 1990).

2.8.3 Chromosomale Aneuploidie

Chromosomale Aneuploidie gilt als Marker für neoplastische Zellen (Barlogie et al. 1980, Barlogie B. 1984, Saito et al. 1991). Dies bedeutet, daß der Nachweis von Zellen mit aneuploiden Chromosomensätzen dem Nachweis neoplastisch transformierter Zellen gleichkommt (Atkin N. 1971). Durch Einwirkung ionisierender Strahlung oder zytostatischer Agentien kann allerdings Aneuploidie auch in gutartigen Geweben entstehen. Will man Aneuploidie als Marker für einzelne maligne Zellen benutzen, so muß man diese beiden Einwirkungen ausschließen (Böcking A. 1990).

Ein Zellkern-DNA-Gehalt gilt in der DNA-Zytometrie dann als aneuploid, wenn er keinem normalen, euploiden oder polyploiden Chromosomensatz entsprechen kann. Aus dem oben Gesagten kann daher abgeleitet werden, daß in nicht polyploidisierenden Geweben Zellkern-DNA-Gehalte $>4c$ im Prinzip als aneuploid anzusehen sind. Berücksichtigt man jedoch den Gesamtfehler der Feulgen DNA-Zytometrie, so sollten erst Zellkerne mit einem DNA-Gehalt $>5c$ als aneuploid gewertet werden (Böcking A. 1990).

2.8.4 Zytometrische Meßwerte

Die relative Anzahl der Zellen größer $5c$ zur Gesamtzahl der gemessenen Zellen nennt man die $5c$ -Exceeding-Rate. So genügt im Prinzip eine eindeutig als aneuploid erkannte Zelle, um eine Neoplasie zu definieren. Da jedoch Zellen mit letaler Mutation in gesundem Gewebe auftreten können, und Fehler in der Methode nicht auszuschließen sind, muß man die Grenze zum eindeutigen Neoplasienachweis höher ansetzen. So wird der Nachweis von drei aneuploiden Zellen mit einem DNA-Gehalt $> 5c$ in einem Gewebe als Grenzwert für den Neoplasienachweis vorgeschlagen (Böcking A. 1990).

In polyploiden Geweben ist die $5c$ -Exceeding-Rate nicht aussagekräftig; z.B. ist es sinnvoll, bei einem physiologisch als $8c$ -polyploid bekannten Gewebe eine $9c$ -Exceeding-rate als Marker für Aneuploidie zu benutzen.

Der Modalwert der Messung ist der am häufigsten vorkommende Wert und gibt somit den DNA-Gehalt der Stammzelllinie an. Überschreitet der DNA-Gehalt dieser Zellen $5c$, so ist diese Zelllinie als aneuploid anzusehen. Das bedeutet in der Praxis, daß über den Nachweis einer aneuploiden Stammlinie die Malignitätsdiagnose bei vielen Tumoren erst relativ spät erfolgen kann, weil die Mehrzahl der Zellen erst spät im Verlauf eine zytometrisch erkennbare Aneuploidie aufweisen, während eine

geringe Anzahl schon frühzeitig aneuploid ist. Eine Frühdiagnose von Malignität wird also in der Stammlinien-Interpretation weniger sensitiv als mit der Einzelzell-Interpretation sein, dafür möglicherweise spezifischer.

Als besonders prognostisch valide hat sich für verschiedene Tumoren die Streuung der DNA-Werte um den normalen 2c-Wert erwiesen. Dieser Index wird als 2c-Deviation-Index bezeichnet. Der 2c-Deviation-Index, kurz 2cDI, ist definiert als die statistische Standardabweichung vom normalen 2c-Wert. Je größer die Abweichung vom normalen 2c, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der Aneuploidie (Böcking A. 1990).

2.9 Tumorfrontmorphologie und Zahl der Gefäße

Die Tumorfront ist die Kommunikationsebene zwischen Wirt und Tumor. Anhand ihrer Gestalt können Rückschlüsse über die Interaktion zwischen den Tumorzellen und dem umgebenden Stroma bzw. den Zellen des Immunsystems gezogen werden. Mit der mikroskopischen Untersuchung der Tumorfront kann diese Interaktion eingeschätzt werden. Hierzu dienen die etablierten Tumorfrontgrading-Systeme nach BRODERS et al. (1941) und BRYNE et al. (1989 und 1992), die neben der Tumorfrontmorphologie weitere Parameter, wie z.B. Keratinisierung, Kernpolymorphismus, Tiefe der Invasion und lymphozytäre Reaktion berücksichtigen, wobei diese Teilaspekte gleichberechtigt in einen Score eingehen. Je höher der Punktwert, desto aggressiver ist die Tumorfront.

In der vorliegenden Untersuchung wird jedoch nur der Teilaspekt der Tumorfrontmorphologie („Mode of Invasion“, bzw. „Pattern of Invasion“) betrachtet. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, daß die Durchführung einfach und wenig zeitaufwendig ist. Der Zweck der Verwendung der Einschätzung der Tumorfrontmorphologie ist vor allem auf den Vergleich zwischen der Expression der „Invasionsmarker“ E-Cadherin, Integrin $\alpha v \beta 3$, CD44v4/5 und CD44v6 mit der Tumorfrontmorphologie als einfache histologische Referenz ausgerichtet.

Die Zahl der Gefäße pro Flächeneinheit in einem Tumorgewebe wird mit malignen Eigenschaften von Tumoren in Verbindung gebracht. In einigen Studien kann eine Prognoserelevanz dieses Parameters gezeigt werden. Die Ergebnisse sind jedoch sehr heterogen (Weidner et al. 1991, Albo et al. 1994, Kainz et al. 1995).

2.10 Heterogenität der Oropharynxkarzinome

Oropharynxkarzinome werden häufig als homogene Tumoren dargestellt, wobei einem Tumor einzelne tumorbiologische Parameter zugeteilt werden. Dies gilt sowohl für die DNA-Indizes, Expressionswerte der Immunmarker CD44v4/5, CD44v6, E-Cadherin, Integrinketten αv und $\beta 3$, als auch für histologische Eigenschaften wie Tumorfront und Gefäßdichte.

MAHMOOD et al. können jedoch unterschiedliche Stammzelllinien innerhalb verschiedener HNSCC (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) feststellen (Mahmood et al. 1998). Auch SLOOTWEG et al. weisen mehrere Stammzelllinien innerhalb der untersuchten Tumoren nach (Slootweg et al. 1993). Heterogene DNA-Indizes innerhalb derselben Tumoren können von JACOB et al. nachgewiesen werden (Jacob et al. 1996). Eine intratumorale heterogene Verteilung der E-Cadherin-Expression wird von SCHIPPER et al. beschrieben (Schipper et al. 1991). HUDSON et al. und OSTWALD et al. berichten über regionale intratumorale Unterschiede bei der Expression von CD44v4/5 und CD44v6 (Ostwald et al. 1997, Hudson et al. 1996). PELTONEN et al. und JONES et al. finden Zonen variabler Expression von Integrinen (Peltonen et al. 1989, Jones et al. 1993). Auch für histologische Parameter, wie das Tumorfrontgrading und die Gefäßzahl, kann eine intratumorale Heterogenität nachgewiesen werden (Jacob et al. 1996, Schor et al. 1998).

3 Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung

1. Durch die Untersuchung mehrerer Gewebeproben aus den Tumoren soll eine vermutete intratumorale Heterogenität erkannt werden.
2. Mit Hilfe der DNA-Zytometrie werden die DNA-Indizes 2cDI und 5c-Exceeding-Rate, sowie die Stammzelllinien der einzelnen Regionen und der Lymphknotenmetastasen bestimmt.
3. Eine immunhistochemische Detektion der Oberflächenmoleküle CD44v4/5, CD44v6, E-Cadherin und Integrinketten αv und $\beta 3$ soll die Expression innerhalb der Tumoren, sowie in den Metastasen darstellen.
4. Die Einschätzung der Tumorfrontmorphologie soll als histologische Referenz zu den immunhistochemisch bestimmten Expressionsraten der Oberflächenmoleküle dienen. Außerdem soll die Gefäßdichte innerhalb der Primärtumoren und im Metastasengewebe bestimmt werden.
5. Es wird ein grundsätzlicher Vergleich bezüglich der einzelnen Parameter zwischen metastasierenden und nicht-metastasierenden Tumoren angestellt, außerdem zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen.
6. Die Parameter sollen auf ihre Prognoserelevanz hin untersucht werden und ein Zusammenhang mit dem T-Stadium soll geprüft werden.
7. Die einzelnen Parameter werden miteinander korreliert.

4 Material und Methoden

4.1 Patientenauswahl

In die Studie werden insgesamt 20 Patienten aufgenommen, die im Zeitraum von 1995 bis 1997 behandelt wurden. Die Patientenauswahl erfolgt zufällig, mit der Voraussetzung, daß der Tumor groß genug ist, um bei der Operation mehrere Proben aus dem Primärtumor entnehmen zu können. Ein Einverständnis von Seiten des Patienten zur Durchführung biologischer Untersuchungen an dem entnommenen Gewebe mußte vorliegen.

Histologisch handelt es sich bei allen Tumoren um Plattenepithelkarzinome. Bei einigen Tumoren sind angrenzende Areale wie Hypopharynx, Larynx oder Zunge mitbetroffen. Hier wird von der Ursprungslokalisierung Oropharynx ausgegangen. Fünf der ausgewählten Patienten hatten zum Zeitpunkt der operativen Tumorentfernung keine klinisch und sonographisch nachweisbaren Lymphknotenmetastasen, die anderen 15 Patienten zeigten eine regionäre Lymphknotenmetastasierung. Das Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen 43 und 72 Jahren. Unter den Patienten waren drei Frauen und 17 Männer.

Zur Abschätzung der Prognoserelevanz der einzelnen Marker werden die Patienten bis Ende des Jahres 1998 beobachtet. Die Studie steht im Einklang mit den Empfehlungen des Weltärztebundes der 18. Weltärzteesammlung in Helsinki 1964 und ihren Ergänzungen.

Die Tabelle 3-1 faßt die klinischen Patientendaten zusammen:

Tabelle 4-1 Patientendaten und genaue Lokalisation

ID	Geschl	T	N	M	pT	pN	pM	G	Lokalisation und Ausbreitung
1	m	2	2c	0	2	2b	x	G2	Oro-/Hypopharynx: Laterale Pharynxwand, Sinus piriformis
2	m	2	2a	0	2	2a	x	G2	Oropharynx: Valecula li, Zungengrund
3	m	4	1	0	4	1	x	G3	Oro-/Hypopharynx: Laterale Pharynxwand, Sinus piriformis, Larynx
4	m	2	2a	0	1	1	x	G2	Oropharynx: Laterale Pharynxwand
5	m	3	2b	0	3	2b	x	G2	Oropharynx: Tonsille, Gaumen
6	m	4	2b	0	3	2c	x	G3	Oro-/Hypopharynx: Laterale Pharynxwand, Sinus piriformis
7	m	4	3	0	4	2b	x	G3	Oropharynx: Gaumen, laterale Pharynxwand, Tonsille li
8	m	4	0	0	2	0	x	G2	Oropharynx laterale Pharynxwand Tonsille Zungengrund
9	m	4	2b	0	4	1	x	G2	Oro-/Hypopharynx: Zungengrund, Pharynxwand, Sinus piriformis
10	m	4	2b	0	2	0	x	G3	Oropharynx : Zungengrund, Zunge
11	m	4	3	0	4	2	x	G3	Oro-/Hypopharynx: Laterale Pharynxwand, Sinus piriformis
12	m	3	2b	0	3	2b	x	G2	Oropharynx: Tonsille, laterale Pharynxwand, Zungengrund
13	m	2	0	0	3	0	x	G2	Oropharynx/Zunge: Zungengrund, Zunge
14	w	4	0	0	1	x	x	G2	Oro-/Hypopharynx: Tonsillen-Gaumen bds.
15	w	4	2c	0	4	2b	x	G2	Oro-/Hypopharynx: Laterale Pharynxwand, Sinus piriformis
16	m	4	2b	0	3	2c	x	G2	Oropharynx: Tonsille, Vallekula, Epiglottis
17	m	2	2b	0	1	2	x	G2	Oropharynx: Mundboden-Glossotonsillarfurche
18	m	2	2b	0	2	1	x	G2	Oropharynx/Mundraum: Zungengrund und Zunge, Mundraum
19	w	3	0	0	2	x	x	G1	Oropharynx: Uvula, weicher Gaumen
20	m	4	2c	0	4	2c	x	G2	Oro-/Hypopharynx: Pharynxwand, Sinus piriformis

4.2 Tumorausdehnung gemäß TNM (4. Auflage UICC, 1987)

4.2.1 Stadieneinteilung/Staging

Die Tumoren auf dem Gebiet der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde werden durch das TNM-System lokalisationspezifisch eingeteilt. T beschreibt die Ausdehnung des Tumors, N das Fehlen bzw. Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, und M das von Fernmetastasen. Das TNM-System wurde gemeinsam von AJC und UICC 1987 und 1997 revidiert. Da die hier untersuchten Tumoren mit dem 1987 revidierten TNM-System eingeteilt werden, wird im folgenden dieses ältere System benutzt. Die zahlreichen Kombinationen sind letztlich in vier Stadien eingeteilt, wobei sich die Prognose mit jedem Stadium verschlechtert.

Diese Art der Einteilung von Tumoren soll eine schnelle Abschätzung der Prognose erlauben und die Aufstellung eines Therapieplans erleichtern. Ein Nachteil des TNM-Systems liegt jedoch in seiner geringen Konkordanz zwischen Tumoren mit der gleichen Stadieneinteilung. Die individuelle Prognose kann mit diesem System nur statistisch eingeschätzt werden, was ein weiterer Nachteil ist.

Den größten Nutzen bringt dieses anatomisch orientierte System bei Patienten mit kleinen Läsionen und guter Prognose (Clark, J. 1992). Die Tabellen 3.2 und 3.3 enthalten die TNM-, bzw. die Stadien-Einteilung der Oropharynxkarzinome:

Tabelle 4-2 Übersicht über die TNM-Einteilung der Oropharynxkarzinome (1987)

T-Kategorien	
TX: Minimalanforderung zur Diagnose eines Tumors ist nicht gegeben	
T0: Keine Evidenz auf Primärtumor	
Tis: Carzinoma in situ	
T1	≤2 cm
T2	>2 cm bis 4 cm
T3	>4 cm
T4	Invasion in angrenzende Organe
N-Status	
NX: Minimalanforderung zur Diagnose einer Lymphknotenmetastase ist nicht gegeben	
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	einzelne Lymphknotenmetastase einseitig ipsilateral <3 cm
N2a	einzelne Lymphknotenmetastase einseitig ipsilateral >3cm, <6 cm
N2b	mehrere Lymphknotenmetastasen einseitig ipsilateral, keine >6 cm
N2c	Lymphknotenmetastasen beidseitig oder kontralateral, keine >6 cm
N3	Lymphknotenmetastase >6 cm
M-Kategorie	
MX: Minimalanforderung zur Diagnose einer Fernmetastase ist nicht gegeben	
M0	keine Fernmetastase
M1	Fernmetastase vorhanden

Tabelle 4-3 Stadieneinteilung der Oropharynxkarzinome

Stadieneinteilung					
	N0	N1	N2	N3	M1
Tis	Stadium 0				
T1	Stadium I				
T2	Stadium II			Stadium IVb	Stadium IVc
T3		Stadium III			
T4			Stadium IVa		

4.3 Probenentnahme

4.3.1 Die einzelnen Regionen

Aus jedem Primärtumor werden 3-5 Proben entnommen. Die Entnahmeregionen entsprechen den Uhrzeigerzahlen 3°, 6°, 9° und 12° des Tumors, eine Region wird an der Basis des Tumors entnommen (Region Zentrum). Aus den Lymphknotenmetastasen wird jeweils eine Gewebeprobe entnommen. Siehe Abb. 3.1.

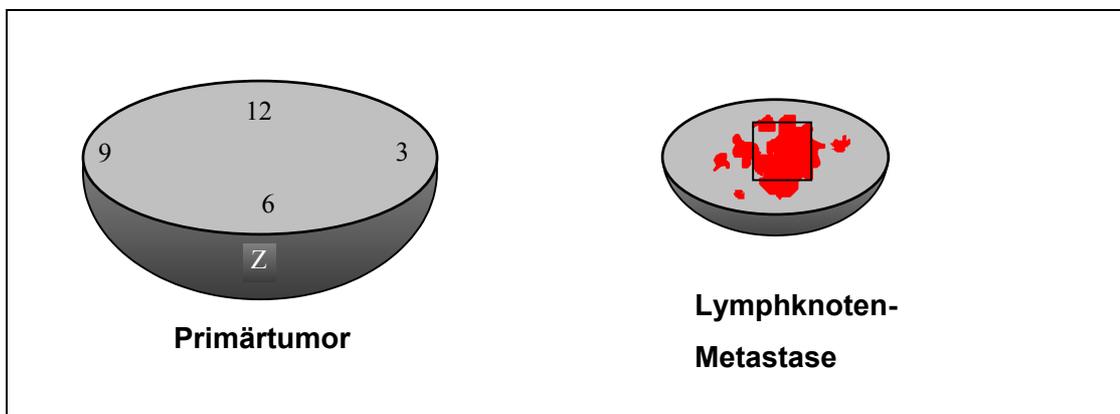


Abbildung 4-1 Entnahmestellen für die einzelnen Regionen

4.3.2 Gewebeentnahme und Aufbereitung

Unmittelbar nach der operativen Entfernung des Tumors werden die Proben aus dem Operationspräparat entnommen und wie folgt verarbeitet:

1. Nativprobe in vorgekühltem 2-Methylbutan schockgefrieren (Vorkühlen mit Flüssigstickstoff (-196°C)).
2. Überführen der gefrorenen Proben in Kryoröhrchen, Transport der Röhrchen in Flüssigstickstoff.
3. Lagerung bei -80°C.

4.3.3 Präparategewinnung aus Kryoblöcken

Auf den Kryobjekthalter (Fa. Shandon Nr. AS-0620-001) wird bei -27°C Cryomatrix (Cryomatrix®, Fa. Shandon Nr. 6769006) aufgetropft und der Kryobjekthalter auf die Schockgefrierstelle aufgelegt (-60°C). Wenn das Cryomatrix im Randbereich einzufrieren beginnt, wird nochmals Cryomatrix aufgetropft. Das aufgeblickte

Präparat wird in den Kryostat eingespannt, und es werden hiervon Schnitte angefertigt. Zur Weiterverarbeitung für die immunhistochemische Färbung, sowie für die histologischen Präparate werden 7 μ -Schnitte, für die DNA-Zytometrie einige 50 μ -Schnitte angefertigt.

4.3.4 Grundsätzliches zur Laborarbeit

4.3.4.1 PBS-Puffer für die Feulgen-Färbung

Vor der Kernfärbung muß ein PBS-Puffer für die Feulgen-Färbung (PBS = phosphat-buffer-sodium) hergestellt werden:

1. Ansetzen einer 0,1 molaren Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (alkalische Komponente).
2. Titrieren mit 0,1 molarer K⁺-Dihydrogenphosphat-Lösung (saure Komponente) bis pH=7,2.
3. Stammlösung 1:1 verdünnen zur 0,05 molaren Gebrauchslösung.
4. Objektträger mit Poly-L-Lysin beschichten (siehe 3.6.1).

4.3.4.2 Lymphozytengewinnung aus Venenblut als Referenzzellen

1. Aus Venenblut 20 ml entnehmen und mit 0,5 ml Liquemin 5000N vermischen.
2. Blut 1:1 mit 25 mM PBS (pH7,2 ohne Salze) mischen.
3. 20 ml Ficoll-Lösung (Seromed®, Biochem KG, Leonorenstr. 2-6, Berlin. Nr. L6115) in 50 ml Falcon-Zentrifugenkuvette vorlegen, DNA Blut-Puffer-Gemisch vorsichtig darüberschichten.
4. Zentrifugieren bei 2000 U/min 10 min bei Zimmertemperatur, dabei entstehen von oben nach unten folgende Phasen: Serum, Leukozytenphase, Ficoll-Phase, Erythrozyten.
5. Leukozytenphase abpipettieren, und erneut bei 2000 U/min 10 min bei Zimmertemperatur zentrifugieren.
6. Zwei mal mit PBS (pH7,2 ohne Salze) waschen und zentrifugieren wie unter Punkt 4.
7. Eine Stunde fixieren in 4% gepuffertem Formalin (PBS-Puffer, pH7,2 ohne Salze).
8. Zweimaliges Waschen in PBS (pH7,2 ohne Salze) und je 10 min bei 3000 U/min und 10°C zentrifugieren.

9. Suspendieren der Zellen in Carbowax und Aufbringen auf Objektträger.

4.4 Feulgen-Färbung

4.4.1 Vorbereitung der Präparate

Zur DNA-zytometrischen Untersuchung wird eine Feulgen-Kernfärbung durchgeführt (nach Romeis, modifiziert nach Böhm). Die folgende Auflistung zeigt den Arbeitsvorgang:

1. Einige 50 μ -Schnitte anfertigen.
2. Schnitte sofort in gepuffertes Formalin geben (4% Formalin in 25 mM. PBS ohne Salze mit pH7,2) und mindestens 20 min bei Zimmertemperatur fixieren.
3. Zentrifugieren der Röhrchen bei 3000 U/min und 10°C, 10 min lang (Minifuge RF, Fa. Heraeus Instruments, 63450 Hanau), dann abkantieren und PBS dazugeben und erneut zentrifugieren, dann den gleichen Vorgang noch einmal wiederholen.
4. PBS abkippen.
5. 2 ml Protease (Protease(r), Typ XXIV Bacterial, Fa. Sigma, Nr. P8038) dazugeben und bei Zimmertemperatur 5 min inkubieren.
6. Röhrchen auffüllen mit PBS, um die Protease zu stoppen.
7. 5 min zentrifugieren (Minifuge) bei 3000 U/min und 10 °C, dann absaugen, wieder mit PBS auffüllen und 10 min zentrifugieren, nochmals mit PBS auffüllen und nochmals 10 min zentrifugieren.
8. Röhrchen mit 1 ml PBS auffüllen und die Proben mit Pasteur-Pipette durchmischen.
9. Filtern des durchmischten Gewebes durch eine Gaze (Nylongaze Porenstärke 70 μ , Fa. Stokvis-Smiths, Niederlande, Nr. 484219, PA-70/43).
10. Gefilterte Zellsuspension 15 min bei 3000 U/min zentrifugieren (Minifuge), dann PBS abkantieren.
11. Überführen der Zellsuspension in eine Zytokammer (mit Zytoklemme auf Objektträger befestigte Kammer). Überführen der Lymphozyten in eine zweite Zytokammer. Zugabe von 2 ml Carbowax (2%-iges Polyethylenglycol 1500 (2% Polyethylglycol 1500[®], Fa. Schuchard, Hohenbrunn, Nr. 807489) in 50% vergelltem Ethanol)) zu der Tumorzell-Suspension .
12. 15 min Zentrifugieren in der Zytozentrifuge bei 3000 U/min (Universal RF, Fa. Hettich, Tuttlingen).
13. Abkippen der Flüssigkeit, ca. 12 Stunden trocknen lassen.

4.4.2 Färbevorgang

1. Getrocknete Präparate zur Hydrolyse eine Stunde bei 28°C (Wasserbad) in 4-normaler Salzsäure inkubieren.
2. Stoppen des Hydrolysevorgangs mit Aqua dest.
3. Hinzugeben von Schiff'schem Reagenz auf Präparate (Schiff'schem Reagenz, Fa. Merck, 500ml, Nr.1.09033) und 30 min inkubieren.
4. Abkippen der Flüssigkeit.
5. 2 min mit SO₂-Wasser inkubieren, Flüssigkeit verwerfen und diesen Vorgang insgesamt 3 mal wiederholen (SO₂-Wasser: 475ml Leitungswasser plus 3g K₂S₂O₅ plus 25ml einnormale HCl).
6. Präparat mit Leitungswasser spülen und 10 min in Leitungswasser bläuen.
7. Auswaschen mit Aqua dest.
8. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (siehe:4.6.1).
9. Eindecken der Präparate mit Entellan (Entellan®, Fa. Merck, Nr.1.0791.0100).
10. Unter Abzug trocknen lassen.

4.5 **Histomorphologische Untersuchung**

4.5.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Präparate zur Auswertung der Tumorfront und der Zahl der Gefäße werden nach der HE-Standardfärbung nach Romeis gefärbt.

4.5.2 Tumorfrontmorphologie

Die Tumorfront kann verschiedene Formen annehmen: Von glatter Tumorfront mit verdrängendem Wachstum bis hin zu diffuser Infiltration des Stroma.

So werden diese Veränderungen zweckmäßig in vier Grade (Tumorfrontmorphologie Typ I bis IV) eingeteilt, entsprechend der Punkteverteilung (1-4 Punkte) im Malignancy-Grading (Tumorfrontgrading) von BRYNE et al.: Dabei entspricht Typ I der glatten, verdrängenden Tumorfront, Typ IV der diffusen Invasion. Die folgende Tabelle faßt die Einteilung der Tumorfront zusammen:

Tabelle 4-4 Einteilung der Tumorfrontmorphologie („Pattern of Invasion“)

Grade	„Pattern of Invasion“ nach BRYNE et al. (1992)
I	Pushing, well delineated infiltrating borders
II	Infiltrating, solid cords, bands and/or strands
III	Small groups or cords of infiltrating cells
IV	Marked and widespread cellular dissociation in small groups and/or in single cells

Nach diesen Kriterien werden die HE-Schnitte der Tumoren untersucht. Da die Tumorfronten innerhalb desselben Präparates variieren, werden je 10 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung untersucht und die dominierende Tumorfrontmorphologie wird der Gewebeprobe zugeordnet. Diese Vorgehensweise entspricht den Empfehlungen von BRYNE et al. (Bryne et al. 1992).

4.5.3 Zahl der Gefäße bzw. Gefäßdichte

Die Zahl der Gefäße eines Tumors soll Auskunft über die Angiogenese geben. Im umgebenden Stroma wird nach Kapillaren oder Gefäßen gesucht. Hier werden in 400-facher Vergrößerung 10 Gesichtsfelder eines HE-Präparates untersucht und die Gefäßquerschnitte in diesem Bereich gezählt. Die 10 Werte werden arithmetisch gemittelt, da die einzelnen Felder zum Teil deutliche Schwankungen der Gefäßzahl aufweisen. So wird die Gefäßdichte bestimmt und es ergibt sich die Einheit Gefäße pro High power field. Durch die Mittelung entstehen Zehntel-Werte hinter dem Komma.

4.6 *Immunhistochemische Untersuchung*

4.6.1 Grundsätzliches zur Laborarbeit

4.6.1.1 Poly-L-Lysin-Beschichtung der Objektträger

Vor dem Auflegen der Präparateschnitte werden die Objektträger mit Poly-L-Lysin-beschichtet:

1. Stammlösung (Poly-L-Lysin®, Fa. Sigma Diagnostics, St.Louis, MO, USA, Nr. P8920) 1/10 mit Aqua dest. zur Gebrauchslösung verdünnen. Gebrauchslösung filtrieren durch Filterpapier.
2. Objektträger 5 min inkubieren, dann abtropfen lassen und 10 Stunden bei 50°C trocknen.
3. Lagerung bei Zimmertemperatur.

4.6.1.2 PBS-Puffer zur Verwendung bei Immunhistochemischen Färbungen

Die Herstellung des PBS-Puffers zur Verwendung bei Immunhistochemischen Färbungen (PBS = phosphat-buffer-sodium) zeigt die folgende Auflistung:

1. Ansetzen einer 0,1 molaren Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (alkalische Komponente) mit 0,308 molarer Na^+Cl^- und 0,006 molarer K^+Cl^- .
2. Titrieren mit 0,1 molarer K^+ -Dihydrogenphosphat-Lösung (saure Komponente) bis pH7,4.
3. Stammlösung 1/1 verdünnen zur 0,05 molaren Gebrauchslösung.

4.6.1.3 Entwässerung durch die Alkoholreihe

Zur Einbettung der Präparate in das hydrophobe Entellan muß vorher eine Entwässerung der Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe erfolgen. Zwischen den einzelnen Verdünnungen bzw. Alkoholen wird jeweils der Alkohol verworfen. Die Arbeitsschritte erfolgen bei Zimmertemperatur.

Tabelle 4-5 Alkoholreihe

Isopropanol	70%	je 5 min
Isopropanol	80%	↓
Isopropanol	96%	
Isopropanol	96%	
Isopropanol	100%	
Isopropanol	100%	
Isopropanol	100%	
Xylol	100%	
Xylol	100%	
Xylol	100%	

4.6.2 Avidin-Biotin-Complex-Methode

Die immunhistochemischen Färbungen werden nach der ABC-Methode (=Avidin-Biotin-Complex-Methode, auch Peroxidase-Methode) durchgeführt. Im folgenden ist der genaue Arbeitsvorgang aufgelistet:

4.6.2.1 Vorbereiten der Präparate

1. Auffangen der 7 μ -Schnitte auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (Poly-L-Lysin 0,1% in Aqua dest., Fa. Sigma Diagnostics, St.Louis, MO, USA, Nr. P8920).
2. Lufttrocknen bei Zimmertemperatur, ca. 5 min.
3. In -20°C vorgekühltem 100%-igem Aceton 10 min lang fixieren.
4. Aceton abkippen.
5. Kurz lufttrocknen lassen.
6. Schnitte umranden mit DAKO-PEN (Fa. DAKO, Nr. S2002).
7. Präparate in PBS waschen.
8. Abkippen des Puffers.

9. Deaktivieren der endogenen Peroxidase: Präparate in vorbereitete Lösung geben: 60 ml 50 mM PBS plus 40ml 100% Methanol plus 2 ml 30% H₂O₂, mindestens 15 min.
10. Abkippen und mit PBS waschen.

4.6.2.2 Färbung der Präparate

1. Objektträger in feuchter Kammer mit Normalserum (Goat Serum, Fa. DAKO, Denmark, Nr. X0907, Ch.B. 096 (102)) 30 min lang inkubieren.
2. Abtupfen des Normalserums mit Fließpapier.
3. Erst-Antikörper der jeweiligen Färbung (und entsprechender Verdünnung) auftropfen und 12 h in feuchter Kammer inkubieren bei -4°C.
4. 3 mal 5 min auswaschen mit PBS.
5. Zweit-Antikörper (Ziege-anti-Maus, biotinyliert, Fa. DAKO Nr.E 0433) auf Präparat geben (in angegebener Verdünnung).
6. 30 min lang bei Zimmertemperatur in feuchter Kammer inkubieren.
7. 3 mal 5 min auswaschen mit PBS.
8. Auftropfen von verdünnter (1/100 mit Aqua dest. verdünnt) Peroxidase-conjugated Streptavidin-Lösung (Fa. Immunresearch Laboratories INC, Nr.016-030-084) und 20 min in feuchter Kammer inkubieren.
9. Nochmals 3 mal 5 min lang mit PBS waschen.
10. Zugabe von DAB (3-3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, Fa. Sigma, Nr. D5905). Inkubation über 5 min bei Zimmertemperatur (nicht in Feuchtkammer).
11. Waschen mit Aqua dest.
12. Färbung der Kerne mit Mayers-Hämalaunlösung (Fa. Mayer, Nr. 1.09249.0500): Präparat 2 min in Hämalaunlösung inkubieren, dann mit Leitungswasser 10 min bläuen. Danach Auswaschen des Leitungswassers mit Aqua dest. Aqua dest. abkippen.
13. Mit Alkoholreihe entwässern.
14. Aufbringen von Entellan auf die Präparate zur Fixation (Entellan®, Fa. Merck, Nr. 1.07961.0100).
15. Unter Abzug trocknen.

4.6.3 Verwendung monoklonaler Antikörper

In Tabelle 4-6 sind die einzelnen verwendeten monoklonalen Antikörper aufgeführt, die in oben genanntem Färbeporgang als Erstantikörper zum Einsatz kommen.

Tabelle 4-6 Verwendete monoklonale Antikörper

Erstantikörper	Antikörpertyp	Firma	Catalog No.	Verdünnung
E-Cadherin	IgG (mouse), monoclonal (Clon: 67A4)	Immunotech Hamburg	1763	1:40
Integrin α v	IgG1 (mouse), monoclonal (Clon: AMF7)	Immunotech Hamburg	0770	1:25
Integrin β 3	IgG1 (mouse), monoclonal (Clon: SZ21)	Immunotech Hamburg	0540	1:50
CD44v4/5	IgG (mouse), monoclonal (Clon: 3D2)	R&D Systems	BBA 25	1:100
CD44v6	IgG (mouse), monoclonal (Clon: 2F10)	R&D Systems	BBA 13	1:50

4.6.4 Auswertung der Schnittpräparate

Die Auswertung der Schnittpräparate erfolgt an einem binokulären Mikroskop (H500, Hund GmbH, Wetzlar) mit Hilfe eines Zähllokulars (Zähllokular WF10x, Hund GmbH, Wetzlar) in 400-facher Vergrößerung. Das Zählfeld des Zähllokulars ist eingeteilt in 100 Felder. Pro Präparat werden 10 Gesichtsfelder ausgezählt.

Bei allen Färbungen handelt es sich um monoklonale Antikörper-Färbungen. Dennoch sind die spezifischen Färbungen häufig von einer unspezifischen Reaktion begleitet, so daß Bindegewebe und intrazelluläre Strukturen ebenfalls eine leicht positive Reaktion zeigen. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, werden deshalb nur diejenigen Zellen als positiv angesehen, deren Färbung der Zellmembran eindeutig zuzuordnen sind. Zellen mit ausschließlich intrazellulärer Färbung werden als negativ angesehen. Zellen, deren Färbeintensität die der unspezifischen Grundfärbung nicht übertrifft, werden ebenfalls als negativ angesehen.

4.7 Quantitative DNA-Analyse

4.7.1 Prinzipien und Gesetze der Messung:

Die Messung beruht auf einer Absorptionsmessung, wobei das monochromatische Licht des Mikroskops (566nm) nach dem Gesetz von Lambert-Beer (=Extinktionsgesetz) absorbiert wird:

$$I = I_0 \cdot e^{-\sigma s}$$

I	Intensität der Welle hinter dem Absorber
I₀	Intensität vor dem Absorber, also für s=0
s	Dicke des Absorbers
σ	Extinktionskoeffizient [1/m]

Der Extinktionskoeffizient für die nach Feulgen gefärbte Desoxyribonukleinsäure ist eine konstante Größe. Der Funktionswert der Gleichung ist **s**, also die Dicke des Absorbers **I** ist gleich **I₀** für **s=0**, so daß $e^{-\sigma s} = 1$ ist. Für **s>0** steigt die Extinktion **I**.

4.7.2 Bildanalyzesystem

Das Prinzip der quantitativen DNA-Zytometrie ist die Messung des DNA-Gehalts von Zellen. Die Messungen werden mit Hilfe des computergestützten Bildanalyzesystems CM1 Version 1.6 (Hund GmbH Wetzlar) durchgeführt.

Das System ist aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

1. Binokuläres Mikroskop (H500, Hund GmbH Wetzlar)
2. Analog-Digital-Wandler CCD Video Kamera, Auflösung 1062x1062 Bildpunkte
3. Software „DNA-Zytometrie“ von A. Böcking
4. Personal-Computer und Peripherie-Geräte (Monitor, Drucker, Keyboard, Maus)

4.7.3 Vorgang der Messung:

Die fixierten und nach Feulgen gefärbten Präparate werden auf das Mikroskop aufgelegt (Objektiv 40:1). Mit Hilfe des Bildanalyzesystems werden die Zellen nun auf dem Monitor sichtbar. Das Softwareprogramm „DNA-Zytometrie“ ermöglicht eine Messung des DNA-Gehalts der einzelnen Zellen.

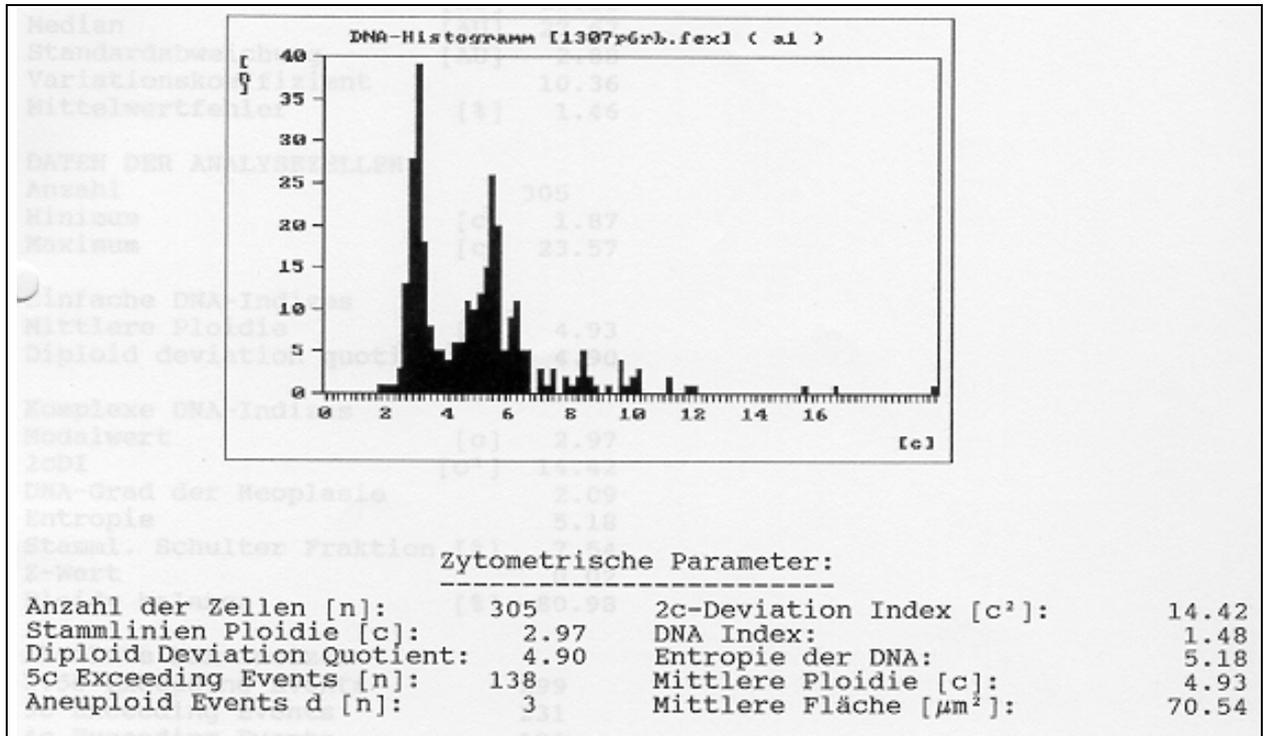
Bevor die Tumorzellen ausgewertet werden, muß zuerst jedes Präparat geeicht werden. Auf jedem Objektträger werden dazu Lymphozyten in einem separaten Teil des Objektträgers aufgebracht, deren Zellkerne im selben Färbeprozess mitgefärbt werden.

Zur Eichung wird die DNA von je 30 Lymphozyten gemessen. Um bei unterschiedlicher Färbintensität der einzelnen Präparate exakte Werte zu erlangen, wird dem normalen 2c-Wert der Lymphozyten eine Referenzextinktion zugeordnet. Es werden Lymphozyten zur Eichung verwendet, weil diese leicht zu gewinnen und morphologisch einfach zu erkennen sind: die Kerne sind nahezu kreisrund und haben eine dichtgepackte DNA. Bei der Eichung wird ein Fehlerquotient von 2% nicht überschritten.

So wird vom Softwareprogramm dem DNA-Gehalt der Zellen ein Extinktionswert zugeordnet, der sich aus Anzahl der Pixel (=Fläche) und Grauwerten der einzelnen Pixel (=Extinktion) errechnet. Die einzelnen Grauwerte werden gemittelt und mit der Fläche zu einem bestimmten Wert verrechnet. Durch die vorherige Eichung mit den Lymphozyten, deren DNA-Wert bekannt ist, kann der Meßwert der Tumorzellen mit demjenigen der Eichzellen verglichen werden und so der genaue DNA-Wert der Tumorzellen berechnet werden.

Das System erfaßt die Gesamtheit des Zellkerns, wobei der Extinktionssprung zwischen DNA und Hintergrund als Kerngrenze erkannt wird. Zur Bestimmung der DNA-Indizes der einzelnen Präparate werden dann nach diesem Prinzip 300 Zellen ausgewertet. Das Software-Programm rechnet diese Parameter selbständig aus. Abbildung 3.2 zeigt den fertigen Ausdruck der Ergebnisse nach erfolgter Messung:

Abbildung 4-2 Beispiel-Ausdruck der DNA-Zytometrie Software



4.8 Indizes der DNA-Zytometrie

4.8.1 2cDI

Der 2cDI (=2c-Deviation Index) ist die statistische Standardabweichung von dem normalen Chromatin-Gehalt von 2c:

$$2cDI = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (c_i - 2c)^2$$

Normale Gewebe haben einen 2cDI nahe 0. Stark proliferierende Gewebe mit vielen Mitosen haben einen 2cDI > 0, aber stets < 2 (Böcking A. 1990).

4.8.2 DNA-Index und Modalwert

Der Modalwert ist der am häufigsten gemessene Wert, ausgedrückt in der Einheit c (c=einfacher Chromatingehalt). Der DNA-Index ergibt sich aus dem Modal-Wert geteilt durch 2c. Ein ruhendes, normales Gewebe hat einen Modalwert von 2c und einen DNA-Index von 1. Ein stark proliferierendes, normales Gewebe hat einen Modalwert $2c \leq x \leq 4c$, und einen DNA-Index von $1 \leq x \leq 2$ (Böcking A. 1990).

4.8.3 5c-Exceeding-Rate

Die 5c-Exceeding-Rate erfaßt den prozentualen Anteil der Zellen mit einem DNA-Gehalt $\geq 5c$ an allen gemessenen Zellen. Die 5c-Exceeding-Rate normaler Gewebe ist gleich 0. Ausnahmen sind polyploide Gewebe (Böcking A. 1990) (Vgl. Kap. 1.8.4).

4.9 Statistische Methoden

Tabelle 4-7 Übersicht der verwendeten Begriffe

Mittelwert	= die Werte aller Regionen eines Tumors geteilt durch die Anzahl der Regionen
Minimum	= kleinster Wert aller Regionen
Maximum	= größter Wert aller Regionen
Range = Spannweite	= größter Wert aller Regionen minus kleinster Wert
N(+)	Gruppe der Tumoren mit Lymphknotenmetastasierung ohne Berücksichtigung des TNM-Status
N(0)	Gruppe der Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen ohne Berücksichtigung des TNM-Status

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt im Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Mainz auf einem PC unter Verwendung des Programmsystems SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA; Release 6.12).

Für quantitative Variablen wird zur Prüfung der Unterschiedlichkeit der Werte zwischen Primärtumor und Metastase der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet. Hier stehen die Daten von 12 Patienten zur Verfügung.

Der Gruppenvergleich quantitativer Variablen zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden Tumoren wird mit dem Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt.

Als Maß für die Stärke des Zusammenhangs zwischen quantitativen und ordinalen Variablen werden Spearmansche Rangkorrelationskoeffizienten berechnet.

Zur Prüfung der Frage, welche Variablen den stärksten prognostischen Einfluß haben, wird die univariate Cox-Regression herangezogen. Bei der univariaten Analyse wird der Einfluß jeder einzelnen Variablen auf die Zielgröße untersucht.

Für wichtige Variablen wird dieser Einfluß mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven veranschaulicht. Zum Vergleich dieser Kurven wird der Logrank-Test herangezogen.

Alle statistischen Tests werden im Sinne einer deskriptiven Datenanalyse verwendet. P-Werte ≤ 0.05 werden als statistisch auffällig angesehen. Werte von $0.05 < p < 1$ werden als grenzwertiger Befund interpretiert.

5 Ergebnisse

Es werden insgesamt 20 Plattenepithelkarzinome des Oropharynx untersucht. Bei 15 der Tumoren werden histologisch Lymphknotenmetastasen nachgewiesen (pN₁-pN_{2c}), die restlichen 5 werden als pN0 eingestuft. Die bereits metastasierten Tumoren werden unter der Gruppe N(+) zusammengefaßt. Die klinischen T-Stadien variieren von T2-T4, die pT-Stadien von T1 bis T4. Folgende Tabellen geben eine Übersicht über die Verteilung der klinischen und der pathologischen TN-Stadien.

Tabelle 5-1 Klinisches T-Stadium und N, Häufigkeitsverteilung (absolute Zahlen)

Anzahl n	T1	T2	T3	T4
N(0)	0	1	1	3
N(+)	0	5	2	8

Tabelle 5-2 pT-Stadium und N, Häufigkeitsverteilung (absolute Zahlen)

Anzahl n	pT1	pT2	pT3	pT4
N(0)	1	3	1	0
N(+)	2	3	4	6

Direkt nach der operativen Entfernung der Tumoren werden je fünf Proben aus dem Primärtumor und je eine Probe aus der korrespondierenden Lymphknotenmetastase entnommen. Die fehlenden Proben sind im folgenden Ergebnisteil mit (*) gekennzeichnet.

Für jede Probe entstehen ein Feulgen-gefärbtes Präparat für das Bildanalysesystem, fünf immunhistochemisch gefärbte Präparate (CD44v4/5, CD44v6, Integrinkette αv , Integrinkette $\beta 3$ und E-Cadherin) zur mikroskopischen Auswertung und eine HE-Färbung zur histologischen Beurteilung (Gefäßdichte und Tumorfront). Für einen Tumor mit 5 Proben und einer Probe aus einer Lymphknotenmetastase ergeben sich somit je 35 Präparate für den Primärtumor und sieben für die Metastase (vgl. Kapitel 3.3 ff.).

Nach Auswertung mit dem DNA-Analysesystem und der mikroskopischen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen und der HE-Färbungen entstehen für jeden Tumor 3-5 Werte für DNA-Indizes, 3-5 Expressionswerte für die Immunmarker, 3-5 Werte für Tumorfrontgrading und Gefäßzahl.

Aus diesen Werten werden folgende Berechnungen und Vergleiche angestellt:

1. Bestimmung der Mittelwerte, Minima, Maxima und Range innerhalb der Primärtumoren für alle durchgeführten Untersuchungen (vgl. Kapitel 3.9).

2. Vergleich der Gruppen N(0) und N(+) bezüglich dieser errechneten Werte (z.B. statistischer Vergleich zwischen Maxima des 2cDI in N(0)- und N(+)-Gruppe, oder statistischer Vergleich zwischen den Mittelwerten von E-Cadherin in N(0) und N(+)-Gruppen).
3. Vergleich der N(+)-Primärtumoren mit den korrespondierenden Lymphknoten-Metastasen (z.B. Vergleich der Maxima von CD44v6 in den Primärtumoren mit den Werten der Metastasen, oder Vergleich der Minima der Integrinketten αv und $\beta 3$ mit den Metastasenwerten).
4. Bestimmung der Stammzelllinien der einzelnen Proben mittels DNA-zytometrischer Untersuchung (siehe Kap. 3.8.2), und Vergleich der Stammzelllinien von Primärtumoren und Metastasen, sowie innerhalb der Primärtumoren. Außerdem Vergleich stammzelliniengleicher Regionen bezüglich DNA-Indizes, Expressionsverhalten der Marker und histologischen Eigenschaften (Gefäßzahl und Tumorfrontmorphologie).
5. Bestimmung von Einzelkorrelationen zwischen beliebigen Markern (z.B. Korrelation von DNA-Indizes und der Tumorfrontmorphologie, oder Korrelation von CD44v4/5 mit den DNA-Indizes).
6. Bestimmung der statistischen Abhängigkeiten zwischen Rezidivwahrscheinlichkeit bzw. Überlebenszeit mit den errechneten Werten (z.B. der Einfluß der Minima von E-Cadherin innerhalb der Tumoren auf die Rezidivwahrscheinlichkeit, oder die Abhängigkeit von CD44v6 und Überlebenszeit).

5.1 DNA-Zytometrie

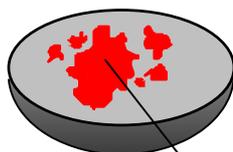
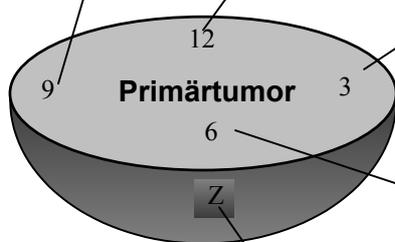
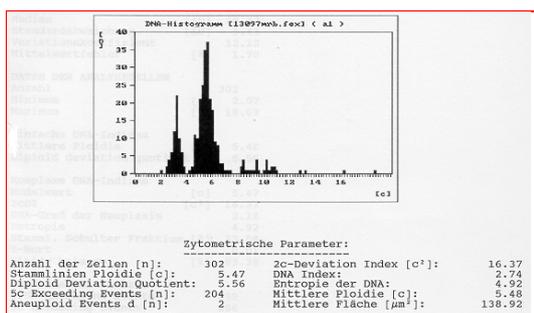
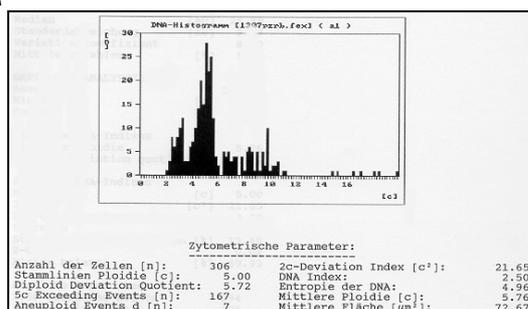
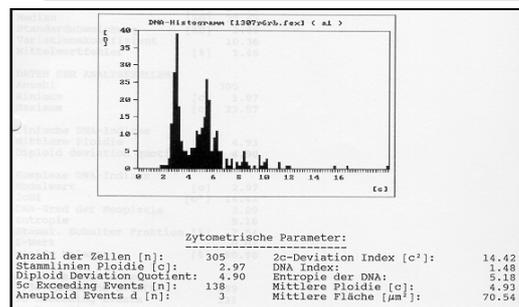
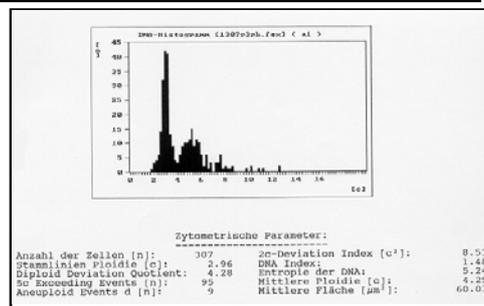
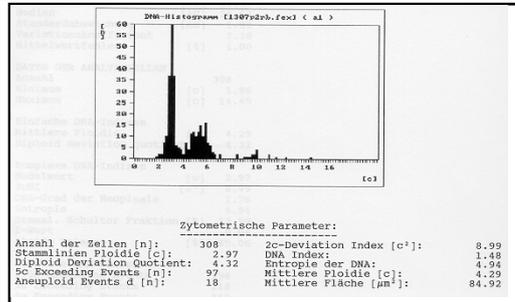
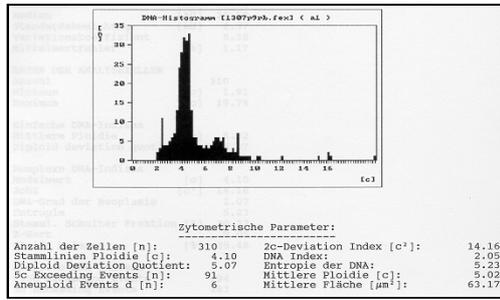
5.1.1 Bilder 2cDI

In der folgenden Abbildung werden an einem Beispiel (ID1) die DNA-zytometrischen Befunde der einzelnen Regionen des Primärtumors und der Metastase graphisch dargestellt. Die rechts in der Abbildung gezeigten Histogramme sind die Computerausdrucke der einzelnen Proben.

Die Histogramme zeigen die Auswertung von ca. 300 Zellen in den einzelnen Regionen (vgl. Kap. 3.7.3). Diese Gegenüberstellung der einzelnen Proben soll die Verteilung und Variabilität innerhalb eines Tumors und der Lymphknotenmetastase darstellen.

Die 2cDI der einzelnen Regionen unterscheiden sich deutlich. Der höchste 2cDI wird in der Region Zentrum („Z“) gemessen (2cDI=21,65). Diese Region hat auch eine ähnliche Stammzelllinie (im Computerausdruck als „Stammlinien Ploidie“ aufgeführt) wie die Metastase. Die Kriterien zur Stammzelllinien-Identität nach SLOOTWEG (1993) werden aber nicht erfüllt (Identität von zwei Stammzelllinien bedeutet, daß die DNA-Index-Differenz dieser beiden Zelllinien $\leq 0,1$ beträgt (Slootweg et al. 1993, Mahmood et al. 1998), vgl. Kapitel 4.10.1 und 5.1). Dennoch zeigen die Histogramme von Region Zentrum und Lymphknotenmetastase eine ähnliche Verteilung. Möglicherweise ist aus dieser (oder einer angrenzenden) Region die Metastase entstanden (siehe Kapitel 5 „Heterogenität der Tumorarchitektur“). Der 2cDI der Lymphknotenmetastase überragt den Maximalwert des Primärtumors (in Region Zentrum) nicht.

Die Regionen 3°, 6° und 12° haben gleiche Stammzelllinien, die Histogramme dieser Proben sind ähnlich.

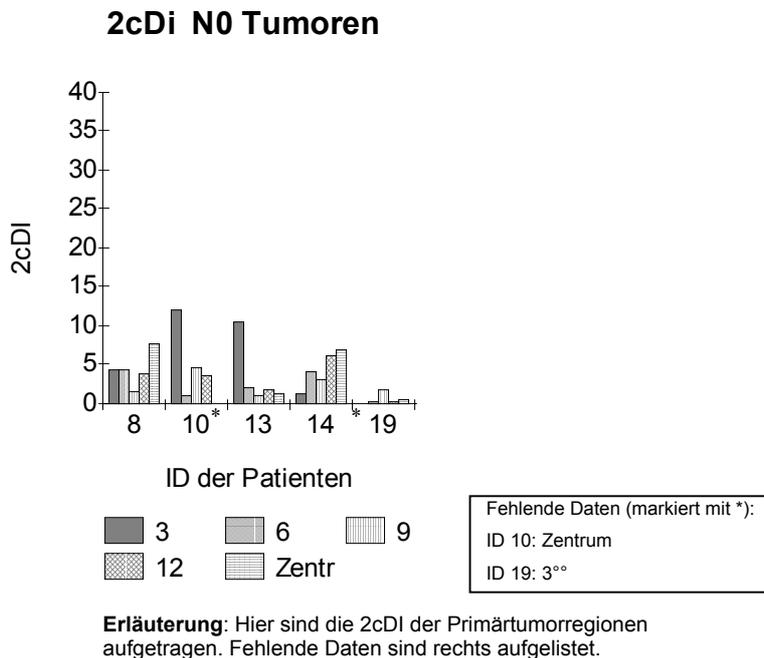
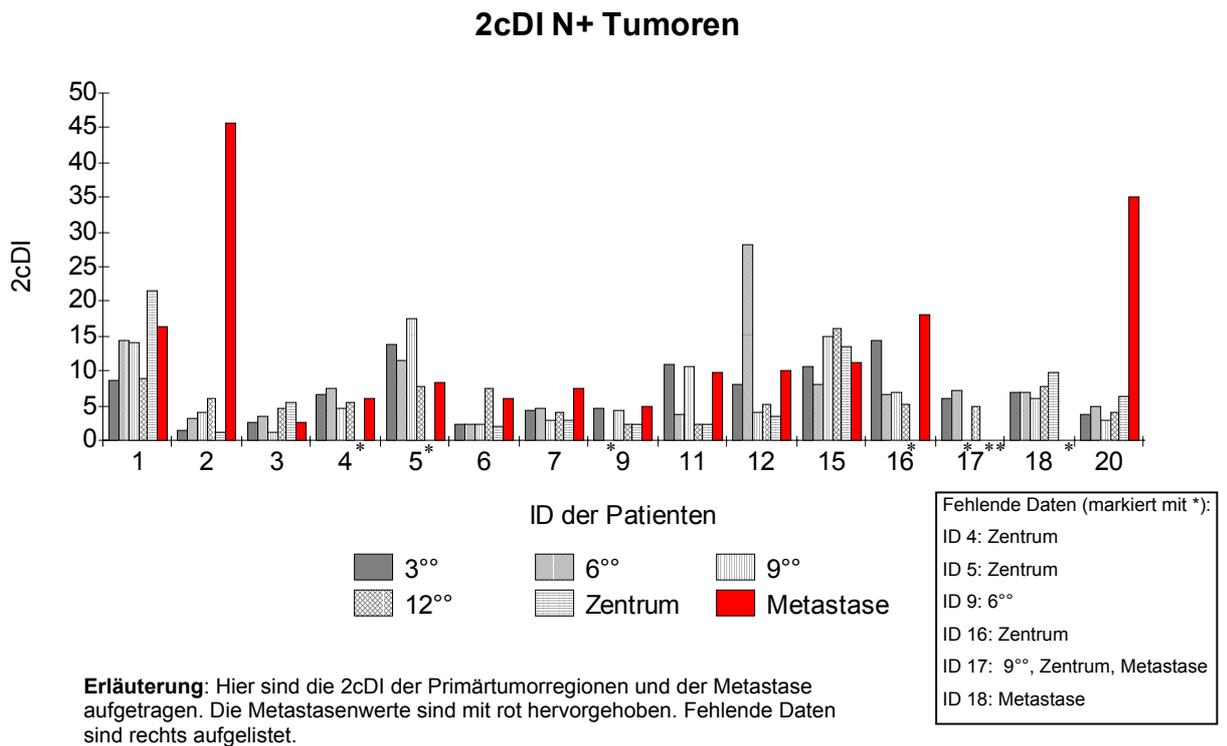


Erläuterung: DNA-zytometrische Messung der verschiedenen Proben von ID1 und Metastase. Einzelheiten siehe Text

5.1.2 2cDI

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der DNA-Zytometrie graphisch dargestellt. Die 20 Tumoren sind mit ihren Einzelregionen (Grautöne) und der Metastase (rot) dargestellt. Die statistische Bearbeitung wird in den darauffolgenden Kapiteln zusammengefaßt.

5.1.2.1 Darstellung der Einzeldaten



5.1.2.2 Vergleich des 2cDI zwischen N(+) und N(0) -Tumoren

Die 2cDI-Minima aus den einzelnen Regionen der N(+)-Tumoren liegen höher als die Minima der N(0)-Tumoren ($p=0,0052$).

Mittelwerte ($p=0,1161$) und Maxima ($p=0,6625$) der 2cDI-Werte zeigen keine gruppenspezifischen Auffälligkeiten.

Der Range der Werte innerhalb der Tumoren ist in den beiden Gruppen N(0) und N(1) statistisch nicht auffällig unterschiedlich ($p=0,6625$).

5.1.2.3 Zusammenhang des 2cDI mit pT und klinischem T-Stadium

Der 2cDI zeigt keinen statistisch auffälligen Zusammenhang mit pT und klinischem T-Stadium: 2cDI-Mittelwerte (T-Stadien ($p=0,7637$), pT-Stadien ($p=0,4981$)); 2cDI-Minima (T-Stadien ($p=0,6539$), pT-Stadien ($p=0,4494$)). 2cDI-Maxima (T-Stadien ($p=0,8524$) und pT-Stadien ($p=0,4868$)). Auch die Rangewerte der 2cDI verhalten sich in dieser Weise (T-Stadien ($p=0,8935$) und pT-Stadien ($p=0,9972$)).

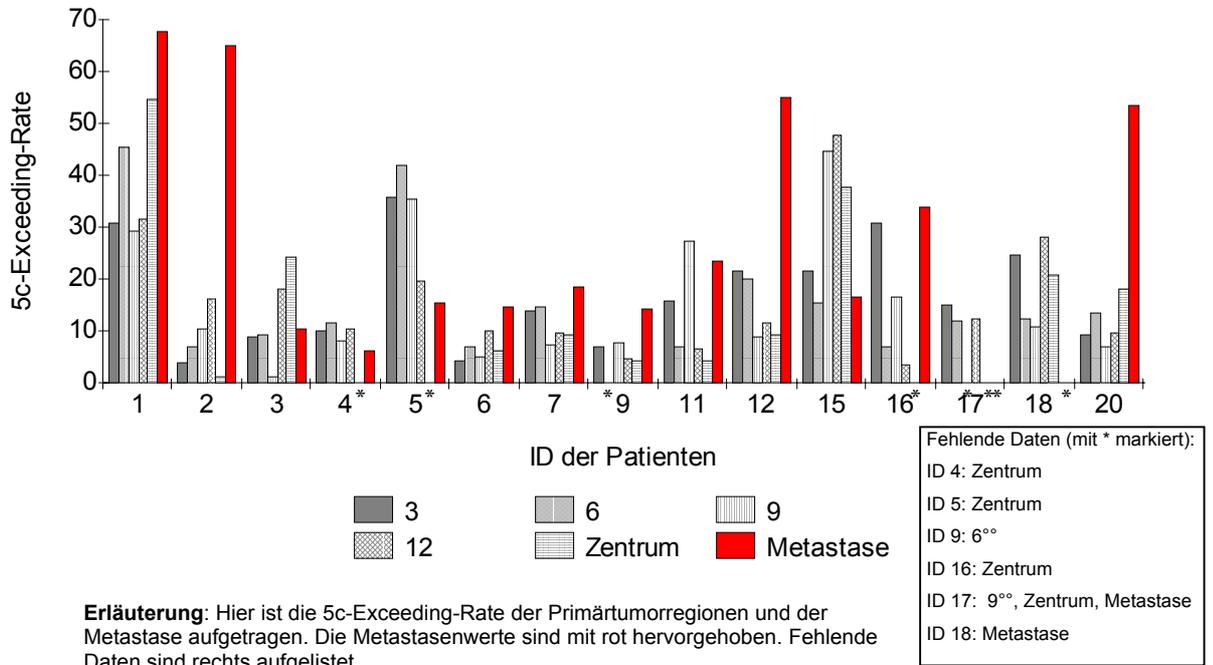
5.1.2.4 Vergleich des 2cDI zwischen Primärtumor und Metastase

Die 2cDI der Metastasen liegen insgesamt höher als die Mittelwerte der Primärtumoren. Es ergibt sich ein statistisch auffälliges Ergebnis mit $p=0,0479$. Die Minima der Primärtumoren liegen statistisch auffällig unterhalb der Werte der Metastasen ($p=0,0002$). Die Maxima der Primärtumoren zeigen keinen statistisch auffälligen Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,6848$).

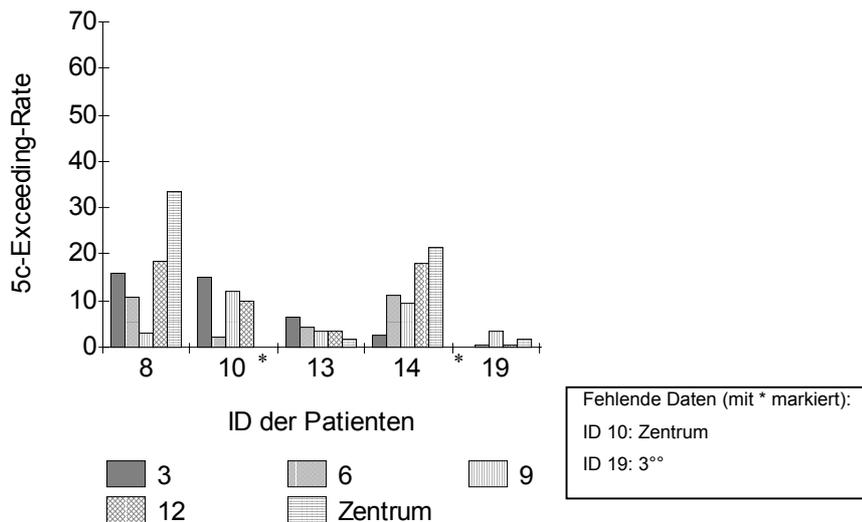
5.1.3 5c-Exceeding-Rate

5.1.3.1 Darstellung der Einzeldaten

5c-Exceeding-Rate N+ Tumoren



5c-Exceeding-Rate N0 Tumoren



5.1.3.2 Vergleich der 5c-Exceeding-Rate zwischen N(+) und N(0) -Tumoren

Für die 5c-Exceeding-Rate-Minima der N(+)-Tumoren können höhere Werte gemessen werden ($p=0,0113$).

Die Mittelwerte ($p=0,1904$) der 5c-Exceeding-Rate, sowie Maxima ($p=0,2949$) und Range ($p=0,7934$) zeigen keine Gruppenspezifität.

5.1.3.3 Zusammenhang der 5c-Exceeding-Rate mit pT und klinischem T-Stadium

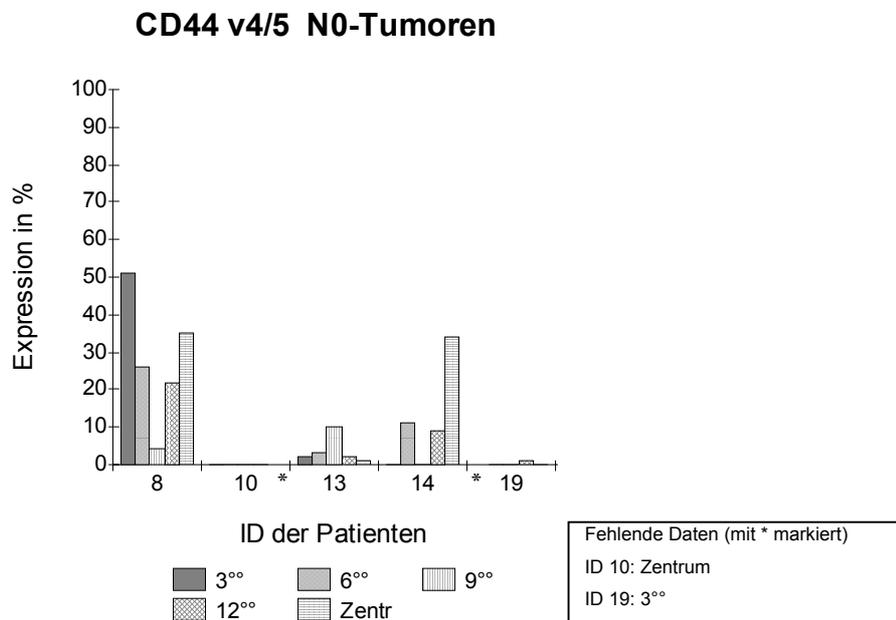
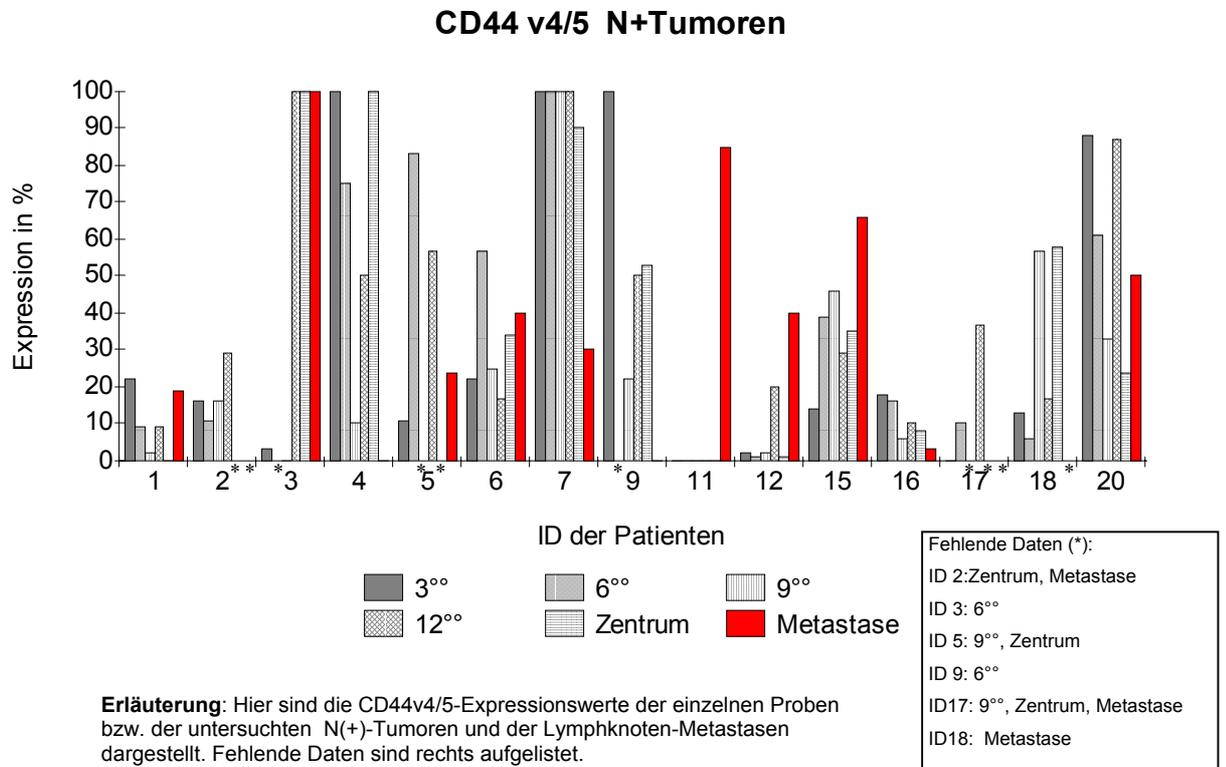
Zwischen der 5c-Exceeding-Rate und pT bzw. klinischem T-Stadium ergibt sich kein statistischer Zusammenhang: 5c-ER-Mittelwerte (T-Stadien ($p=0,8319$), pT-Stadien ($p=0,8774$)); 5c-ER-Minima (T-Stadien ($p=0,8857$), pT-Stadien ($p=0,3009$)); 5c-ER-Maxima (T-Stadien ($p=0,7562$) und pT-Stadien ($p=0,6324$)). Auch die Rangewerte der 5c-ER verhalten sich in dieser Weise (T-Stadien ($p=0,3567$) und pT-Stadien ($p=0,1350$)).

5.1.3.4 Vergleich der 5c-Exceeding-Rate zwischen Primärtumor und Metastase

Die Mittelwerte der 5c-Exceeding-Rate der Tumoren liegen durchschnittlich niedriger als die Werte der Metastasen. Der statistische Test ergibt einen grenzwertigen Befund mit $p=0,0574$. Die Minima der Primärtumoren liegen statistisch auffällig unterhalb der Werte der Metastasen ($p=0,0024$). Die Maxima der Primärtumoren unterscheiden sich nicht statistisch auffällig von den Werten der Metastasen ($p=0,4973$).

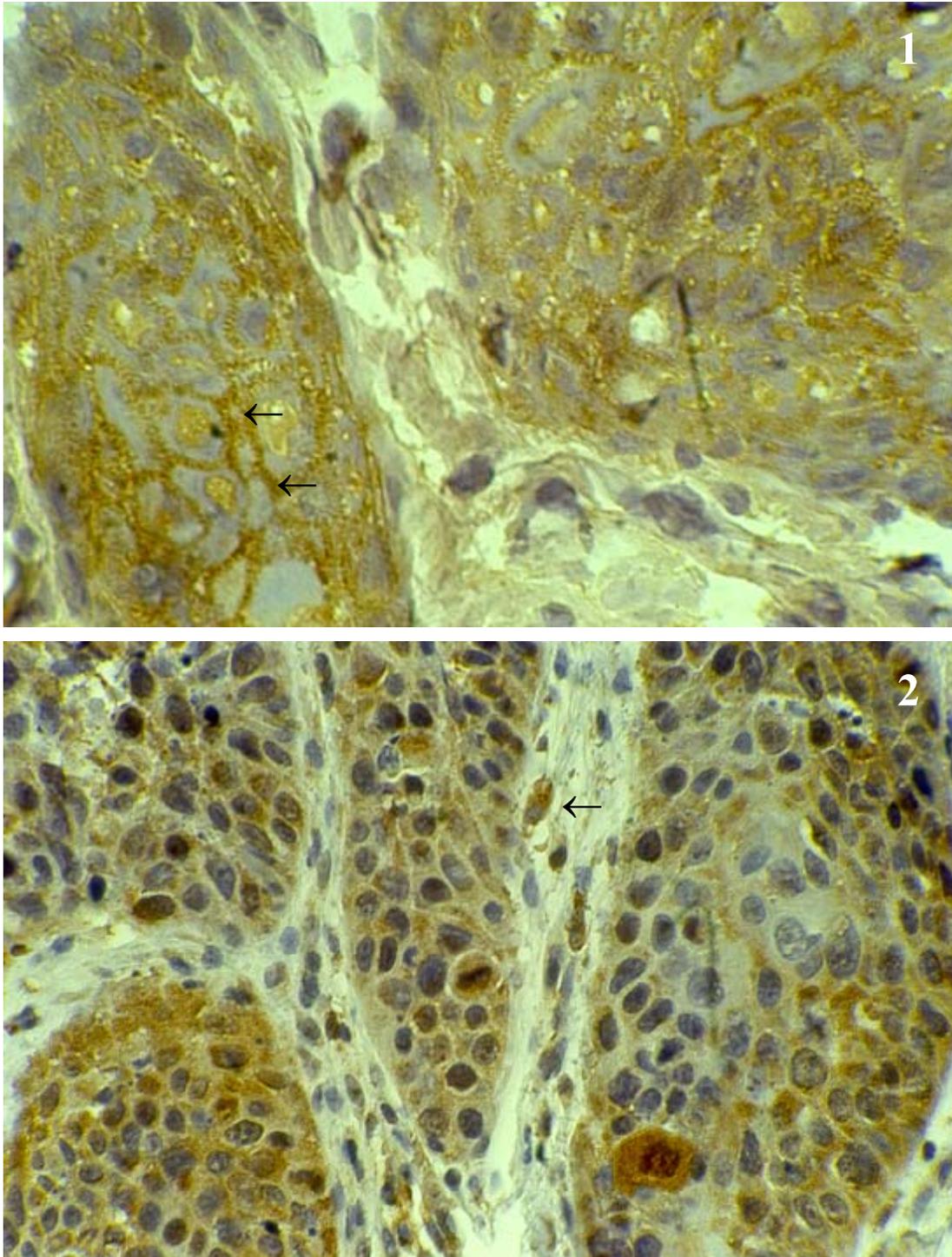
5.2 CD44v4/5

5.2.1 Darstellung der Einzeldaten



5.2.2 Bilder zur CD44v4/5-Expression

Abbildung 5-1 CD44v4/5



Erläuterung: Abb. 4.1 zeigt die CD44v4/5-positiven Tumorzellen (braune Färbung) an zwei Beispielen (Bild 1: ID 20, Primärtumor, Region Zentrum, Bild 2: ID 20, Primärtumor, Region 3° (je 160fach vergrößert)). In Bild 1 zeigen die Pfeile auf CD44v4/5-positive Zellgrenzen, in Bild 2 zeigt der Pfeil auf CD44v4/5-positive Zellen im Stroma.

5.2.3 Vergleich der CD44v4/5-Expression zwischen N(+) und N(0) - Tumoren

Innerhalb der N(+)-Tumoren können höhere CD44v4/5-Mittelwerte errechnet werden ($p=0,0260$).

Die Minima der N(+)-Gruppe sind insgesamt größer ($p=0,0549$).

Die Maxima der N(+)-Tumoren sind statistisch auffällig höher im Vergleich zu denjenigen der N(0)-Tumoren ($p=0,0486$).

Der Range ist nicht gruppenspezifisch ($p=0,1062$).

5.2.4 Zusammenhang der CD44v4/5-Expression mit pT und klinischem T-Stadium

Die Minima der CD44v4/5-Expression ergeben einen statistisch auffälligen Zusammenhang mit dem pT-Stadium ($p=0,0427$). Je höher das pT, desto höher die CD44v4/5-Expression.

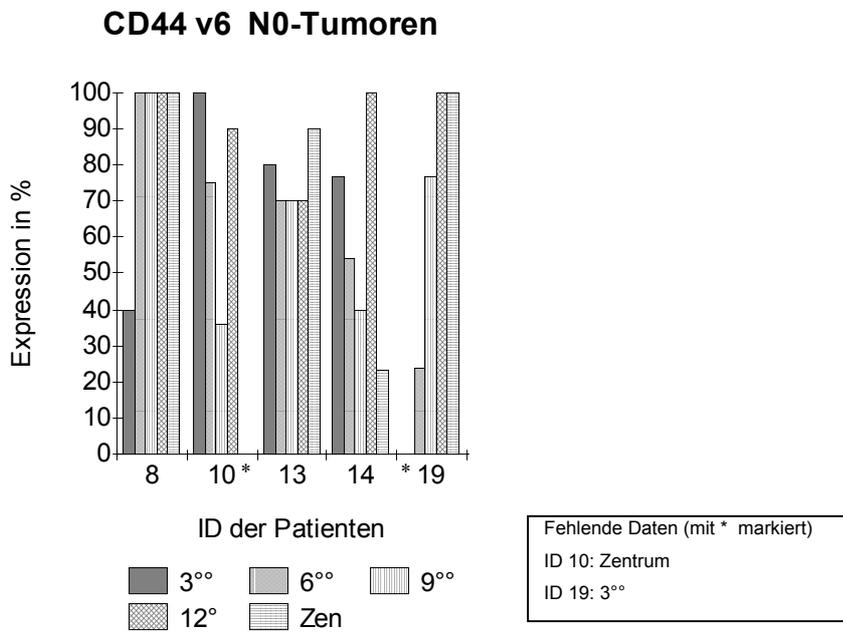
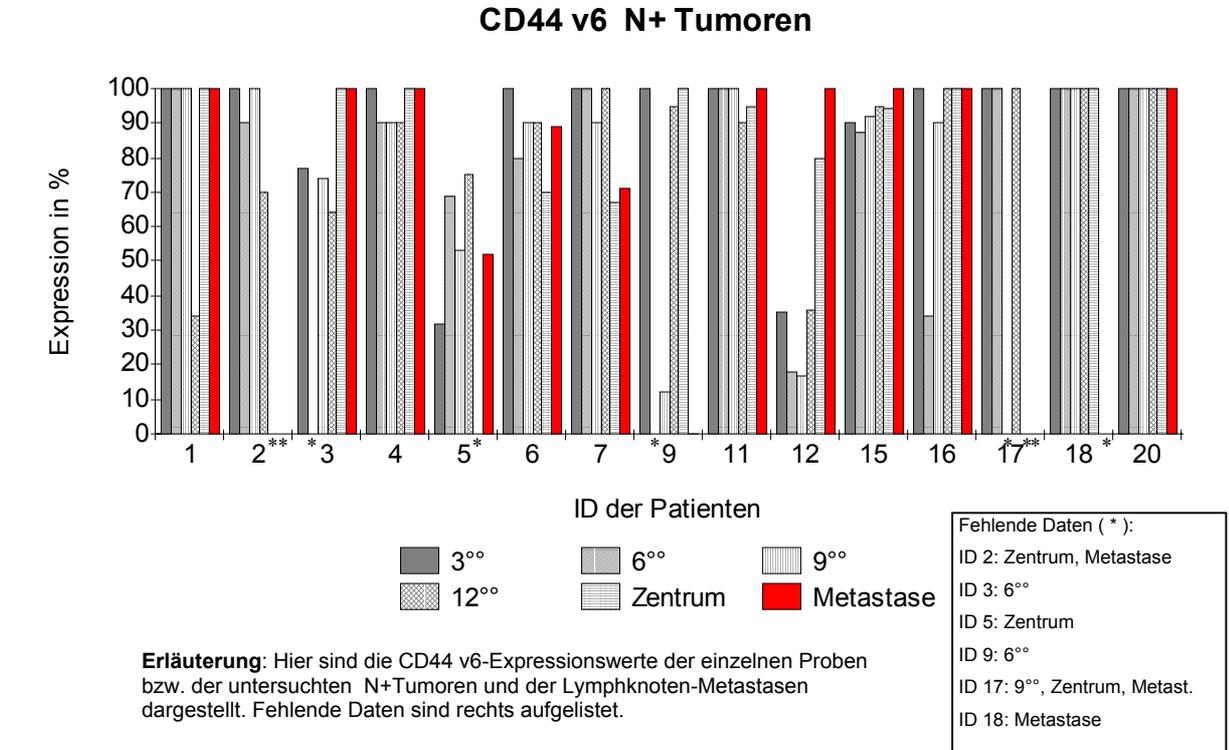
Zwischen Mittelwerten, Maxima und Range der CD44v4/5 Expression und dem pT Stadium bzw. klinischem T-Stadium kann kein statistisch auffälliger Zusammenhang festgestellt werden.

5.2.5 Vergleich des CD44v4/5 zwischen Primärtumor und Metastase

Im statistischen Test ergibt sich kein statistisch auffälliger Unterschied zwischen der CD44v4/5-Expression in den Primärtumoren und den Metastasen: Mittelwert ($p=0,9697$); Minima ($p=0,1099$); Maxima ($p=0,2002$).

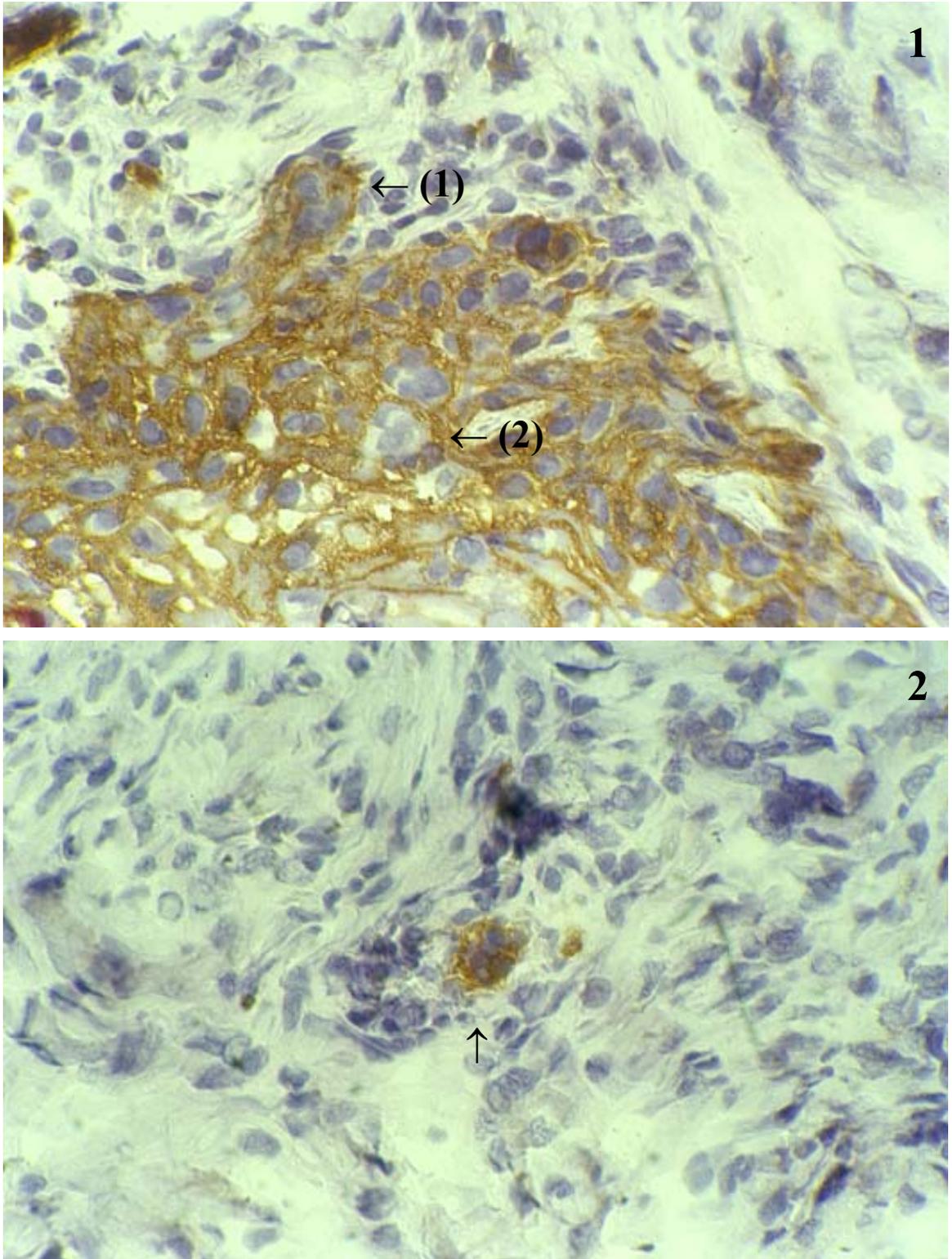
5.3 CD44v6

5.3.1 Darstellung der Einzeldaten



5.3.2 Bilder zur CD44v6-Expression

Abbildung 5-2 CD44v6



Erläuterung: Abb. 4.2 zeigt CD44v6-positive Tumorzellen (braune Färbung) an zwei Beispielen (Bild 1 und Bild 2: ID 20, Primärtumor, Region Zentrum (je 100fach vergrößert)). In Bild 1 markiert Pfeil (1) einige CD44v6-positive Zellen, die sich vom Verband lösen. Pfeil (2) markiert die positiven Zellränder. In Bild 2 markiert der Pfeil einige CD44v6-positive Zellen in sonst CD44v6-negativer Umgebung.

5.3.3 Vergleich der CD44v6-Expression zwischen N(+) und N(0) - Tumoren

Die Mittelwerte der CD44v6-Expression innerhalb der N(+)-Tumoren liegen insgesamt über denen der N(0)-Tumoren ($p=0,0544$).

Für Minima und Maxima ergibt sich keine Gruppenspezifität: Minima ($p=0,1888$), Maxima ($p=1,000$).

Die N(0)-Tumoren zeigen höhere Range-Werte als die N(+)-Tumoren ($p=0,0963$).

5.3.4 Zusammenhang der CD44v6-Expression mit pathologischem T bzw. klinischem T-Stadium

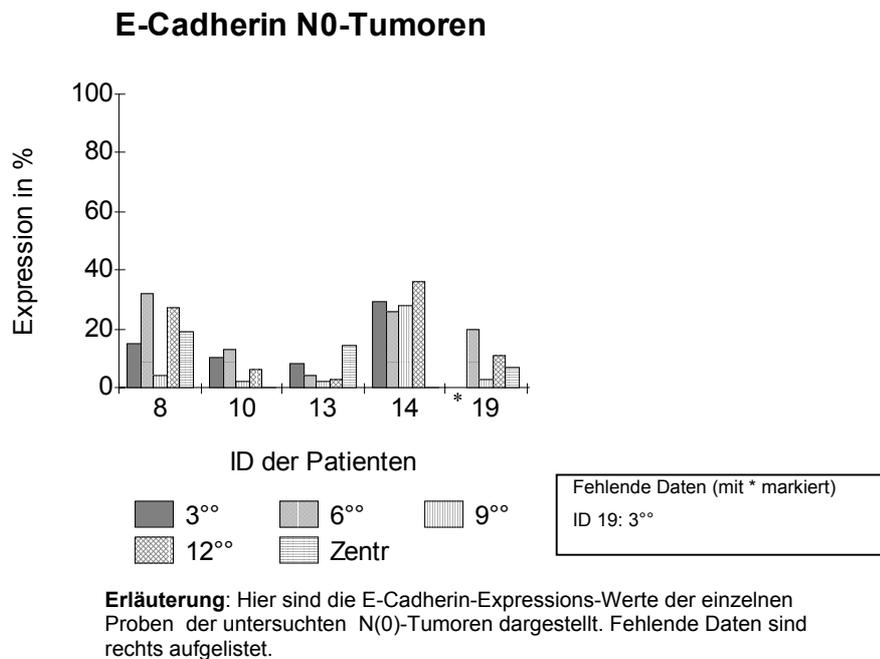
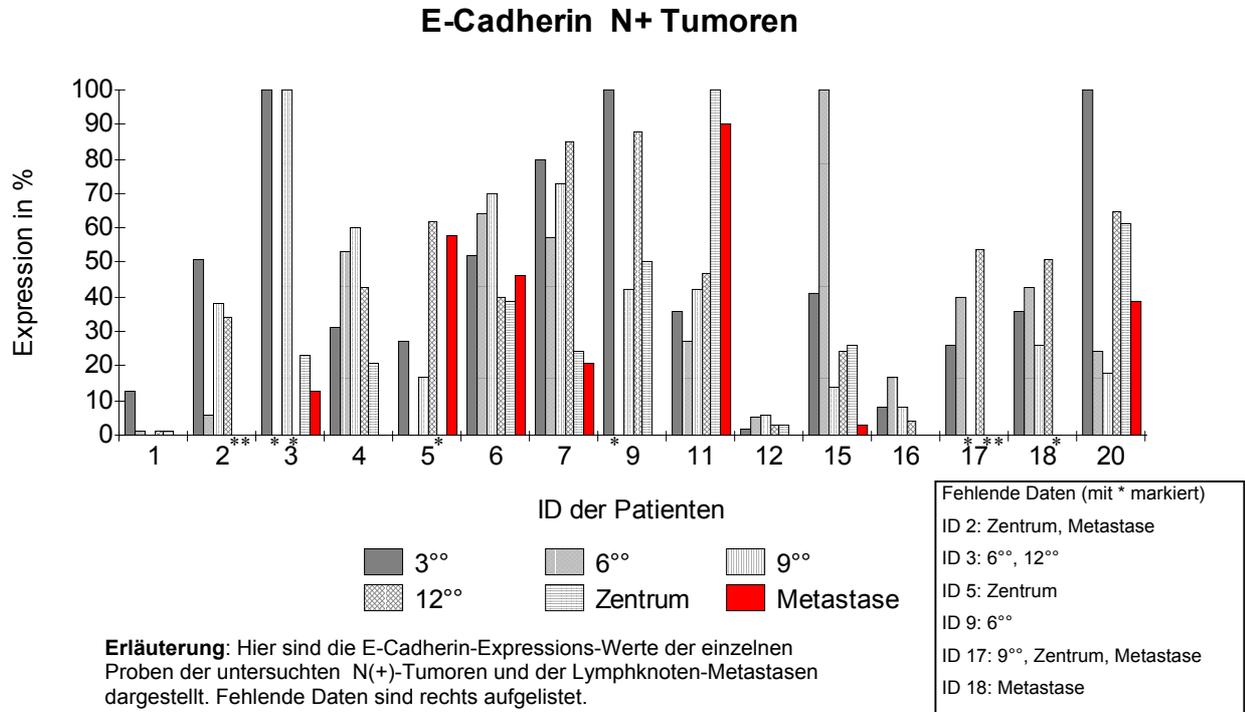
Zwischen der Expression von CD44v6 und pT bzw. klinischem T-Stadium kann kein statistischer Zusammenhang festgestellt werden.

5.3.5 Vergleich der CD44v6-Expression zwischen Primärtumor und Metastase

Es kann kein statistisch auffälliger Unterschied zwischen Mittelwerten der CD44v6 in den Primärtumoren und den CD44v6 Werten der Metastasen nachgewiesen werden ($p=0,3535$). Die Minima der Primärtumoren liegen statistisch auffällig unterhalb der Werte der Metastasen ($p=0,0068$). Für die Maxima der Primärtumoren ergibt sich kein statistisch auffälliger Gruppenunterschied ($p=0,2188$).

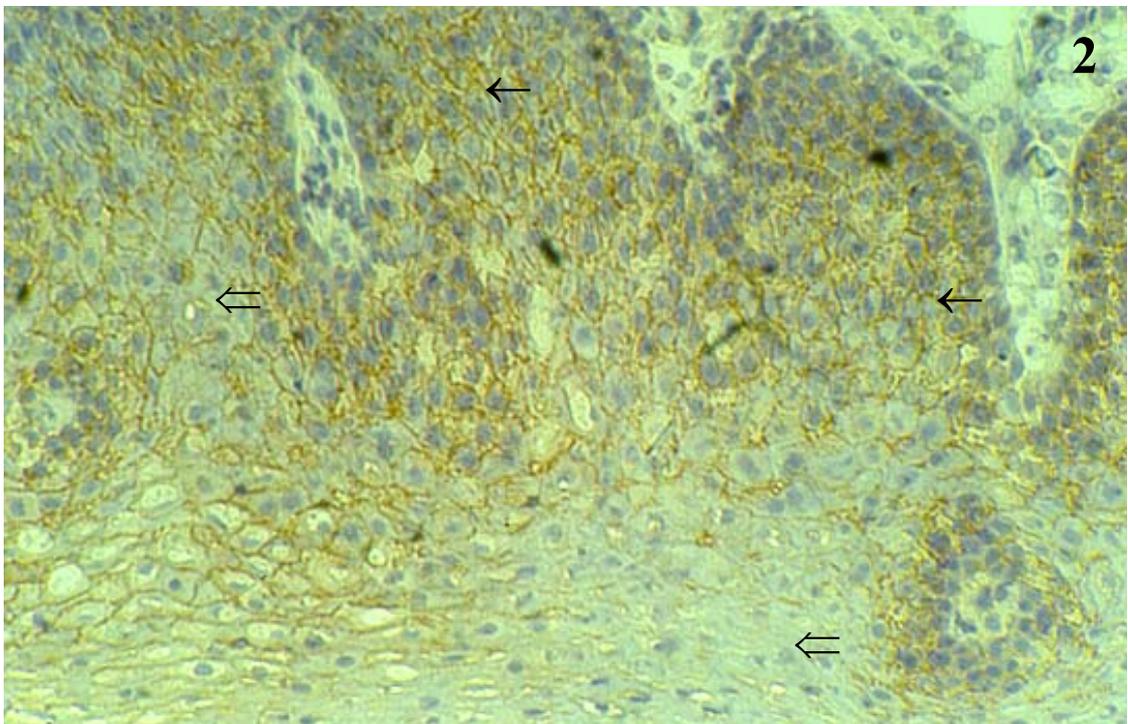
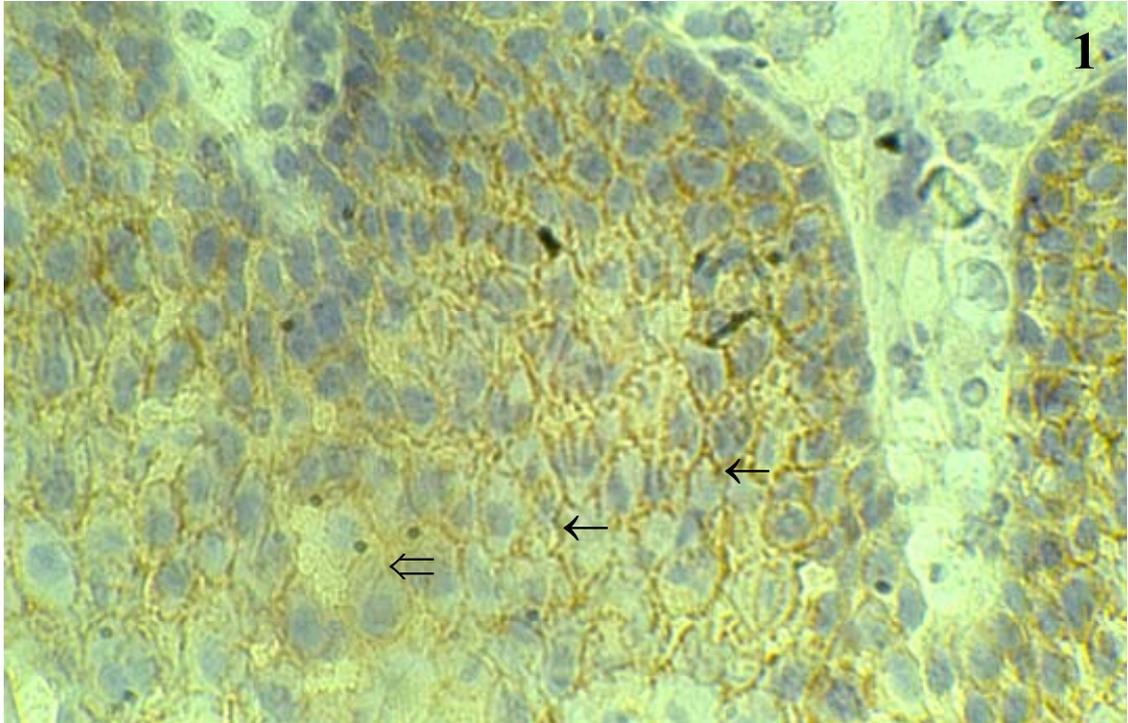
5.4 E-Cadherin

5.4.1 Darstellung der Einzeldaten



5.4.2 Bilder zur E-Cadherin-Expression

Abbildung 5-3 E-Cadherin



Erläuterung: Abb. 4.3 zeigt E-Cadherin-positive Tumorzellen (braune Färbung) an zwei Beispielen (Bild 1 und Bild 2: ID 15, Primärtumor, Region Zentrum (100fach bzw. 64fach vergrößert)). In Bild 1 und 2 markieren Pfeile E-Cadherin-positive Zellgrenzen. Die Doppelpfeile (⇐) zeigen Areale verminderter Expression. In Bild 2 kann man die intratumoral heterogene Expression von E-Cadherin gut erkennen.

5.4.3 Vergleich der E-Cadherin-Expression zwischen N(+) und N(0) - Tumoren

Die E-Cadherin-Mittelwerte der Gruppe N(+) sind insgesamt höher als diejenigen der N(0)-Tumoren ($p=0,0361$).

Die Minima zeigen keinen statistisch auffälligen Unterschied ($p=0,1016$).

Die N(+)-Tumoren weisen höhere Maxima der E-Cadherin-Expression auf ($p=0,0310$).

Die Range-Werte der E-Cadherin-Expression liegen bei der Gruppe N(+) höher als bei den N(0)-Tumoren ($p=0,0400$).

5.4.4 Zusammenhang der E-Cadherin-Expression mit pathologischem T bzw. klinischem T-Stadium

Je höher das pT-Stadium ist, desto größer sind die berechneten Werte für E-Cadherin (E-Cadherin-Mittelwerte ($p=0,0228$), Minimum ($p=0,0667$), Maximum ($p=0,0055$) und Range ($p=0,0130$)).

Je höher das klinische T-Stadium ist, desto höher sind die Mittelwerte der E-Cadherin-Expression ($p=0,0875$) und die Maxima innerhalb der Primärtumoren ($p=0,0668$). Minima und Range zeigen keinen statistisch auffälligen Zusammenhang mit dem klinischen T-Stadium.

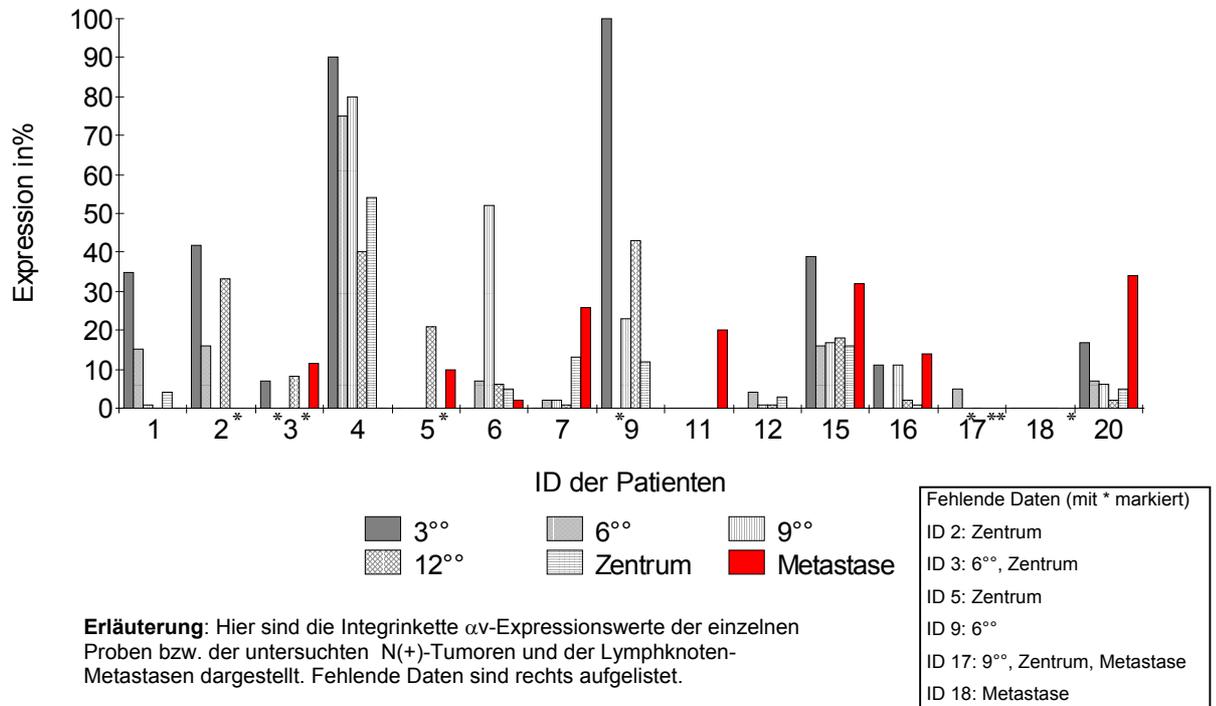
5.4.5 Vergleich der E-Cadherin-Expression zwischen Primärtumoren und Metastasen

Die E-Cadherin-Expression der Metastasen liegt insgesamt niedriger als die Mittelwerte der Primärtumoren ($p=0,0522$). Die Maxima der Primärtumoren liegen statistisch auffällig oberhalb der Werte der Metastasen ($p=0,0005$). Für die Minima kann kein statistisch auffälliger Unterschied festgestellt werden ($p=0,6848$).

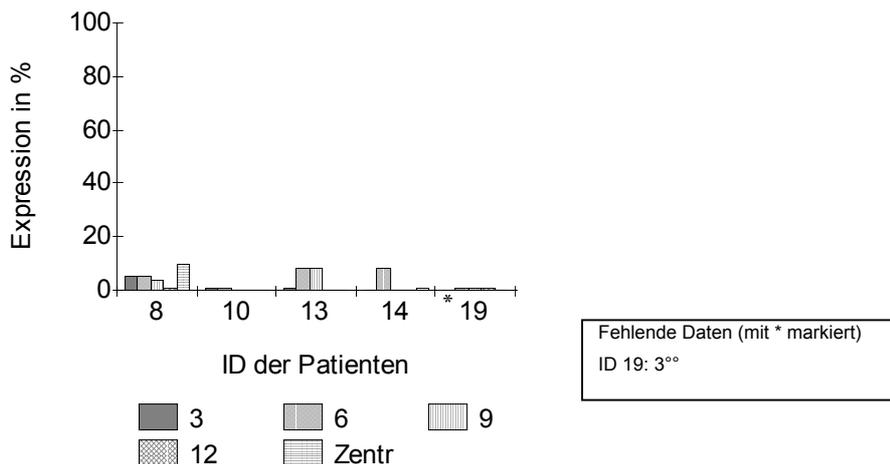
5.5 Integrinkette αv (CD51)

5.5.1 Darstellung der Einzeldaten innerhalb der N(+)-Tumoren

Integrinkette alpha v (CD51)

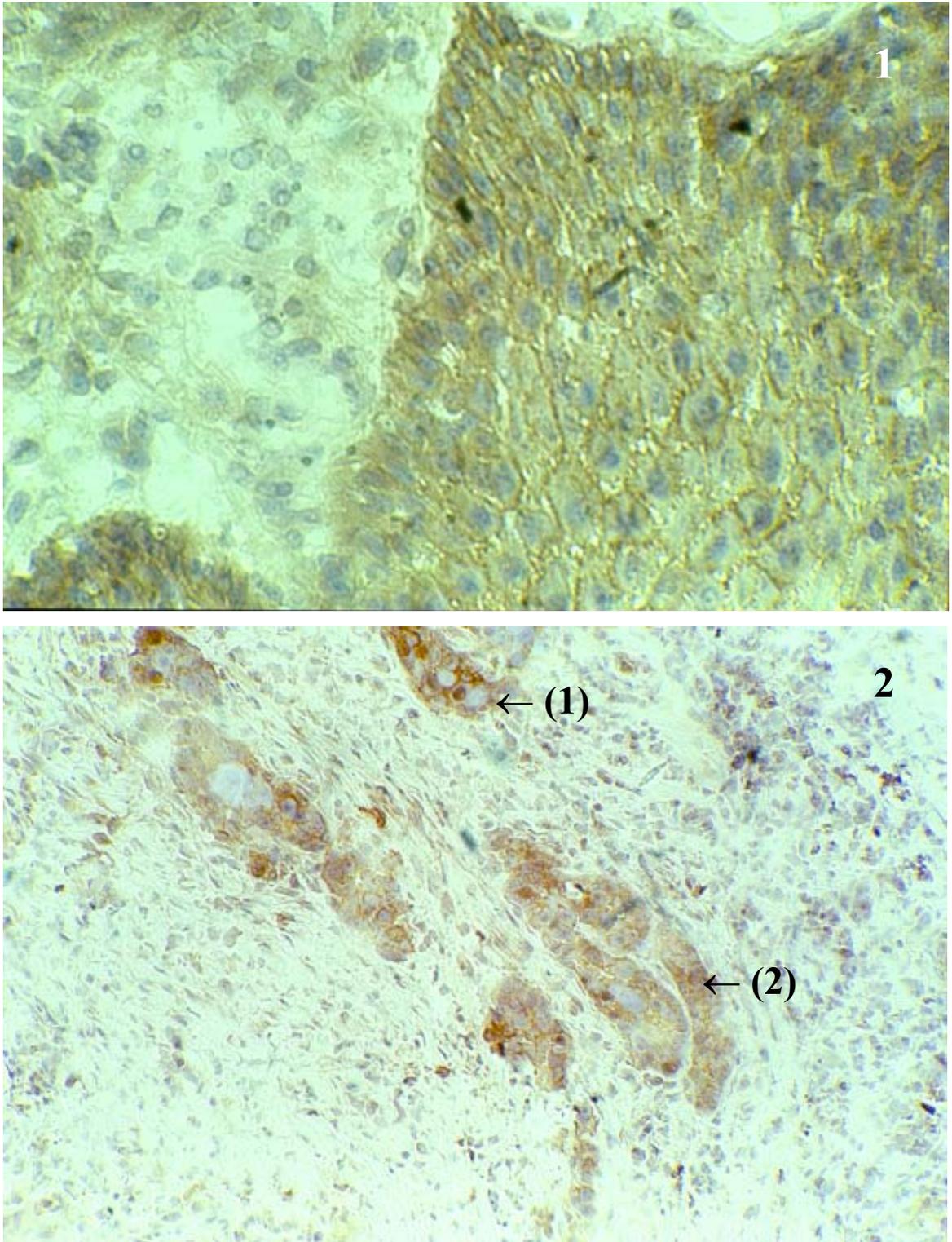


Integrinkette alpha v N0-Tumoren



5.5.2 Bilder der Integrinkette αv

Abbildung 5-4



Erläuterung: Abb. 4.4 zeigt Integrinkette αv -positive Tumorzellen (braune Färbung) an zwei Beispielen (Bild 1 und Bild 2: ID 10, Primärtumor, Region 3° und Region Zentrum (100fach bzw. 40fach vergrößert)). In Bild 2 markieren Pfeile Integrinkette αv -positive Zellgruppen in sonst negativer Umgebung.

5.5.3 Vergleich der Expression der Integrinkette αv bei N(+) und N(0) - Tumoren

Die Mittelwerte, Maxima und Range der Integrin αv -Expression liegen in den N(+)-Tumoren insgesamt höher (Mittelwert ($p=0,0732$), Maxima ($p=0,0965$), Range ($0,0965$)), wobei dies jeweils einen statistisch grenzwertigen Befund darstellt.

Die Minima zeigen keinen statistischen Gruppenunterschied ($p=0,6463$).

5.5.4 Zusammenhang der Integrinkette αv - Expression mit pathologischem T bzw. klinischem T-Stadium

Zwischen Mittelwert, Maxima, Minima, Range der Integrin αv -Expression und den pT- bzw. T-Stadien ergibt sich kein statistisch auffälliger Zusammenhang.

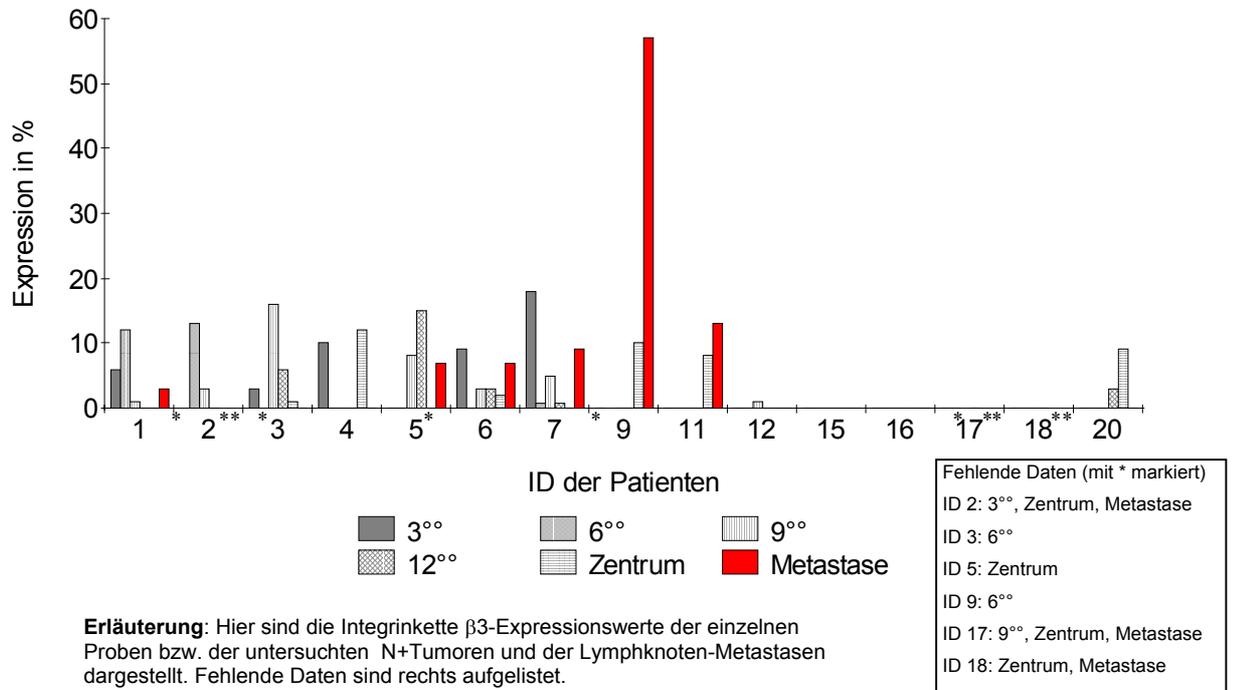
5.5.5 Vergleich der Expression der Integrinkette αv in Primärtumor und Metastase

Hier ist kein statistisch auffälliger Unterschied zwischen dem Mittelwert, Minima bzw. Maxima der Primärtumoren und dem Metastasenwert nachweisbar (Mittelwert ($p=0,9097$), Minima ($p=0,1934$), Maxima ($p=0,2661$)).

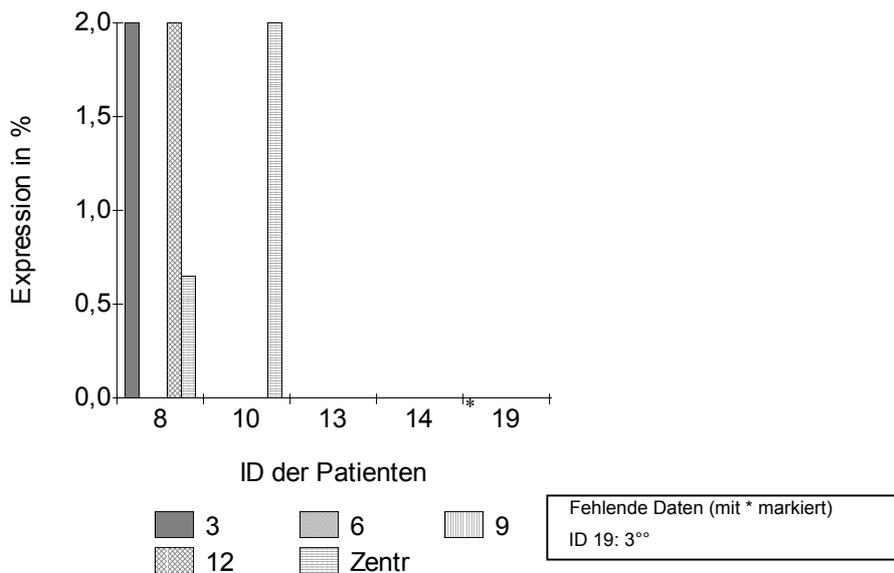
5.6 Integrinkette $\beta 3$ (CD61)

5.6.1 Darstellung der Einzeldaten

Integrinkette beta 3 N+ Tumoren

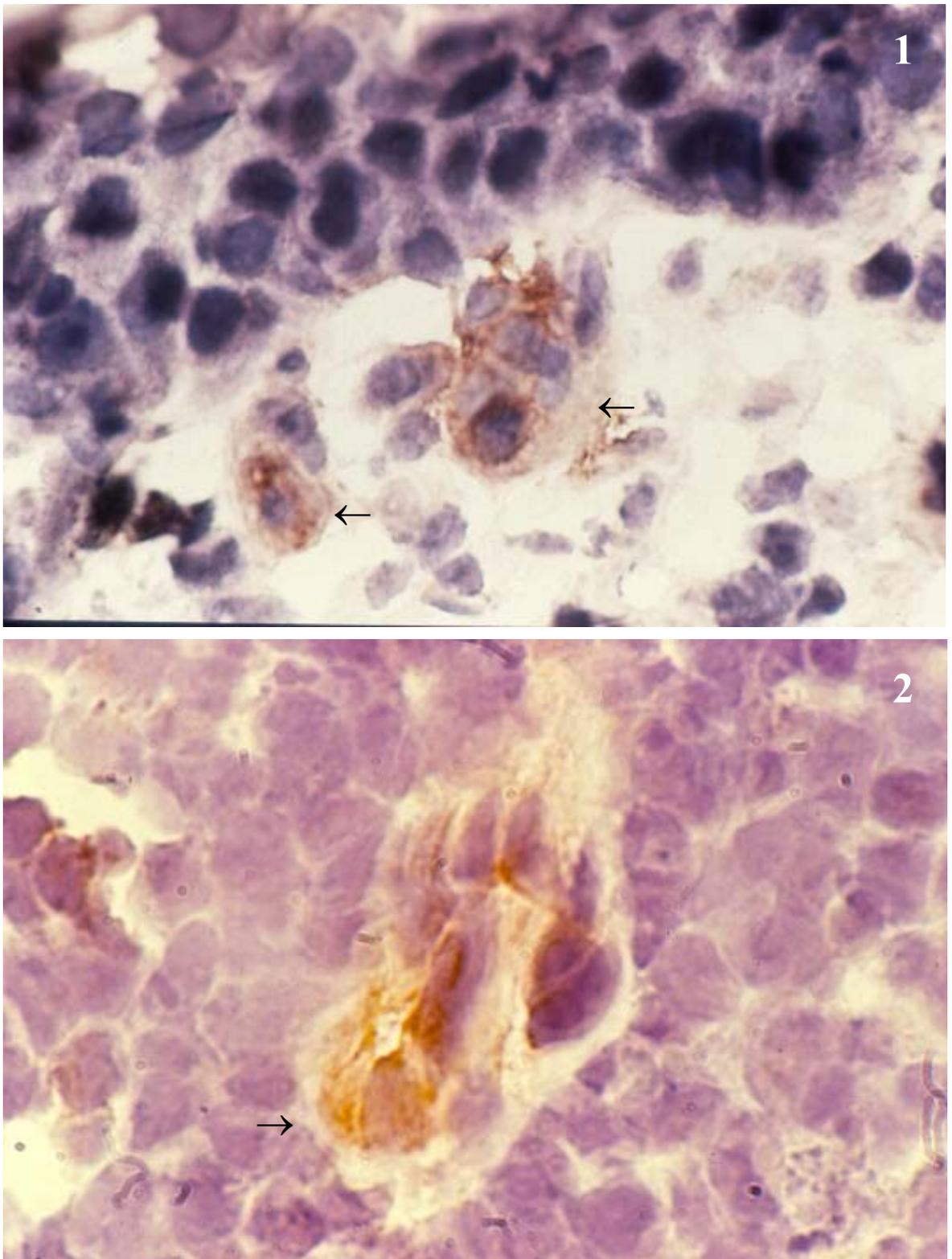


Integrinkette beta 3 N0 Tumoren



5.6.2 Bilder der Integrinkette $\beta 3$

Abbildung 5-5



Erläuterung: Abb. 4.5 zeigt Integrinkette $\beta 3$ -positive Tumorzellen (braune Färbung) an zwei Beispielen (Bild 1 : ID 9, Primärtumor, 9°, Bild 2: ID 13, Metastase (je 250fach vergrößert). In Bild 1 markieren Pfeile Integrinkette $\beta 3$ -positive Zellaggregate, die sich von einem $\beta 3$ -negativen Zellverband lösen. In Bild zwei sieht man einige positive Zellen im Lymphknotengewebe (siehe Pfeil).

5.6.3 Vergleich der Expression der Integrinkette $\beta 3$ in N(+) und N(0) - Tumoren

Die Mittelwerte, Maxima und Range-Werte der $\beta 3$ -Expression sind in den N(+)-Tumoren insgesamt höher, wobei sich jeweils statistisch grenzwertige Unterschiede ergeben (Mittelwert ($p=0,0611$), Maxima ($p=0,0608$), Range ($p=0,0607$)).

Die Minima zeigen keinen statistisch auffälligen Unterschied.

5.6.4 Zusammenhang der Integrinkette $\beta 3$ - Expression mit pathologischem T bzw. klinischem T-Stadium

Zwischen Mittelwert, Maxima, Minima, Range der Integrin $\beta 3$ -Expression und den pT- bzw. T-Stadien ergibt sich kein statistisch auffälliger Zusammenhang.

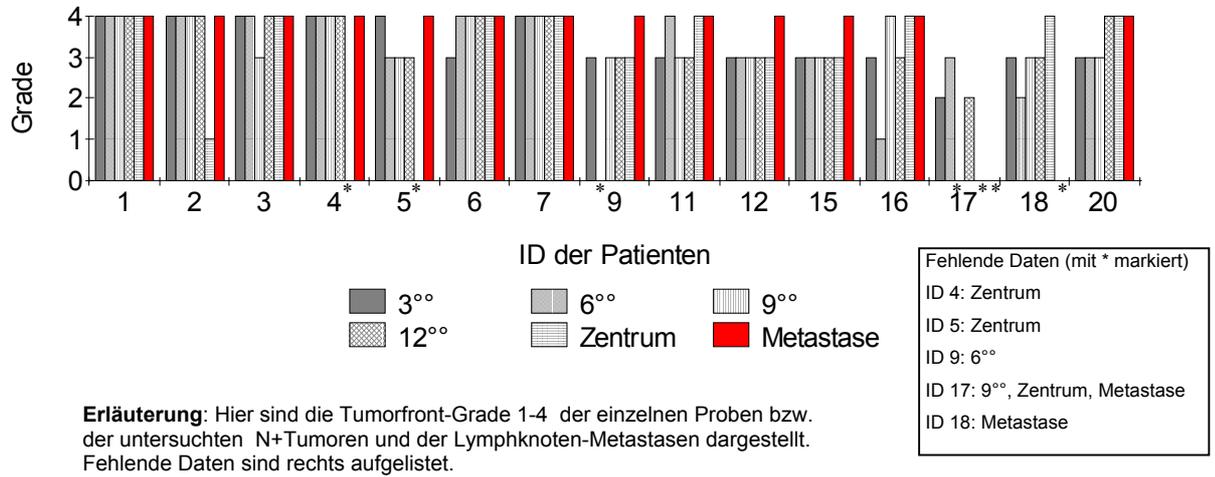
5.6.5 Vergleich der Expression der Integrinkette $\beta 3$ in Primärtumor und Metastase

Die Minima der $\beta 3$ -Werte der Primärtumoren sind statistisch auffällig kleiner als die Werte der Metastasen ($p=0,0313$). Zwischen Mittelwerten bzw. Maxima der Primärtumoren und den Metastasenwerten ergibt sich kein statistisch auffälliger Unterschied (Mittelwert ($p=0,6250$), Maxima ($p=0,1602$)).

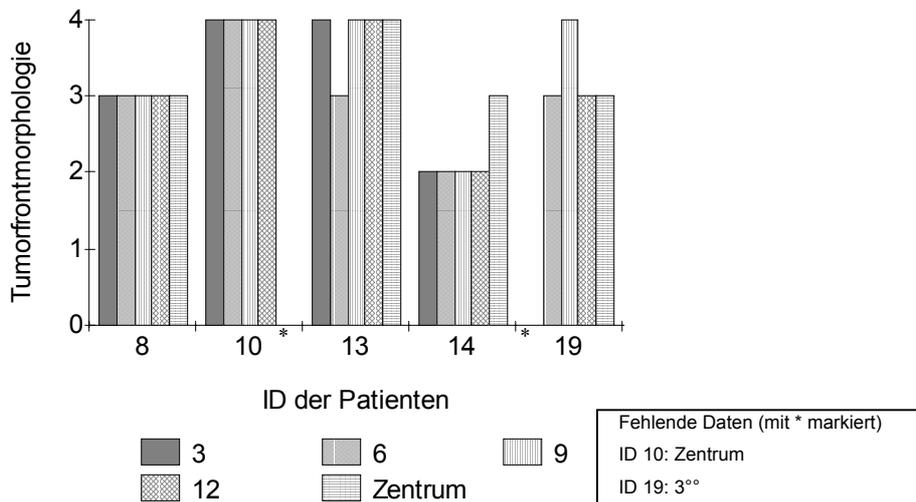
5.7 Tumorfrontmorphologie

5.7.1 Darstellung der Einzeldaten

Tumorfrontmorphologie N+ Tumoren



Tumorfrontmorphologie N0 Tumoren



5.7.2 Vergleich der Tumorfrontmorphologie zwischen N(+) und N(0) - Tumoren

Im statistischen Test ergibt sich kein statistisch auffälliger Unterschied der Tumorfrontmorphologie zwischen N(0)- und N(+)-Tumoren: Mittelwert ($p=0,8237$); Minimum ($p=0,8099$); Maximum ($p=0,6211$); Range ($p=0,7042$).

5.7.3 Zusammenhang der Tumorfrontmorphologie mit pT und klinischem T-Stadium

Hier ergeben sich keine statistisch auffälligen Zusammenhänge.

5.7.4 Vergleich der Tumorfrontmorphologie zwischen Primärtumor und Metastase

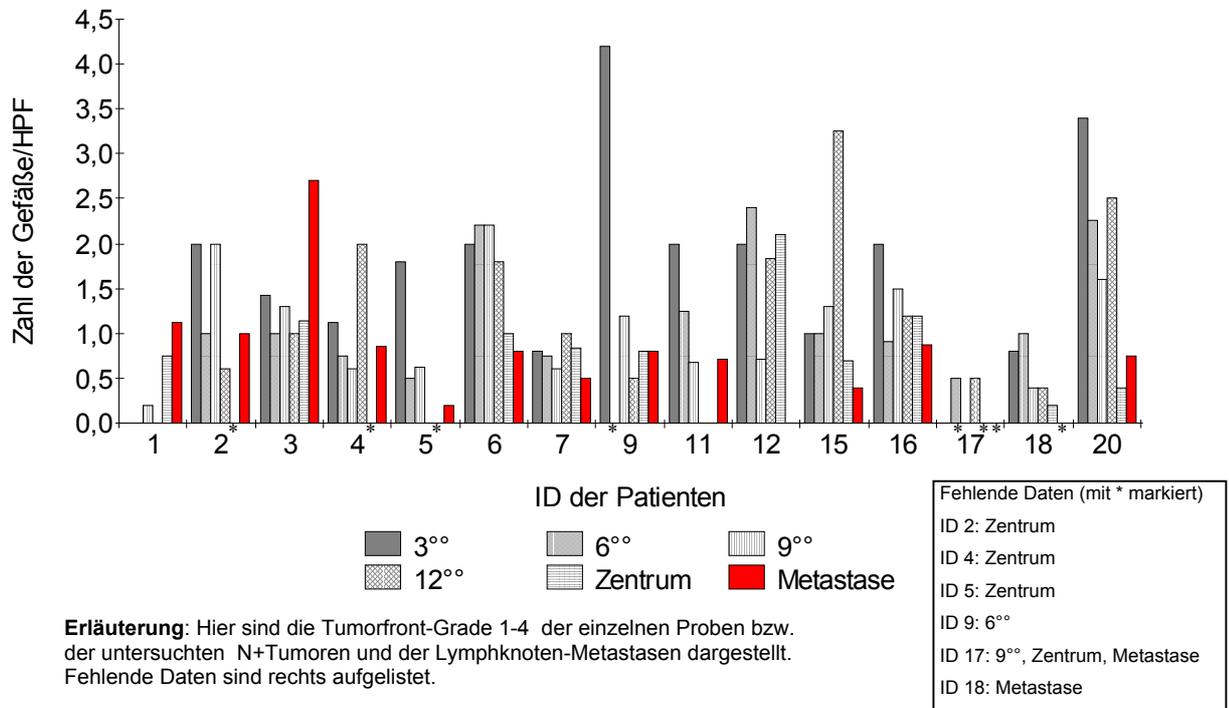
Eine Tumorfront in den Metastasen existiert im eigentlichen Sinne nicht. Sie müßte korrekterweise z.B. als „Metastasenfront“ oder „Metastasenmorphologie“ definiert werden. Prinzipiell ist jedoch die Beurteilung der Tumorzell-Wirt-Interaktion mittels Einteilung der Tumorfrontmorphologie („Pattern of Invasion“) nach Bryne et al. (1992) auch in den Lymphknotenmetastasen möglich, auch wenn diese Einteilung für Primärtumoren entwickelt wurde. In der vorliegenden Arbeit wird bewußt ein Vergleich der Tumorfrontmorphologien in Primärtumoren und ihren korrespondierenden Metastasen angestellt:

Die Werte für die Metastasen sind im Vergleich zu den Mittelwerten erhöht ($p=0,0020$). Die Minima der Tumorfrontmorphologie-Werte der Primärtumoren sind statistisch auffällig kleiner als die der Metastasen ($p=0,0020$). Die Maxima der Primärtumoren zeigen keinen statistisch auffälligen Unterschied zu den Werten der Metastasen ($p=0,2500$).

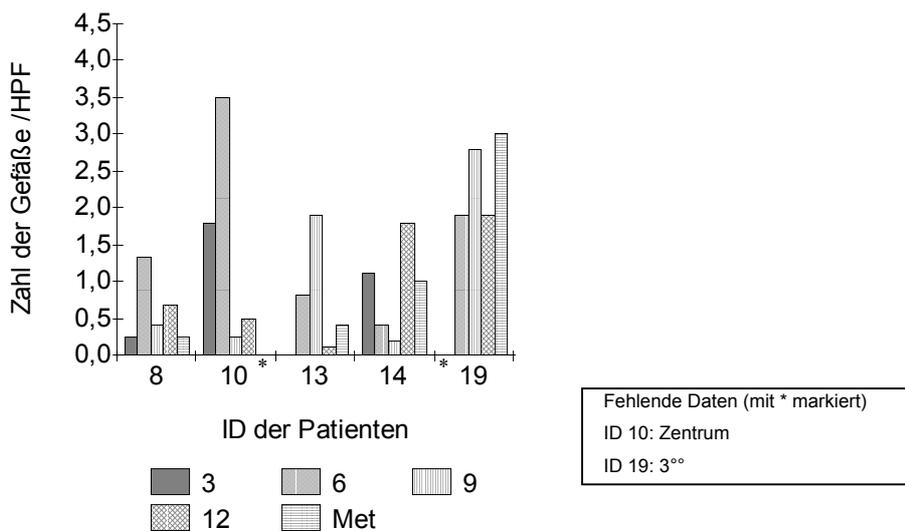
5.8 Gefäßdichte

5.8.1 Darstellung der Einzeldaten

Gefäßdichte N+ Tumoren

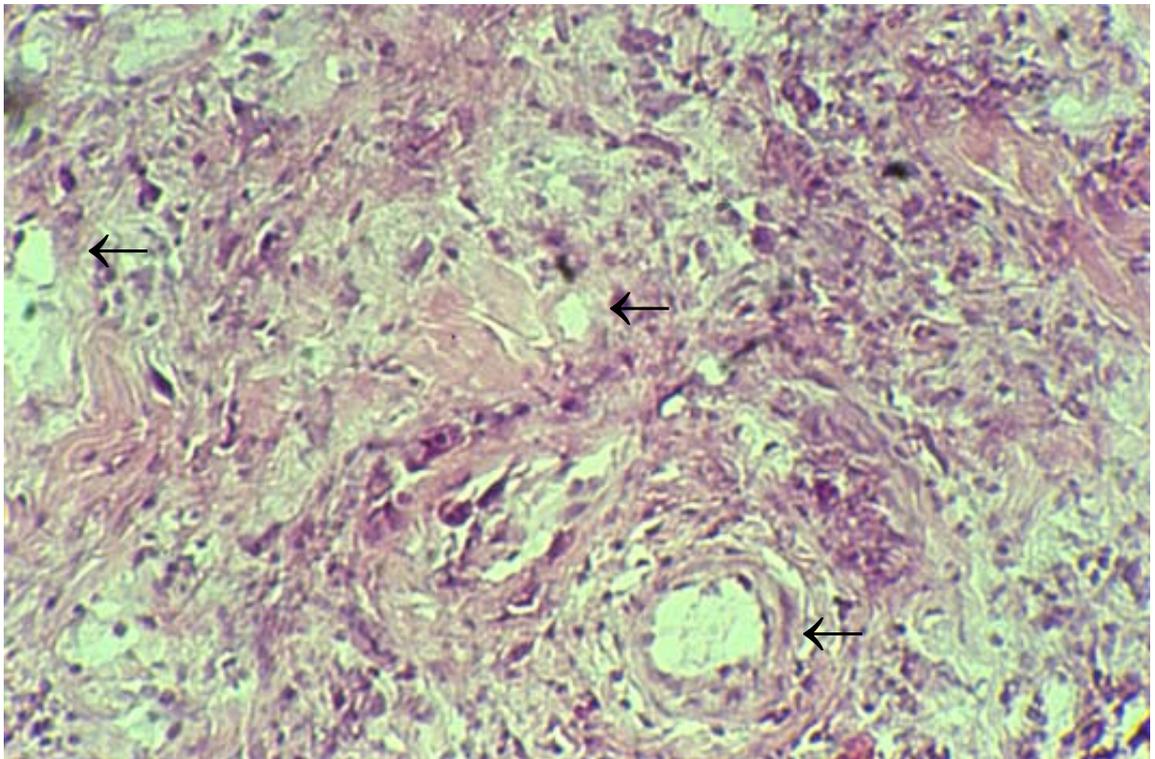


Gefäßdichte N0-Tumoren



5.8.2 Bild zur Gefäßdichte im Primärtumor

Abbildung 5-6



Erläuterung: Abb. 4.6 zeigt Gefäße im Stroma eines Primärtumors. Die Pfeile markieren jeweils ein Gefäß.

5.8.3 Vergleich der Zahl der Gefäße zwischen N(+) und N(0) -Tumoren

Die Zahl der Gefäße zeigt für keinen der berechneten Werte einen statistisch auffälligen Unterschied: Mittelwert ($p=1,000$); Minimum ($p=0,6277$); Maximum ($p=0,7589$); Range ($p=0,5702$).

5.8.4 Zusammenhang der Gefäßdichte mit pathologischem T bzw. klinischem T-Stadium

Mittelwert ($p=0,0625$) und Maximum ($p=0,0876$) der Gefäßzahl zeigen einen statistisch grenzwertig auffälligen Zusammenhang mit dem klinischen T-Stadium, wobei die Gefäßdichte mit zunehmendem klinischem T-Stadium größer ist. Für die Gefäßdichte und das pT-Stadium ergibt sich kein statistisch auffälliger Zusammenhang bezüglich der berechneten Werte.

5.8.5 Vergleich der Zahl der Gefäße in Primärtumor und Metastase

Die Werte der Metastasen sind insgesamt kleiner als die Mittelwerte der Primärtumoren. Es zeigt sich ein statistisch grenzwertiger Unterschied ($p=0,0803$). Für die Minima kann kein statistisch auffälliger Unterschied festgestellt werden ($p=0,1316$). Die Maxima der Primärtumoren liegen statistisch auffällig höher als die Metastasenwerte ($p=0,0046$).

5.9 Cox-Regression und Kaplan-Meier-Schätzung

Mittels univariater Cox-Regression wird ein Zusammenhang zwischen den tumorbiologischen Parametern (Mittelwert, Minimum, Maximum und Range) und der Rezidivfreiheit bzw. der Überlebenszeit geprüft. Für aussagekräftige Variablen ($P_{\text{cox}} < 0,1$) werden Kaplan-Meier-Kurven erstellt.

Die auffallendsten Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln graphisch dargestellt.

Tabelle 5-3 Klinische Verlaufsdaten

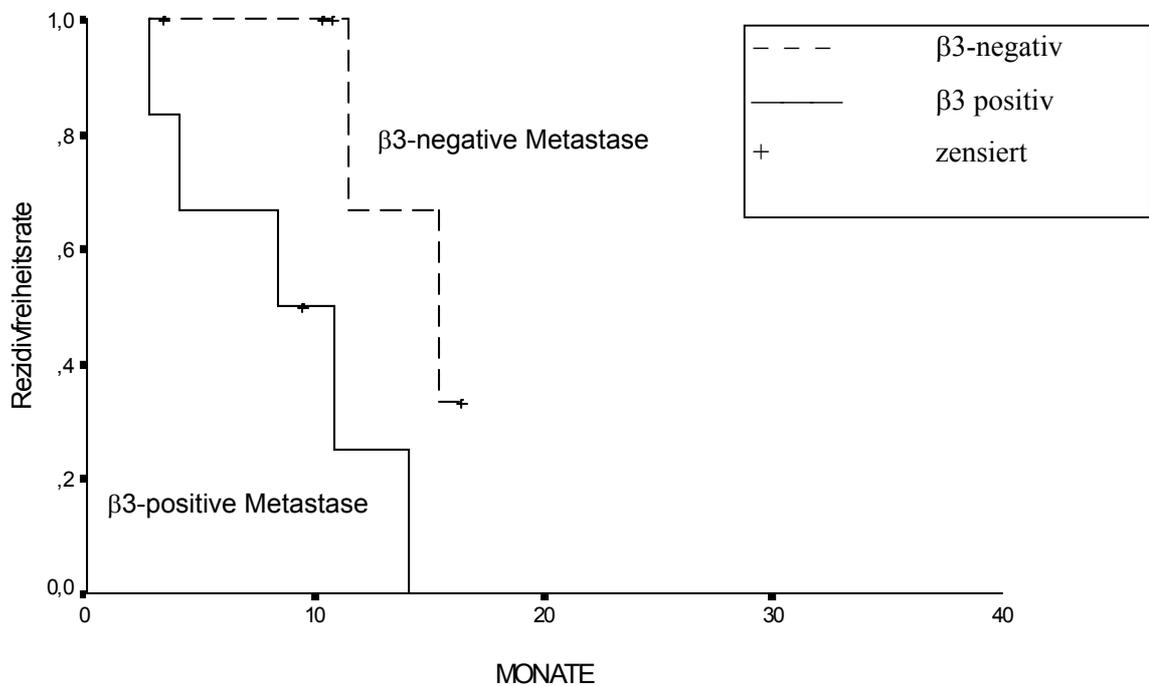
ID	Diagnose-Datum:	T	N	M	pT	pN	pM	letzte Nachsorge:	Beobachtungszeitraum in Monaten	Rezidiv	Tod
1	19.06.97	2	2c	0	2	2b	x	Oktober 98	16	5-98	
2	27.08.97	2	2a	0	2	2a	x	August 98	12	tumorfrei	
3	21.10.97	4	1	0	4	1	x	September 98	11	tumorfrei	
4	5.12.97	2	2a	0	1	1	x	Oktober 98	10	tumorfrei	
5	01.03.97	3	2b	0	3	2b	x	Dezember 97	9	tumorfrei	
6	12.06.95	4	2b	0	3	2c	x	Juli 98	37	8-96	8-98
7	23.06.95	4	3	0	4	2b	x	November 95	5	9-95	11-95
8	01.07.95	4	0	0	2	0	x	Oktober 98	40	tumorfrei	
9	01.11.95	4	2b	0	4	1	x	Juli 96	8	7-96	
10	02.11.95	4	2b	0	2	0	x	August 98	33	tumorfrei	
11	10.11.95	4	3	0	4	2	x	Dezember 96	13	3-96	12-96
12	01.11.95	3	2b	0	3	2b	x	März 97	16	tumorfrei	
13	12.12.95	2	0	0	3	0	x	November 98	35	tumorfrei	
14	01.10.95	4	0	0	1	x	x	November 98	37	tumorfrei	
15	01.03.97	4	2c	0	4	2b	x	November 98	20	6-98	
16	01.03.97	4	2b	0	3	2c	x	Februar 98	11	2-98	
17	07.12.95	2	2b	0	1	2	x	Februar 98	26	2-98	
18	01.11.95	2	2b	0	2	1	x	August 97	21	tumorfrei	
19	04.12.95	3	0	0	2	x	x	Juni 96	6	tumorfrei	
20	05.11.97	4	2c	0	4	2c	x	Februar 98	3	tumorfrei	

5.9.1 Integrinkette $\beta 3$

5.9.1.1 Expression der Integrinkette $\beta 3$ in Metastasen

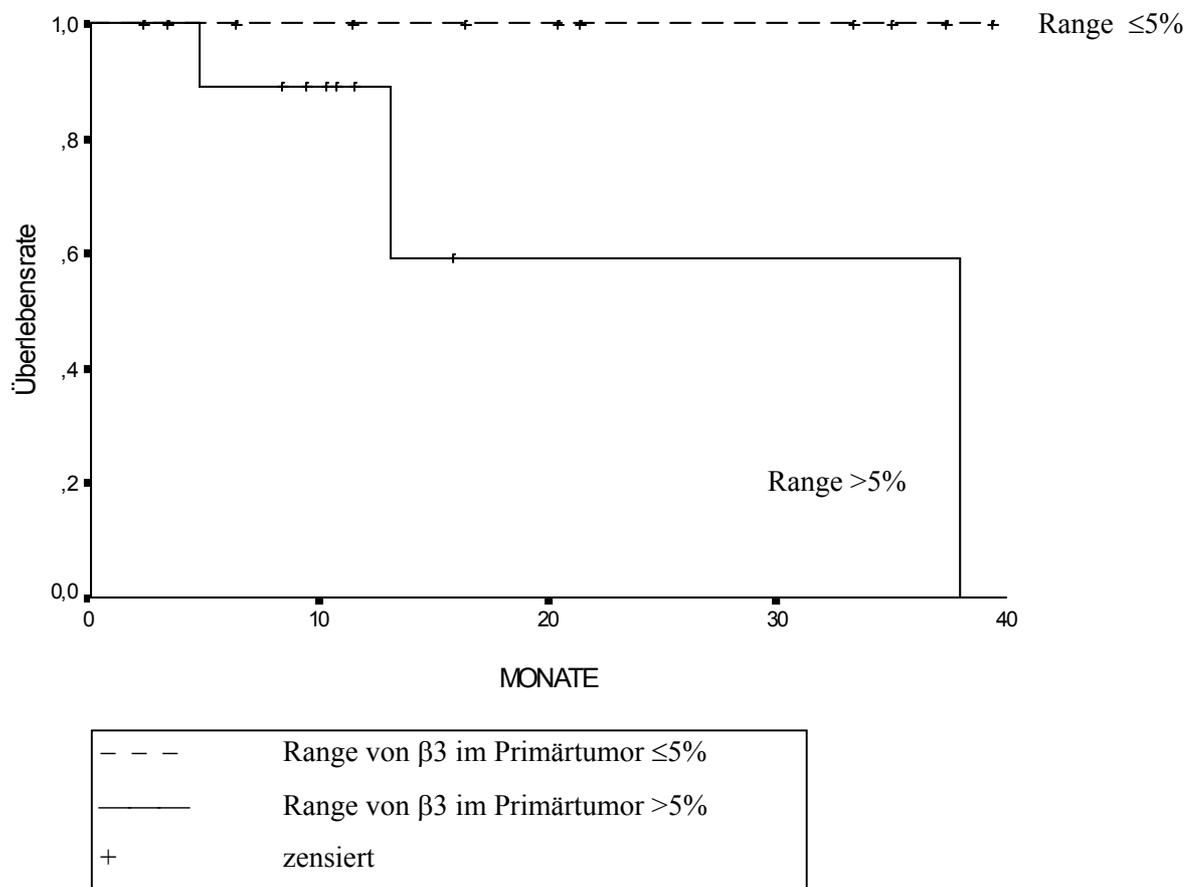
Die $\beta 3$ Expression in den Metastasen ist meist gering ausgeprägt und nicht selten negativ. Die Rezidivfreiheitsrate wird errechnet bei Patienten mit $\beta 3$ -positiven Metastasen (Expressionsrate $>0\%$) und $\beta 3$ -negativen Metastasen (Expressionsrate $=0\%$).

Die Gruppe der Patienten mit $\beta 3$ -positiven Metastasen hat eine niedrigere Rezidivfreiheitsrate, das heißt sie besitzt ein höheres Risiko, an einem Rezidiv zu erkranken (Log-Rank = 0,0295).



5.9.1.2 Range von $\beta 3$ -Integrinkette im Primärtumor

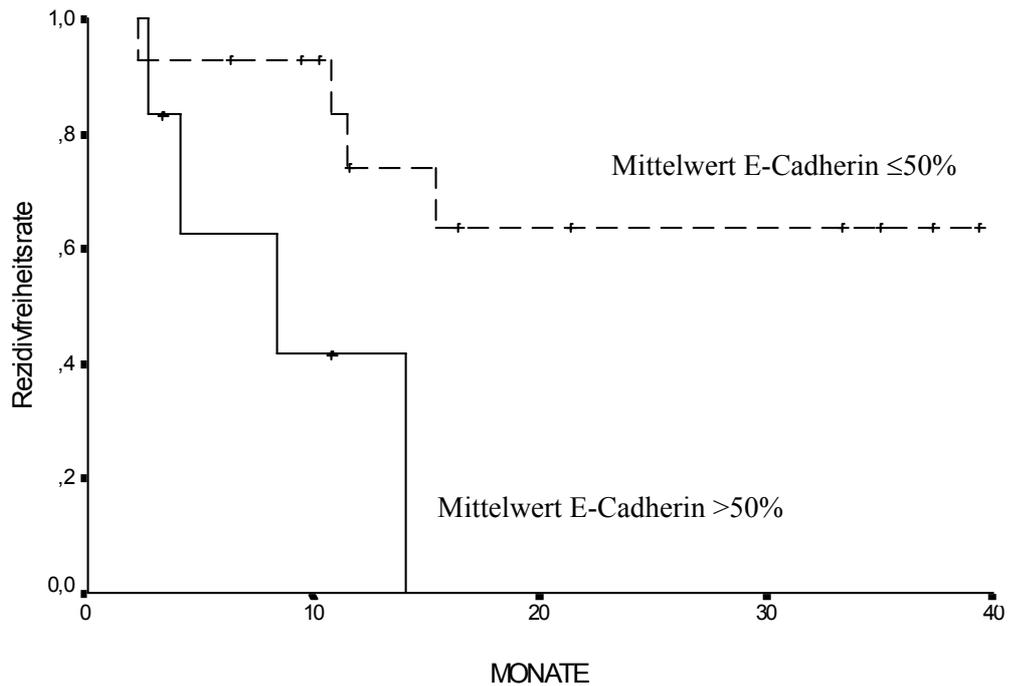
Für den Range von $\beta 3$ innerhalb der Primärtumoren ergibt sich eine Abhängigkeit zwischen Höhe des Range und der Überlebenszeit der Patienten. Die Berechnung wird an Range $\beta 3 > 5$ und Range $\beta 3 \leq 5$ gesplittet. (Range der Integrinkette $\beta 3$ = maximaler Wert der Expression der Integrinkette $\beta 3$ minus minimaler Expressionswert für die Integrinkette $\beta 3$ innerhalb des Primärtumors, also die Spannweite). Die Überlebenszeit ist abhängig von der Höhe des Range: Ist der Range > 5 , sinkt die Überlebenszeit (Log Rank = 0,0436).



5.9.2 E-Cadherin

5.9.2.1 Mittelwert der E-Cadherin-Expression im Primärtumor

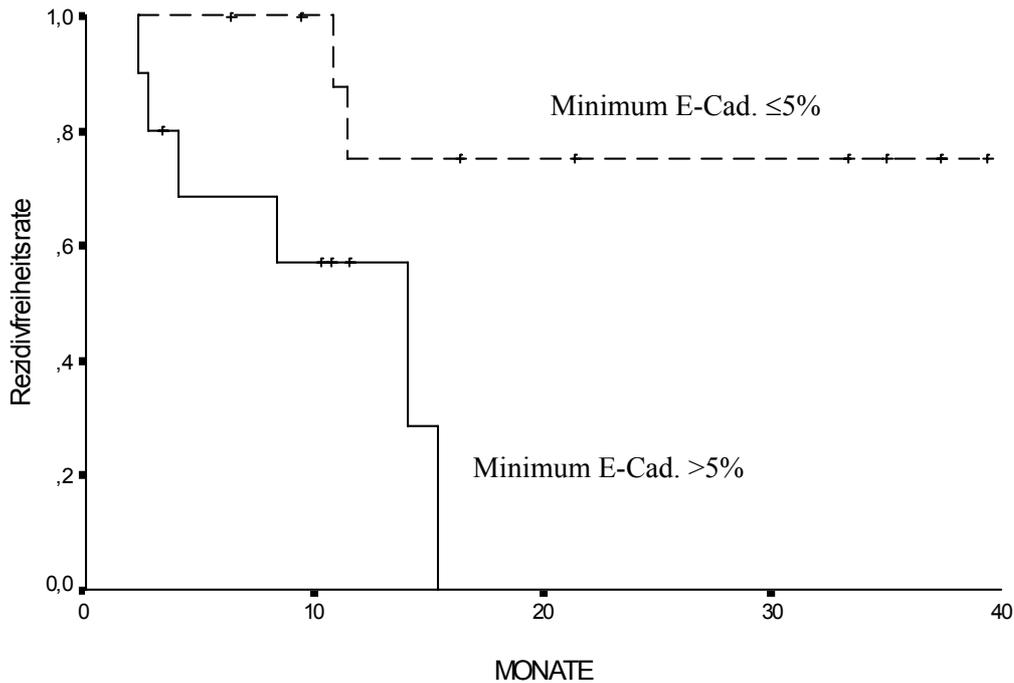
Zur Berechnung werden 2 Gruppen gebildet: Mittelwert der E-Cadherin-Expression **>50%** und Mittelwert der E-Cadherin-Expression \leq **50%**. Die Gruppe **>50%** hat eine niedrigere Rezidivfreiheitsrate, das heißt, daß diese Patienten schneller an Rezidiven erkrankt sind (Log Rank = 0,0101).



- - -	Mittelwert von E-Cadherin im Primärtumor \leq 50%
—	Mittelwert von E-Cadherin im Primärtumor $>$ 50%
+	zensiert

5.9.2.2 Minimum des E-Cadherin im Primärtumor

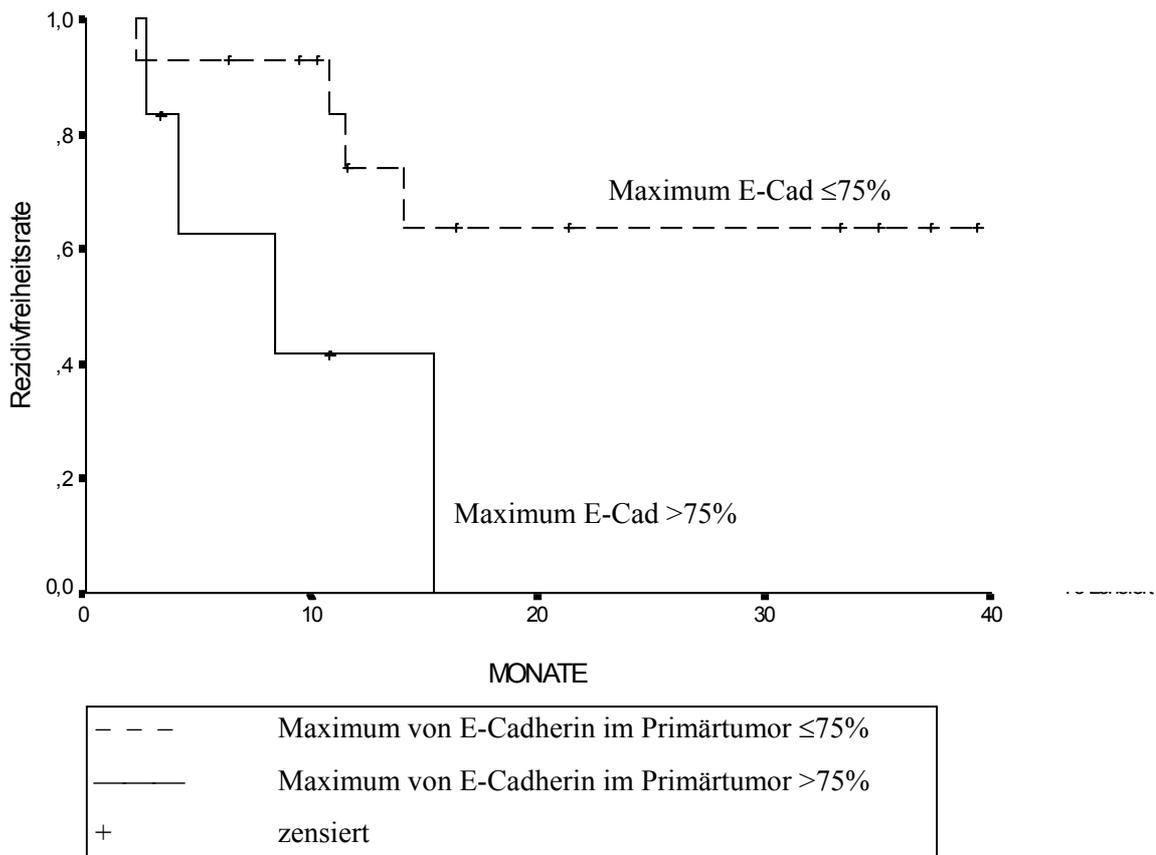
Zur Berechnung werden 2 Gruppen gebildet: Tumoren mit einem Minimum der E-Cadherin-Expression $\leq 5\%$ und Tumoren mit einem Minimum der E-Cadherin-Expression $>5\%$. Patienten mit einem Minimum der E-Cadherin-Expression $>5\%$ haben eine schlechtere Prognose, was die Rezidivfreiheit betrifft, d.h. sie erkranken häufiger und nach kürzeren Intervallen an einem Rezidiv (Log Rank = 0,0127).



- - -	Minimum von E-Cadherin im Primärtumor $\leq 5\%$
—	Minimum von E-Cadherin im Primärtumor $>5\%$
+	zensiert

5.9.2.3 Maximum des E-Cadherin im Primärtumor

Zur Berechnung werden 2 Gruppen gebildet: Tumoren mit einem Maximum der E-Cadherin-Expression $\leq 75\%$ und Tumoren mit einem Maximum der E-Cadherin-Expression $>75\%$. Patienten mit einem Maximum der E-Cadherin-Expression $>75\%$ haben eine schlechtere Prognose, was die Rezidivfreiheit betrifft, d.h. sie erkranken nach kürzeren Intervallen an einem Rezidiv (Log Rank = 0,0214).



5.10 Die Heterogenität der Tumorarchitektur

Die Untersuchung mehrerer Regionen eines Tumors läßt eine intratumorale Heterogenität sowohl für die Stammzelllinien und die DNA-Indizes, als auch für die Expressionswerte der einzelnen Immunmarker (CD44v4/5 und v6, E-Cadherin, Integrinketten αv und $\beta 3$) und der histologisch bestimmten Gefäßdichte und Tumorfrontmorphologie erkennen.

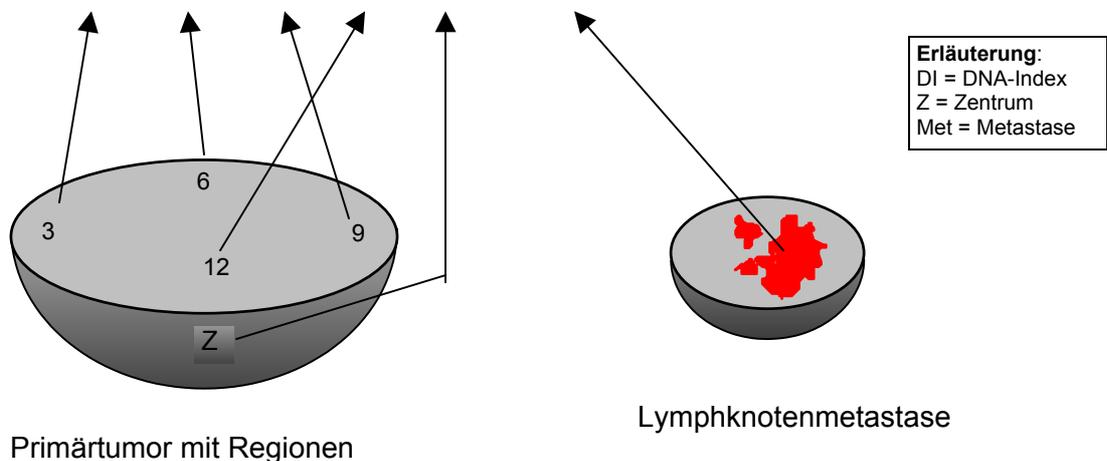
5.10.1 Heterogenität der Stammzelllinie

Die DNA-zytometrische Bestimmung der Stammzelllinie zeigt, daß innerhalb eines Tumors mehrere Stammzelllinien existieren können. Die Stammzelllinie einer Region der Tumors wird durch Modalwert und DNA-Index der Messung bestimmt. Der Modalwert gibt den DNA-Gehalt der am häufigsten vorkommenden DNA-Gehalt-gleichen Zellen an. Der DNA-Index (=DI) ist der Quotient aus Modalwert geteilt durch 2 (vgl. Kapitel 3.8 „Indizes der DNA-Zytometrie“). Zur Bestimmung einer Stammzelllinien-Identität wird der DNA-Index benutzt. Identität von zwei Stammzelllinien bedeutet, daß die DNA-Index-Differenz dieser beiden Zelllinien $\leq 0,1$ beträgt (Slootweg et al. 1993, Mahmood et al. 1998). Ein untersuchter Tumor wird als heterogen bezüglich der Stammzelllinien eingestuft, wenn mindestens 2 Stammzelllinien nachweisbar sind (Petersen et al. 1978) (vgl. Kap.5.1).

Tabelle 4.4 zeigt den DNA-Index der einzelnen Regionen der untersuchten Primärtumoren und den DNA-Index der korrespondierenden Lymphknotenmetastasen. Unterschiedliche Stammzelllinien innerhalb eines Tumors sind durch verschiedene Grautöne oder schwarz dargestellt, identische Stammzelllinien innerhalb eines Tumors erkennt man am gleichen Farbton. Gleiche Farbgebung in verschiedenen ID hat keine Bedeutung. Die Stammzelllinien der Metastasen und metastasengleiche Stammzelllinien sind rot unterlegt. Die Spalte „Anzahl Stammlinien/Regionen gesamt“ zeigt die Anzahl der Stammzelllinien innerhalb eines Tumors und die Gesamtzahl untersuchter Regionen an. Die rechte Spalte zeigt die Beurteilung „Heterogenität“ nach den oben genannten Kriterien. Fehlende Daten sind grau schraffiert.

Tabelle 5-4 DNA-Index der Tumorregionen 3^{oo} bis Zentrum und Metastasen

ID	DI 3 ^{oo}	DI 6 ^{oo}	DI 9 ^{oo}	DI 12 ^{oo}	DI Z	DI Met	Anzahl Stammlinien/Regionen gesamt	Intratumorale Heterogenität nach Slootweg et al. 1993
1	1,48	1,48	2,05	1,48	2,5	2,74	3/5	ja
2	1,42	1,63	1,53	1,46	1,36	1,48	3/5	ja
3	1,54	1,31	1,53	1,5	1,53	1,39	2/5	ja
4	1,91	1,83	1,82	1,76	1,76		2/4	ja
5	1,57	1,53	1,58	1,27	1,27		2/4	ja
6	1,13	1,06	0,93	0,92	1,11	1,16	2/4	ja
7	1,14	1,72	1,00	1,17	1,07	1,95	3/5	ja
8	0,92	1,69	0,89	0,78	1,66	NO	3/5	ja
9	1,18			1,13	1,05	1,53	2/4	ja
10	1,04	0,93	0,91	0,93	0,93	NO	2/4	ja
11	2,16	1,01	1,95	1,29	0,98	1,31	4/5	ja
12	1,23	1,27	0,95	1,06	1,03	1,5	3/5	ja
13	1,17	1,21	1,08	1,22	1,26	NO	2/5	ja
14	1,22	1,22	1,35	1,49	1,18	NO	4/5	ja
15	1,82	1,85	1,65	1,61	1,82	2,22	4/5	ja
16	1,85	1,74	1,8	1,95	1,95		4/4	ja
17	1,26	1,06			2,04	1,95	2/3	ja
18	1,09	1,14	1,05	1,14	2,04	1,95	2/5	ja
19			1,53	1,17	1,26	NO	2/4	ja
20	1,28	1,26	1,38	1,59	1,52	1,77	3/5	ja



5.10.2 Heterogenität von 2cDI und 5c-Exceeding-Rate

Zu den wichtigsten Parametern der DNA-Zytometrie gehören der 2cDI und die 5c-Exceeding-Rate. Ihre Aussagekraft bezüglich der Aggressivität von Tumoren, der Metastasierung und ihrer prognostischen Bedeutung kann für viele Tumoren nachgewiesen werden (vgl. Kap 5.1 und 5.2.1). Eine intratumorale Heterogenität wird jedoch selten berücksichtigt. Die DNA-zytometrische Untersuchung mehrerer Regionen zeigt aber deutlich unterschiedliche 2cDI und 5c-Exceeding-Rates innerhalb der Tumoren. Die Berechnung der Range (=Spannweite) aus Maximum des 2cDI bzw. 5c-Exceeding-Rate innerhalb des Primärtumors minus Minimum des 2cDI bzw. 5c-Exceeding-Rate (5c-ER) innerhalb des Primärtumors wird in den Tabellen 4.5 und 4.6 dargestellt.

Tabelle 5-5 2cDI in den einzelnen Regionen und die berechneten Range-Werte.

ID	2cDI 3°°	2cDI 6°°	2cDI 9°°	2cDI 12°°	2cDI Z	Range
1	8.53	14,42	14,16	8,99	21.65	13.12
2	1,52	3,21	4,07	6.05	1.02	5.03
3	2,59	3,38	1.28	4,66	5.38	4.10
4	6,6	7.49	4.64	5,39		2.85
5		11,55	17.5	7.68		9.82
6	2,28	2,44	2,18	7.35	2.07	5.28
7	4,36	4.54	2.91	3,88	2,97	1.63
8	4,29	4,26	1.51	3,77	7.81	6.3
9	4.61		4,39	2,24	2,23	2.38
10	12.14	1.12	4,5	3,51		11.02
11	10.81	3,86	10,57	2,39	2.31	8.5
12	7,98	28.05	3,95	5,3	3.58	24.47
13	10.61	1,98	1.15	1,75	1,19	9.46
14	1.18	4,11	3,2	6,15	6.82	5.64
15	10,52	7.97	15	16.23	13,47	8.26
16	14.4	6,74	6.82	5.15		9.25
17	6,17	7.31		4.97		2.34
18	6.98	6,76	6	7,63	9.67	3.67
19		0.37	1.72	0,27	0,53	1.45
20	3,85	4,79	2.73	4,04	6.24	3.51

Erläuterung: Maxima und Minima sind fett hervorgehoben. Fehlende Daten sind grau markiert.

Tabelle 5-6 5c-Exceeding-Rate in den einzelnen Regionen und die berechneten Range-Werte.

ID	5cER3	5cER6	5cER9	5cER12	5cERZ	Range
1	30,94	45,25	29,35	31,49	54,58	25,23
2	4	6,95	10,3	16,33	1	15,33
3	8,67	9,09	1	17,97	24,09	23,09
4	10	11,44	8	10,3		3,44
5	35,83	41,91	35,5	19,74		22,17
6	4,15	6,84	4,89	9,85	5,99	5,7
7	13,84	14,61	7,42	9,65	9,29	7,19
8	16,07	10,93	2,93	18,27	33,55	30,62
9	6,98		7,77	4,65	4,21	3,56
10	15,08	2,33	12,01	9,71		12,75
11	15,85	6,96	27,48	6,54	4,08	23,4
12	21,45	20,13	9	11,61	9,3	12,45
13	6,64	4,33	3,3	3,33	1,65	4,99
14	2,64	11,3	9,24	17,88	21,67	19,03
15	21,59	15,23	44,7	47,84	37,67	32,61
16	30,79	6,97	16,71	3,64		27,15
17	15	11,92		12,23		3,08
18	24,5	12,21	10,85	28	20,69	17,15
19		0,33	3,64	0,33	1,66	3,31
20	9,24	13,33	7,07	9,67	17,94	10,87

Erläuterung: Maxima und Minima sind fett hervorgehoben. Fehlende Daten sind grau markiert.

5.10.3 Heterogenität der Immunmarker

Die Untersuchung mehrerer Regionen innerhalb eines Primärtumors zeigt, daß das Expressionsverhalten innerhalb des Tumors eine große Variabilität aufweisen kann. Maxima und Minima werden bestimmt und hieraus wird die Range berechnet (vgl. Kap 3.9 „Statistische Methoden“). Dies gibt Auskunft über die Spannweite der Werte in den einzelnen Primärtumoren. Hohe Range-Werte bedeuten ein hohes Maß an Heterogenität. In den Tabellen 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 und 4.11 sind Einzelwerte und Range-Werte für die einzelnen immunhistochemischen Untersuchungen zusammengestellt. Fettgedruckte Zahlen markieren Maxima und Minima (bei mehreren gleichen Werten wurde nur ein Wert markiert). Grau unterlegte Felder bedeuten fehlende Daten.

Tabelle 5-7 E-Cadherin in den Einzelregionen und die berechneten Range-Werte

ID	E-Cad 3°°	E-Cad 6°°	E-Cad 9°°	E-Cad 12°°	E-CadZ	Range
1	13	1	0	1	1	13
2	51	6	38	34	1	45
3	100	53	100	43	23	77
4	31	53	60	43	21	39
5	27	0	17	62	21	62
6	52	64	70	40	39	31
7	80	57	73	85	24	61
8	15	32	4	27	19	28
9	100	32	42	88	50	58
10	10	13	2	6	0	13
11	36	27	42	47	100	73
12	2	5	6	3	3	4
13	8	4	2	3	14	12
14	29	26	28	36	0	36
15	41	100	14	24	26	86
16	8	17	8	4	0	17
17	26	40	8	54	0	28
18	36	43	26	51	0	51
19	36	20	3	11	7	17
20	100	24	18	65	61	82

Tabelle 5-8 Integrinkette αv in den Einzelregionen und die berechneten Range-Werte

ID		Alpha 6°°	Alpha 9°°	Alpha 12°°	Alpha Z	Range
1	35	15	1	0	4	35
2	42	16	0	33		42
3	7		0	8		8
4	90	75	80	40	54	50
5	0	0	0	21		21
6	0	7	52	6	5	52
7	0	2	2	1	13	13
8	5	5	4	0.7	10	9.3
9	100		23	43	12	88
10	1	1	0	0	0	1
11	0	0	0	0	0	0
12	0	4	1	1	3	4
13	1	8	8	0	0	8
14	0	8	0	0	1	8
15	39	16	17	18	16	23
16	11	0	11	2	1	11
17	0	5		0		5
18	0	0	0	0	0	0
19		1	1	1	0	1
20	17	7	6	2	5	15

Erläuterung: „Alpha“ = Integrinkette αv

Tabelle 5-9 Integrinkette $\beta 3$ in den Einzelregionen und die berechneten Range-Werte

ID	Beta 3°°	Beta 6°°	Beta 9°°	Beta 12°°	Beta Z	Range
1	6	12	1	0	0	12
2		13	3	0		13
3	3		16	6	1	15
4	10	0	0	0	12	12
5	0	0	8	15		15
6	9	0	3	3	2	9
7	18	0.78	5	0.65	0	18
8	2	0	0	2	0.65	2
9	0		0	0	10	10
10	0	0	0	0	2	2
11	0	0	0	0	8	8
12	0	0	1	0	0	1
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0		0		0
18	0	0	0	0	0	0
19		0	0	0	0	0
20	0	0	0	3	9	9

Erläuterung: „Beta“ = Integrinkette $\beta 3$

Tabelle 5-10 CD44v4/5 in den Einzelregionen und die berechneten Range-Werte

ID	CD44v4/5 3 ^{oo}	CD44v4/5 6 ^{oo}	CD44v4/5 9 ^{oo}	CD44v4/5	CD44v4/5 Z	Range
1	22	9	2	9	0	22
2	16	11	16	29		18
3	3		0	100	100	100
4	100	75	10	50	100	90
5	11	83		57		72
6	22	57	25	17	34	40
7	100	100	100	100	90	10
8	51	26	4	22	35	47
9	100		22	50	53	78
10	0	0	0	0		0
11	0	0	0	0	0	0
12	2	1	2	20	1	19
13	2	3	10	2	1	9
14	0	11	0	9	34	34
15	14	39	46	29	35	32
16	18	16	6	10	6	12
17	0	10		37		37
18	13	6	57	17	58	52
19		0	0	1	0	1
20	88	61	33	87	24	64

Tabelle 5-11 CD44v6 in den Einzelregionen und die berechneten Range-Werte

ID	CD44v6 3 ^{oo}	CD44v6 6 ^{oo}	CD44v6 9 ^{oo}	CD44v6 12 ^{oo}	CD44v6 Z	Range
1	100	100	100	34	100	66
2	100	90	100	70		30
3	77		74	64	100	36
4	100	90	90	90	100	10
5	32	69	53	75		43
6	100	80	90	90	70	30
7	100	100	90	100	67	33
8	40	100	100	100	100	60
9	100		12	95	100	88
10	100	75	36	90		64
11	100	100	100	90	95	10
12	35	18	17	36	80	63
13	80	70	70	70	90	20
14	77	54	40	100	23	77
15	90	87	92	95	94	8
16	100	34	90	100	100	66
17	100	100		100		0
18	100	100	100	100	100	0
19		24	77	100	100	76
20	100	100	100	100	100	0

5.10.4 Heterogenität der histologischen Marker Gefäßdichte und Tumorfrontmorphologie

In der folgenden Tabelle 4.12 sind die Gefäßdichten der einzelnen Regionen innerhalb der Primärtumoren zusammengestellt. Die Gefäße werden pro Flächeneinheit ausgezählt (Gefäße pro High Power Field, vgl. Kap. 3.5.3). Aus Maximum und Minimum berechnete Range-Werte sind rechts zu sehen. Es wird ersichtlich, daß es keine für einen Primärtumor repräsentative Gefäßdichte gibt, sondern daß sich die Regionen deutlich voneinander unterscheiden.

Tabelle 5-12 Gefäßdichten in den Einzelregionen und die berechneten Range-Werte

ID	Gefäßdichte	Gefäßdichte	Gefäßdichte	Gefäßdichte	Gefäßdichte	Range
1	0	0	0.2	0	0.75	0.75
2	2	1	2	0.6		1.4
3	1.43	1	1.3	1	1.4	0.43
4	1.125	0.75	0.6	2		1.4
5	1.8	0.5	0.625	0		1.8
6	2	2.2	2.2	1.8	1	1.2
7	0.8	0.75	0.6	1	0.83	0.4
8	0.25	1.33	0.4	0.67	0.25	1.08
9	4.2		1.2	0.5	0.8	3.7
10	1.8	3.5	0.25	0.5		3.25
11	2	1.25	0.67	0	0	2
12	2	2.4	0.71	1.83	2.1	1.69
13	0	0.8	1.9	0.11	0.4	1.9
14	1.1	0.4	0.2	1.8	1	1.6
15	1	1	1.3	3.25	0.7	2.55
16	2	0.9	1.5	1.2	1.2	1.1
17	0	0.5		0.5		0.50
18	0.8	1	0.4	0.4	0.2	0.80
19		1.9	2.8	1.9	3	1.1
20	3.4	2.25	1.6	2.5	0.4	3.0

In Tabelle 4-13 sind schließlich die Einzelwerte und die berechneten Range-Werte für die Tumorfrontmorphologie der einzelnen Regionen zusammengestellt. Die Einteilung der Tumorfrontmorphologie erfolgt in Grade I-IV (vgl. Kap. 3.5.2). Acht der 20 Tumoren haben homogene Tumorfronten in den einzelnen Regionen. Die restlichen 12 Tumoren zeigen z.T. deutliche Unterschiede (z.B. ID 2 oder ID 16).

Tabelle 5-13 Tumorfrontmorphologie in den Einzelregionen und die berechneten Range-Werte

ID	TF 3°°	TF 6°°	TF 9°°	TF 12°°	TF Z	Range
1	4	4	4	4	4	0
2	4	4	4	4	1	3
3	4	4	3	4	4	1
4	4	4	4	4	4	0
5	4	3	3	3	4	1
6	3	4	4	4	4	1
7	4	4	4	4	4	0
8	3	3	3	3	3	0
9	3	3	3	3	3	0
10	4	4	4	4	4	0
11	3	4	3	3	4	1
12	3	3	3	3	3	0
13	4	3	4	4	4	1
14	2	2	2	2	3	1
15	3	3	3	3	3	0
16	3	1	4	3	4	3
17	2	3	4	2	4	1
18	3	2	3	3	4	2
19	3	3	4	3	3	1
20	3	3	3	4	4	1

Erläuterung: TF = Tumorfrontmorphologie

5.10.5 Vergleich der Heterogenität in N(+) und N(0)-Tumoren

Um einen möglichen Unterschied der Heterogenität, d.h. der Range-Werte in N(+) und N(0)-Tumoren ausfindig zu machen, wird mit dem Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben ein Vergleich zwischen den beiden Gruppen bezüglich des Range durchgeführt. Ein statistisch auffälliger Befund ergibt sich lediglich für das E-Cadherin, wobei die Gruppe N(+) insgesamt höhere Range-Werte besitzt. Statistisch grenzwertige Befunde ergeben sich für das CD44v6 und die beiden Integrinketten αv und $\beta 3$. Die Range-Werte für das CD44v6 sind in der Gruppe N(+) insgesamt kleiner als in den N(0)-Tumoren. Die Range-Werte der Integrinketten liegen in den N(+)-Tumoren höher als in der N(0)-Gruppe. Für die einzelnen Untersuchungen werden die Ergebnisse in Tabelle 4.14 noch einmal zusammengefaßt.

Tabelle 5-14 Vergleich der Range-Werte in N(0) und N(+)-Tumoren

Untersuchung	P-Wert	Richtung	Statistische Aussage
2cDI	0,6625		kein Zusammenhang
5c-ER	0,7934		kein Zusammenhang
CD44v6	0,0963	N(+)<N(0)	statistisch grenzwertiger Befund
CD44v4/5	0,1062		kein Zusammenhang
E-Cadherin	0,04	N(+)>N(0)	statistisch auffälliger Befund
αv (CD51)	0,0965	N(+)>N(0)	statistisch grenzwertiger Befund
$\beta 3$ (CD61)	0,0607	N(+)>N(0)	statistisch grenzwertiger Befund
TF	0,7042		kein Zusammenhang
Gefäßdichte	0,5702		kein Zusammenhang

Erläuterung: αv (CD51): Integrinkette αv

$\beta 3$ (CD61): Integrinkette $\beta 3$

TF: Tumorfrontmorphologie

5.11 Gegenüberstellung von Metastasen und stammliniengleichen Primärtumorregionen

Hier werden die Stammzelllinien der einzelnen Regionen untereinander und mit den Metastasen verglichen. Bei drei (ID 2, ID 6 und ID 11) der 20 untersuchten Tumoren ist die Stammzelllinie der Metastasen identisch mit Stammzelllinien aus dem Primärtumor. Die Voraussetzungen zur Identität der Stammzelllinie sind bei einer Differenz des DNA-Index von kleiner oder gleich 0,10 gegeben (Slootweg et al. 1993).

Es läßt sich die Hypothese aufstellen, daß bei identischen Stammzelllinien in der Metastase und einer (oder mehrerer) Region(en) des Primärtumors die Metastasierung aus diesen Bereichen erfolgt.

Auf eine Gegenüberstellung dieser Regionen mit den Metastasenherden bezüglich der einzelnen Untersuchungen wird deshalb im folgenden ein besonderes Augenmerk gerichtet.

In Tabelle 4.15 sind diese 3 Tumoren (ID 2, 6 und 11) mit den Ergebnissen der einzelnen Untersuchungen aufgeführt. Metastasengleiche Regionen sind rot gefärbt. Zur Veranschaulichung ist unten am Beispiel von ID6 ein Ausschnitt der Tabelle erläutert: Links sind die einzelnen durchgeführten Untersuchungen aufgelistet. In der Mitte sind die einzelnen Tumorregionen, rechts die korrespondierende Lymphknotenmetastase mit den jeweiligen Untersuchungsergebnissen dargestellt. In den Primärtumorregionen 3^{oo}, 6^{oo} und Zentrum („Zen“) können metastasengleichen Stammzelllinien (rot) festgestellt werden. Dort können z.B. 2cDI, 5c-Exceeding-Rate, CD44 v4/5 und die übrigen Untersuchungen untereinander und mit den Metastasenwerten verglichen werden. In Kapitel 5 werden diese Vergleiche diskutiert.

ID	Untersuchung	Primärtumor					Metastase
		3 ^{oo}	6 ^{oo}	9 ^{oo}	12 ^{oo}	Zen	
6	Stammzelllinie(n)	1,13	1,06	0,93	0,92	1,11	1,16
	2cDI	2,28	2,44	2,18	7,35	2,07	5,97
	5c-Exceed.Rate	4,15	6,84	4,89	9,85	5,99	14,78
	CD44v4/5	22	57	25	17	34	40
	(...)						

Tabelle 5-15 Darstellung der Ergebnisse in Metastasen und stammzelliniengleiche Regionen

ID	Untersuchung	Primärtumor					Metastase
		3 ^{oo}	6 ^{oo}	9 ^{oo}	12 ^{oo}	Zen	
2	Stammzellinie(n)	1,42	1,63	1,53	1,46	1,36	1,48
	2cDI	1,52	3,21	4,07	6,05	1,02	45,83
	5c-Exceed.Rate	4,00	6,95	10,30	16,33	1,00	65,08
	CD44v4/5	16	11	16	29		
	CD44v6	100	90	100	70		
	E-Cadherin	51	6	38	34		
	Integrinkette α v	42	16	0	33		
	Integrinkette β 3		13	3	0		
	Tumorfrontmorphologie	4	4	4	4		4
	Zahl der GefäÙe	2,0	1,0	2,0	0,6		1,0
6	Stammzellinie(n)	1,13	1,06	0,93	0,92	1,11	1,16
	2cDI	2,28	2,44	2,18	7,35	2,07	5,97
	5c-Exceed.Rate	4,15	6,84	4,89	9,85	5,99	14,78
	CD44v4/5	22	57	25	17	34	40
	CD44v6	100	80	90	90	70	89
	E-Cadherin	52	64	70	39	46	46
	Integrinkette α v	0	7	52	6	5	2
	Integrinkette β 3	9	0	3	3	2	7
	Tumorfrontmorphologie	3	4	4	4	4	4
	Zahl der GefäÙe	2	2,2	2,2	1,8	1,0	0,8
11	Stammzellinie(n)	2,16	1,01	1,95	1,29	0,98	1,31
	2cDI	10,81	3,86	10,57	2,39	2,31	9,80
	5c-Exceed.Rate	15,85	6,96	27,48	6,54	4,08	23,62
	CD44v4/5	0	0	0	0	0	85
	CD44v6	100	100	100	90	95	100
	E-Cadherin	36	27	42	47	100	90
	Integrinkette α v	0	0	0	0	0	20
	Integrinkette β 3	0	0	0	0	8	13
	Tumorfrontmorphologie	3	4	3	3	4	4
	Zahl der GefäÙe	2,0	1,25	0,67	0	0	0,71

Legende:

-  Metastasen bzw. stammliniengleiche Regionen
-  fehlende Daten

5.12 Gesamtkorrelationen

Hier werden statistische Abhängigkeiten zwischen den einzelnen tumorbiologischen Markern geprüft. Z.B. soll ein statistischer Zusammenhang von 2cDI und CD44v6-Expression geprüft werden, oder zwischen Integrinkette- α v-Expression und Gefäßdichte usw. Grundsätzlich wird jeder tumorbiologische Marker mit allen anderen untersuchten Markern korreliert.

Um diese Korrelationen berechnen zu können, müssen die einzelnen Regionen der Primärtumoren als eigenständige Tumoren angesehen werden. Ein gültiger P-Wert kann so jedoch nicht bestimmt werden. Aus Korrelationskoeffizient r und dem Bestimmtheitsmaß r^2 läßt sich jedoch ein statistischer Trend ablesen.

Die Gesamtkorrelationen werden innerhalb der metastasierenden Tumoren N(+), der nichtmetastasierenden Tumoren N(0), der Metastasen und als Gesamtkollektiv (N(+) und N(0)) berechnet. Auf diese Weise sollen grundsätzliche Trendunterschiede in den einzelnen Kollektiven aufgedeckt werden. Z.B. ergibt sich ein statistischer Trend zwischen 2cDI und CD44v4/5-Expression in der Gruppe N(0), bei den N(+)-Tumoren dagegen nicht. Ein anderes Beispiel ist der statistische Trend zwischen E-Cadherin und Tumorfrontmorphologie, der im Kollektiv N(0) nachzuweisen ist, bei den N(+)Tumoren dagegen nicht.

Die Korrelationen werden als Rangkorrelationen (Spearman Correlation Coefficients) ermittelt, weil die Wertepaare nicht einer Normalverteilung entsprechen. In den folgenden Tabellen 4.16, 4.17, 4.18 und 4.19 sind die Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern dargestellt.

Die auffallendsten Ergebnisse ($p < 0,05$) sind in blau (■) hervorgehoben, die etwas weniger aussagekräftigen ($0,05 < p \leq 0,1$) grau (■), und diejenigen Felder ohne statistische Auffälligkeiten sind weiß belassen.

Beispiel zur Vereinfachung: Unten dargestellter Ausschnitt aus Tabelle 4-16 zeigt die statistisch berechneten Werte, die bei der Korrelation von 2cDI und CD44v4/5 entstehen: $r=0,27137$, $r^2=0,073642$, $p=0,0231$.

Das Bestimmtheitsmaß $r^2=0,073642$ besagt, daß ca. 7 % der einen Variable durch die andere bestimmt sind.

Parameter		...	CD44v4/5
2cDI	r	...	0,27137
	r ²	...	0,073642
	p	...	0,0231

Tabelle 5-16 Korrelationen der Einzelparameter in allen Tumoren unabhängig vom N-Status (N(0) und N(+))

Parameter		5c-ER	CD44v4/5	CD44v6	E-Cadh	CD51	CD61	TF	Gefäße
2cDI	r	0,91329	0,27137	0,09888	-0,16578	0,11123	-0,01067	-0,07699	-0,21737
	r ²	0,8341	0,073642	0,00978	0,02748	0,01237	0,00011	0,00593	0,04725
	p	0,0001	0,0231	0,412	0,245	0,3593	0,9301	0,5174	0,0666
5c-ER	r		0,25374	0,10149	-0,2447	0,03524	0,02702	-0,01822	-0,22946
	r ²		0,064384	0,0103	0,05988	0,00124	0,00073	0,00033	0,05265
	p		0,0164	0,3412	0,0412	0,743	0,8027	0,8631	0,0287
CD44v4/5	r			0,17332	0,28738	0,48943	0,33035	0,09784	0,03928
	r ²			0,03004	0,08259	0,23954	0,10913	0,00957	0,00154
	p			0,1004	0,0151	0,0001	0,0016	0,3589	0,7132
CD44v6	r				0,18119	0,01671	0,14653	0,01493	0,03728
	r ²				0,03283	0,00028	0,02147	0,00022	0,00139
	p				0,1277	0,8751	0,1682	0,8883	0,7257
E-Cadherin	r					0,19544	0,2227	-0,03081	0,12403
	r ²					0,0382	0,0496	0,00095	0,01538
	p					0,0999	0,0619	0,7987	0,3027
CD51 (αv)	r						0,11768	0,18463	0,18705
	r ²						0,01385	0,03409	0,03499
	p						0,0619	0,0815	0,0775
CD61 ($\beta 3$)	r							0,32245	-0,16042
	r ²							0,10397	0,02573
	p							0,0021	0,1332
TF	r								-0,00872
	r ²								7,6E-05
	p								0,9343

Erläuterung: ($p < 0,05$) sind in blau (■) hervorgehoben, ($0,05 < p \leq 0,1$) mit grau (■). Auf der linken Seite und oben sind die einzelnen tumorbiologischen Parameter aufgeführt. Die Schnittmengen der einzelnen Zeilen und Spalten zeigen die statistisch ermittelten r, r² und p-Werte. TF = Tumorfrontmorphologie, CD51 und CD61 = Integrinkette αv und $\beta 3$.

Tabelle 5-17 Korrelationen zwischen den Einzelparametern in N(0)-Tumoren

Parameter		5c-ER	CD44v4/	CD44v6	E-Cadh.	CD51	CD61	TF	GefäÙe
2cDI	r	0,96446	0,56969	-0,04508	-0,01982	0,07278	0,36528	-0,29059	-0,50463
	r ²	0,930183	0,324547	0,002032	0,000393	0,005297	0,133430	0,084443	0,254652
	p	0,0001	0,0109	0,8546	0,9464	0,7672	0,1241	0,2275	0,0276
5c-ER	r		0,55797	-0,00025	-0,06302	0,1908	0,51941	-0,17431	-0,38969
	r ²		0,311331	6,25E-08	0,003972	0,036405	0,269787	0,030384	0,151854
	p		0,0057	0,9991	0,8038	0,3832	0,0111	0,4263	0,066
CD44v4/5	r			0,06467	0,00919	0,59721	0,55919	-0,28868	-0,30423
	r ²			0,004182	8,44E-05	0,356660	0,312694	0,083336	0,092556
	p			0,7694	0,9711	0,0026	0,0055	0,1816	0,1581
CD44v6	r				0,16206	-0,02991	0,13608	-0,01258	0,21505
	r ²				0,026263	0,000895	0,018518	0,000158	0,046247
	p				0,5206	0,8922	0,5358	0,9546	0,3244
E-Cadherin	r					0,10133	-0,05814	-0,56763	-0,14998
	r ²					0,010268	0,003380	0,322204	0,022494
	p					0,6798	0,8131	0,014	0,5525
CD51 (αv)	r						0,11638	-0,07434	0,05324
	r ²						0,013544	0,005526	0,002835
	p						0,5881	0,736	0,8093
CD61 (β3)	r							-0,15759	-0,28716
	r ²							0,024835	0,082461
	p							0,4727	0,184
TF	r								0,02333
	r ²								0,000544
	p								0,9159

Erläuterung: ($p < 0,05$) sind in blau (■) hervorgehoben, ($0,05 < p \leq 0,1$) mit grau (■). Auf der linken Seite und oben sind die einzelnen tumorbiologischen Parameter aufgeführt. Die Schnittmengen der einzelnen Zeilen und Spalten zeigen die statistisch ermittelten r , r^2 und p -Werte.

Tabelle 5-18 Korrelationen zwischen den Einzelparametern in N(+)-Tumoren

Parameter		5c-ER	CD44v4/ 5	CD44v6	E-Cadh	CD51	CD61	TF	Gefäße
2cDI	r	0,89258	-0,09572	0,04305	-0,52355	-0,0299	-0,25933	-0,09793	-0,19602
	r ²	0,796699	0,009162	0,001853	0,274105	0,000894	0,067252	0,009590	0,038424
	p	0,0001	0,504	0,7619	0,0009	0,835	0,0661	0,4811	0,1595
5c-ER	r		-0,01848	-0,01848	-0,55054	-0,09903	-0,1862	0,00814	-0,2369
	r ²		0,000342	0,000342	0,303094	0,009805	0,034670	6,63E-05	0,056122
	p		0,8829	0,8829	0,0001	0,4289	0,1375	0,9471	0,0518
CD44v4/5	r			0,11561	0,2115	0,40398	0,21213	0,17482	0,08326
	r ²			0,013366	0,044732	0,16320	0,0450	0,030562	0,006933
	p			0,3478	0,1284	0,0007	0,0873	0,1571	0,503
CD44v6	r				0,03769	-0,05742	0,09088	0,02022	-0,5267
	r ²				0,001421	0,003297	0,008259	0,000409	0,277413
	p				0,7867	0,6418	0,4645	0,87	0,6697
E-Cadherin	r					0,1708	0,17904	0,05109	0,15225
	r ²					0,029173	0,032056	0,002611	0,023180
	p					0,2214	0,2041	0,7164	0,2764
CD51	r						0,05007	0,22805	0,21522
	r ²						0,002507	0,052007	0,046320
	p						0,6897	0,0634	0,0803
CD61	r							0,40392	-0,16298
	r ²							0,163151	0,026563
	p							0,0008	0,191
TF	r								-0,02877
	r ²								0,000828
	p								0,8145

Erläuterung: ($p < 0,05$) sind blau (■) hervorgehoben, ($0,05 < p \leq 0,1$) mit grau (■). Auf der linken Seite und oben sind die einzelnen tumorbiologischen Parameter aufgeführt. Die Schnittmengen der einzelnen Zeilen und Spalten zeigen die statistisch ermittelten r , r^2 und p -Werte.

Tabelle 5-19 Korrelationen zwischen den Einzelparametern in den Metastasen

Parameter		5c-ER	CD44v4/5	CD44v6	E-Cadh	CD51	CD61	Gefäße
2cDI	r	0,85165	0,03158	0,50758	-0,09426	0,39152	-0,38894	-0,01926
	r ²	0,7253077	0,0009973	0,2576375	0,0088849	0,1532879	0,1512743	0,0003709
	p	0,0002	0,9224	0,0921	0,7707	0,2082	0,2115	0,9502
5c-ER	r		0,10877	0,37028	-0,08701	0,1744	-0,11967	-0,02476
	r ²		0,0118309	0,1371073	0,0075707	0,0304154	0,0143209	0,0006131
	p		0,7365	0,2361	0,788	0,5877	0,711	0,936
CD44v4/5	r			0,37993	0,58577	0,58399	-0,17451	-0,19332
	r ²			0,1443468	0,3431265	0,3410443	0,0304537	0,0373726
	p			0,2231	0,0454	0,0462	0,5875	0,5472
CD44v6	r				-0,23296	0,19576	-0,73424	0,2584
	r ²				0,0542704	0,038322	0,5391084	0,0667706
	p				0,4662	0,5848	0,0065	0,4174
E-Cadherin	r					0,54622	0,38003	-0,33777
	r ²					0,2983563	0,1444228	0,1140886
	p					0,0662	0,223	0,2829
CD51 (αv)	r						-0,12563	-0,22998
	r ²						0,0157829	0,0528908
	p						0,6972	0,4721
CD61 (β3)	r							-0,15547
	r ²							0,0241709
	p							0,6295

Erläuterung: ($p < 0,05$) sind blau (■) hervorgehoben, ($0,05 < p \leq 0,1$) mit grau (■). Auf der linken Seite und oben sind die einzelnen tumorbiologischen Parameter aufgeführt. Die Schnittmengen der einzelnen Zeilen und Spalten zeigen die statistisch ermittelten r , r^2 und p -Werte.

6 Diskussion

6.1 *Heterogenität der Tumorarchitektur*

Die Hypothese, daß ein maligner Tumor aus einer monoklonalen malignen Zelllinie entsteht, ist weitgehend akzeptiert (Mahmood et al. 1998). Weitere Zelllinien entwickeln sich aus dieser während der Tumorprogression, und so kann ein Tumor mehrere Subpopulationen beherbergen (Sun et al. 1995, Sasaki et al. 1991, Mahmood et al. 1998), die ein unterschiedliches biologisches Verhalten zeigen. Die Anwesenheit verschiedener Zellpopulationen ist jedoch histologisch nicht darstellbar. Mit Hilfe der DNA-Zytometrie kann der DNA-Gehalt als Repräsentant unterschiedlicher Zelllinien bestimmt werden, die Untersuchung der Immunmarker verdeutlicht das biologisch heterogene Verhalten der Zellen.

PETERSEN et al. definieren den Begriff DNA-Heterogenität in dem Sinne, daß ein Tumor dann heterogen ist, wenn 2 oder mehr als 2 Stammzelllinien darin nachweisbar sind (Petersen et al. 1978).

Durch die Untersuchung mehrerer Regionen mit Hilfe von DNA-Zytometrie, Immunhistochemie und Histologie wird in der vorliegenden Arbeit gezielt nach der Heterogenität der Tumoren gesucht. Es werden 3-5 Regionen untersucht. Einige Autoren untersuchen in ihren Studien mehr als fünf Regionen (Sasaki et al. 1992) andere lediglich 2 Regionen (Mahmood et al. 1998).

Zur Bestimmung der Stammzelllinie wird der Modalwert benutzt (vgl. Kap. 3.8.2). Der DNA-Index (=Modalwert geteilt durch 2c) wird in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Stammzelllinien-Identität herangezogen. Identische Stammzelllinien werden angenommen bei einer Differenz des DNA-Index $\leq 0,1$. Die Definition der Identität von Stammlinien in Bezug auf den DNA-Index wird unterschiedlich gehandhabt. Hier wird das Vorgehen von SLOOTWEG et al. (1993) übernommen. MAHMOOD et al. benutzen sehr ähnliche Kriterien (Identität bei Differenz des DNA-Index $\leq 0,09$) (Slootweg et al. 1993, Mahmood et al. 1998).

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß in jedem der untersuchten Tumoren mindestens 2 Stammzelllinien nachweisbar sind, was die Annahme der DNA-Heterogenität nach PETERSEN et al. (1978) unterstützt. Der Nachweis der Immunmarker in den verschiedenen Regionen zeigt ebenfalls sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die hier in Range ausgedrückte Heterogenität ist für alle Marker in allen Tumoren nachweisbar.

In drei der untersuchten Primärtumoren können Regionen mit der gleichen Stammzelllinie, wie in den korrespondierenden Lymphknoten-Metastasen

nachgewiesen werden (ID 2, ID 6 und ID 11). Bei einem der Tumoren (ID 11) ist es nur eine Region mit metastasengleicher Stammzelllinie, in den beiden anderen sind in je drei Regionen metastasengleiche Stammzelllinien nachweisbar (ID 2 und ID 6). Da hier davon ausgegangen wird, daß Regionen mit metastasengleicher Stammzelllinie entscheidenden Anteil an der Entwicklung von Metastasen haben, sind diese Regionen in Bezug auf die gemessenen biologischen Parameter von besonderer Bedeutung

Drei Beobachtungen können hier herausgearbeitet werden:

1. Stammzelliniengleiche Regionen innerhalb des Primärtumors zeigen ein unterschiedliches Expressionsverhalten für die Oberflächenmoleküle, sowie andere Gefäßdichten und unterschiedliche 2cDI und 5c-ER.
2. Der Vergleich dieser Regionen mit den Metastasen zeigt, daß die DNA-Indizes 2cDI und 5c-ER in allen drei Fällen in den Metastasen deutlich erhöht sind.
3. Der Vergleich der immunhistochemisch untersuchten Expression von CD44v4/5 und v6, E-Cadherin und den Integrinketten αv und $\beta 3$ in metastasengleichen Regionen und in Metastasen ist sehr variabel und scheint keinem Gesetz zu folgen.

Ad 1.: Auch stammliniengleiche Regionen zeigen ein unterschiedliches „biologisches“ Verhalten. Die Tatsache, daß die berechneten DNA-Indizes 2cDI und 5cER variieren, zeigt, daß sich neben der Stammzelllinie andere Zellen mit hohem DNA-Gehalt entwickeln und dies mit regional unterschiedlicher Verteilung. Diese Zellen bestimmen maßgeblich den 2cDI und die 5c-ER. Dies zeigt auch, daß der Tumor sozusagen „in Bewegung ist“, daß er sich wandelt, und sich wahrscheinlich immer wieder neue Subklone entwickeln.

Die unterschiedlichen Meßwerte der immunhistologischen Untersuchung zwischen stammliniengleichen Regionen zeigen, wie variabel die Expression dieser Moleküle im Tumor ist. Diese Beobachtung unterstützt die durch den Range der Einzelwerte der Regionen dargestellte Heterogenität und ist möglicherweise eine Begründung für die uneinheitlichen Forschungsergebnisse vieler immunhistochemischer Studien.

Ad 2.: Die deutlich erhöhten 2cDI und 5cER in den Metastasen bei gleicher Stammzelllinie zeigen, daß in den Metastasen der Anteil aneuploider Zellen >5c deutlich größer ist. Diese Beobachtung wird bestätigt durch den allgemeinen Vergleich von Primärtumor-Mittelwerten, -Minima und -Maxima mit den Metastasen. Sie spricht aber gegen die Annahme einer Diploidisierung von Metastasen, wie sie

von SUZUKI et al. und BURGIO et al. publiziert wurde (Suzuki et al. 1994, Burgio et al. 1992), steht jedoch im Einklang mit der beobachteten Aneuploidisierung in Lymphknotenmetastasen (Welkoborsky et al. 1993).

Es stellt sich hier die Frage, ob die Zellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$ maßgeblich die Metastasierung bestimmen oder solche Zellen per se einen Selektionsvorteil durch rasche Zellteilung haben.

Ad 3.: Bei angenommener Metastasierung aus Regionen metastasengleicher Stammlinien würde man einfache Gesetzmäßigkeiten erwarten, beispielsweise die Reduktion der E-Cadherin-Expression in den Metastasen, die Erhöhung der Expression von CD44v4/5 und v6. Wie aber die anderen Daten zeigen, sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen schwer vorherzusagen und durch die extreme Heterogenität der Primärtumoren bestimmt. Bei zwei der drei Tumoren mit identischen Stammzelllinien in Primärtumor und Metastase können in der vorliegenden Untersuchung immunhistologische Daten erhoben werden (ID6 und ID11). Diese zwei Fälle lassen jedoch Aussagen über grundsätzliche Up- oder Down-Regulation von Molekülen während des Metastasierungsprozesses nicht zu. So wird zum Beispiel im dem einen Tumor (ID6) das E-Cadherin in der Metastase in ähnlicher Höhe exprimiert (in 2 Regionen leicht höher, in einer Region leicht niedriger), in dem anderen Tumor (ID11) ist das E-Cadherin in der Metastase fast verdoppelt. Auch die anderen Marker verhalten sich in dieser Weise. Wahrscheinlich wird die Regulation der Expression von Oberflächenmolekülen von extrinsischen Faktoren wie z.B. Zytokinen oder Entzündungsmediatoren wesentlich mitbestimmt.

6.1.1 Heterogenität von DNA-Index, 2cDI und 5c-Exceeding-Rate

6.1.1.1 DNA-Index und Stammzelllinie

In jedem der 20 untersuchten Tumoren sind mindestens 2 Stammzelllinien nachweisbar, was die Annahme der Stammzelllinien-Heterogenität nach der Definition von PETERSEN et al. und anderen Autoren unterstützt (Petersen et al. 1978, Mahmood et al. 1998, El-Naggar et al. 1992, Slootweg et al. 1993).

MAHMOOD et al. untersuchen 30 HNSCC (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) und können nur bei 30% der Tumoren eine intratumorale Heterogenität feststellen (Mahmood et al. 1998), wobei die Autoren aber nur jeweils 2 Regionen innerhalb der Tumoren untersuchen. Da es sich jedoch im Rahmen der

vorliegenden Untersuchung zeigt, daß gleiche Stammzelllinien in 2 oder 3 Regionen des Primärtumors nachweisbar sein können, liegt die Vermutung nahe, daß die Autoren eigentlich heterogene Tumoren als homogen einschätzen. SASAKI et al. untersuchen 23 Plattenepithelkarzinome des Ösophagus in jeweils 7-11 Regionen. Bei 10 der untersuchten Tumoren (43,5%) können die Autoren eine intratumorale Heterogenität nachweisen (Sasaki et al. 1991). Die gleichen Autoren untersuchen in einer weiteren Studie mehrere Regionen aus Transitionalzell-Karzinomen der Blase. Dort können sie in 7 von 9 Fällen eine Stammzelllinien-Heterogenität nachweisen (Sasaki et al. 1992). Auch viele andere Studien berichten über eine beobachtete intratumorale Heterogenität (Jacob et al. 1996, Tylor et al. 1991, Koha et al. 1992, Nguyen et al. 1992).

Heterogenität ist somit ein wichtiges tumorbiologisches, aber auch klinisches Kriterium: Diagnostik und Therapie heterogener Tumoren werden durch eine intratumorale Heterogenität erschwert. Die diagnostische Einschätzung der Tumoren wird verfälscht, wenn nur eine einzelne Region betrachtet wird. So können möglicherweise aggressive Areale übersehen werden. Die Therapie heterogener Tumoren ist dadurch erschwert, daß unterschiedliche Zellklone innerhalb der Tumoren unterschiedlich auf Chemo- und Strahlentherapie ansprechen, was den Erfolg der Therapie herabsetzen kann (Mahmood et al. 1998).

6.1.1.2 2cDI und 5c-Exceeding-Rate

2cDI und 5c-Exceeding-Rate sind klinisch relevante Parameter (Böcking et al. 1990). Der 2cDI ist die Standardabweichung des normalen Chromatingehalts 2c, die 5c-Exceeding-Rate der prozentuale Anteil an Zellen mit einem aneuploiden DNA-Gehalt $>5c$.

Viele Studien zeigen, daß diese Parameter eine Einschätzung der Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes bezüglich des Risikos einer Lymphknotenmetastasierung (Rubio et al. 1998), sowie allgemein der Aggressivität und Prognose erlauben (Hemmer et al. 1999). Andere Studien erarbeiten konträre Ergebnisse (Baretton et al. 1995).

Die Untersuchung der einzelnen Regionen zeigt in der vorliegenden Untersuchung deutlich unterschiedliche Werte für diese Parameter innerhalb der Tumoren. Die Range-Werte für diese Marker variieren für den 2cDI von 1,45 bis 24,47, für die 5c-Exceeding-Rate von 3,08% bis 32,61%. Die Ursache dafür liegt erstens in der Existenz unterschiedlicher Stammzelllinien in den Einzelregionen, zweitens in der Anfälligkeit des 2cDI für Ausreißer, d.h. Zellen mit sehr hohem DNA-Gehalt beeinflussen diesen Wert überproportional, weil die Differenzen vom normalen 2c ins Quadrat genommen werden. Modalwert und DNA-Index werden von solchen Ausreißern kaum beeinflusst, so können 2 Regionen denselben Modalwert und DNA-Index haben, aber völlig verschiedene 2cDI und auch 5c-Exceeding-Rates (vgl. Kapitel 3.8).

Hier wird deutlich, daß eine zuverlässige Einschätzung eines Tumors nicht durch die Messung nur einer Region gewährleistet sein kann. Auch die Untersuchung einer großen Region innerhalb eines Tumors bietet wenig Vorteile, weil eventuell kleine aggressive Areale diese Parameter aufgrund der großen Zellzahl kaum verändern.

Die Wahrscheinlichkeit, Areale mit hohen 2cDI und 5c-Exceeding-Rates zu übersehen, kann nur durch ein „Multisampling“, d.h. der Untersuchung mehrerer Einzelregionen verringert werden. Durch maximal hohe Probenentnahmen könnte ein Tumor theoretisch völlig DNA-zytometrisch „gescannt“ werden. So würden zwar theoretisch alle malignen Regionen mit hohen DNA-Indizes erfaßt werden, dies ist jedoch im klinischen Alltag aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes nicht praktikabel. Um den Einsatz dieser Parameter zu optimieren, sollten also so viele Einzelregionen wie möglich untersucht werden.

6.1.2 Heterogenität der CD44v4/5 und v6-Expression

Die CD44 Splicevarianten v4/5 und v6 zeigen eine deutliche intratumorale Variabilität der Expression. Dieses Ergebnis läßt eine biologische Heterogenität bezüglich der Expression dieser Moleküle innerhalb der untersuchten Tumoren vermuten. Die biologische Heterogenität überrascht nicht, da in der vorliegenden Arbeit mit der DNA-Zytometrie mehrere Zelllinien in einem Tumor nachgewiesen werden können. Diese Zelllinien unterscheiden sich neben dem unterschiedlichen DNA-Gehalt der Tumorzellen auch in ihrem Expressionsverhalten für die untersuchten Oberflächenmoleküle, und selbst stammzelliniengleiche Regionen variieren in den Expressionsleveln der Moleküle. Für das E-Cadherin wird bei SCHIPPER et al. auf eine variable Expression innerhalb der Tumoren hingewiesen (Schipper et al. 1991). Über die Heterogenität der Expression von CD44v4/5 und v6 gibt es bisher in der gesichteten Literatur kaum Hinweise, lediglich HUDSON et al. berichten über fokale Unterschiede in der Expression von CD44v4/5 und v6 (Hudson et al. 1996) und OSTWALD et al. berichten über eine intensivere Expression für CD44v5 (und v6) in der Peripherie von Larynxkarzinomen (Ostwald et al. 1997). In den meisten Studien wird jedoch den Tumoren je ein Expressionswert zugeordnet (Tepfler et al. 1996b, Regidor et al. 1996, Herrlich et al. 1995, Piffko et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit zeigen sich erhebliche Unterschiede in der Expression des CD44v4/5 und v6 zwischen den einzelnen Regionen. Die Range-Werte des CD44v4/5 streuten bei den 20 Tumoren von 0 bis 88 (Median:33), die des CD44v6 von 0 bis 100 (Median: 34,5).

Die Konsequenz hieraus ist, daß die biologische Heterogenität der Tumorregionen mit der Untersuchung mehrerer Regionen eines Tumors bedacht werden muß. Dieses Vorgehen hat mehrere Vorteile: Erstens kann mit dem ermittelten Range die Heterogenität des Markers aufgedeckt werden, zweitens werden Regionen mit minimaler bzw. maximaler Expression erkannt. Durch die Bestimmung eines Durchschnittswertes für die Expression innerhalb eines Gesamttumors gehen solche Informationen verloren.

6.1.3 Heterogenität der E-Cadherin-Expression

Die Range-Werte für E-Cadherin schwanken von 4 bis 86 (Median: 37,5). Dies bedeutet, daß auch für die E-Cadherin-Expression kein eindeutiger Wert für den Primärtumor angegeben werden kann, obwohl in vielen Untersuchungen ein Wert

pro Tumor ermittelt wird (Schorsch et al. 1995, Koseki et al. 1999, Inada et al. 1999).

SCHIPPER et al. weisen in ihrer Untersuchung über die E-Cadherin-Expression in HNSCC unter anderem auf die beobachtete Heterogenität der E-Cadherin-Expression innerhalb eines Tumors hin (Schipper et al. 1991). Auch eine zweite Arbeit von SCHIPPER et al. berichtet von einem heterogenen Expressionsmuster: „In many cases it was difficult to evaluate the expression level of E-cadherin. For example in cases, in which we have assessed the tumour with a high E-cadherin expression we also found small tissue areas with low expression levels [...]. Possibly the expression analysis of a sample of another portion of the same tumour would show another result“ (Schipper et al. 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen somit im Einklang mit der Beobachtung von SCHIPPER et al.

6.1.4 Heterogenität der Integrin $\alpha v \beta 3$ -Expression (CD51 und CD61)

Auch bei den untersuchten Integrinketten αv und $\beta 3$ kann eine heterogene Expression innerhalb der Tumoren nachgewiesen werden. Die Range-Werte für das αv streuen von 0 bis 88, wobei der Median 10 beträgt, die Range-Werte für das $\beta 3$ streuen von 0 bis 18 mit einem Median von 5. Häufig kann keine Expression nachgewiesen werden. Auch PELTONEN et al. und JONES et al. weisen auf variable Zonen der Integrin-Expression innerhalb von Plattenepithelkarzinomen hin (Peltonen et al. 1989, Jones et al. 1993).

Das Integrin $\alpha v \beta 3$ wird vor allem beim malignen Melanom in Verbindung mit Metastasierung gebracht. Beim Plattenepithelkarzinom des Oropharynx könnte die Präsenz dieses Molekül im Prozeß der Metastasierung eine Rolle spielen. Regionen mit hoher Expression zu erkennen ist deshalb wichtig, weil diese für eine Metastasierung maßgeblich verantwortlich sein können. Somit wird der klinische Wert des Nachweises der $\alpha v \beta 3$ -Expression entscheidend durch die Untersuchung mehrerer Regionen beeinflusst.

6.1.5 Heterogenität der Tumorfrontmorphologie

Die Range-Werte für die Tumorfrontmorphologie betragen zwischen 0 und 3 (Median: 1). Hier zeigt sich auch eine intratumorale Heterogenität, wobei die

Tumorfronteinteilungen in 9 von 20 Fällen ± 1 Gradeinteilung im selben Tumor abweichen, bei einem Tumor um 2 Gradeinteilungen, und 2 der Tumoren zeigen Regionen mit Grad 1 und gleichzeitig mit Grad 4. Bei 8 der Tumoren sind die einzelnen Regionen jedoch identisch.

Die Tumorfrontmorphologie zeigt zwar ein heterogenes Bild, jedoch sind 40% der Tumoren homogen bezüglich der Tumorfront. Dieser Marker ist somit unter den untersuchten Parametern der Konstanteste. Es muß jedoch auf die Klasseneinteilung in 4 Grade hingewiesen werden, die letztlich eine relativ grobe Einteilung ist. Trotzdem zeigen diese 8 bezüglich der Tumorfrontmorphologie homogenen Tumoren, daß sich das histologische Bild in einem heterogenen Tumor weniger und wahrscheinlich langsamer verändert, als es an den anderen Parametern gezeigt werden kann. Dies bedeutet, daß die Einschätzung der Tumorfrontmorphologie innerhalb eines Tumors nicht so deutlich an die Untersuchung mehrerer Regionen gebunden ist, wie es bei den anderen Untersuchungen der Fall ist. In der gesichteten Literatur gibt es kaum Hinweise zur Heterogenität der Tumorfrontmorphologie. Lediglich JACOB et al. können eine intratumorale Heterogenität bezüglich des Tumorfrontgradings feststellen (Jacob et al. 1996).

6.1.6 Heterogenität der Gefäßdichte

Die Range-Werte der Gefäßauszählungen schwanken zwischen 0,4 und 3,7 (Median: 1,4). Der höchste gemessene Gefäßdichte-Wert der 20 Tumoren beträgt 4,2 Gefäße/HPF. Damit stellt sich die Gefäßdichte als heterogener Parameter dar. Auch die Untersuchung stammliniengleicher Regionen zeigt, daß diese Regionen unterschiedliche Gefäßdichten aufweisen (ID2: 2,0; 2,0; 0,6 (Range = 1,4), ID6: 2,0; 2,2; 1,0 (Range = 1,2) (Meßeinheit: Gefäße/HPF)).

SCHOR et al. untersuchen mehrere Proben aus Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinomen und finden eine deutlich heterogene Gefäßverteilung (Schor et al. 1998). Auch PENFOLD et al. berichten über eine heterogene Verteilung, wobei die höchsten Werte am Tumorrand gefunden werden (Penfold et al. 1996). In vielen anderen Arbeiten wird die sogenannte „Average microvascular Density“ (=a-MVD) benutzt, die die durchschnittliche Gefäßdichte angibt und die „Highest microvascular Density“ (=h-MVD), oder auch „hot spot“, die die höchste gefundene Gefäßdichte angibt (Chandrachud et al. 1997, Schor et al. 1998).

Diese Heterogenität mag auch ein Grund für die konträren Ergebnisse sein, die zu diesem Thema bisher erschienen sind (Schor et al. 1998). So können viele Studien an verschiedenen Tumorarten zeigen, daß hohe Gefäßdichten eine

schlechte Prognose bedeuten (Weidner et al. 1991, Horak et al. 1992, Williams et al. 1994). Andere Studien können jedoch nachweisen, daß hohe Gefäßdichten eine gute Prognose für die Patienten bedeutet (Kainz et al. 1995, Zatterström et al. 1995).

Die heterogene Gefäßdichte der hier untersuchten Tumoren und die konträren Ergebnisse bisheriger Studien schränken die klinische Verwertbarkeit dieses Markers möglicherweise ein.

6.2 Tumorbiologische Parameter:

6.2.1 DNA-Zytometrie: 2cDI und 5c-Exceeding-Rate

Zahlreiche Studien ergeben, daß anhand der DNA-Indizes das Risiko der Lymphknotenmetastasierung abgeschätzt werden kann (Rubio et al. 1998, Welkoborsky et al. 1993, Chen et al. 1993, Mahmood et al. 1995, Goldsmith et al. 1987), ferner Anhaltspunkte für Aggressivität und Prognose (Hemmer et al. 1999, Schimming et al. 1998, Melchiorri et al. 1996, Struikmans et al. 1998) bei vielen verschiedenen Tumorarten, und speziell auch beim Plattenepithelkarzinom des oberen Aerodigestivtraktes erhalten werden können. Auch Korrelationen mit dem T-Stadium des TNM-Systems werden häufig beschrieben (Schimming et al. 1998, Schimming et al. 1997, Balsara et al. 1994). Demgegenüber ergeben andere Studien keine Korrelationen zwischen der DNA-Ploidie und Lymphknotenmetastasierung bzw. Überlebenszeit und Rezidivfreiheit (Baretton et al. 1995, Saito et al. 1994, King et al. 1995, Epp et al. 1996) und T-Stadium (Syms et al. 1995, Wang et al. 1990, Ensley et al. 1989, Lee et al. 1993 (Magen-Ca), Carp et al. 1992 (Nicht-Kleinzelliges Bronchial-Karzinom)).

Zur DNA-Analyse bei soliden Karzinomen wird häufig das Verfahren der Flow-Zytometrie benutzt, in dieser Arbeit wird die Image-Zytometrie angewandt. Der Vergleich der beiden Verfahren wird kontrovers beurteilt, jedoch wird von vielen Autoren die Image-Zytometrie als die aussagekräftigere Meßmethode angesehen (Bloyet et al. 1999, Alanen et al. 1998, Sarker et al. 1997, Faranda et al. 1997), wobei meist darauf hingewiesen wird, daß die Image-Zytometrie den Vorteil hat, Artefakte, Zelldedritus und benigne Zellen, wie z.B. die häufig vorkommenden Leukozyten oder Fibrozyten von der Messung auszuschließen (Yasuda et al. 1993). Die Tendenz geht dahin, daß die Flow-Zytometrie eher zu niedrige, die Image Zytometrie eher zu hohe DNA-Indizes bestimmt (Gandour-Edwards et al. 1994).

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumoren hängen die DNA-Indizes (Mittelwert, Minima, Maxima und Range) nicht mit dem T-Stadium zusammen (pT und klinisches T-Stadium). Dies steht im Einklang mit zahlreichen Studien, die ebenfalls keinen Zusammenhang von DNA-Indizes und T-Stadium finden können (Syms et al. 1995, Ensley et al. 1989, Wang et al. 1990).

Auch zwischen Überlebenszeit bzw. Rezidivfreiheit im beobachteten Zeitintervall ergibt sich kein statistischer Zusammenhang zu den DNA-Indizes. WELKOBORSKY et al. können jedoch eine Prognoserelevanz der DNA-Indizes bei HNSCC bzw. Mundhöhlenkarzinomen feststellen (Welkoborsky et al. 1998 und 1999). Das relativ kleine Patienten-Kollektiv und der z.T. kurze Beobachtungszeitraum der

vorliegenden Untersuchung können Ursachen für die eingeschränkte Prognoseaussage sein. Jedoch wird die fehlende Prognoserelevanz der DNA-Indizes durch die Ergebnisse von BARETTON et al. bestätigt, die HNSCC aus unterschiedlichen Regionen untersuchen, außerdem die Ergebnisse von SAITO et al. (Zungenkarzinome), SYMS et al. (Oropharynxkarzinome und Mundhöhlenkarzinome), BELTRAMI et al. (Mundhöhlenkarzinome) und KING et al. (Mundhöhlen- und Zungengrundkarzinome (Saito et al. 1994, Baretton et al. 1995, Syms et al. 1995, Beltrami et al 1992, King et al. 1995).

Hinsichtlich der Gruppierung der Tumoren in N(+) und N(0) ergibt sich, daß die Minima der 2cDI und 5c-Exceeding-Rate der Primärtumoren in den N(+)Tumoren auffällig höher sind, Mittelwerte und Maxima dagegen nicht. Höhere DNA-Indizes in N(+)-Tumoren werden von vielen Autoren veröffentlicht (Welkoborsky et al. 2000 und 1993, Rubio et al. 1998, Schimming et al. 1998, Chen et al. 1993, Mahmood et al.1995), zur genauen Differenzierung in Minima, Mittelwert und Maxima gibt es in der gesichteten Literatur jedoch bisher keine Erfahrungen.

Die DNA-Indizes der Metastasen liegen statistisch auffällig höher als die Mittelwerte und Minima der Primärtumoren, jedoch nicht grundsätzlich höher als die Maxima der DNA-Indizes innerhalb der Primärtumoren. Es scheint jedoch ein Trend zur Aneuploidisierung in Lymphknotenmetastasen zu bestehen, was von den Ergebnissen von WELKOBORSKY et al. unterstützt wird (Welkoborsky et al. 2000 und 1993). Diese Autoren können neben erhöhten DNA-Indizes gehäufte chromosomale Alterationen in Lymphknotenmetastasen nachweisen.

Das Auffinden des definitiven Metastasierungsursprungs ist nicht möglich. Es können jedoch grundsätzliche Überlegungen angestellt werden:

Geht man von einer Metastasierung aus metastasengleichen Stammzelllinien des Primärtumors aus, so kann man von einer grundsätzlichen Aneuploidisierung in den Metastasen ausgehen: In allen drei Primärtumor-Metastase-Paaren mit stammzelliniengleichen Regionen können erhöhte DNA-Indizes in den Metastasen festgestellt werden (Vgl. Kap. 4.11 und 5.1). In zwei der drei Fälle (ID6 und ID11) befinden sich die Maxima der DNA-Indizes nicht in denjenigen Regionen, die identische Stammzelllinien wie die Metastasen haben. Bei Annahme der Metastasierung aus diesen stammzelliniengleichen Regionen wäre somit eine Metastasierung aus den Maxima der DNA-Indizes wenig wahrscheinlich. Außerdem könnte hierdurch erklärt werden, warum die Primärtumor-Maxima von den Metastasenwerten nicht grundsätzlich überragt werden.

Zur Metastasierung von Tumorzellen sind zahlreiche Einzelschritte in einer insgesamt komplexen Kaskade notwendig (Albeda S. M. 1993). Eine Tumorzelle muß neben beschleunigter Zellteilung eine sehr spezifische Fähigkeit zur Zell-Zell

und Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktion haben. Möglicherweise hat eine Tumorzelle, deren DNA-Gehalt zwar erhöht ist, das Genom aber noch ausreichend organisiert ist, im Prozeß der Metastasierung einen Selektionsvorteil. So könnte es zu einer Metastasierung aus Regionen mäßig erhöhter DNA-Indizes innerhalb der Primärtumoren kommen.

Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß sich die metastasierenden Tumorzellen auf ihrem Weg verändern und differente Subklone entwickeln, die andere Eigenschaften als ihre „Mutterzellen“ haben. Durch eine solche Evolution könnte der Metastasierungsursprung versteckt bleiben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die DNA-zytometrische Messung durch eine Untersuchung mehrerer Regionen ergänzt werden muß. Ohne diese Ergänzung bleiben Regionen extremer DNA-Indizes verborgen. Außerdem werden heterogene Tumoren nicht erkannt. Auch die Unterscheidung von N(0) und N(+)-Tumoren anhand zytometrischer Daten ist nur durch die Entnahme mehrerer Proben und durch die Betrachtung der Minima möglich.

Im Rahmen der Gesamtkorrelation zwischen den biologischen Parametern der einzelnen Regionen der Tumoren ergeben sich statistische Abhängigkeiten zwischen den DNA-Indizes und den anderen Parametern:

Es ergibt sich eine positive Korrelation zwischen der Höhe der CD44v4/5-Expression und den DNA-Indizes. Mit steigender Aneuploidisierung wird das CD44v4/5 vermehrt exprimiert. Möglich wäre eine vermehrte und ungehemmte Expression dieses Moleküls im zunehmenden „Chromatin-Chaos“ der Aneuploidie. Erstaunlich ist aber die Tatsache, daß bei isolierter Betrachtung der N(+)-Tumoren keine solche Korrelation nachgewiesen werden kann. Eine Erklärung hierfür muß derzeit offen bleiben. Arbeiten zu diesem Thema finden sich in der gesichteten Literatur nicht.

Die Korrelationen der DNA-Indizes mit E-Cadherin sind ebenfalls auffällig. Überraschenderweise scheint die 5c-Exceeding-Rate enger mit der Expression dieses Moleküls zusammenzuhängen, denn in der Gesamtgruppe (N(0) und N(+)) zeigt sich ein inverser Zusammenhang zwischen 5c-Exceeding-Rate und Höhe der E-Cadherin-Expression. Der 2cDI und das E-Cadherin zeigen nur in der N(+) Gruppe eine umgekehrte Abhängigkeit. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür ist die relativ niedrige Fallzahl der N(0)-Tumoren, so daß trotzdem ein grundsätzlicher Trend für ein vermindertes E-Cadherin bei steigenden DNA-Indizes vermutet werden kann.

Ähnliche Ergebnisse, jedoch mit dem Vorbehalt, daß dort Adenokarzinome untersucht wurden, veröffentlichten ROSS et al. Sie untersuchen Prostatakarzinome und finden einen inversen Zusammenhang zwischen Tumor-Ploidie und E-

Cadherin-Expression (Ross et al. 1994). Dagegen zeigen LIPPONEN et al., daß in den untersuchten Mammakarzinomen kein Zusammenhang zwischen DNA-Ploidie und E-Cadherin-Expression besteht (Lipponen et al. 1994).

Hinsichtlich der Gefäßzahl finden sich positive Abhängigkeiten, jedoch nicht einheitlich für beide DNA-Indizes. Über die Gefäßzahl in Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes sind Studien erschienen, die eine erhöhte Gefäßdichte mit Tumorprogression und Prognose in Zusammenhang bringen (Pazouki et al. 1997, Ravazoula et al. 1996), andere jedoch lehnen einen solchen Zusammenhang ab (Chandrachud et al. 1997, Moriyama et al. 1997). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung kann aber geschlossen werden, daß die Gefäßdichte mit steigenden DNA-Indizes abnimmt (Ausnahme: In der N(+)-Gruppe ergibt sich kein statistischer Zusammenhang von 2cDI und Gefäßzahl).

Die Korrelationen zwischen den DNA-Indizes und der Expression der Integrinkette $\beta 3$ erscheinen komplex. In der N(+)-Gruppe und in den untersuchten Metastasen ergibt sich eine inverse Beziehung zwischen 2cDI und $\beta 3$ -Expression, in der N(0)-Gruppe eine positive Abhängigkeit zwischen der 5c-Exceeding-Rate und $\beta 3$ -Expression. Diese Ergebnisse bedürfen weiterer Klärung.

Auffallend ist auch die positive Korrelation von 2cDI und der CD44v6-Expression in den Metastasen, wobei es in den N(0) und N(+)-Tumoren keine Abhängigkeiten gibt. Diese Korrelation ist aber nur grenzwertig statistisch auffällig, und es besteht auch kein Zusammenhang mit der 5c-Exceeding-Rate, obwohl 2cDI und 5c-Exceeding-Rate eng miteinander verknüpft sind. Möglicherweise ist das eine Folge der geringen Zahl der untersuchten Tumoren.

Zwischen den DNA-Indizes, Tumorfrontmorphologie und Expression der Integrinkette αv können keine statistische Abhängigkeiten gefunden werden.

6.2.2 Expression von CD44v4/5 und v6

Das CD44 ist ein multistrukturelles und multifunktionales Oberflächenmolekül, das in Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen involviert ist. Lymphozyten-Homing, Präsentation von Chemokinen und Wachstumsfaktoren, Transmission von Wachstumsfaktoren, Aufnahme und Degradierung von Hyaluronat in Zellen, Transduktion von Signalen, die Hämatopoese und Apoptose steuern, sind Vorgänge, die mit dem CD44-Molekül und dessen Varianten in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus scheint die Expression verschiedener varianter CD44 und Standard CD44 auf malignen Tumorzellen im Zusammenhang mit Tumorprogression zu stehen (Naot et al. 1997).

6.2.2.1 CD44v4/5

Die benutzte Färbung erfaßt die zwei Splicevarianten v4 und v5. Auch bei Vorhandensein nur einer der Varianten ist die verwendete Färbung positiv. Dies ist ein Nachteil, doch waren zu Beginn dieser Arbeit keine getrennten Antikörper für CD44v4 und v5 auf dem Markt verfügbar.

Vor allem das CD44v5 wird bei zahlreichen soliden Tumoren mit den Eigenschaften der Malignität in Verbindung gebracht (Regidor et al. 1996, Kainz et al. 1996 Herrlich et al. 1995). Über das v4 liegen weniger Studien vor und diese weisen eher auf eine untergeordnete Rolle des Exons v4 bei der Progression von Tumoren hin. Bei den Tumoren aus dem oberen Aerodigestivtrakt zeigen FOX et al., HEROLD-MENDE et al., sowie PIFFKO et al., daß die Splicevarianten v4/5 und v6 schon von normaler oraler Mukosa exprimiert werden (Fox et al. 1994, Herold-Mende et al. 1996, Piffko et al. 1996), und daß CD44v5 und v6 während der Tumorentwicklung von normalem oralen Plattenepithel zu dysplastischem Plattenepithel und Plattenepithelkarzinomen, sowie in Lymphknotenmetastasen dieser Karzinome unverändert stark exprimiert wird (Piffko et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, daß die metastasierenden Tumoren N(+) im Vergleich zu den N(0)-Tumoren höhere Werte für Mittelwert, Maximum und Minimum (hier statistisch grenzwertig) der CD44v4/5-Expression aufweisen. Ein solches Ergebnis ist bisher für die Plattenepithelkarzinome des Oropharynx oder der angrenzenden Lokalisationen nicht beschrieben worden. Es steht auch im Widerspruch zu den Ergebnissen von OLIVEIRA et al., die die CD44v4/5-Expression in N(+) und N(0)-Plattenepithelkarzinome aus der Mundhöhle untersuchen und keinen Unterschied in den beiden Gruppen finden können (Oliveira et al. 1998). Diese Autoren untersuchen jedoch ausschließlich Plattenepithelkarzinome aus Mundhöhle und Zunge, nicht aber des Oropharynx.

Dies könnte ein Grund für die konträren Ergebnisse sein. Auch OSTWALD et al. können in Larynxkarzinomen mit und ohne Metastasen keine Unterschiede in der CD44v5-Expression feststellen (Ostwald et al. 1997). Aber auch hier stellt sich die Frage, ob die unterschiedliche Lokalisation einen direkten Vergleich mit den Oropharynx Tumoren erlaubt.

Außerdem können OLIVEIRA et al. eine Reduktion CD44v4/5-Expression in den korrespondierenden Metastasen feststellen (Oliveira et al. 1998). PIFFKO et al. weisen jedoch auf eine unverändert starke Expression des CD44v5 in den Lymphknotenmetastasen hin. In der vorliegenden Arbeit erbringt der Vergleich der CD44v4/5-Expression in den Primärtumorregionen mit der Expression in den Metastasen keinen statistischen Zusammenhang.

Zwischen der CD44v4/5-Expression und den T-Stadien (pT und klinisches T-Stadium) kann kein Zusammenhang hergestellt werden. Eine Ausnahme sind die Minima der CD44v4/5-Expression. Diese Werte sind mit steigendem pT-Stadium erhöht, jedoch besteht keine Abhängigkeit zu den klinischen T-Stadien. Diese Ergebnisse stellen neue Erkenntnisse für die Oropharynxkarzinome dar. Für andere solide Tumoren werden ähnliche Ergebnisse gezeigt: REGIDOR et al. untersuchen die CD44v4/5 und v6- Expression in Mammakarzinomen. Sie können nachweisen, daß CD44v4/5 und v6 in T3- und T4-Tumoren im Vergleich zu T1- und T2-Tumoren vermehrt exprimiert wird (Regidor et al. 1996).

Der Range des CD44v4/5 ist im Vergleich von N(0) und N(+)-Tumoren nicht signifikant unterschiedlich, die Expression ist gleich heterogen. Gezielte Untersuchungen zur Heterogenität der CD44v4/5-Expression sind bisher noch nicht durchgeführt worden. Lediglich einige Autoren beschreiben regionale Unterschiede in der Expression innerhalb der untersuchten Tumoren (Hudson et al. 1996, Ostwald et al. 1997).

Zwischen der Expression von CD44v4/5 und Überlebenszeit respektive Rezidivfreiheit im beobachteten Zeitintervall kann kein Zusammenhang hergestellt werden. Für Oropharynxkarzinome liegen bisher zur Prognoserelevanz des CD44v4/5 keine Studien vor. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ähneln jedoch denjenigen von BEHAM-SCHMID et al., die Hodgkin-Lymphome untersuchen, und für das CD44v5 keine Prognoserelevanz feststellen können (Beham-Schmid et al. 1998), und den Ergebnissen von TEMPFER et al., die für das CD44v5 beim Plattenepithelkarzinom der Vulva keine Prognoserelevanz finden können (Tempfer et al. 1996). Für das Mammakarzinom zeigen TEPFLER et al. jedoch, daß die 5-Jahres-Überlebensrate der Patientinnen von der Expression von CD44v5 abhängt (positiv für v5: 71% 5-Jahres-Überlebens-Rate, negativ für v5: 86% 5-Jahres-

Überlebens-Rate) (Tepfler et al. 1996b). Diese Ergebnisse sind aber nicht direkt mit den Plattenepithelkarzinomen vergleichbar .

Die Gegenüberstellung metastasengleicher Stammlinien im Primärtumor mit den Metastasen ergibt, daß Regionen mit metastasengleicher Stammzelllinie selbst untereinander heterogene Ergebnisse zeigen. Die Expression in den drei Regionen metastasengleicher Stammzelllinien im Tumor ID6 zeigen Expressionsraten von 22%, 57% und 34%, der Metastasenwert ist 40%. In Tumor ID 11, bei dem nur eine metastasengleiche Stammzelllinie im Primärtumor vorhanden ist, sind diese Region und sämtliche anderen Regionen negativ für CD44v4/5, der Metastasenwert ist 85%.

Diese Beobachtungen an den 2 Tumoren ID6 und ID11 unterstützen die These der heterogenen Expression des CD44v4/5 und den fehlenden Zusammenhang zwischen Metastase und Primärtumor in Bezug auf die Expression dieses Moleküls. Hinsichtlich der Gesamtkorrelationen ergibt sich Folgendes:

Auffallend ist die positive Korrelation der CD44v4/5-Expression mit der Expression der beiden untersuchten Integrinketten αv und $\beta 3$. In allen drei Gruppen zeigt sich hier ein statistisch auffälliger p-Wert mit Ausnahme der $\beta 3$ -Expression in der N(+)-Gruppe. Hier zeigt sich lediglich ein grenzwertiges Ergebnis. Außerdem liegt zwischen der CD44v4/5-Expression und der $\beta 3$ -Expression in den Metastasen keine statistische Auffälligkeit vor.

Sowohl für die CD44v4/5-Expression, als auch für die Expression der Integrinketten αv und $\beta 3$ wird ein statistisch auffälliger Unterschied zwischen den N(0) und N(+)-Tumoren beobachtet. Über die Expression dieser drei Moleküle in Oropharynxkarzinomen und deren mögliches Zusammenspiel liegen in der Literatur keine Erfahrungen vor. Es ist aber zu vermuten, daß die Expression dieser Oberflächenmoleküle die Biologie der Tumoren entscheidend beeinflusst. Zu diskutieren ist, ob die parallele Expression des CD44v4/5 und der Integrinketten eine Bedeutung im Vorgang der Metastasierung hat. Voraussetzung für eine solche Schlußfolgerung ist jedoch die Annahme, daß diese Gesamtkorrelationen und die daraus berechneten p-Werte nur dann berechtigt sind, wenn die untersuchten Tumorregionen als eigenständige Tumoren angesehen werden.

Die positiven Korrelationen der CD44v4/5-Expression und der E-Cadherin-Expression in der Gesamtgruppe und in den Metastasen sind auffallend.

Die N(+)-Tumoren exprimieren erhöhte Level an E-Cadherin. Die berechneten Werte aus den Primärtumoren zeigen, daß die Patienten mit verminderter E-Cadherin Expression ein höheres Rezidivrisiko haben. Es wäre möglich, daß die Tumorzellen beide Moleküle parallel hochregulieren, wobei möglicherweise das E-

Cadherin defekt und nicht funktionsfähig ist. Über den Vergleich der Expression dieser beiden Moleküle in Oropharynxkarzinomen liegen bisher in der gesichteten Literatur keine Erfahrungen vor.

6.2.2.2 CD44v6

Ein möglicher Zusammenhang zwischen CD44v6-Expression und Metastasierung von Tumoren verdeutlicht die Veröffentlichung von GÜNTHERT et al., die das CD44v6 als für die Metastasierung verantwortliches Molekül ansehen: In ihrem Versuch zeigt eine lokal wachsende, nichtmetastasierende Zelllinie aus Pankreasgewebe einer Ratte nach Transfektion von cDNA von Exon v4 bis v7 metastasierendes Verhalten, welches durch einen Antikörper gegen v6 wieder geblockt werden kann (Günthert et al. 1991). MIYOSHI et al. zeigen, daß Lymphknotenmetastasen-positive Nicht-Kleinzellige Lungenkarzinome signifikant mehr v6 exprimieren (Miyoshi et al. 1997). Für das Magenkarzinom wird von KUROZUMI et al. gezeigt, daß die Expression von CD44v6 und Metastasenbildung zusammenhängen (Kurozumi et al. 1998). Diese Studien lassen einen Zusammenhang der Expression des CD44v6 und der Metastasierung in den genannten Tumorentitäten vermuten.

Wie das CD44v4/5 wird das CD44v6 von normaler oraler Mukosa (Van-Hal et al. 1999, Herold-Mende et al. 1996, Piffko et al. 1996), sowie von Plattenepithelien aus Epidermis, Ösophagus, und Bronchien exprimiert (Fox et al. 1994). Die Expression von CD44v6 in normaler Mukosa, dysplastischen Läsionen, Plattenepithelkarzinomen und ihren Metastasen ist unverändert positiv (Piffko et al. 1996). Einige Studien berichten sogar über den Verlust der CD44v6-Expression während der Dedifferenzierung von Tumoren im Vergleich zu normaler Mukosa (Salmi et al. 1993, Hudson et al. 1996, Kunishi et al. 1997, Soukka, T. 1997, Kanke et al. 2000). Die CD44v6-Expression hat bei den Plattenepithelkarzinomen demnach möglicherweise weniger Relevanz in Bezug auf Tumorprogression und Metastasierung.

Die Expressionswerte von CD44v6 der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumoren sind insgesamt hoch, was die Ergebnisse von PIFFKO et al. und STOLL et al. unterstützt (Piffko et al. 1996, Stoll et al. 1999). Der Median der Mittelwerte der Expression der Einzelregionen beträgt 86,4 %. Viele Tumorregionen zeigen eine 100-prozentige Positivität für den immunhistochemischen Nachweis der CD44v6-Expression.

Für die N(+)-Tumoren lassen im Vergleich zu den N(0)-Tumoren höhere CD44v6-Mittelwerte nachweisen ($p=0,0544$). Dies würde für eine höhere Expression

dieses Moleküls während der Tumorprogression sprechen, wobei dieses Ergebnis jedoch lediglich statistisch grenzwertig auffällig ist.

Zwischen der Expression von CD44v6 und dem T-Stadium (pT und klinisches T-Stadium) kann kein Zusammenhang hergestellt werden. Studien von PIFFKO et al. und HUDSON et al. unterstützen den fehlenden Zusammenhang zwischen T-Stadien und CD44v6 (Piffko et al. 1996, Hudson et al. 1996).

In einigen Tumorarten wird die Expression von CD44v6 als bedeutsamer Prognoseparameter herausgestellt (AML: Yokota et al. 1998, Plattenepithelkarzinom der Vulva: Tepler et al. 1998, Magenkarzinom: Nihei et al. 1996). Andere Studien beschreiben keine Prognoserelevanz für die CD44v6-Expression (Beham-Schmid et al. 1998 (M.Hodgkin)). An Larynxkarzinomen kann die Downregulation von CD44v6 mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht (Spafford et al. 1996). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, daß Überlebenszeit und Rezidivfreiheit nicht mit der Expression des CD44v6 zusammenhängen. PIFFKO et al. schließen eine Prognoserelevanz des CD44v6 ebenfalls weitgehend aus. Diese Autoren können zeigen, daß bezüglich der Expression des CD44v6 sowohl in normalem Plattenepithel, in dysplastischen Läsionen, wie in Plattenepithelkarzinomen keine Unterschiede bestehen (Piffko et al. 1996).

Die nachgewiesene Heterogenität der CD44v6-Expression, die selbst in stammlinienidentischen Regionen der Tumoren nachgewiesen werden kann, steht im Widerspruch zu den Beobachtungen von PIFFKO et al., die eine homogene Expression dieses Moleküls beschreiben (Piffko et al. 1996). Diese Beobachtung der Heterogenität wird durch die Arbeiten von OSTWALD et al. und HUDSON et al. unterstützt (Ostwald et al. 1997, Hudson et al. 1996). OSTWALD et al. weisen auf eine unterschiedliche Verteilung der CD44v6-Expression innerhalb der untersuchten Larynxkarzinome hin (Ostwald et al. 1997). HUDSON et al. untersuchen normale Mukosa und Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und beschreiben eine regionale Variabilität der CD44v6-Expression in den Tumoren: „In many cases CD44 staining of a tumour was variable, with one area of a tumour being positive and the rest being negative“. Die Autoren finden bei 7 von 11 CD44v6-positiven Karzinomen eine heterogene Expression (Hudson et al. 1996).

Die Range-Werte der CD44v6-Expression zeigen höhere Werte in den N(+)-Tumoren ($p=0,0963$), was ein Indiz für eine heterogene Synthesefähigkeit für CD44v6 in fortgeschrittenen Tumoren ist, wobei dieses Ergebnis lediglich als statistisch grenzwertig zu interpretieren ist. Die Expression von CD44v6 ist in den N(+)-Tumoren im Mittel erhöht, weshalb man in der vorliegenden Untersuchung nicht von einer grundsätzlich verminderten Expression während der

Tumorprogression ausgehen kann, wie sie unter anderem von SALMI et al. beschrieben wird (Salmi et al. 1993).

Die Berechnung der Gesamtkorrelationen ergibt eine negative Korrelation der Expression von CD44v6 und der β 3-Integrinkette in den Metastasen. Hieraus wäre zu schließen, daß die Expression von CD44v6 über eine noch unbekannt inverse Beziehung mit der Expression der β 3-Integrinkette verknüpft ist, die weiterer Verifizierung bedarf. Außerdem kann ein statistisch grenzwertig auffälliger Zusammenhang zwischen CD44v6 und dem 2cDI in den Metastasen nachgewiesen werden. Angaben in der gesichteten Literatur sind hierzu nicht auffindbar.

Darüber hinaus ergeben sich weder mit CD44v4/5, E-Cadherin oder der α v-Integrinkette, noch mit Tumorfrontmorphologie und Gefäßzahl statistisch auffällige Ergebnisse.

Die einzige Studie, die den Zusammenhang zwischen der Expression von CD44v6 und anderen Oberflächenmolekülen untersucht, ist die Arbeit von NANASHIMA et al. Die Autoren prüfen einen Zusammenhang zwischen der CD44v6- und E-Cadherin-Expression in Kolonkarzinom-Gewebe und deren Lebermetastasen, wobei sie keine Abhängigkeit in der Expression dieser beiden Moleküle finden können (Nanashima et al. 1999).

Zusammenfassend scheint das CD44v6 beim Plattenepithelkarzinom des Oropharynxkarzinom als Malignitätsmarker eine untergeordnete Rolle zu spielen. In der vorliegenden Untersuchung gibt es außer einer grenzwertig auffälligen Erhöhung der CD44v6-Expression-Mittelwerte in N(+)-Tumoren und einer grenzwertig statistisch auffälligen Korrelation zwischen 2cDI und CD44v6 in den Metastasen keine weiteren Hinweise, daß dieses Oberflächenmolekül in den Prozeß der Tumorprogression und Metastasierung eingebunden ist. Vielmehr sprechen die Ergebnisse zahlreicher anderer Studien gegen einen solchen Zusammenhang (Piffko et al. 1996, Hudson et al. 1996, Kunishi et al. 1997, Herold-Mende et al. 1996, Stoll et al. 1999).

6.2.3 E-Cadherin-Expression

Der Verlust der E-Cadherin Expression wird mit Dedifferenzierung und Aggressivität in Verbindung gebracht (Schipper et al. 1991, Sorscher et al. 1995, Mattijssen et al. 1993, Andrews et al. 1997, Yokoyama et al. 2001, Wu et al. 2000). Auch das Auftreten von Lymphknotenmetastasen kann mit reduzierter oder fehlender E-Cadherin-Expression korreliert werden (Koseki et al. 1999, Schipper et al. 1994). Die prognostische Bedeutung der Expression dieses Moleküls wird ebenfalls durch viele Studien gezeigt (Mattijssen et al. 1993, Inada et al. 1999, Tamura et al. 1996). Die Studienergebnisse sind aber nicht immer übereinstimmend; so postulieren KINSELLA et al., daß E-Cadherin nur eines von vielen Molekülen ist, die in die Tumorprogression involviert sind. Sie untersuchen Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen der Zunge, die unterschiedliches Expressionsverhalten für E-Cadherin zeigen: Sowohl die E-Cadherin-positiven als auch die E-Cadherin-negativen Zelllinien zeigen invasives Verhalten (Kinsella et al. 1994). Auch MATTIJSEN et al. zeigen, daß die E-Cadherin-Expression in den von ihnen untersuchten 50 HNSCC aus Larynx und Mundhöhle keinen Zusammenhang zum Lymphknotenstatus hat (Mattijssen et al. 1993). Schließlich ergeben die Untersuchungen von ANDREWS et al. an 36 HNSCC, daß die E-Cadherin-Expression nicht mit Lymphknotenstatus, Rezidiv- und Überlebenszeit korreliert (Andrews et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit kann demonstriert werden, daß Maxima und Mittelwerte der E-Cadherin-Expression in der Gruppe der N(+)-Tumoren erhöht sind. Dies steht im Widerspruch zu den Arbeiten von KOSEKI et al. an 55 Plattenepithelkarzinomen der Haut, bei denen die Gruppe der untersuchten N(+)-Tumoren niedrigere E-Cadherin-Level exprimiert (Koseki et al. 1999). Auch SCHIPPER et al. zeigen, daß der Verlust der E-Cadherin-Expression mit höheren Lymphknotenmetastasenraten einhergeht (Schipper et al. 1994). Die Widersprüche der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Literaturangaben werden durch die Studie von BOWIE et al. relativiert, die an HNSCC zwischen der E-Cadherin-Expression und Lymphknotenstatus keine Korrelation herstellen können (Bowie et al. 1993). Auch könnte die kleine Fallzahl an N(0)-Tumoren in der vorliegenden Untersuchung die Ergebnisse verzerren.

Der Vergleich der E-Cadherin-Expression in Primärtumoren und Metastasen ergibt, daß in Metastasen die E-Cadherin-Expression reduziert ist. Der Vergleich der Metastasen-Werte mit Minimum, Maximum und Mittelwert der E-Cadherin-Expression in den Primärtumoren ergibt, daß die metastasierten Zellen kleinere Werte als der Mittelwert des Primärtumors aufweisen und die Maxima der

Primärtumoren über dem Level der Metastasen liegen. Dies bestätigt die Ergebnisse von SORSCHER et al. Diese Autoren finden reduzierte E-Cadherin-Level in den Metastasen (Sorscher et al. 1995). BOWIE et al. finden dagegen bei den untersuchten Lymphknotenmetastasen eine ähnlich hohe E-Cadherin-Expression wie in den Primärtumoren. Diese Autoren teilen die Expression aber lediglich in „positiv“ und „reduziert“ ein (Bowie et al. 1993). SCHIPPER et al. berichten von homogen schwacher Expression in 5 von 15 untersuchten Metastasen, heterogener Expression in 2 von 15, und negativer Expression in 8 von 15 Metastasen (Schipper et al. 1993). Auch die Ergebnisse von SCHIPPER et al. stehen in dieser Hinsicht im Einklang mit der vorliegenden Studie, obwohl diese Autoren die E-Cadherin-Expression in nur wenige Klassen einteilen und ein Vergleich von Primärtumor und Metastase nicht erfolgt.

Die Expression von E-Cadherin in den Metastasen ist zwar im Vergleich zu den Primärtumoren reduziert, der höchste hier gemessene Wert ist jedoch eine positive Expression bei 90% der Tumorzellen. Der Verlust von E-Cadherin scheint demnach keine notwendige Bedingung im Rahmen der Metastasierung zu sein.

Die Range-Werte der E-Cadherin-Expression in den N(+)-Tumoren sind statistisch auffällig erhöht. Angaben in der gesichteten Literatur zu diesem Vergleich finden sich nicht. Lediglich beschreiben SCHIPPER et al. eine heterogene Expression des E-Cadherins innerhalb von HNSCC (Schipper et al. 1991, Schipper et al. 1994).

Die Korrelationen der E-Cadherin-Expressions-Werte (Mittelwert, Minima, Maxima und Range) mit pT und dem klinischen T-Stadium zeigen, daß positive Korrelationen zwischen pT-Stadium und Mittelwert, Minimum, Maximum und Range der E-Cadherin-Expression, sowie positive Korrelationen zwischen klinischem T-Stadium und Mittelwert und Maximum der E-Cadherin-Expression bestehen. Das heißt, daß mit steigender TumorgroÙe auch die E-Cadherin-Expression ansteigt. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu einigen Studien in der Literatur, in denen entweder eine inverse Korrelation zwischen E-Cadherin-Expression und TumorgroÙe nachgewiesen wird (Yamada et al. 1997), oder kein Zusammenhang von E-Cadherin und TumorgroÙe gefunden werden kann (Bowie et al. 1993, Koseki et al. 1999).

Die Kaplan-Meier-Schätzung in Bezug auf Rezidivrate und E-Cadherin-Expression (Mittelwert, Minima und Maxima) ergibt, daß große Mittelwerte (>50% Gesamtexpression) mit einer höheren Rezidivrate einhergehen als Mittelwerte \leq 50%. Auch die minimalen E-Cadherin-Werte der Tumoren bedeuten eine höhere Rezidivrate, wenn sie 5% Expression übertreffen, wobei Patienten, deren Primärtumoren Minima der E-Cadherin-Expression \leq 5% Gesamtexpression

aufweisen, eine bessere Prognose haben. Auf die Überlebenszeit im beobachteten Zeitintervall hat dieses Expressionsverhalten aber keinen Einfluß. Die kurze Dauer nach Nachbeobachtung von 1-3 Jahre könnte ein Grund für diese Diskrepanz sein.

Viele Studien weisen auf die prognostische Bedeutung des E-Cadherins hin, wobei eine verminderte E-Cadherin-Expression als schlechter Prognosefaktor gilt (Mattijssen et al. 1993 (HNSCC), Inada et al. 1999, Tamura et al. 1996 (Ösophaguskarzinom), Bringuier et al. 1993 (Blasenkarzinom)). In anderen Publikationen kommt der E-Cadherin-Expression keine Prognoserelevanz zu (Andrews et al. 1997, Bowie et al. 1993 (HNSCC), Natsugoe et al. 1998 (Ösophaguskarzinom)). Eine verminderte E-Cadherin-Expression als guter Prognosefaktor wird in der gesichteten Literatur nicht beschrieben, weshalb diese Beobachtung weiterer Klärung bedarf. Die geringe Nachbeobachtungsdauer könnte die Prognoseabschätzung verzerrt haben.

Bei den N(0)-Tumoren kann im Rahmen der Gesamtkorrelationen eine inverse Korrelation von Tumorfrontmorphologie und E-Cadherin-Expression dargestellt werden, d.h. eine aggressive Tumorfront geht mit verminderter, eine weniger aggressive Tumorfront mit erhöhter E-Cadherin-Expression einher. Eine steigende Invasivität im Zusammenhang mit verminderter E-Cadherin-Expression wird von HOTEIYA et al. und SCHIPPER et al. ebenfalls berichtet (Hoteiya et al. 1999, Schipper et al. 1994). Die Tumorfrontmorphologie in N(+)-Tumoren und Metastasen ist jedoch nicht von der Expression des E-Cadherin abhängig. Als Erklärung ist zu diskutieren, ob N(+)-Tumoren, die zwar (im Vergleich zu den N(0)-Tumoren) über eine erhöhte, aber heterogenere Expression von E-Cadherin verfügen, andere Mechanismen der Invasion benutzen, und nicht mehr vom Verlust des E-Cadherins abhängig sind, wie es möglicherweise bei den N(0)-Tumoren der Fall ist.

Die positiven Korrelationen zwischen E-Cadherin-Expression und α v- und β 3-Expression sind so zu erklären, daß N(+)-Tumoren, die im Vergleich zu den N(0)-Tumoren eine höhere E-Cadherin-Expression aufweisen, parallel im Zuge ihrer Progression diese Integrine hochregulieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Invasion nicht grundsätzlich vom Verlust des E-Cadherin abhängig ist, daß Tumoren, die metastasiert haben, nicht notwendigerweise verminderte Level dieses Moleküls exprimieren, und daß diejenigen Tumorzellen, die sich in Lymphknoten metastatisch abgesiedelt haben ebenfalls zum Teil hohe E-Cadherin-Expressionsraten aufweisen können. Das bedeutet, daß das E-Cadherin nur bedingt, und nicht allein als Prognosemarker oder Marker für Metastasierungswahrscheinlichkeit angesehen werden kann.

6.2.4 Integrin $\alpha v\beta 3$ -Expression

Das Integrin $\alpha v\beta 3$ ist ein Rezeptor für eine große Anzahl von Extrazellulär-Matrix-Proteinen mit einer exponierten RGD-Sequenz: Vironectin, Fibronectin, Fibrinogen, Thrombospondin, proteolytisiertes Kollagen, von-Willebrand Faktor und Osteopontin. Dieses Integrin wird vor allem von endothelialen Gefäßzellen während der Neovaskularisation im Rahmen von Wundheilung, Entzündungen und Tumorwachstum exprimiert. (Brooks et al. 1994a+b, Storgard et al. 1999, Luna et al. 1996, Drake et al. 1995). Eine Eigenschaft von Gefäßzellen ist es, während der Angiogenese in Gewebe einzuwandern und mit der Extrazellulärmatrix zu interagieren. Da die Invasion von Tumorzellen hier Parallelen zeigt, liegt es nahe, auch maligne Tumoren auf die Expression dieses Moleküls hin zu untersuchen.

Unter den malignen Tumoren wird vor allem das maligne Melanom auf sein Expressionsverhalten von $\alpha v\beta 3$ hin untersucht, hier werden die Eigenschaften der Metastasierung und Tumorprogression für die beiden Ketten αv und $\beta 3$ nachgewiesen (Hieken et al. 1996, Felding-Habermann et al. 1992, Seftor et al. 1992, Gehlsen et al. 1992). Auch in anderen Tumoren wird die $\alpha v\beta 3$ -Expression untersucht. So können z.B. BAUM et al. unter anderem zeigen, daß Basaliome hohe Level an $\beta 3$ Integrinketten exprimieren, jedoch kaum αv . Aufgrund der Eigenschaft der Basaliome, nur extrem selten zu metastasieren wird angenommen, daß ein solches Expressionsverhalten eventuell für die geringe Metastasierungstendenz dieser Tumoren verantwortlich ist (Baum et al. 1996). Dagegen können TUOMINEN et al. für Basaliome sowohl eine hohe αv -, als auch eine hohe $\beta 3$ -Expression nachweisen (Tuominen et al. 1994).

ELICEIRI und CHERESH postulieren, daß das $\alpha v\beta 3$ in normalem Gewebe des erwachsenen Menschen nicht typischerweise exprimiert wird (Eliceiri B.P. und Cheresch D.A. 1999). Auch KIM et al. zeigen, daß die αv -Integrinkette von normalen Keratinozyten in die Zellkultur nicht exprimiert wird (Kim et al. 1998). Dagegen stellen JONES et al. fest, daß die αv Untereinheit von den Basalzellen oraler Mukosa (Jones et al. 1997), αv und $\beta 3$ von den basalen Lagen normalen Ösophagusepithels exprimiert werden (Dobson et al. 1994).

Über die Expression der αv und $\beta 3$ -Integrinketten in Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx oder anderer Lokalisationen im oberen Aerodigestivtraktes finden sich in der gesichteten Literatur nur wenige Informationen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie kann Folgendes festgestellt werden:

- In den N(+)-Tumoren werden die beiden Untereinheiten αv und $\beta 3$ grenzwertig statistisch höher exprimiert, als in der N(0)-Vergleichsgruppe.
- Die Metastasen unterscheiden sich nicht von den Primärtumoren bezüglich der Expressionslevel. Beide Moleküle finden sich sowohl in Primärtumoren, als auch in Metastasen, mit deutlicher inter- und intratumoraler Variabilität.
- Zwischen T-Stadium und Expression der Integrinketten αv und $\beta 3$ kann kein Zusammenhang festgestellt werden
- Die Existenz $\beta 3$ -positiver Zellen in den Metastasen bedeutet ein höheres Rezidivrisiko für die Patienten. Auch der Range der Primärtumoren für die $\beta 3$ -Expression hat prognostische Aussagekraft. Hier geht ein Range >5 mit kürzerer Überlebenszeit einher. Die Klassen werden hier bei Range >5 und ≤ 5 geteilt. Diese Ergebnisse bestärken die Vermutung, daß das $\beta 3$ bei der Progression der Tumoren eine Rolle spielen könnte.

Das Bild in Kapitel 5.6.2 (Abbildung 4-5, S.72) zeigt mehrere infiltrierende Zellen, die sich gerade von ihrem Zellverband lösen. Diese Zellen exprimieren die $\beta 3$ -Integrinkette, die stationären Zellen sind negativ für dieses Molekül. Diese Beobachtung unterstützt die These, daß dieses Molekül im Prozeß der Metastasierung eine Rolle spielen könnte. Ebenfalls dafür spricht, daß die $\beta 3$ -Integrinkette in den N(+)-Tumoren vermehrt exprimiert wird. Darüber hinaus wird dies durch die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Schätzung unterstützt, die bei Vorhandensein der Expression der $\beta 3$ -Integrinkette in den Metastasen eine schlechtere Prognose ermittelt. Auch die Korrelation von αv und $\beta 3$ mit der histologischen Beurteilung der Tumorfront bei N(+)-Tumoren ist ein Indiz für eine mögliche Beteiligung im Metastasierungsprozeß, wobei die Korrelationen der $\beta 3$ -Expression mit der Tumorfrontmorphologie jeweils wesentlich aussagekräftigere P-Werte zeigen: Je aggressiver histologisch die Tumorfront eingeschätzt wird, desto höher ist der Anteil der αv - beziehungsweise $\beta 3$ -positiven Zellen. Sowohl für die N(0)-Tumoren, als auch für die Metastasen ergibt sich kein solcher Zusammenhang zwischen der Expression des Integrin $\alpha v\beta 3$ und Tumorfrontmorphologie.

Aufgrund der Ergebnisse spricht vieles dafür, daß das Integrin $\alpha v\beta 3$, und vor allem die $\beta 3$ -Untereinheit im Prozeß von Invasion und Metastasierung der Plattenepithelkarzinome des Oropharynx, sowie hinsichtlich der Prognose von Patienten eine Rolle spielt. Zur tumorbiologischen Einschätzung von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx scheinen sie deshalb bedeutsam zu sein.

Es müssen jedoch mehrere Regionen eines Tumors untersucht werden, da die Expression dieser Moleküle äußerst heterogen ist.

6.2.5 Tumorfrontmorphologie

Die Tumorfront ist Kommunikationsplattform zwischen Tumor und Wirt, sozusagen die Kontaktstelle, an welcher der Tumor in das Gewebe infiltriert.

Das Tumorfrontgrading ist ein etabliertes Gradingssystem mit prognostischer Aussagekraft für Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes (Hogmo et al. 1999, Bryne et al. 1992, Piffko et al. 1996). Das älteste Verfahren ist das Tumorfrontgrading nach BRODERS (Broders, A. 1941).

Die Tumorfrontgrading-Systeme nach BRODERS und BRYNE berücksichtigen neben der Beurteilung der Tumorfrontmorphologie („Mode of Invasion“, bzw. „Pattern of Invasion“) weitere Parameter, wie z.B. Keratinisierung, Kernpolymorphismus, Tiefe der Invasion und lymphozytäre Reaktion, wobei alle diese Einzelparameter gleichberechtigt in einen Score eingehen (Broders, A. 1941, Bryne et al. 1992).

In der vorliegenden Studie wird davon ausgegangen, daß allein die Formation der Tumorfront bereits maßgeblich die Tumor-Wirt-Interaktion und das Invasionsverhalten reflektiert. Deshalb wird ein vereinfachtes Tumorfrontgrading benutzt, wobei die Tumorfrontmorphologie als einziger Parameter dient. Der wesentliche Vorteil dieses Vorgehens ist, daß es sich um eine einfache und wenig zeitaufwendige Untersuchungsmethode handelt.

Der Zweck der Verwendung der Einschätzung der Tumorfrontmorphologie in der vorliegenden Arbeit ist vor allem auf den Vergleich zwischen der Expression der „Invasionsmarker“ E-Cadherin, Integrin $\alpha v \beta 3$ und CD44v4/5 und v6 und der Tumorfrontmorphologie als einfache histologische Referenz ausgerichtet, und weniger auf die Prognoseabschätzung. Deshalb sind die Gesamtkorrelationen von besonderem Interesse:

In den untersuchten N(+)-Tumoren gehen höhere Expressionswerte für die Integrinketten αv und $\beta 3$ mit einer aggressiveren Tumorfrontmorphologie einher. In den N(0)-Tumoren ergibt sich kein solcher Zusammenhang. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür ist möglicherweise die geringe Fallzahl der N(0)-Tumoren. In der gesichteten Literatur gibt es hierzu bisher keine Erfahrungen.

Dies ist ein Indiz für eine Beteiligung dieser Integrinketten im Prozeß der Tumorzellinvasion und Metastasierung der Plattenepithelkarzinomen des

Oropharynx, wie es für andere Tumorarten gezeigt wird (Hieken et al. 1996, Felding-Habermann et al. 1992).

In der Gruppe der N(0)-Tumoren ergibt sich ein inverser Zusammenhang zwischen E-Cadherin-Expression und Tumorfrontmorphologie, d.h. aggressivere Tumorfrontareale zeigen eine verminderte E-Cadherin-Expression. In N(+)-Tumoren und Metastasen kann dies nicht bestätigt werden. Dieses Ergebnis ist so zu interpretieren, daß in den N(+)-Tumoren im Gegensatz zu den N(0)-Tumoren die Invasion möglicherweise nicht von der verminderten Expression von E-Cadherin abhängig ist. Die Arbeiten von SCHIPPER et al. und HOTEIYA et al., die verminderte E-Cadherin-Expressionsraten mit erhöhter Invasivität in Verbindung bringen unterstützen diese Beobachtung (Schipper et al. 1994, Hoteiya et al. 1999).

Wie aber sowohl in der vorliegenden Arbeit, als auch von BOWIE et al. gezeigt wird, kann das E-Cadherin auch von metastatischem Tumorgewebe exprimiert werden und der Verlust der E-Cadherin-Expression ist keine unbedingte Voraussetzung für die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen (Bowie et al. 1993).

Zwischen den Expressionsraten von CD44v4/5 und CD44v6 im untersuchten Tumorgewebe kann kein Zusammenhang zur Tumorfrontmorphologie hergestellt werden. Außerdem ergeben sich keine Korrelationen zwischen Tumorfrontmorphologie und den DNA-Indizes 2cDI und 5c-Exceeding-Rate sowie der Gefäßdichte. Zwischen DNA-Indizes und dem Tumorfrontgrading können SEOANE et al. statistisch auffällige Abhängigkeiten nachweisen (Seoane et al. 1999), eine isolierte Betrachtung der Tumorfrontmorphologie ist jedoch nicht direkt mit den Gradingssystemen vergleichbar.

Die alleinige Bestimmung der Tumorfrontmorphologie besitzt keinen prognostischen Wert. Die Prognoserelevanz etablierter Gradingssysteme kann jedoch von zahlreichen Arbeiten nachgewiesen werden (Bryne et al. 1992, Bryne et al. 1989, Piffko et al. 1996, Umeda et al. 1992).

Außerdem unterscheiden sich N(+) und T(0)-Tumoren nicht bezüglich der Tumorfrontmorphologie. Ein statistischer Zusammenhang zwischen dem T-Stadium und der Tumorfrontmorphologie besteht nicht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die isolierte Betrachtung der Tumorfrontmorphologie etablierte Gradingssysteme nicht ersetzen kann. Als einfache histologische Referenz zu Invasionsmarkern ist dieses Verfahren jedoch geeignet.

6.2.6 Zahl der Gefäße

Es ist bekannt, daß Tumorwachstum von der Einsprossung und der Proliferation neuer Gefäße abhängig ist (Folkmann J. 1990). Ein Tumor kann ohne neue Gefäße eine Größe von 2mm in den drei Dimensionen nicht überschreiten (Penfold et al. 1996).

Eigenschaften der Malignität werden mit der Gefäßdichte verschiedener Tumorarten in Verbindung gebracht (Weidner et al. 1991, Horak et al. 1992). Für das HNSCC können ALBO et al. zeigen, daß die Gefäßdichte mit dem frühen Auftreten und der hohen Aggressivität von Lokalrezidiven korreliert (Albo et al. 1994). CARRAU et al. können dagegen keine Korrelation zwischen Gefäßdichte und Rezidivneigung bzw. Metastasierung finden (Carrau et al. 1995). Zur Prognoserelevanz der Gefäßdichte kann von zahlreichen Autoren an verschiedenen Tumorarten gezeigt werden, daß hohe Gefäßdichten eine schlechte Prognose bedeuten (Weidner et al. 1991, Horak et al. 1992, Williams et al. 1994). Andere Studien können nachweisen, daß hohe Gefäßdichten eine gute Prognose für die Patienten bedeuten (Kainz et al. 1995, Zatterström et al. 1995).

Bei den im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten Tumoren kann gezeigt werden, daß sich die N(0)-Tumoren in Bezug auf die Gefäßdichte nicht von den bereits metastasierten Tumoren unterscheiden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von CARRAU et al. (Carrau et al. 1995), jedoch im Widerspruch zu der Arbeit von PENFOLD et al., die höhere Gefäßdichten in N(+)-Tumoren finden (Penfold et al. 1996).

Die Gefäßdichte der Metastasen ist insgesamt niedriger als die Gefäßdichte der Primärtumoren. Ein möglicher Grund ist in der Morphologie von Metastasen und Primärtumor zu sehen. Metastasen zeigen häufig nekrotische Areale. Dies könnte mit der verminderten Gefäßbildung zusammenhängen.

Zwischen pT-Stadium und den Gefäßzahlen kann kein Zusammenhang gefunden werden. Die Ergebnisse von CARRAU et al. und PENFOLD et al. können in diesem Punkt bestätigt werden, die ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen T-Stadium und Gefäßdichte finden können. Auch ZATTERSTRÖM et al. und MORIYAMA et al. finden keine Korrelation von T-Stadium und Gefäßdichte (Zatterström et al. 1995, Moriyama et al. 1997). Erstaunlicherweise zeigt jedoch im Rahmen der vorliegenden Untersuchung das klinische T-Stadium im Gegensatz zum pT-Stadium einen relevanten Zusammenhang mit den Gefäßdichten-Mittelwerten und -Maxima. Dies ist Ausdruck mangelnder Konkordanz der pT- und T-Stadien-Bestimmung. Auch diese Beobachtung kann jedoch durch die Ergebnisse anderer Studien bestätigt werden, denn PAZOUKI et al. können zeigen, daß die Gefäßdichte von

normaler Mukosa, über leicht- und schwergradige Dysplasie zu Karzinomen stetig ansteigt (Pazouki et al. 1997).

Die Gefäßdichte erweist sich in der vorliegenden Arbeit nicht als prognoserelevanter Faktor, was durch zahlreiche andere Studien unterstützt wird (Carrau et al. 1995, Sarbia et al. 1996, Tahan et al. 1995).

Die hier zitierten Studien färben jedoch im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit die Gefäßendothelien mit Antikörpern gegen von-Willebrand Faktor, gegen CD31 oder CD34. Diese Färbungen liefern vergleichbare Resultate, so SIITONEN et al. (Siitonen et al. 1995). Die immunhistochemische Darstellung hat den Vorteil, daß sie sehr kleine Gefäße erfaßt, selbst Gefäße ohne mikroskopisch sichtbares Lumen. Dies erklärt auch die wesentlich höheren Gefäßzahlen, die in der Literatur angegeben werden. Unspezifische Reaktionen sind aber nicht ausgeschlossen, was ein Nachteil sein könnte.

Bei den berechneten Gesamtkorrelationen findet sich v.a. in den N(0)-Tumoren ein negativer Zusammenhang mit den DNA-zytometrischen Messungen: Je höher die DNA-Indizes, desto niedriger die Gefäßzahl. Zu diskutieren ist, ob die Gefäßbildung in undifferenziertem Tumorgewebe (mit hohen DNA-Indizes) gestört ist und in differenziertem Tumorgewebe (mit niedrigen DNA-Indizes) normal verläuft.

Die Gefäßzahl stellt sich als heterogener Parameter dar. Sie korreliert weder mit pT-Stadium und N-Status, noch mit Überlebenszeit und Rezidivfreiheit. Ein möglicher Grund der unterschiedlichen Ergebnisse in der gesichteten Literatur ist möglicherweise in der Heterogenität der Gefäßverteilung zu sehen (Schor et al. 1998, De Jong et al. 1995), weswegen sich die Auswertung der Gefäßdichte nicht als alleiniger Parameter bei der Aggressivitäts- und Prognoseabschätzung beim Oropharynxkarzinom eignet.

7 Zusammenfassung

Es werden mehrere Gewebeproben aus unterschiedlichen Regionen von 20 Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx und 13 korrespondierenden Lymphknotenmetastasen untersucht. 15 der 20 Tumoren sind metastasierende Tumoren, 5 Tumoren sind nichtmetastasierend.

DNA-Zytometrie, immunhistologische Detektion der Expression von CD44v4/5, CD44v6, E-Cadherin sowie der Integrinketten αv und $\beta 3$, histologische Ermittlung der Gefäßdichte und Bestimmung der Tumorfrontmorphologie werden in jeder der 3 bis 5 Regionen und in den Lymphknotenmetastasen durchgeführt.

Aus den Ergebnissen dieser Einzeluntersuchungen werden Minima, Maxima, Mittelwerte und Range innerhalb der Tumoren für alle Parameter bestimmt.

Anhand dieser Werte werden N(+) mit N(0)-Tumoren, sowie N(+)-Tumoren mit den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen verglichen. Die einzelnen Parameter werden miteinander korreliert, und ein Zusammenhang mit T-Stadium, Überlebenszeit und Rezidivrisiko wird geprüft.

Es kann gezeigt werden, daß die untersuchten Oropharynxkarzinome eine heterogene Tumorarchitektur besitzen. Durch die Untersuchung mehrerer Gewebeproben gelingt der Nachweis verschiedener Stammzelllinien innerhalb der Tumoren, außerdem kann eine große Variabilität für die untersuchten Parameter in den Einzelregionen festgestellt werden. Selbst stammzelliniengleiche Regionen haben sowohl unterschiedliche DNA-Indizes (2cDI und 5c-Exceeding-Rate), als auch stark variierende Expressionsraten für CD44v4/5, CD44v6, E-Cadherin, Integrinketten αv und $\beta 3$, sowie unterschiedliche histologische Eigenschaften wie Gefäßdichte und Tumorfrontmorphologie.

Die Bestimmung der DNA-Indizes 2cDI und 5c-Exceeding-Rate in den Einzelregionen zeigt deutlich unterschiedliche Werte für diese Parameter innerhalb der Tumoren. Ein Zusammenhang mit dem T-Stadium kann nicht hergestellt werden, außerdem haben diese Parameter keine prognostische Relevanz. Die Minima der beiden DNA-Indizes sind in den metastasierenden Tumoren erhöht, Mittelwerte und Maxima unterscheiden sich nicht in den N(+) und N(0)-Tumoren. In den Lymphknoten-Metastasen gemessene 2cDI und 5c-Exceeding-Rates überragen die Mittelwerte der Primärtumoren, nicht jedoch die Maxima der Primärtumoren. Höhere DNA-Indizes bedeuten höhere Expressionsraten für CD44v4/5 und eine verminderte E-Cadherin-Expression. Die Gegenüberstellung stammzelliniengleicher Regionen in Primärtumor und Metastase ergibt eine Erhöhung der DNA-Indizes in den Metastasen in jedem der drei Fälle.

DNA-Indizes sind etablierte Tumormarker. In der vorliegenden Untersuchung ergeben sich zahlreiche Hinweise, daß während der Tumorprogression erhöhte DNA-Indizes festgestellt werden können. Die nachgewiesene Heterogenität dieser Marker muß jedoch zur Beurteilung der Tumorbiologie einbezogen werden.

Die immunhistochemische Detektion der CD44v4/5-Expression zeigt eine deutliche intratumorale Variabilität. In metastasierenden Tumoren können höhere Expressionsraten für das CD44v4/5 festgestellt werden. Die CD44v4/5-Expression in den Primärtumoren unterscheidet sich nicht von der Expression in den Lymphknotenmetastasen. Die Minima der CD44v4/5-Expression innerhalb der Primärtumoren sind in Tumoren mit höheren pT-Stadien erhöht. Mittelwerte und Maxima zeigen keinen Zusammenhang mit dem T-Stadium. Die Höhe der Expression des CD44v4/5 hat keine prognostische Relevanz. Mit den Integrinketten αv und $\beta 3$ kann eine positive Korrelation festgestellt werden, außerdem zeigt sich eine positive Korrelation mit E-Cadherin. Insgesamt stellt sich das CD44v4/5 bei den untersuchten Oropharynxkarzinomen als möglicher Malignitätsmarker für diese Tumorentität dar.

Die einzelnen Gewebeproben zeigen hohe Expressionsraten für das CD44v6. Außerdem kann eine heterogene Verteilung innerhalb der Tumoren festgestellt werden. In den Lymphknoten-Metastasen ergibt sich im Vergleich zu den Primärtumoren keine unterschiedliche Expression für dieses Oberflächenmolekül. Die metastasierenden Tumoren haben im Vergleich zu den N(0)-Tumoren höhere Expressions-Mittelwerte für das CD44v6. Die Höhe der Expression des CD44v6 hat keine prognostische Bedeutung, außerdem kann kein Zusammenhang mit dem T-Stadium hergestellt werden. Insgesamt scheint das CD44v6 als Malignitätsmarker eine untergeordnete Rolle zu spielen, ausschließen kann man eine Rolle im Prozeß der Tumorprogression und Metastasierung jedoch nicht.

Die Bestimmung der E-Cadherin-Expression in den einzelnen Gewebeproben läßt eine intratumorale heterogene Verteilung erkennen. N(+)-Tumoren haben höhere Expressionsraten für dieses Molekül. In den Lymphknotenmetastasen ist die E-Cadherin-Expression im Vergleich zu den Primärtumoren vermindert. Metastasierende Tumoren zeigen eine größere Heterogenität der E-Cadherin-Expression innerhalb der Tumoren. Höhere T-Stadien gehen mit höheren Expressionsraten für dieses Molekül einher. Je höher die E-Cadherin-Expression, desto höher die Rezidivrate; zur Überlebenszeit ergibt sich jedoch kein Zusammenhang. In den Gesamtkorrelationen zeigt sich eine positive Korrelation zwischen E-Cadherin-Expression und der Expression der Integrinketten αv und $\beta 3$. Insgesamt ergeben die gesammelten Daten zum E-Cadherin ein konträres Bild.

Die Untersuchung der Integrinketten αv und $\beta 3$ zeigt eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität der Expression. In den metastasierenden Tumoren ist die Expression im Vergleich zu den N(0)-Tumoren erhöht, in den Metastasen ergibt sich keine unterschiedliche Expression dieser Moleküle. Zwischen T-Stadium und Expression der beiden Integrinketten kann kein Zusammenhang hergestellt werden. Integrinkette $\beta 3$ -positive Zellen in den Lymphknotenmetastasen bedeuten eine kürzere Überlebenszeit für die Patienten. In Tumorregionen mit aggressiver Tumorfrontmorphologie können höhere Expressionsraten für αv und $\beta 3$ festgestellt werden. Für beide Integrinketten αv und $\beta 3$ ergeben sich Hinweise auf eine mögliche Bedeutung im Prozeß der Tumorprogression und Metastasierung.

Die Tumorfrontmorphologie wird aus den etablierten Gradingssystemen ausgekoppelt und dient v.a. als einfache histologische Referenz. Die alleinige Bestimmung der Tumorfrontmorphologie hat jedoch keinen prognostischen Wert. Zwischen T-Stadium und Tumorfrontmorphologie kann keine statistische Abhängigkeit festgestellt werden. Außerdem unterscheiden sich N(+) und N(0)-Tumoren nicht bezüglich der Tumorfrontmorphologie. Die Tumorfrontmorphologie kann somit als Tumormarker nicht aus den Gradingssystemen ausgekoppelt werden. Als einfache histologische Referenz zu den Oberflächenmolekülen können jedoch wichtige Informationen gewonnen werden.

Die Gefäßzahl stellt sich als heterogener Parameter dar. N(+) und N(0)-Tumoren haben keine unterschiedlichen Gefäßdichten. Die Gefäßdichten der Metastasen sind im Vergleich zu den Primärtumoren vermindert. Die Gefäßdichte hat keine prognostische Relevanz. In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich die Gefäßdichte als unsicherer Tumormarker, was von der Vielzahl konträrer Studienergebnisse unterstützt wird.

In der Zusammenschau kann in der vorliegenden Arbeit eine intratumorale Heterogenität der untersuchten biologischen Parameter beim Plattenepithelkarzinom des Oropharynx nachgewiesen werden. Diese Heterogenität ist ein bisher wenig beachtetes biologisches Charakteristikum der Plattenepithelkarzinome des Oropharynx. Künftig wird sie für Diagnostik und Therapie dieser Tumorentitäten möglicherweise eine wichtige Rolle spielen.

8 Literaturverzeichnis

1. Alanen, K., Lintu, M., Joensuu, H. (1998 Jun) DNA diploid by flow cytometry: time to revise the concept of DNA diploidy? *Analytical And Quantitative Cytology And Histology* **20 (3)**: 178-86.
2. Albeda, S., Mette, S., Elder, D., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., Buck, C. (1991) A Integrin distribution in malignant melanoma: association of the $\beta 3$ subunit with tumor progression. *Cancer Research* **50**: 6757-6764.
3. Albeda, S. (1993) Biology of disease. Role of Integrins and other Adhesion Molekules in tumor progression and metastasis. *Laboratory Investigation* **68**: 4-17.
4. Andrews, N., Jones, A., Helliwell, T., Kinsella, A. (1997) Expression of the E-cadherin-catenin cell adhesion complex in primary squamous cell carcinoma of the head and neck and their nodal metastasis. *British Journal of Cancer* **75 (10)**: 1474-80.
5. Atkin, N. (1971) Modal DNA value and chromosome number in ovarian neoplasia. A clinical and histopathologic assessment. *Cancer* **27**: 1964-1974.
6. Balsara, B., Borges, A., Pradhan, S., Rajpal, R., Bhisey, A. (1994) Flow cytometric DNA analysis of squamous cell carcinomas of the oral cavity: correlation with clinical and histopathological features. *European Journal of Cancer and Oral Oncology* **30**: 98-101.
7. Baretton, G., Li, X., Stoll, C., Fischer-Brandies, E., Schmidt, M., Lohrs, U. (1995) Prognostic significance of DNA ploidy in oral squamous cell carcinomas: A retrospective flow and image cytometric study with comparison of DNA ploidy in excisional biopsy specimens and resection specimens. primary. tumors. and lymph node metastases. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology And Endodontics* **79 (1)**: 68-76.
8. Barlogie, B., Drewinko, B., Schuman, J. (1980) Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *American Journal of Medicine* **69**: 169-203.
9. Barlogie, B. (1984) Abnormal cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* **20**: 1123-1125.

10. Baum, H., Schmid, T., Reichrath, J. (1996 Jan) Integrin molecules: a clue to the non-metastasizing behaviour of basal cell carcinomas? *Acta Dermato-Venereologica* **76**: 24-7.
11. Beham-Schmid, C., Heider, K., Hoefler, G., Zatloukal, K. (1998) Expression of CD44 splice variant v10 in Hodgkin's disease is associated with aggressive behaviour and high risk of relapse. *Journal of Pathology* **186**: 383-9.
12. Behrens J. (1999). Cadherins and catenins: role in signalling transduction an tumor progression. *Cancer Metastasis Reviews* **18(1)**: 15-30
13. Beltrami, C., Desinan, L., Rubini, C. (1992) Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. A retrospective study of 80 cases. *Pathology Research And Practice* **188**: 510-6.
14. Bloyet, D., Herlin, P., Masson, E., Plancoulaine, B., Duigou, F., Angot, F., Signolle, J., Deman, D., Mandard, A., Belhomme, P., Datry, T., Rougereau, O. (1999) Image analysis software for automatic DNA ploidy assessment of archival solid tumours. *Cytometry* **37**: 267-274.
15. Boenninghaus H.G.: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für Medizinstudenten. 9. Auflage (1993): S. 265-269. In: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
16. Böcking, A. (1990) DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik. *Onkologie* **38**: 298-347.
17. Bowie, G., Caslin, A., Roland, N., Field, J., Jones, A., Kinsella, A. (1993) Expression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Otolaryngology* **18**: 196-201.
18. Binguier, P., Umbas, R., Schaafsma, H., Karthaus, H., Debruyne, F., Schalken, J. (1993 Jul 15) Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Research* **53 (14)**: 3241-5.
19. Broders, A. (1941) The microscopic grading of cancer. *Surgical Clinics Of North America* **21**: 947-62.
20. Brooks, P., Clark, R., Cherish, D. (1994) Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science* **264**: 569-571.
21. Brooks, P., Montgomery, A., Rosenfeld, M., Reisfeld, R., Hu, T., Klier, G., Cheresch, D. (1994 Dec 30) Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **79**: 1157-64.

22. Bryne, M., Koppang, H., Lilleng, R., Stene, T., Bang, G., Dabelsteen, E. (1989 Sep) New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **18 (8)**: 432-7.
23. Bryne, M., Koppang, H., Lilleng, R., Kjaerheim, A. (1992 Apr) Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Journal of Pathology* **166**: 375-81.
24. Burgio, D., Jacobs, J., Maciorowski, Z., Alonso, M., Pietraszkiewicz, H., Ensley, J. (1992 Feb) DNA ploidy of primary and metastatic squamous cell head and neck cancers. *Archives Of Otolaryngology -Head And Neck Surgery* **118**: 185-7.
25. Carp, N., Ellison, D., Brophy, P., Watts, P., Chang, M., Keller, S. (1992 Apr) DNA content in correlation with postsurgical stage in non-small cell lung cancer. *Annals Of Thoracic Surgery* **53**: 680-3.
26. Carrau, R., Barnes, E., Snyderman, C., Petruzzelli, G., Kachman, K., Rueger, R., D'Amico, F., Johnson, J. (1995) Tumor angiogenesis as a predictor of tumor aggressiveness and metastatic potential in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Invasion and Metastasis* **15 (5-6)**: 197-202.
27. Chandrachud, L., Pendleton, N., Chisholm, D., Horan, M., Schor, A. (1997) Relationship between vascularity. age and survival in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* **76 (10)**: 1367-75.
28. Chen, R., Suzuki, K., Nomura, T., Nakajima, T. (1993 Apr) Flow cytometric analysis of squamous cell carcinomas of the oral cavity in relation to lymph node metastasis. *Journal of Oral And Maxillofacial Surgery* **51 (4)**: 397-401.
29. Cherish, D. (1991) Structure, function and biological properties of integrin $\alpha v \beta 3$ on human melanoma cells. *Cancer Metastasis Reviews* **10**: 3-10.
30. Clark, J. (1992). *Cancer of the head and neck region*. In: Arthur T Skarin MD Diagnostik Onkology Gower Medical Publishing 101 Fifth Avenue New York NY 10003.
31. De Jong, J., Vandiest, P., Baak, J. (1995) Methods in laboratory investigation-heterogeneity and reproducibility of microvessel counts in breast cancer. *Laboratory Investigation* **73**: 922-926.

32. Dobson, H., Pignatelli, M., Hopwood, D., D'Arrigo, C. (1994 Oct) Cell adhesion molecules in oesophageal epithelium. *Gut* **35**: 1343-7.
33. Drake, C., Cheresh, D., Little, C. (1995 Jul) An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *Journal of Cell Science* **108**: 2655-61.
34. Eliceiri, B., Cheresh, D. (1993) The role of αv integrins during angiogenesis: insight into potential mechanism of action and clinical development. *The Journal of Clinical Investigation* **103**: 1227-1230.
35. El-Naggar, A., Lopez-Varela, V., Luna, M., Weber, R., Batsakis, J. (1992 Feb) Intratumoral DNA content heterogeneity in laryngeal squamous cell carcinoma. *Archives Of Otolaryngology - Head And Neck Surgery* **118**: 169-73.
36. Ensley, J., Maciorowski, Z., Hassan, M., Pietraszkiewicz, H., Heilbrun, L., Kish, J., Tapazoglou, E., Jacobs, J., al-Sarraf, M. (1989 May) Cellular DNA content parameters in untreated and recurrent squamous cell cancers of the head and neck. *Cytometry* **10**: 334-8.
37. Epp, R., Justice, W., Garcia, F., McGregor, D., Giri, S., Kimler, B. (1996 Oct) Retrospective DNA ploidy analysis by image and flow cytometry in head and neck cancer. *Laryngoscope* **106**: 1306-13.
38. Faranda, A., Costa, A., Canova, S., Abolafio, G., Silvestrini, R. (1997 Aug) Image and flow cytometric analyses of DNA content in human solid tumors. A comparative study. *Analytical And Quantitative Cytology And Histology* **19**: 338-44.
39. Felding-Habermann, B., Mueller, B., Romerdah, C., Cheresh, D. (1992) Involvement of integrin αv gene expression in human melanoma tumorigenicity. *Journal of Clinical Investigations* **89**: 2018-2022.
40. Folkman, J. (1990) What is the evidence, that tumours are angiogenesis dependent? *Journal Of The National Cancer Institute* **82**: 4-6.
41. Fox, S., Fwacett, J., Jackson, D., Collins, I., Gatter, K., Harris, A., Gearing, A., Simmons, D. (1994) Normal human tissue in addition to some tumors express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Research* **54**: 4539-4546.
42. Frixen, U., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D., Birchmeier, W. (1991 Apr) E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *Journal of Cell Biology* **113**: 173-85.

43. Furukawa F, Takigawa M, Matsuyoshi N, Shirahama S, Wakita H, Fujita M, Horiguchi Y, Imamura S (1994) Cadherins in cutaneous biology. *Journal of Dermatology* **21(11)**:802-13
44. Gandour-Edwards, R., Donald, P., Yu, T., Howard, R., Teplitz, R. (1994 Mar) DNA content of head and neck squamous carcinoma by flow and image cytometry. *Archives Of Otolaryngology - Head And Neck* **120**: 294-7.
45. Gehlsen, K., Davis, G., Sriramarao, P. (1992 Mar) Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties. *Clinical and Experimental Metastasis* **10 (2)**: 111-20.
46. Girard, J., Springer, T. (1995) High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunology Today* **16**: 42-46.
47. Goldsmith, M., Cresson, D., Arnold, L., Postma, D., Askin, F., Pillsbury, H. (1987 Apr) DNA flow cytometry as a prognostic indicator in head and neck cancer. *Otolaryngology - Head And Neck Surgery* **96 (4)**: 307-18.
48. 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 Vol* **65**: 13-24.
49. Günthert, U., Stauder, R., Mayer, B., Terpe, H., Finke, L., Friedrichs, K. (1995) Are CD44 variant isoforms involved in human tumor progression. *Cell Adhesion and Cancer* **24**: 19-42.
50. Hamidi S., Salo T., Kainulainen T., Epstein J., Lerner K., Larjava H. (2000) Expression of alpha(v)beta6 integrin in oral leukoplakia. *British Journal of Cancer* 2000 Apr; **82(8)**:1433-40
51. Hemmer, J., Nagel, E., Kraft, K. (1999 Mar- Apr) DNA aneuploidy by flow cytometry is an independent prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Anticancer Research* **19**: 1419-22.
52. Herold-Mende, C., Seiters, S., Born, A., Patzelt, E., Schupp, M., Zoller, J., Bosch, F., Zoller, M. (1996 May) Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinoma of the Head and Neck. *Journal of Pathology* **179**: 66-73.
53. Herrlich, P., Pals, S., Ponta, H. (1995 Jul- Aug) CD44 in colon cancer. *European Journal of Cancer* **31**: 1110-2.

54. Hieken, T., Farolan, M., Ronan, S., Shilkaitis, A., Wild, L., Das, G., TK (1996) $\beta 3$ integrin expression in melanoma predicts subsequent metastasis. *Journal of Surgical Research* **63**: 169-173.
55. Hogmo, A., Kuylenstierna, R., Lindholm, J., Munck-Wikland, E. (1999 Jan) Predictive value of malignancy grading systems. DNA content. p53. and angiogenesis for stage I tongue carcinomas. *Journal of Clinical Pathology* **52**: 35-40.
56. Horak, E., Leek, R., Klenk, N., LeJeune, S., Smith, K., Stuart, N., Greenall, M., Stepniewska, K., Harris, A. (1992 Nov). Angiogenesis assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* **340**: 1120-4.
57. Hoteiya, T., Hayashi, E., Satomura, K., Kamata, N., Nagayama, M. (1999 Mar) Expression of E-cadherin in oral cancer cell lines and its relationship to invasiveness in SCID mice in vivo. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **28**: 107-11.
58. Hudson, D., Speight, P., Watt, F. (1996 May 16) Altered expression of CD44 isoforms in squamous-cell carcinomas and cell lines derived from them. *International Journal of Cancer* **66 (4)**: 457-63.
59. Hynes, R. (1992) Integrins: Versatility. modulation. and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
60. Inada, S., Koto, T., Futami, K., Arima, S., Iwashita, A. (1999) Evaluation of malignancy and the prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53. E-cadherin. epidermal growth factor receptor). *Surgery Today* **29 (6)**: 493-503.
61. Jacob, R., Welkoborsky, H., Mann, W., Hofken, F., Dienes, H., Freije, J. (1996 Sept) Heterogeneity of squamous cell carcinoma of the head and neck-analysis of tumor biologic factors and proliferation rates. *Laryngoscope* **106**: 1170-5.
62. Jalkanen, S., Bargatze, R., de-los-Toyos, J., Butcher, E. (1987) Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95-kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node. mucosal. or synovial endothelial cells. *Journal of Cell Biology* **105**: 983-990.

63. Jones, J., Sugiyama, M., Watt, F., Speight, P. (1993 Feb) Integrin expression in normal, hyperplastic, dysplastic and malignant oral epithelium. *Journal of Pathology* **169 (2)**: 235-43.
64. Jones, J., Watt, F., Speight, P. (1997 Feb) Changes in the expression of alpha v integrins in oral squamous cell carcinomas. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **26 (2)**: 63-8.
65. Kainz, C., Speiser, P., Wanner, C., Obmaier, A., Tempfner, C., Sliutz, G., Reinthaller, A., Breitenbacher, G. (1995) Prognostic value of tumour microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. *Anticancer Research* **15**: 1549-1551.
66. Kainz, C., Tempfer, C., Kohlberger, P., Janisch, S., Koebl, H., Gitsch, G., Breitennecker, G. (1996 Jun) Immunohistochemical detection of adhesion molecule CD44 splice variants in lymph node metastasis of cervical cancer. *International Journal of Cancer* **21**: 170-3.
67. Kanke M., Fujii M., Kameyama K., Kanzaki J., Tokumaru Y., Imanishi Y., Tomita T., Matsumura Y. (2000). Role of CD44 variant exon 6 in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology and Head and Neck Surgery* 2000 Oct;126(10):1217-23
68. Kim, L., Wu, J., Turnage, R. (1998) Integrin av promotor activity in keratinocytes. *Journal of Surgical Research* **76**: 185-191.
69. King, W., Lam, P., Li, A. (1995 May) DNA ploidy as a predictor of cervical metastasis in advanced squamous carcinoma of the tongue. *Acta Oto-Laryngologica (Stockh)* **115 (3)**: 455-8.
70. Kinsella, A., Bowie, G., Field, J., Jones, A. (1994 Nov) Expression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in tongue carcinoma cell lines. *Journal of Laryngology And Otology* **108 (11)**: 957-61.
71. Koha, M., Brismar, B., Wikstrom, B. (1992 Jul) DNA content in primary tumours and lymph node metastases in colorectal adenocarcinoma. *APMIS* **100 (7)**: 640-4.
72. Koseki, S., Aoki, T., Ansai, S., Hozumi, Y., Mitsuhashi, Y., Kondo, S. (1999 Jul) An immunohistochemical study of E-cadherin expression in human squamous cell carcinoma of the skin: relationship between decreased expression of E-cadherin in

the primary lesion and regional lymph node metastasis. *Journal of Dermatology* **26** (7): 416-22.

73. Kunishi, M., Kayada, Y., Yoshiga, K. (1997 Aug) Down-regulated expression of CD44 variant 6 in oral squamous cell carcinomas and its relationship to regional lymph node metastasis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **26** (4): 280-3.
74. Kurozumi, K., Nishida, T., Nakao, K., Nakahara, M., Tsujimoto, M. (1998 Aug) Expression of CD44 variant 6 and lymphatic invasion: importance to lymph node metastasis in gastric cancer. *World Journal of Surgery* **22** (8): 853-7.
75. Langmann J.: *Medizinische Embryologie. Die normale Entwicklung und ihre Fehlbildungen.* 8. Auflage (1989): S. 246-262. In: Georg Thieme Verlag Stuttgart
76. Lee, K., Lee, J., Suh, C., Ahn, M., Kim, S., Doh, B., Min, Y., Kim, B., Park, K., Lee, I. (1993) DNA flow cytometry of stomach cancer. Prospective correlation with clinicopathologic findings. *Cancer* **72** (6): 1819-26.
77. Leonhardt H.: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, Taschenatlas der gesamten Anatomie.* 8. Auflage (1990): S.389-400. In: Georg Thieme Verlag Stuttgart
78. Lesley, J., Hyman, R., Kincade, P. (1993) CD44 and its interaktion with extracellular matrix. *Advances in Immunology* **54**: 271-335.
79. Lipponen, P., Saarelainen, E., Ji, H., Aaltomaa, S., Syrjanen, K. (1994 Oct) Expression of E-cadherin (E-CD) as related to other prognostic factors and survival in breast cancer. *Journal of Pathology* **174** (2): 101-9.
80. Löffler G.: *Biosynthese von Mono- und Polysachariden* (1993) S. 233-234. In: Springer-Verlag, Funktionelle Biochemie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
81. Löffler-Petrides: *Physiologische Chemie*, 4. Auflage (1988). In: Springer-Verlag Berlin Heidelberg
82. Luna, J., Tobe, T., Mousa, S., Reilly, T., Campochiaro, P. (1996 Oct) Antagonists of integrin alpha v beta 3 inhibit retinal neovascularization in a murine model. *Laboratory Investigation* **75** (4): 563-73.
83. Mahmood, J., Suzuki, K., Nomura, T., Shingaki, S., Nakajima, T. (1995 Dec) The implication of DNA content and S-phase fraction in oral carcinomas with and without metastasis. *International Journal of oral and maxillofacial Surgery* **24** (6): 427-32.

84. Mahmood, J., Nomura, T., Suzuki, K., Shingaki, S., Nakajima, T. (1998) Heterogeneity of squamous cell carcinomas of the head and neck in relation to clinicopathological variables. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **36**: 446-52.
85. Mattijssen, V., Peters, H., Schalkwijk, L., Manni, J., van't-Hof-Grootenboer, B., de Mulder, P., Ruiter, D. (1993 Oct) E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. *International Journal of Cancer* **55 (4)**: 580-5.
86. Melchiorri, C., Cattini, L., Lalli, E., Campobassi, A., Marchetti, C., Facchini, A. (1996 Sep) DNA ploidy analysis of squamous cell carcinomas of the oral and maxillofacial region: clinical and pathologic correlations. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Adendodontics* **82 (3)**: 308-14.
87. Miyoshi, T., Kondo, K., Hino, N., Uyama, T., Monden, Y. (1997 Aug) The expression of the CD44 variant exon 6 is associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* **3 (8)**: 1289-97.
88. Montgomery, A., Reisfeld, R., Cheresch, D. (1994) Integrin $\alpha\beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Cell Biology* **91**: 8856-8860.
89. Moriyama, M., Kumagai, S., Kawashiri, S., Kojima, K., Kakihara, K., Yamamoto, E. (1997) Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* **33 (5)**: 369-74.
90. Nanashima, A., Yamaguchi, H., Sawai, T., Yasutake, T., Tsuji, T., Jibiki, M., Yamaguchi, E., Nakagoe, T., Ayabe, H. (1999) Expression of adhesion molecules in hepatic metastases of colorectal carcinoma: relationship to primary tumours and prognosis after hepatic resection. *Journal of Gastroenterology And Hepatology* **14 (10)**: 1004-9.
91. Naot, D., Sionov, R., Ish-Shalom, D. (1997) CD44: structure. function and association with the malignant process. *Advances in Cancer Research* **71**: 241-319.
92. Natsugoe, S., Mueller, J., Stein, H., Feith, M., Hofler, H., Siewert, J. (1998 Sep 1) Micrometastasis and tumor cell microinvolvement of lymph nodes from esophageal squamous cell carcinoma: frequency. associated tumor characteristics. and impact on prognosis. *Cancer* **83 (5)**: 858-66.

93. Navarro, P., Gomez, M., Pizarro, A., Gamallo, C., Quintanilla, M., Cano, A. (1991 Oct) A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *Journal of Cell Biology* **115 (2)**: 517-33.
94. Nguyen, H., Sevin, B., Averette, H., Ramos, R., Ganjei, P., Perras, J. (1993 Apr) Evidence of tumor heterogeneity in cervical cancers and lymph node metastases as determined by flow cytometry. *Cancer* **71(8)**: 2543-50.
95. Nihei, Z., Ichikawa, W., Kojima, K., Togo, S., Miyanaga, T., Hirayama, R., Mishima, Y. (1996) The positive relationship between the expression of CD44 variant 6 and prognosis in colorectal cancer. *Surgery Today* **26 (9)**: 760-1.
96. Oliveira, D., Sherriff, M., Odell, E. (1998) Expression of variant exons by primary and metastatic oral squamous carcinomas. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **27 (7)**: 303-7.
97. Ostwald, J., Pracht, O., Rhode, E., Kramp, B. (1997 May) Sind die Produkte der Exons v5 und v6 von CD44 Marker für die Metastasierung von Larynxkarzinomen? *Laryngorhinoontologie* **76 (5)**: 295-9.
98. Pazouki, S., Chisholm, D., Adi, M., Carmichael, G., Farquharson, M., Ogden, G., Schor, S., Schor, A. (1997 Sep) The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. *Journal of Pathology* **183**: 39-43.
99. Pelletier, A., J, Kunicki, T., Quaranta, V. (1996 Jan 19) Activation of the integrin $\alpha v \beta 3$ involves a discrete cation-binding site that regulates conformation. *Journal of Biological Chemistry* **271 (3)**: 1364-70.
100. Peltonen, J., Larjava, H., Jaakkola, S., Gralnick, H., Akiyama, S., Yamada, S., Yamada, K., Uitto, J. (1989 Dec) Localization of integrin receptors for fibronectin, collagen, and laminin in human skin. Variable expression in basal and squamous cell carcinomas. *Journal of Clinical Investigation* **84 (6)**: 1916-23.
101. Penfold, C., Partridge, M., Rojas, R., Langdon, J. (1996 Feb) The role of angiogenesis in the spread of oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Oral And Maxillofacial Surgery* **34 (1)**: 37-41.
102. Petersen, S., Bichel, P., Lorentzen, M. (1978) Flow cytometric demonstration of tumor-cell subpopulations with different DNA contents in human colorectal carcinomas. *European Journal of Cancer* **15**: 383-386.

103. Piffko, J., Bankfalvi, A., Klauke, K., Dreier, U., Joos, U., Böcker, W., Schmid, K. (1996 Oct) Unaltered strong immunochemical expression of CD44v6 and v5 isoforms during development and progression of oral squamous cell carcinomas. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **25 (9)**: 502-6.
104. Piffko, J., Bankfalvi, A., Joos, U., Ofner, D., Krassort, M., Schmid, K. (1999) Immunophenotypic analysis of normal mucosa and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Detection And Prevention* **23 (1)**: 45-56.
105. Ravazoula, P., Zolota, V., Hatjicondi, O., Sakellaropoulos, G., Kourounis, G., Maragoudakis, M. (1996) Assessment of angiogenesis in human cervical lesions. *Anticancer Research* **16**: 3861-4.
106. Récamier, J. (1829) L'histoire de la même maladie. *Gabor* **2**: 110.
107. Regidor, P., Callies, R., Regidor, M., Günther, U., Zöllner, M., Schindler, A. (1996) Expression of the CD44 variant isoforms 6 and v4/5 in breast cancer: Correlation with established prognostic parameters. *Archives Of Gynecology And Obstetrics* **258 (3)**: 125-35.
108. Ross, J., Figge, H., Bui, H., del, R., AD, Fisher, H., Nazeer, T., Jennings, T., Ingle, R., Kim, D. (1994 Oct) E-cadherin expression in prostatic carcinoma biopsies: correlation with tumor grade. DNA content. pathologic stage. and clinical outcome. *Modern Pathology* **7 (8)**: 835-41.
109. Rubio Bueno, P., Naval Gias, L., Garcia Delgado, R., Domingo Cebollada, J., Diaz Gonzalez, F. (1998 May) Tumor DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the oral cavity and tongue base. *Head and Neck* **20 (3)**: 232-9.
110. Saito, T., Notani, K., Miura, H., Fukuda, H., Mizuno, S., Shindoh, M., Amemiya, A. (1991) DNA analysis of oral leukoplakia by flow cytometry. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **20 (5)**: 259-63.
111. Saito, T., Sato, J., Satoh, A., Notani, K., Fukuda, H., Mizuno, S., Shindoh, M., Amemiya, A. (1994 Feb) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in tongue squamous cell carcinoma: relation to cervical lymph node metastasis. *International Journal of Oral And Maxillofacial Surgery* **23 (1)**: 28-31.
112. Salmi, M., Grön-Wirta, 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 squamouscellular origin. *Journal of Cell Biology* **122**: 431-442.

113. Sarbia, M., Bittinger, F., Porschen, R., Dutkowski, P., Willers, R., Gabbert, H. (1996 Jul- Aug) Tumor vascularization and prognosis in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Anticancer Research* **16 (4)**: 2117-21.
114. Sarker, S., Ghufloor, K., Patel, K., Tolley, N., Coleman, D. (1997 Jan) Nuclear DNA content using computerized image cytometry of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Journal of Laryngology And Otology* **111 (1)**: 43-7.
115. Sasaki, K., Murakami, T., Murakami, T., Nakamura, M. (1991 Dec 1) Intratumoral heterogeneity in DNA ploidy of esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* **68 (11)**: 2403-6.
116. Sasaki, K., Hamano, K., Kinjo, M., Hara, S. (1992) Intratumoral heterogeneity in DNA ploidy of bladder carcinomas. *Oncology* **49 (3)**: 219-22.
117. Schimming, R., Hlawitschka, M., Haroske, G. (1997 Mar) DNA analysis of squamous cell carcinoma in the oral cavity by image cytometry and its rating in the assessment of tumor prognosis. *Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie* **1 (2)**: 108-10.
118. Schimming, R., Hlawitschka, M., Hariske, G., Eckelt, U. (1998) Prognostic relevance of CDN image cytometry in oral cavity carcinomas. *Analytical And Quantitative Cytology And Histology* **20 (1)**: 43-51.
119. Schipper, J., Frixen, U., Behrens, J., Unger, A., Jahnke, K., Birchmeier, W. (1991 Dec) E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Research* **51 (23)**: 6328-37.
120. Schipper, J., Unger, A., Jahnke, K. (1994) E-cadherin as a functional marker of the differentiation of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Otolaryngology* **19**: 381-384.
121. Schor, A., Pazouki, S., Morris, J., Smither, R., Chandrachud, L., Pendleton, N. (1998 Mar) Heterogeneity in microvascular density in lung tumours: comparison with normal bronchus. *British Journal of Cancer* **77 (6)**: 946-51.
122. Seelentag, W., Günthert, U., Saremaslani, P., Futo, E., Pfaltz, M., Heitz, P., Roth, J. (1996) CD44 standard and variant isoform expression in human skin tumors is not correlated with tumor aggressiveness but downregulated during proliferation and tumor de-differentiation. *International Journal of Cancer* **69 (3)**: 218-24.

123. Seftor, R., Seftor, E., Gehlsen, K., Stetler-Stevenson, W., Brown, P., Ruoslahti, E., Hendrix, M. (1992 Mar) Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **89 (5)**: 1557-61.
124. Seoane J, Asenjo JA, Bascones A, Varela-Centelles PI, Romero MA (1999 May): Flow cytometric DNA ploidy analysis of oral cancer comparison with histologic grading. *Oral Oncology* **35(3)**:266-72
125. Shimoyama, Y., Hirohashi, S., Hirano, S., Noguchi, M., Shimosato, Y., Takeichi, M., Abe, O. (1989 Apr) Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Research* **49 (8)**: 2128-33.
126. Shimoyama, Y., Hirohashi, S. (1991 Apr 15) Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Research* **51 (8)**: 2185-92.
127. Shiozaki, H., Oka, H., Inoue, M., Tamura, S., Monden, M. (1996 Apr) E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* **77 Suppl**: 1605-13.
128. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M, (1991) Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *American Journal of Pathology* 1991 Jul;**139(1)**:17-23
129. Siitonen, S., Haapasalo, H., Rantala, I., Helin, H., Isola, J. (1995 Sep) Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Modern Pathology* **8 (7)**: 745-52.
130. Slootweg, P., Giessen, M., Rutgers, D., Wils, I. (1993 Dec) DNA heterogeneity in metastasizing squamous cell head and neck cancer. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* **21 (8)**: 348-50.
131. Sorscher, S., Russack, V., Cagle, M., Feramisco, J., Green, M. (1995 Jan) Immunolocalization of E-cadherin in human head and neck cancer. *Archives Of Pathology And Laboratory Medicine* **119 (1)**: 82-4.
132. Soukka, T., Salmi, M., Joensuu, H., Hakkinen, L., Sointu, P., Koulu, L., Kalimo, K., Klemi, P., Grenman, R., Jalkanen, S. (1997 Jun 1) Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithel cells. *Cancer Research* **57 (11)**: 2281-9.

133. Spafford M.F., Koeppe J., Pan Z., Archer P.G., Meyers A.D., Franklin W.A. (1996) Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6 and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. Archives of Otolaryngology-Head and Neck surgery **122**:627-32
134. Stauder, R., Günthert, U. (1995) CD44 isoforms: impact on lymphocyte activation and differentiation. The Immunologist **3/3**: 3-11.
135. Stoll C., Baretton G., Soost F., Terpe H.J., Domide P., Lohrs U. (1999) Prognostic importance of the expression of CD44 splice variants in oral squamous cell carcinomas. Oral Oncology 1999 Sep;**35(5)**:484-9
136. Storgard, C., Stupack, D., Jonczyk, A., Goodman, S., Fox, R., Cheresh, D. (1999) Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an av β 3 antagonist. Journal of Clinical Investigation **103**: 47-54.
137. Struikmans, H., Rutgers, D., Hordijk, G., Slootweg, P., van der Tweel, I., Battermann, J. (1998 Jan) Prognostic significance of cell proliferation markers and DNA-ploidy in head and neck tumors. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **40 (1)**: 27-34.
138. Sun, P., el-Mofty, S., Haughey, B., Scholnick, S. (1995 Oct) Allelic loss in squamous cell carcinomas of the larynx: discordance between primary and metastatic tumors. Genes Chromosomes and Cancer **14 (2)**: 145-8.
139. Suzuki, K., Chen, R., Nomura, T., Nakajima, T. (1994 Aug) Flow cytometric analysis of primary and metastatic squamous cell carcinomas of the oral and maxillofacial region. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **52 (8)**: 855-61.
140. Syms, C., Eibling, D., McCoy, J., Barnes, L., Emanuel, B., Fowler, C., Wagner, R., Johnson, J. (1995 Feb) Flow cytometric analysis of primary and metastatic squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Laryngoscope **105 (2)**: 149-55.
141. Tahan, S., Stein, A. (1993) Angiogenesis in invasive squamous cell carcinoma of the lip: tumour vascularity is not an indicator of metastatic risk. Journal of Cutaneous Pathology **22**: 236-240.
142. Takeichi M (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science **251**: 1451-1455

143. Tamura, S., Shiozaki, H., Miyata, M., Kadowaki, T., Inoue, M., Matsui, S., Iwazawa, T., Takayama, T., Takeichi, M., Monden, M. (1996 Nov) Decreased E-cadherin expression is associated with haematogenous recurrence and poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Journal of Surgery* **83 (11)**: 1608-14.
144. Tepfler, C., Gitsch, G., Haeusler, G., Reinthaller, A., Koelbl, H., Kainz, C. (1996 Jul) Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 expression in Patients with carcinoma of the vulva. *Cancer* **78 (2)**: 273-7.
145. Tepfler, C., Losch, A., Heinzl, H., Hausler, G., Hanzal, E., Koelbl, H., Breitenecker, G., Kainz, C. (1996 Oct) Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 isoforms CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in human breast cancer. *European Journal of Cancer* **32 (11)**: 2023-5.
146. Tepfler, C., Sluitz, G., Haeusler, G., Speiser, P., Reinthaller, A., Breitenecker, G., Vavra, N., Kainz, C. (1998 Oct) CD44v3 and v6 variant isoform expression correlates with poor prognosis in early stage vulvar cancer. *British Journal of Cancer* **78 (8)**: 1091-4.
147. Tuominen, H., Junittila, T., Karvonen, J., Kallioinen, M. (1994 Dec) Cell-type related and spatial variation in the expression of integrins in cutaneous tumors. *Journal of Cutaneous Pathology* **21 (6)**: 500-6.
148. Tuszynski, G., Wang, T., Berger, D. (1997) Adhesive Proteins and the Hematogenous Spread of Cancer. *Acta Haematologica* **97**: 29-39.
149. Tytor, M., Windgren, S., Olofsson, J. (1991) Heterogeneity of squamous cell carcinomas of the oral cavity studied by flow cytometry. *Pathology Research And Practice* **1887 (1)**: 30-5.
150. Van Hal, N., van, D., GA, Stigter-van Walsum, M., Snow, G., Brakendorff, R. (1999) Characterization of CD44v6 isoforms in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* **82 (6)**: 837-45.
151. Wang, X., Chen, R., Wang, Z., Chen, W., Zuo, L. (1990 Jul) Flow cytometric DNA-ploidy as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Chinese Medical Journal (Engl)* **103 (7)**: 572-5.
152. Weidner, N., Semple, J., Welch, W., Folkmann, J. (1991) Tumour angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma. *New England Journal of Medicine* **324**: 1-8.

153. Welkoborsky, H.J., Mann, W., Gluckman, J., Freije, J. (1993 Jan) Comparison of quantitative DNA measurements and cytomorphology in squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract with and without lymph node metastases. *Annals Of Otolaryngology Rhinology And Laryngology* **102**: 52-7.
154. Welkoborsky H.J., Gluckman J.L., Jacob R., Bernauer H.S., Mann W.J. (1999): Tumorbilologische Prognoseparameter beim T1N0M0-Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. *Laryngo-Rhino-Otologie*. 1999 Mar;78(3):131-8.
155. Welkoborsky H.J., Jacob R., Bernauer H.S., Riazimand H.S., Mann W.J. (1998): Prognostic factors and cytogenetics of head and neck carcinomas. 1st. World Congress, Madrid, Spain
156. Welkoborsky H.J., Bernauer H.S., Riazimand H.S., Jacob R., Mann W.J., Hinni M.L. (2000) Patterns of chromosomal aberrations in metastasizing and nonmetastasizing squamous cell carcinomas of the oropharynx and hypopharynx. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology* 2000 Apr;109(4):401-10.
157. Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M (2000): E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *British Journal of Surgery* 2000 Aug;**87(8)**:992-1005
158. Williams, H., Sanders, D., Jankowski, J., Landini, G., Brown, A. (1998 Aug) Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **27 (7)**: 308-17.
159. Williams, J., Carlson, G., Cohen, C., Derose, P., Hunter, S., Jerkiewicz, M. (1994) Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumours. *American Journal of Surgery* **168**: 373-380.
160. Wu H., Lotan R., Menter D., Lippman S.M., Xu X.C. (2000) Expression of E-cadherin is associated with squamous differentiation in squamous cell carcinomas. *Anticancer Research* **20(3A)**:1385-90
161. Yamada, K., Jordan, R., Mori, M., Speight, P. (1997 Jun) The relationship between E-cadherin expression, clinical stage and tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Diseases* **3 (2)**: 82-5.

162. Yokota, A., Ishii, G., Sugaya, Y., Nishimura, M., Saito, Y., Harigaya, K. (1998 Dec) Expression of exon v6-containing CD44 isoforms is related to poor prognosis of acute myelocytic leukemia. *Hematological Oncology* **16 (4)**: 131-41.
163. Yokoyama K., Kamata N., Hayashi E., Hoteiya T., Ueda N., Fujimoto R., Nagayama M. (2001) Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncology* **37(1)**:65-71
164. Zatterström, U., Brun, E., Willen, R., Kjellen, E., Wennerberg, J. (1995) Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head and Neck* **17 (4)**: 312-8.
165. Zöller, M., Kaufmann, M. (1994) CD44 und Metastasierung. *Onkologie* **17**: 114-122.