

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Minimale Resterkrankung bei Patienten mit
Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region in einem
Xenotransplantationsmodell

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Katharina Schulze
aus Öhringen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. M. Klein
 2. Prof. Dr. Dr. B. Hofmeister
 3. Prof. Dr. Dr. H.-R. Metelmann

Datum der Promotion: 20. November 2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

Kurzbezeichnungen bei den Versuchstieren

1. Einleitung

- 1.1. Plattenepithelkarzinome und Basaliome der Kopf-Hals-Region
- 1.2. Vorgänge bei der Metastasierung
- 1.3. Früh disseminierte Tumorzellen bei Kopf-Hals-Karzinomen

2. Fragestellung

3. Material und Methoden

- 3.1. Geräte
 - 3.1.1. Allgemeine Geräte
 - 3.1.2. Zentrifugen
 - 3.1.3. Elektrophoresegeräte
- 3.2. Verbrauchsmaterialien
 - 3.2.1. Chemikalien
 - 3.2.2. Feinchemikalien
 - 3.2.3. Reagenzsätze
 - 3.2.4. Proteine und Peptide
 - 3.2.5. Antikörper
 - 3.2.6. Enzyme und Nukleinsäuren
- 3.3. Biologisches Material
 - 3.3.1. Gewinnung und Aufarbeitung des Knochenmarkpunkttates
 - 3.3.2. Gewinnung und Aufarbeitung von Tumormaterial
 - 3.3.3. Versuchstiere
- 3.4. Molekularbiologische Methoden
 - 3.4.1. DNS Extraktion
 - 3.4.2. DNS Amplifikation
- 3.5. Pathohistochemische Methoden
 - 3.5.1. Färbung der Zytoprinpräparate (APAAP-Technik)
 - 3.5.2. Immunhistochemische Färbung der Maustumoren und Organe
 - 3.5.3. Hämalaun-Eosin- Färbung der Nackentumoren
- 3.6. Patienten
- 3.7. Vorgehensweise bei den tierexperimentellen Versuchen
- 3.8. Statistische Methodik

4. Ergebnisse

- 4.1. Klinische Daten der Patienten
- 4.2. Analyse der Beckenkamm punktate
- 4.3. Tierexperimentelle Ergebnisse
 - 4.3.1. Pathohistologische Untersuchungen
 - 4.3.2. Immunhistochemische Untersuchungen
 - 4.3.3. Ergebnisse der PCR-Analyse
- 4.4. Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

5. Diskussion

- 5.1. Minimale Resterkrankung bei Kopf-Hals-Karzinomen
- 5.2. Biologische Verhalten der disseminierten Tumorzellen im Xenotransplantationsmodell
- 5.3. Metastasierungspotential einzelner disseminierter Tumorzellen

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

Anhang:

- Danksagung
- Lebenslauf
- Publikationsverzeichnis
- Selbständigkeitserklärung

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BSA	Rinderserumalbumin
D	relative Molekülmasseneinheit in Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
FACS	fluorescence activated cell sorting
Ig	Immunglobulin
M	Mol pro Liter
MRD	Minimale Resterkrankung
mAb	monoklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIC	Protease Inhibitor
RAM	Kaninchen-Immunglobuline gegen Maus Immunglobuline
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAR	Schwein Immunglobuline gegen Kaninchen Immunglobuline
SCCHN	Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TEMED	N.N'.N.N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
V	Volumen
(v/v)	Konzentrationsangabe als Volumenanteil am Gesamtvolumen
(w/v)	Konzentrationsangabe als Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
x x g	x-fache der Erdbeschleunigung

Kurzbezeichnungen bei Versuchstieren

NOD/SCID Mäuse non obese diabetic, severely immunodeficient Mäuse
(The Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA)

1. Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome und Basaliome der Kopf-Hals-Region

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region sind mit einer jährlichen Inzidenz von 500.000 Neuerkrankungen, die am fünfthäufigsten diagnostizierte Krebserkrankung weltweit [4]. 78 % der Betroffenen sind Männer im Alter zwischen 45 und 65 Jahren, nur 22% der Betroffenen sind Frauen, wobei es sich vor allem um die Altersgruppe der 50 bis 70-jährigen handelt. Am häufigsten sind diese Karzinome im Bereich des Mundbodens (36%), der Zunge (21%), der Wangenschleimhaut (15%) und der Lippen (8%) lokalisiert [31]. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben ein Drittel der Patienten ein frühes Stadium (T1/T2), die restlichen zwei Drittel weisen schon ein fortgeschrittenes Stadium (T3/T4) auf [72]. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt ca. 50%. Allerdings leben nach 5 Jahren noch 60 % der Patienten mit einem T1/T2 Tumor, sind während nur 40 % der Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein T3/T4 Stadium aufwiesen, überlebten [32]. Ein Therapieversagen bei der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region wird vor allem durch Lokalrezidive, Rezidive in den Halslymphknoten sowie durch die Entwicklung von Zweittumoren ausgelöst [73]. Früher wurde das Schicksal der Patienten vor allem durch das lokal destruierende Wachstum des Tumors bestimmt, der lebenswichtige Strukturen zerstörte. Heute ist durch die Weiterentwicklung chirurgischer Techniken sowie durch Strahlentherapie und Chemotherapie eine deutlich bessere lokoregionäre Kontrolle des Tumors möglich. Die radikale Tumoroperation hat sich als die Therapie mit der besten 5-Jahresüberlebensrate erwiesen. Dabei wird gefordert, daß der Tumor mit 1 cm Sicherheitsabstand entfernt wird (R0-Resektion). Ist der Knochen infiltriert, meist der Unterkieferknochen, muß dieser reseziert werden. Das operative Vorgehen schließt die Entfernung der Halslymphknoten je nach Stadium durch eine neck dissection in verschiedenen Modifikationen [17] oder die supraomohyoidale Ausräumung mit ein. Bei fortgeschrittenen Tumorstadien oder bei multimorbiden Patienten, denen keine ausgedehnte Tumoroperation zugemutet werden kann, hat sich die Radiatio als effektivste Maßnahme erwiesen [2]. Ein vielversprechender Ansatz scheint die simultane Anwendung von Radiatio und Chemotherapie zu sein. Man geht davon aus, daß der lokale Therapieeffekt durch die systemische Komponente der Chemotherapie ergänzt wird und sich die Effekte addieren, wenn nicht sogar multiplizieren. Mehrere randomisierte Studien konnten diesen positiven Effekt hinsichtlich der lokoregionären

Kontrolle in ersten Ergebnissen belegen [1, 77, 57]. In 30 % der Fälle kam es zu einem Therapieversagen mit Manifestation von Fernmetastasen.

Das Basalzellkarzinom (oder Basaliom) ist ein langsam wachsendes, lokal destruierendes Malignom. In Deutschland liegt die Inzidenz bei ca. 100 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner. Sonnenbestrahlung (UV-Licht) fördert die Entstehung dieser zu 80 % im Gesichtsbereich auftretenden Tumoren. Sie treten vorwiegend im höheren Lebensalter auf, da auch die Dauer der Sonnenbestrahlung Einfluß hat. Im Gegensatz zu den Plattenepithelkarzinomen zeichnen sie sich dadurch aus, dass sie zwar lokal destruierend wachsen aber nur in den seltensten Fällen Fernmetastasen bilden. Die Therapie der Wahl ist die operative Entfernung mit Sicherheitsabstand im gesunden. Sollte die nicht möglich sein, kann eine Strahlentherapie oder in palliativer Intention eine Lasertehrapie erfolgen [31].

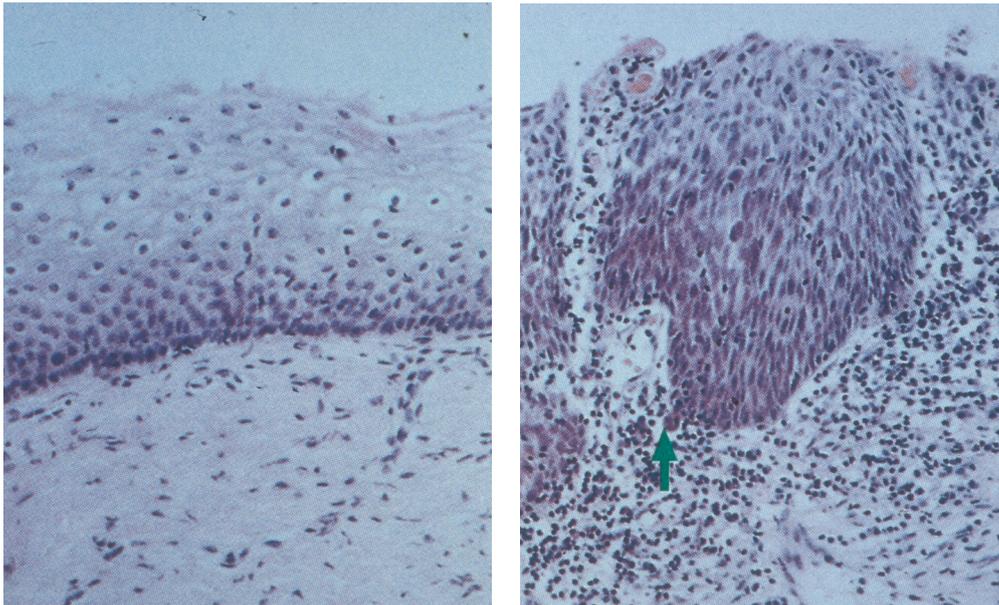
Trotz der Fortschritte in der Therapie hat sich die Überlebensrate der Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen in den letzten Jahren nicht entscheidend gebessert. Eine Hypothese geht dahin, daß Tumorresiduen (sog. minimale Resterkrankung oder minimal residual disease, MRD) im Körper verbleiben und nach einer gewissen Latenzzeit Fernmetastasen oder Zweittumoren ausbilden. *Stupp et al.* konnten zeigen, daß es bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium in 50-60% der Fälle zu einem Lokalrezidiv kommt und bei 25% im Verlauf der Erkrankung Fernmetastasen diagnostiziert werden [67]. Die Anzahl der Lokalrezidive sowie die Häufigkeit des Auftretens von Fernmetastasen sind eng mit der Anzahl von Lymphknotenmetastasen korreliert. *Leemans et al.* konnten in ihren Untersuchungen veranschaulichen, daß bei Vorhandensein von vier und mehr Lymphknotenmetastasen das Risiko Fernmetastasen zu entwickeln auf ca. 50 % steigt [38]. Die Fernmetastasierungsrate, die klinisch ca. 25 % in fortgeschrittenen Stadien beträgt, wird wahrscheinlich noch unterschätzt. Autopsiestudien haben ergeben, daß in 40-57 % der Patienten zum Todeszeitpunkt Fernmetastasen vorhanden waren [81, 46]. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß es trotz immer besserer therapeutischer Möglichkeiten und der dadurch verbesserten lokoregionären Kontrolle des Tumors immer häufiger zu einem Therapieversagen durch die Ausbildung von Zweittumoren und Fernmetastasen kommen wird [82, 74].

1.2 Vorgänge bei der Metastasierung

Die anerkannte Hypothese über die Entstehung von Tumoren geht dahin, daß maligne Tumoren aus einer einzigen transformierten Zelle entstehen [47]. Weiterhin unterstützen zusätzliche Faktoren die Transformation von einer normalen gesunden Zelle zu einer maligne veränderten Tumorzelle. Karzinogene Substanzen verursachen Veränderungen in der Nukleotidsequenz der DNA, ionisierende Strahlung induziert chromosomale Veränderungen und Viren sind in der Lage, Fremd-DNA in das Genom der Zelle einzuschleusen [30]. Die Inaktiverung von Tumorsuppressorgenen oder dauerhaft aktive Onkogene stellen weitere Faktoren dar, die zur Entartung von Zellen beitragen [3].

Bis zur endgültigen Manifestation des malignen Tumors vergehen im allgemeinen Jahre. Während dieser Zeit durchlaufen die potentiellen Tumorzellen eine Reihe von verschiedenen Entwicklungsstufen.

In epithelialen Geweben ist die Proliferation der Zellen auf die basale Zellschicht beschränkt [27, 41]. Nach Abschluß der Zellteilung wandern die Tochterzellen durch die oberen Zellschichten und differenzieren dabei zu flacheren, keratinhaltigen Zellen, die kein Potential zur Zellteilung mehr besitzen. Diese Zellen sterben während des Transportes zu den oberen Zellschichten ab und werden schließlich abgestoßen. Untersuchungen an Cervixabstrichen haben ergeben, daß vor allem in den unteren Zellschichten häufig Dysplasien auftreten, wobei die proliferierenden Zellen nicht mehr ausschließlich an der Basalmembran lokalisiert sind [12]. Im Verlauf entwickelt sich dann in einigen Fällen ein sogenanntes carcinoma in situ, bei dem die Ordnung der Zellschichtung völlig aufgehoben, die Basalmembran jedoch noch intakt ist. Aus diesem carcinoma in situ kann sich dann das invasive Karzinom entwickeln [44].



Normales Epithel

carcinoma in situ

Abb.1. Stadien der Tumorentwicklung

Der Durchtritt der transformierten Zellen durch die begrenzende Basallamina stellt den ersten Schritt einer beginnenden Invasion der Karzinomzellen in den Körper dar [66]. Die Adhäsionsmechanismen der Zellen innerhalb ihrer Gewebestruktur sind nicht mehr intakt. Die Zellen sind somit in der Lage aus dem ursprünglichen Zellverband die Basalmembran zu durchdringen und durch das Endothel in das Blut- oder Lymphgefäßsystem einzuwandern. Dies stellt einen wichtigen Schritt bei der Infiltration und Dissemination von Tumorzellen dar. Die Adhäsion und Migration der Zellen werden durch verschiedene Adhäsionsmoleküle wie die Integrine gesteuert [34]. In der basalen Zellschicht liegen die Zellen mit der proliferativen Kapazität und diese exprimieren unter anderem die Integrine $\alpha6\beta4$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$ und $\alpha5\beta1$. Der oben beschriebene Entdifferenzierungsprozess ist eng mit der Inaktivierung der $\beta1$ Kette der Integrine verbunden [76]. Es konnte gezeigt werden, daß ein verändertes Expressionsmuster des Integrins $\alpha6\beta4$ zu einem aggressiveren Erkrankungsverlauf bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region führen [78].

Neben dem veränderten Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen und der Reorganisation des Zytoskeletts, die die Migration ermöglichen, benötigen die Tumorzellen einige Proteinase, um die extrazelluläre Matrix degradieren zu können und in die Blut- und Lymphgefäße einzuwandern. Eine Schlüsselfunktion scheinen hierbei die Aktivierung von Plasmin [71] und die Interaktion mit verschiedenen Metallomatrixproteinase (MMP) zu haben [62]. Mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen ist

die Tumorzelle in der Lage, sich an die Basalmembran zu heften. Die Aktivierung verschiedener Proteinase führt zu einer lokal begrenzten Degradierung der extrazellulären Matrix. So wird eine Invasion durch die Basalmembran ermöglicht [5].

Tumore können sich nur bis zu einer Größe von 1-2 mm durch Diffusion mit Sauerstoff und anderen wichtigen Stoffen versorgen. Ein weiteres Tumorwachstum ist eng an die Entwicklung eines Gefäßsystems gebunden, die sog. Angiogenese [21]. Diese ist eng korreliert mit dem malignen Wachstum und der Invasion von Tumorzellen [28]. Die neu ausgebildeten Tumorgefäße ermöglichen nicht nur ein Wachstum des Tumors, sondern erlauben es auch einzelnen Tumorzellen, sich aus dem Zellverband zu lösen und in die Blutzirkulation einzudringen [40].

Um manifeste Metastasen ausbilden zu können, muss zunächst die Infiltration, dann die Invasion und schließlich die Disseminierung der Tumorzellen stattfinden. Jedoch müssen die ausgeschwemmten Tumorzellen in einem ihnen fremden Milieu überleben und proliferieren, um Metastasen zu formen. Schon um die Jahrhundertwende entstanden erste Theorien, um dieses Phänomen zu erklären. Paget postulierte 1889 die seed and soil Theorie, die besagt, daß eine disseminierte Tumorzelle auf ein ortsspezifisches Mikromilieu angewiesen ist, das die Proliferation erst ermöglicht. Er verglich hierbei die Metastasen mit der Saat (seed), die auf einen geeigneten Boden (soil) treffen muß, um aufzugehen und zu wachsen [49]. Unterschiedliche Tumore haben ein unterschiedliches Metastasierungsmuster, so metastasiert das Kolonkarzinom vor allem in die Leber, das Mammakarzinom bevorzugt in Lunge und Knochen und Kopf-Hals-Karzinome zuerst in die Halslymphknoten. Es konnte auch gezeigt werden, daß eine Tumorzelle, die sich aus dem Verbund des Primärtumors gelöst hat (Separation und Invasion), Anschluß zum Gefäßsystem (Extravasation) gewonnen hat, in ein anderes Gewebe gewandert ist (Migration) und wiederum in ein Gewebe eingedrungen ist (Extravasation und Invasion), nicht sofort proliferieren muß [51]. Die disseminierte Zelle kann auch längere Zeit in einer mitotisch inaktiven Latenzphase verharren, die auch als Tumor Cell Dormancy bezeichnet wird [56, 70]. Durch verschiedene Wachstumsfaktoren oder Änderungen des Mikromilieus kann die mitotisch inaktive Wachstumsphase (G0) durchbrochen werden und das Wachstum einer soliden Metastase beginnen. *Cote et al.* konnten in ihren Untersuchungen zeigen, daß es auch noch nach einem Zeitraum von 10 Jahren zu dem Übergang aus der inaktiven zu der proliferativen Phase kommen kann [16]. Um eine klinisch manifeste Metastase zu bilden, muss eine Vielzahl von Schritten durchlaufen werden und

gleichzeitig muss eine komplexe Interaktion verschiedener molekularer Mechanismen stattfinden, die noch nicht ganz geklärt ist. Neuere in vitro Studien konnten zudem zeigen, dass die Zellen, die von Metastasen isoliert wurden, sich genetisch und phänotypisch von den Zellen unterscheiden, die von Primärtumoren isoliert wurden [50]. Außerdem werden die zirkulierenden Tumorzellen noch durch Immunabwehrmechanismen weiter reduziert. Tierexperimentelle Untersuchungen ergaben, daß nur 0.01% der zirkulierenden Zellen zu einer metastatischen Koloniebildung führen [40]. Diese Zellen stellen also eine in vivo selektionierte Zellpopulation dar.

1.3 Früh disseminierte Tumorzellen bei Kopf-Hals-Karzinomen

Zum Zeitpunkt des Therapiebeginnes hat die frühe Disseminierung einzelner Tumorzellen schon meist stattgefunden [51]. Patienten, bei denen die Generalisation der Tumorerkrankung fortgeschritten ist, sind nach der abgeschlossenen Therapie ohne Symptome. Konventionelle diagnostische Untersuchungsverfahren wie Computertomografie, Sonografie, Kernspintomografie und Laborparameter sind in diesem Stadium nicht in der Lage, die früh disseminierten Zellen zu erfassen. Diese in vivo selektionierten Zellen haben die wesentlichen Schritte der Metastasierung wie Separation, Invasion in das umgebende Gewebe, Migration und Intravasation in das Gefäßsystem, Zirkulation, Extravasation und Invasion in das Zielgewebe, schon hinter sich. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das Vorhandensein von früh disseminierten Tumorzellen im Knochenmark zum Diagnosezeitpunkt des Primärtumors ein vom Tumorstadium und Lymphknotenstatus unabhängiger Prognosefaktor ist, der statistische Signifikanz aufweist [6, 53, 39, 8]. Die Manifestation der Metastase muß allerdings nicht unbedingt im Knochen erfolgen. Das Knochenmark als leicht zugängliche Untersuchungsquelle dient lediglich als Indikatororgan für die Isolation und Detektion einzelner disseminierter Tumorzellen. Diese lassen auf die metastatische Potenz des Primärtumors schließen und kann dadurch therapeutische Konzepte verändern. Im Folgenden sollen die unterschiedlichen Methoden zur Detektion einzelner disseminierter Tumorzellen beschrieben und erläutert werden: Obwohl mikrometastatische Tumorzellaggregate durch konventionelle histopathologische Verfahren identifiziert werden können [11], konnten einzelne disseminierte Tumorzellen nicht eindeutig zytologisch nachgewiesen werden [60].

Durch diese Standardmethode wird in den seltensten Fällen derartige Zellen im Knochenmark entdeckt [15]. Während der letzten Jahrzehnte wurden sensitivere molekularbiologische und immunologische Verfahren entwickelt, die leicht eine Identifizierung individueller Tumorzellen in Organen ermöglichen, die von der Primärlokalisierung des Tumors entfernt sind [64,54]. Für epitheliale Tumoren hat sich die Detektion von disseminierten Tumorzellen in Knochenmarksaspiraten von der Spina iliaca anterior superior als überlegenes Verfahren erwiesen. Das Knochenmark (KM) der Spina iliaca anterior zeichnet sich durch besonders intensiven Zellaustausch zwischen dem Blut und dem Interstitium aus und ist leicht zugänglich für Screeninguntersuchungen. Disseminierte Tumorzellen können sogar bei Patienten mit Karzinomen detektiert werden, die nur selten in den Knochen metastasieren wie z. B. Kolonkarzinome oder Kopf-Hals-Karzinome. Das weist darauf hin, dass das KM ein guter Indikator für das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen ist. Im Gegensatz dazu ist die Detektion einzelner disseminierter Tumorzellen im peripheren Blut von Patienten mit frühen Tumorstadien viel schwieriger, einerseits durch das seltenere Auftreten dieser Zellen im Blut, andererseits bleibt auch die klinische Relevanz dieser zirkulierenden Zellen fraglich [65, 58, 79]. Deswegen scheint peripheres Blut eine suboptimale Quelle für die Detektion von disseminierten Tumorzellen zu bleiben, obwohl es das am einfachsten zugängliche Untersuchungsmaterial wäre. Verschiedene Forschungsgruppen versuchen durch unterschiedliche Verfahren die disseminierten Tumorzellen im Blut anzureichern, um dadurch eine Verbesserung der Diagnostik zu ermöglichen.

Die Detektion von disseminierten epithelialen Tumorzellen im Knochenmark basiert auf Methoden, die Zellen unterschiedlichen embryonalen Ursprungs unterscheidet, wie epitheliale Zellen ektodermalen Ursprunges von hämatopoetischen Zellen mesenchymalen Ursprunges. Dieses Konzept wurde schon vor 20 Jahren von Forschungsgruppen aus dem Royal Marsden Institut und dem Ludwig Institut eingeführt [18]. Viele Studien, die immunzytochemische Methoden (spezifische monoklonale Antikörper) verwendeten, konnten zeigen, daß es einen Zusammenhang zwischen dem Therapieerfolg und dem Vorhandensein von mikrometastatischen Zellen bei Patienten mit verschiedenen Karzinomen gibt [6, 8, 53, 39]. *Gath et al.* konnten dies auch für Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen zeigen [23]. Verschiedene Studien demonstrierten, daß der Nachweis disseminierter Tumorzellen mit monoklonalen Antikörpern klinisch sinnvoll ist [19, 29, 42]. Einige Markerantigene, wie das Muzin 1-Antigen oder das

epitheliale Membranantigenen, werden auch auf hämatopoetischen Zellen exprimiert und sind dadurch nicht geeignet, Zellen epithelialer Herkunft zu detektieren. Viele Analysen haben Zytokeratine (CK) als Markerantigene verwendet. Diese Proteine erwiesen sich als stabil und werden in den meisten Karzinomen überexprimiert [45, 22]. CK Antigene werden äußerst selten auf hämatopoetischen Zellen nachgewiesen [55,13], obwohl die ektopy Expression von messenger RNS (mRNS) nicht ausgeschlossen werden kann [69, 59]. Bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen hat sich für die Detektion einzelner disseminierter Tumorzellen der monoklonale Antikörper A45/B-B3, der die Zytokeratine 8, 18 und 19 erkennt, als besonders effizient erwiesen. Diese Antigene werden auf der Mehrzahl von Kopf-Hals-Karzinomen exprimiert, wie durch immunhistochemische Färbungen des Primärtumors gezeigt werden konnte [24]. Die Abb. 2 zeigt eine einzelne disseminierte Tumorzelle (APAAP-Färbung mit A45/B-B3), sowie die HE-Färbung eines Plattenepithelkarzinoms.

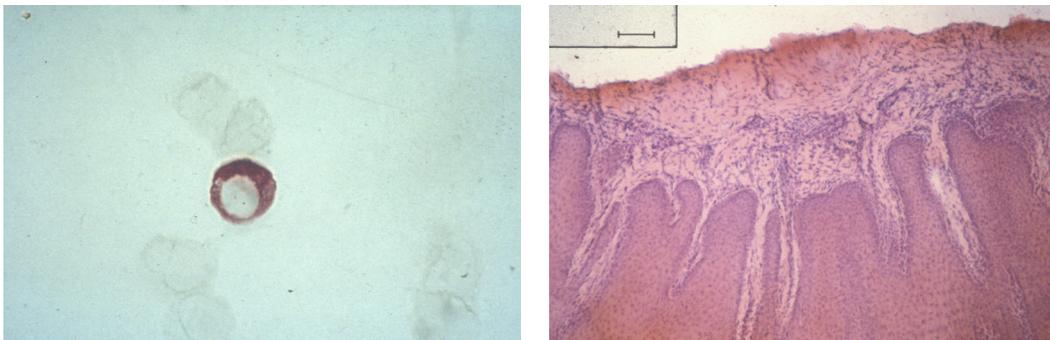


Abb. 2 Disseminierte Tumorzelle in KM und Schnitte eines Primärtumors (HE-Färbung)

Pantel et al. konnten zeigen, dass der Antikörper A45/B-B3 sensitiver ist als ein monoklonaler Antikörper, der nur gegen ein einzelnes Zytokeratin gerichtet ist [55], möglicherweise durch die Downregulation einzelner Antigene in maligne transformierten Zellen. *Braun et al.* demonstrierten in ihren Untersuchungen, daß in 189 von 191 gesunden Kontrollpatienten kein Nachweis von epithelialen Zellen im KM möglich war, was die Spezifität dieses immunhistochemischen Nachweises verdeutlicht [6]. Diese immunhistochemische Methode ist so sensitiv, daß sie eine bis zwei Zellen in 10^6 mononukleären Zellen des KM detektieren kann [55, 13]. Durch die Entwicklung eines computergestützten mikroskopischen Detektionsverfahren (ACIS-automated cell imaging system, Firma Chromavision, San Diego, USA) kann sogar ein teilautomatisiertes Screening der immunhistochemisch gefärbten Zytospinpräparate

durchgeführt werden. Das Detektionsverfahren ermöglicht das Erfassen größerer Patientenpopulationen auch im Rahmen klinischer Studien. Es vereinfacht das Verfahren und erlaubt eine schnellere Diagnose.

Verschiedene Gruppen haben versucht, disseminierte Tumorzellen mit Hilfe der FACS (fluorescence activated cell sorting)-Analyse (Durchflußzytometrie) zu detektieren. Für Lymphome und Leukämien hat sich diese Methode auch sehr gut etabliert [36,14], jedoch gibt es keine Studie, die aufzeigen konnte, daß sie auch bei epithelialen Tumoren klinische Relevanz hat und der Immunhistochemie überlegen ist [51]. In den letzten Jahren wurden vor allem molekularbiologische Methoden entwickelt, um einzelne disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachweisen zu können. So konnten z.B. Lymphome durch spezifische genetische Veränderungen, wie bcl-2 Translokation oder Immunglobulin Gen-Rearrangements, nachgewiesen werden [25, 84]. Prinzipiell kann die disseminierte DNS durch eine PCR amplifiziert werden, so daß eine sehr kleine Anzahl von disseminierten Tumorzellen in einer heterogenen Zellpopulation entdeckt werden kann [64]. Dies setzt jedoch voraus, daß die Tumorzellen spezifische Veränderungen in ihrem Genom aufweisen, die sie von den umgebenden hämatopoetischen Zellen unterscheiden. Dies ist bei soliden Tumoren nicht einfach, da die Zellen meist genetisch sehr verschieden sind. Das Screening für genomische Veränderungen beinhaltet die Analyse des Primärtumors, um individuelle genomische Alterationen festzustellen. Ausnahmen hierfür sind das Kolonkarzinom und das Pankreaskarzinom, die im Allgemeinen Mutationen des Ki-ras Onkogens aufweisen. Diese Mutationen konnten mit Hilfe der PCR in verschiedenen Organen wie dem Blut, dem KM oder Lymphknoten nachgewiesen werden [68, 20]. Eine weitere interessante DNS-basierte Nachweismethode ist die Analyse des p53 Gens in Resektionsrändern des Operationspräparates, die mit Hilfe der konventionellen Pathohistologie als tumorfrei diagnostiziert wurden. *Brennan et al.* konnten in ihren Untersuchungen zeigen, daß diese Analysen klinisch wichtige Daten bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen ergeben haben [9]. Die Detektion von mRNS durch eine RT PCR, bei der die mRNS in komplementäre cDNS umgeschrieben wird und dann durch eine PCR amplifiziert werden kann, ist eine weitere vielversprechende Methode zur Detektion einzelner okkulten Karzinomzellen. Bei dieser Methode wird mRNS, die in Tumorzellen unterschiedlich im Vergleich zu hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, analog der immunhistochemischen Methode, amplifiziert. Weil die Zytokeratine, vor allem CK 19 und 20, in den epithelialen Tumoren häufig überexprimiert werden,

verwendet man sie häufig als Markerantigene [10]. Jedoch konnten einige Untersuchungen zeigen, daß diese Transkripte auch in normalem Blut, KM oder Lymphknoten nachweisbar sind [26, 83]. Die Anwesenheit von Pseudogenen oder die Transkription von epithelspezifischen Markern in hämatopoetischen Zellen könnten Erklärungen für die niedrige Spezifität dieser Methodik sein. Daneben basiert die Spezifität der RT-PCR eng auf der Probenaufbereitung und den Versuchsbedingungen. Zum Beispiel konnten falsch positive Befunde bei CK 20 RT-PCR Analysen dadurch vermieden werden, dass nur mononukleäre Zellen verwendet wurden. Normale Granulozyten exprimieren ebenfalls CK 20 [65]. *Brakenhoff et al.* haben eine RT-PCR entwickelt, bei der das E 48 Antigen bei Patienten mit Kopf-Hals Karzinomen mit einer Sensitivität von einer Tumorzelle auf 2×10^7 hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden konnte [23]. Auch hier treffen die oben beschriebenen Limitationen der Methodik zu. Ein weiteres großes Problem bei der PCR ist die Quantifizierung, die bei der üblicherweise durchgeführten PCR nicht möglich ist, denn die Anzahl der Tumorzellen im KM stellt sich immer mehr als prognostisch wichtiger Faktor dar.

Abschließend kann man sagen, daß die molekularbiologischen Methoden wichtige Erkenntnisse erbracht haben, und sie einen weiteren interessanten Ansatz für die Detektion einzelner disseminierter Tumorzellen bei Karzinomen darstellen. Die prognostischen Aussagen sollten in weiteren klinischen Untersuchungen dargestellt und mit den Aussagen der immunzytochemischen Analysen korreliert werden.

Trotz der Fortschritte der klinischen Onkologie in den letzten Jahrzehnten hat das Vorhandensein residualer Tumorzellen die Verbesserung der Therapieaussichten deutlich limitiert. Die konventionellen Staging-Untersuchungen können zwar zuverlässige Informationen über den Anteil der Patienten geben, die wahrscheinlich ein Rezidiv erleiden. Sie können aber nicht voraussagen, ob vor allem Patienten in einem frühen Erkrankungsstadium nach der Primärtherapie ein hohes individuelles Risiko für ein Rezidiv haben. Es mußten neue Parameter gefunden werden, um diese Patienten herauszufiltern und gegebenenfalls die Therapie auch in einem frühen Tumorstadium intensivieren zu können. In den letzten Jahrzehnten wurden mehrere neue immunologische und molekularbiologische Methoden entwickelt, um die MRD zu diagnostizieren und charakterisieren. Viele Studien versuchen diese Methoden für den klinischen Gebrauch zu standardisieren und zu evaluieren. Wegen der einfachen Verfügbarkeit könnten KM und Blut für ein Monitoring auf okkulte Tumorzellen während

der Therapie oder nach Abschluß der Therapie dienen und so den individuellen Therapierfolg bestätigen oder ein Rezidiv frühzeitig erkennen helfen.

Die vielen Untersuchungen konnten demonstrieren, daß die Detektion und Charakterisierung einzelner disseminierter Tumorzellen im KM wichtige klinische Daten erbracht haben, die für das Tumorstaging und die Prognose der Karzinompatienten von großer Wichtigkeit sind. Vielleicht könnte dies zu einem deutlichen Fortschritt bei der Behandlung von Karzinomen beitragen.

2. Fragestellung

Bei Therapiebeginn von Kopf-Hals-Karzinomen ist die frühe Disseminierung einzelner Tumorzellen in sekundäre Organe wie z.B. dem Knochenmark schon meist erfolgt. Patienten, bei denen einzelne Tumorzellen disseminiert sind, sind häufig nach der Primärtherapie symptomfrei. Dieses frühe Generalisationsstadium kann mit den konventionellen Staginguntersuchungen (CT, MRT, Sonografie, Röntgen) sowie durch pathohistologische Untersuchungen nicht erkannt werden. Die Entwicklung monoklonaler Panzytokeratinantikörper wie dem A45-B/B3 machte es möglich, sensitive und spezifische Verfahren anzuwenden, um einzelne disseminierte Tumorzellen in mesenchymalen Organen wie dem KM zu detektieren. Das KM ist ein leicht zugängliches Untersuchungsmaterial und daher für Screening Untersuchungen gut geeignet. Viele Untersuchungen konnten zeigen, daß die immunhistochemisch nachgewiesenen Tumorzellen im KM prognostisch signifikant sind. Sie stellen einen vom Tumorstadium und dem Lymphknotenstatus unabhängigen Prognosefaktor dar. Die disseminierten Zellen haben bereits wichtige Schritte der Metastasierung absolviert und stellen dadurch in vivo selektionierte Zellen dar. Trotz der Fortschritte in der lokoregionären Kontrolle von Kopf-Hals-Karzinomen, weisen die zunehmende Metastasierung und die auftretenden Zweittumoren auf eine systemische Komponente dieser Erkrankung hin, für die die disseminierten Zellen eine wichtige Rolle spielen könnten. Erkenntnisse über die tumorbiologischen Charakteristika dieser Zellen liegen nur in sehr limitierter Form für Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen vor.

Hieraus ergab sich die Fragestellung, das tumorbiologische Verhalten einzelner disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten Kopf-Hals-Karzinomen in einem geeigneten Xenotransplantationsmodell zu analysieren. Im Mittelpunkt stand hierbei:

1. Sind diese immunhistochemisch nachweisbaren Zellen in der Lage in schwer immunsupprimierten NOD/SCID Mäusen Tumore zu bilden?
2. Sind humane epitheliale Zellen in diesen Maustumoren nachweisbar?
3. Wie sind die gefundenen Ergebnissen mit den klinischen Daten (TNM Stadium, Histologie) und dem klinischen Verlauf (Rezidiv, Zweittumor, Fernmetastasen) korreliert?

Als Untersuchungssystem wurde ein Xenotransplantationsmodell entwickelt, bei dem mononukleäre Zellen aus dem KM von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen in die

Nackenregion von NOD/SCID Mäusen injiziert wurden. Desweiteren wurden den Mäusen mononukleäre Zellen aus dem KM von Basalzellkarzinompatienten injiziert. Basalzellkarzinome bilden im Gegensatz zu den Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region nur selten Lymphknoten- und Fernmetastasen aus, also folglich unterliegen sie einem anderen Metastasierungsmuster. Als Kontrolle wurden den Mäusen mononukleäre Zellen aus dem KM von gesunden Patienten injiziert.

Mit Hilfe dieses Xenotransplantationsversuches soll es ermöglicht werden, mehr über das tumorbiologische Verhalten und die Metastasierungstendenz der disseminierten Tumorzellen zu erfahren, und so eine Änderung der bestehenden Therapieschemata beim Nachweis dieser Zellen zu erreichen. Neue Erkenntnisse tumorbiologischer Charakteristika früh disseminierter Tumorzellen könnten zu einem Verständnis der Metastasierungsvorgänge führen und damit durch frühe Therapiemodifikationen zu einer verbesserten Überlebensrate der Patienten beitragen.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

3.1.1 Allgemeine Geräte

DNS-Workstation, Uni Equip, Berlin

Färbeautomat , Shandon GmbH, Frankfurt a.M.

Gene Amp PCR-System 2400, Perkin Elmer, Überlingen

Hochdruckdampfsterilisator, KSG Sterilisatoren, Olching

Immunfluoreszenzmikroskop, Axiophot, Zeiss, Heidenheim

Lambda Bio Spectrometer, Perkin Elmer, Überlingen

Mikroprozessor pH-Meter 761, Knick, Berlin

Mikrowelle, HMA, Bosch, München

Minishaker, MS1, IKA Works Inc., Wilmington, USA

Plattenphotometer MR 5000 Reader, Dynatech, Denkendorf

Thermomixer 5436, Eppendorf, Köln

Universalmikroskop, Zeiss, Heidenheim

Wasserbad 1012, GFL, Burgwedel

3.1.2 Zentrifugen

Hettich EBA 12, Typ 1000, Tuttlingen

Medifuge, Heraeus Sepatech, Karlsruhe

Hettich Universal 30F, Tuttlingen

3.1.3 Elektrophoresegeräte

Mini-Protean II Electrophoresis Cell, BioRad, München

Sub-Cell-GT DNS Electrophoresis Cell, BioRad, München

3.2 Verbrauchsmaterialien

Die allgemeinen Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen: Kodak (Stuttgart), Nunc (Wiesbaden), Roth (Karlsruhe) sowie Schleicher und Schüll (Dassel) bezogen.

3.2.1 Chemikalien

Alle üblichen Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3.2.2 Feinchemikalien

Agarose NA, Pharmacia, Freiburg
Bromphenolblau, Serva, Heidelberg
Coomassie Blau R-250, Pharmacia, Freiburg
Ethidiumbromid, BioRad, München
TAE- Buffer (10x), Sigma, Deisenhofen
TEMED, Sigma, Deisenhofen
Tryptophanblau, Sigma, Deisenhofen

3.2.3 Reagenzsätze

QIAamp Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

3.2.4 Proteine und Peptide

Antikörperfreies AB Serum, Biotest AG, Dreieich
Ficoll Hypaque Dichtegradient , Pharmacia, Freiburg
Matrigel (Basement Membrane Matrix 40324), Becton Dickinson, Bedford, USA

3.2.5 Antikörper

Primärantikörper

berEP4, Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
A45-B/B3, Micromet GmbH, München
MOPC 21, Sigma, Deisenhofen

Sekundärantikörper

Alle sekundären Antikörper entsprechend der Spezies des Primärantikörpers und die für die Färbung notwendigen Reagenzien wurden von Dako Diagnostika GmbH, Hamburg, verwendet

3.2.6 Enzyme und Nukleinsäuren

dNTP, Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

Taq Polymerase, Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

Synthetische Oligonukleotide, Tip Molbiol, Berlin

1 kb DNS–Leiter, Gibco BRL, Eggenstein

123 kb DNS–Leiter, Gibco BRL, Eggenstein

3.3 Biologisches Material

3.3.1 Gewinnung und Aufbereitung des Knochenmarkpunkts

Im Rahmen der Tumoroperation oder während der Biopsie und Panendoskopie beim Tumorstaging wurden nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung des Patienten Knochenmarkaspirate (5-10ml) von der Spina iliaca anterior superior rechts und links entnommen. Eine mögliche Kontamination durch epitheliale Zellen wird durch eine kleine Hautinzision mit Hilfe eines Hämostilets vermieden. Um das Gerinnen des Untersuchungsmaterials zu vermeiden, wurde mit 2500 I.E. Heparin antikoaguliert. In der darauffolgenden Aufarbeitung wurde das Knochenmarksaspirat von Fettpartikeln, Gewebetrümmern und Blutbestandteilen gereinigt. In der Ficoll-Dichtezentrifugation wurden mononukleäre Zellen und Tumorzellen in der Interphase angereichert, während Erythrozyten und Granulozyten pelletierten. Die zellhaltige Interphase wurde isoliert und auf die Anzahl vitaler Zellen mit Hilfe der Trytophanblaufärbung, mit der devitale Zellen blau angefärbt wurden, untersucht.

Im Detail kann das Vorgehen bei der Bearbeitung folgendermaßen beschrieben werden:

- ⇒ heparinisiertes KM mit Hank`s Lösung auf 20 ml auffüllen
- ⇒ 10 min bei 200 x g zentrifugieren
- ⇒ Fett Überstand abpipettieren und Sediment resuspendieren
- ⇒ 20 ml Ficoll in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vorlegen und mit den entfetteten Knochenmarkszellen vorsichtig überschichten
- ⇒ 30 min bei 1000 x g zentrifugieren
- ⇒ Interphase abnehmen und mit PBS (pH 7.4) auf 50 ml auffüllen
(PBS: NaCl 150mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM, mit 5 M NaOH auf pH 7.4 einstellen)

- ⇒ 10 min mit 800 x g zentrifugieren
- ⇒ Überstand abdekantieren, Sediment resuspendieren und bei bestehender Kontamination mit Erythrozyten 2-10 ml Erythrozytenlysepuffer dazugeben für ca. 3 min
(Erythrozytenlysepuffer: NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 5.0 mM, EDTA 0.1 mM, mit 5 M KOH auf pH 7.4 einstellen)
- ⇒ erneut in PBS waschen, Überstand abdekantieren
- ⇒ Sediment resuspendieren und mit PBS auf 2 ml auffüllen
- ⇒ Ermittlung der Lebendzellzahl in der Neubauer Zählkammer:
10 μl Testansatz in einem Well einer ELISA Platte mit 10 μl Tryptophanblau mischen, anschließend in die Zählkammer einfüllen und die nicht angefärbten (vitalen) Zellen auszählen, wobei die Gesamtzellzahl gleich der Zellzahl in der Kammer x dem Volumen (in ml) im tube x 2 x 10⁴ ist
- ⇒ pro Objektträger 500.000 Zellen bei 150 x g für 5 min zytozentrifugieren
- ⇒ Zytospinpräparate über Nacht lufttrocknen lassen
- ⇒ Sofort färben oder bei – 80°C lagern

3.3.2 Gewinnung und Aufarbeitung des Tumormaterials

Im Rahmen des tumorchirurgischen Eingriffes oder bei der Panendoskopie und Biopsie wurde nach ausführlicher Aufklärung des Patienten und dessen schriftlichem Einverständnis Tumormaterial als Referenz für folgende immunhistochemische Untersuchungen entnommen und in Tissue Taq in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Das Material wurde dann bei –80°C konserviert .

3.3.3 Versuchstiere

Für alle Experimente wurden männliche NOD/SCID Mäuse verwendet [63]. Diese Mäuse zeigen folgende Eigenschaften: Sie leben ca. 250 Tage und versterben gewöhnlich an einem Thymuslymphom. Das Blut weist normale Werte für weiße und rote Blutkörperchen auf. Jedoch besitzen die Tiere keine reifen T- und B-Lymphozyten, sowie keine natürliche Killer (NK)-Zellen. Der Prozentsatz an Makrophagen und Granulozyten ist allerdings erhöht. Der Immunglobulin-Wert im Serum ist während der gesamten Lebensdauer sehr niedrig, und die Tiere besitzen keine Komplementaktivität. Die Mäuse wurden unter streng sterilen und standardisierten Bedingungen (RT 20°C, 50% relative Luftfeuchtigkeit, 12 h Tages- und Nachtrhythmus) in Abluftkäfigen

gehalten. Das Futter sowie das Stroh wurden autoklaviert und das Trinkwasser wurde angesäuert. Lediglich Tiere mit einem IgG Spiegel von unter 100 ng/ml wurden in die Experimente eingeschlossen. Moribunde Tiere wurden getötet und einer Autopsie zugeführt. Alle durchgeführten Experimente wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt (Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung G0247/98, erteilt vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, gültig bis 30.09.2009).

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 DNS Extraktion

Die DNS Extraktion wurde mit Hilfe des DNS Extraktionskits (Qiagen) durchgeführt, wobei die Herstellerangaben hierbei genau befolgt wurden.

3.4.2 DNS PCR

Eine Screening Untersuchung für humane genomische DNS wurde mit Hilfe einer PCR und Primern, die spezifisch an ein 850 bp DNS Fragment der α -Satelliten Region des humanen Chromosoms 17 binden, durchgeführt. Die PCR Reaktion und Primer wurden analog der Publikation von *Warburton et al.* verwendet [75]. Für die Experimente wurden 250 ng DNS eingesetzt, als Positivkontrolle diente humane DNS, als Negativkontrolle Maus DNS.

3.5 Pathohistochemische Methoden

3.5.1 Färbung der KM-Zytospinpräparate (APAAP-Technik)

Nach der Entnahme der Beckenkammpunktate (2-10 ml von jeder Seite) wurden die vollheparinisierten Proben wie unter 3.3.1. beschrieben verarbeitet. Nebenwirkungen bei den Patienten, die über ein unangenehmes Gefühl am nächsten Tag hinausgehen, wurden nicht beobachtet. In der überwiegenden Anzahl der Fälle wurde die Punktion als völlig symptomlos beschrieben.

Der immunhistochemische Nachweis der disseminierten Tumorzellen wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper A45-B/B3 durchgeführt und unter einem Konferenzmikroskop von 2 unabhängigen Beobachtern ausgewertet. Pro Patient werden 1 Million Zellen pro Beckenkammpunktionsseite analysiert.

Der Nachweis von disseminierten epithelialen Zellen beruht darauf, daß der monoklonale Mausantikörper A45-B/B3 ein gemeinsames Epitop der Keratinkomponenten 8, 18 und 19 und vermutlich auch noch weiterer Zytokeratine erkennt und bindet (Panzytokeratinantikörper). Der im Überschuß zugegebene Sekundärantikörper bindet monovalent an das Fc Fragment. Die freibleibende Valenz wird im letzten Schritt durch den Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APPAP) Komplex besetzt. Dieser besteht aus einem für die alkalische Phosphatase spezifischen Mausantikörper. Nach der Zugabe des Enzyms kommt es zu einer Komplexbildung unter Beteiligung eines Antikörpers und zwei bis drei Enzymmolekülen, wodurch die Sensitivität erhöht wird. Die Substratlösung für die Entwicklung des entstandenen Komplexes besteht aus Neufuchsin (Chromogen) und Naphtol AS Biphosphat (Substrat). Nach der enzymatischen Umsetzung entsteht ein leuchtend roter Diazofarbstoff. Um die in Zielzellen möglicherweise vorhandene alkalische Phosphatase zu blockieren, wird der spezifische Inhibitor Levamisol eingesetzt. Weitere unspezifische Bindungsstellen stellen die Fc Fragmente der Antikörper dar, die jedoch durch die Inkubation mit AB-Serum abgeblockt werden. Um Sensitivität und Spezifität der Färbungen zu beurteilen, wurden folgende Kontrollen bei jeder Färbung mitgeführt. Die Positivkontrolle aus Zytospinpräparaten der Zelllinie A431 diente zur Beurteilung der Qualität der Färbung. Eine Negativkontrolle erfolgte durch Zellen der zu untersuchenden Probe, die mit einem Antikörper (MOPC-21) inkubiert wurden. Der Antikörper lässt die Bindung des Brückenantikörpers nicht zu und die folgende APAAP Reaktion bleibt aus. Sind trotzdem Farbreaktionen zu beobachten, kann man diese auf unspezifische Bindungen oder ungenau durchgeführte Waschschrte zurückzuführen. Die Färbung kann in diesem Fall nicht ausgewertet werden und muss wiederholt werden.

Die Färbung wird wie folgt durchgeführt, wobei alle Färbe- und Inkubationsschritte in der feuchten Kammer durchgeführt werden.

- ⇒ Pro Zytospinpräparat werden 10^5 Zellen aufgetragen und über Nacht luftgetrocknet. Das Zellareal wird dann mit einem Wachsstift umfahren, um das Auslaufen der Lösungen zu vermeiden.
- ⇒ Inkubation der Präparate mit 150 µl 10% AB-Serum in PBS, Abklopfen
- ⇒ Inkubation mit 150 µl Primärantikörper A45–B/B3 (unverdünnt, 2.5-4.0 µg/ml), bzw MOPC-21 (1:400, 2.5 µg/ml) für 45 min, Waschen in PBS

- ⇒ Inkubation mit 150 µl Brückenantikörper Z 259 (1:20, 160 µg/ml) für 30 min, Waschen in PBS
 - ⇒ Inkubation mit dem APAAP Komplex (1:100, 1 µg/ml) für 30 min, Waschen in PBS
 - ⇒ Objektträger in die mit Substratlösung gefüllten Küvetten überführen und 20 min entwickeln lassen, waschen in PBS
- Substratlösung bestehend aus 3 Einzellösungen:
1. 90 mg Levamisole in 62.5 ml 0.2 Trislösung (pH 9.7) lösen und auf 187.5 mit Aqua dest. auffüllen.
 2. 50 mg NaNO₂ in 1.25ml Aqua dest. lösen und 500ml 5% Neufuchsin (5g in 100ml 2M HCl) dazugeben und schütteln bis Blasen entstehen.
 3. 125 mg Naphtol-AS-Biphosphat in 1.5 ml N, N-Dimethylformamid lösen.
 1. und 2. mischen, dann 3. dazugeben und alles mehrmals filtrieren bis eine uringelbe Flüssigkeit entsteht.
- ⇒ Im Anschluß an die Färbereaktion werden die Objektträger in PBS gewaschen und nach dem Antrocknen sofort mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Danach können die Präparate bei Raumtemperatur gelagert werden.

3.5.2 Immunhistochemische Färbung der Maustumore und Organe

Die Organe und die gewachsenen Nackentumoren wurden den toten Mäusen sofort entnommen und in flüssigem Stickstoff eingebettet in Tissue Taq schockgefroren. Die Proben wurden dann bei -80°C gelagert. Von diesen wurden 5 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und diese über Nacht an der Luft getrocknet. Sie wurden anschließend entweder sofort gefärbt oder bei -80°C gelagert. Es wurde eine Immunoperoxidase Färbung mit Ber-EP4 als Primärantikörper durchgeführt. Dieser humanspezifische Antikörper ist gegen epithelspezifische Adhäsionsmolekül Ep-CAM (EGP-40 oder 17-1A Antigen) gerichtet und wird von einer großen Anzahl von Karzinomen sowie von Kopf-Hals-Karzinomen exprimiert. Als Negativkontrolle wurden epitheliale Gewebe wie z.B. Mauslunge ohne den entsprechenden Primärantikörper mitgefärbt. Als Positivkontrolle diente Tumorgewebe des Primärtumors. Alle verwendeten Reagenzien und Kits wurden von der Firma Dako bezogen und nach Herstellerangaben verarbeitet.

Die Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt:

- ⇒ Fixierung der Kryoschnitte für 10 min in Aceton

- ⇒ Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität durch 3% Hydrogen Peroxidase für 5 min
- ⇒ Inkubation mit 1% AB-Serum in PBS für 30 min, Waschen in PBS
- ⇒ Inkubation mit dem Primärantikörper (1:100) ber-EP4 für 30 min, Waschen in PBS
- ⇒ Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (1:200) für 15 min
- ⇒ Inkubation mit der mit Streptavidin konjugierten Peroxidase (1:300 in Tris-Puffer) für 15 min, Waschen in PBS
- ⇒ Detektion der Peroxidase Aktivität durch das Chromogen AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) und H₂O₂.
- ⇒ Gegenfärbung der Schnitte mit Harris`Hämatoxyllin und eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine

3.5.3 Hämalaun-Eosin Übersichtsfärbung der Nackentumoren

Für die pathohistologische Beurteilung der Kryoschnitte der Nackentumoren aus der Maus wurden zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen noch Übersichtsfärbungen nach der folgenden Methode durchgeführt:

- ⇒ Inkubation der Schnitte in Hämalaunlösung nach Mayer (1g Hämatoxyllin in 10 ml Ethanol mit Aqua dest. auf 1l auffüllen. Zugabe von 0.17g Natriumiodat und 50 mg Kalium-Aluminiumsulfat. Nach vollständigem Lösen Zugabe von 50g Chloralhydrat und 0.1g Zitronensäure (ergibt eine rotviolette Lösung) für 10 min, Abspülen mit Wasser
- ⇒ 2-3 mal in HCl-Ethanol eintauchen
- ⇒ in Leitungswasser fließend wässern für 10 min
- ⇒ Inkubation in Eosinlösung (1g Eosin in 10ml Aqua dest.) plus 2 Tropfen Eisessig für 5 min, Abspülen mit Wasser
- ⇒ In Ethanol 70% kurz tauchen und schwenken
- ⇒ In Ethanol 96% kurz schwenken, wiederholen
- ⇒ In Ethanol absolut kurz schwenken, wiederholen für 2 min
- ⇒ Dreimal in Xylen stellen und mit Kaisers Glyceringelatine eindeckeln

3.6 Patienten

In die Untersuchung wurden 33 Patienten (n=33) eingeschlossen, davon hatten 29 ein histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (n=29), 2 Patienten ein histologisch gesichertes Basalzellkarzinom (n=2) und 2 gesunde Patienten (n=2), die aufgrund eines dentoalveolären Eingriffes mit Beckenkammpongiosa versorgt werden mußten. Die Tumorpatienten wurden präoperativ standardisierten Staginguntersuchungen unterzogen (Routinelabor, Röntgen Thorax, Abdomensonografie, Computertomografie oder Magnetresonanztomografie der Kopf-Hals-Region, in einigen Fällen auch eine 3-Phasen-Knochenszintigrafie). Im Rahmen der Tumoroperation bzw. bei der Panendoskopie und Zahnsanierung vor geplanter Radiatio wurden von beiden Seiten des Beckenkammes KM-Aspirate genommen und wie im Folgenden beschrieben sofort weiterverarbeitet. Die Patienten wurden nach dem TNM-System klassifiziert und nach abgeschlossener Therapie regelmäßig in unserer Poliklinik nachkontrolliert. Dabei wurden regelmäßige Ultraschalluntersuchungen der Halsregion sowie alle 6 Monate ein Kontroll-CT durchgeführt. Daneben fanden in regelmäßigen Abständen klinische Kontrollen statt.

3.7 Vorgehensweise bei den tierexperimentellen Versuchen

Die entnommenen KM-Aspirate wurden sofort postoperativ zu gleichen Teilen geteilt, wobei der eine Teil dem Screening nach disseminierten Tumorzellen zugeführt wurde und der andere Teil den Mäusen transplantiert wurde. Insgesamt wurden 33 KM Aspirate (n=33) in die Mäuse transplantiert. Dazu wurden jeweils 10^7 mononukleäre Zellen 1:1 mit Matrigel gemischt und in die Nackenregion der nicht anästhesierten Mäuse injiziert. Je nach Anzahl der vorhandenen Knochenmarkszellen konnten 2-12 Mäuse pro Patient transplantiert werden. Die Mäuse selbst wurden in zwei Gruppen unterteilt: Die eine Gruppe (B) wurde nach 4 Wochen getötet, die andere Gruppe (A) wurde gemäß ihrer natürlichen Lebenserwartung am Leben gelassen und in moribundem Stadium getötet. Sofort nach dem Tod wurden Nackentumore, Blut, Leber, Lunge, Milz und Gehirn entnommen. Die Entnahmen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C kryokonserviert. Teilweise wurden die entnommenen Proben für weitere Analysen in Formalin fixiert. Die Mäuse der Gruppe A wurden regelmäßig zweimal in der Woche inspiziert und palpable Tumoren in der Nackenregion mit Hilfe eines speziellen Lineals ausgemessen.

3.8 Statistische Methodik

Die Nullhypothese der Unabhängigkeit wird mit dem exakten Fisher-Test getestet. Alle Tests erfolgen zweiseitig zum Signifikanzniveau 0.05. Die Auswertung erfolgt mit der Software Stata 10.0.

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die tumorbiologischen Charakteristika einzelner disseminierter Tumorzellen bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen in einem Xenotransplantationsmodell mit NOD/SCID Mäusen näher untersucht werden. Hierzu wurden von 33 Patienten (n=33, 29 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region, 2 Basalzellkarzinompatienten, 2 gesunde Kontrollpatienten) präoperativ KM Punktate aus der Spina iliaca superior beidseits entnommen. Die gewonnenen Aspirate wurden heparinisiert und geteilt. Der eine Teil wurde zur immunhistochemischen Detektion einzelner disseminierter Tumorzellen aufgearbeitet, der andere entsprechend verarbeitet und wie beschrieben in die Nackenregion der Mäuse injiziert. Der eine Teil der Mäuse (Gruppe B) wurde nach 4 Wochen getötet, der andere bis zu dem natürlichen Tod (Gruppe A) beobachtet. In beiden Gruppen wurden aufgetretene Nackentumoren regelmäßig gemessen und beobachtet. Sofort nach dem Tod der Tiere wurden die Nackentumore präpariert und die Organe entnommen. Tumore und Organe der Mäuse wurden kryokonserviert und mit Hilfe von verschiedenen Methoden (Pathohistologie, Immunhistochemie, PCR) auf das Vorhandensein von menschlichen Zellen analysiert.

4.1 Klinische Daten der Patienten

In diese Untersuchung wurden 33 Patienten, die in der Zeit von Mai 1997 bis Mai 1998 in der Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der Charité, Humboldt Universität, Berlin, eingeschlossen. Von den Patienten wurde ein schriftliches Einverständnis zu einer Beckenkammpunktion sowie zur Gewebeprobeentnahme zu diagnostischen Zwecken eingeholt und auf die weitere Verarbeitung hingewiesen. 29 Patienten (n=29) hatten ein Plattenepithelkarzinom, 2 (n=2) ein Basalzellkarzinom und 2 Patienten (n=2) hatten einen gutartigen zystischen Prozess des Unterkiefers, der mit Beckenkammpongiosa versorgt werden mußte. Als Kontrollgruppe wurden die gesunden Patienten angesehen. Alle Tumorpatienten wurden einem präoperativen Staging unterzogen, das eine Computertomografie und/oder eine Magnetresonanztomografie der Kopf-Hals-Region, eine Sonografie des Halses, eine Abdomensonografie, Röntgen Thorax und in einigen Fällen Knochenszintigrafie beinhaltete. Bei keinem der Patienten konnten zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen Fernmetastasen diagnostiziert werden. Zum Zeitpunkt der

Operation (entweder bei der radikalen Tumoroperation oder bei der Panendoskopie, Biopsie und Zahnsanierung vor einer Radiatio) wurden Beckenkammpunktate von der Spina iliaca anterior superior beidseits entnommen. Diese wurden dann vollheparinisiert, zur besseren Verteilung geschüttelt und in zwei Anteile aufgeteilt. Ein Teil wurde entsprechend der oben beschriebenen Methode zu Zytospins aufbereitet, gefärbt und wie beschrieben analysiert. In den anderen Aliquot wurden die mononukleären Zellen bestimmt und 10^7 Zellen in einem Volumen von 0.1 ml mit 0.1 ml mit Matrigel vermischt und in die Nackenregion der Mäuse injiziert. Dabei wurden jeweils so viele Mäuse beimpft, wie es aufgrund der Zellzahl möglich war.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen über die gefundenen Pateintendaten und der erfolgten Therapieverfahren.

	Versuchsnummer	TNM Stadium	CK	Histologie	Therapie	Fernmetastasen	Verlauf
B.A. 39	5337	T4N2Mx G2	neg.	Mäßig diff. PECA	Radiochemotherapie	Keine	Kein Lokalrezidiv
B.G. 57	5338	T3N1Mx G2	Neg.	Mäßig diff. verhornendes PECA	Radiochemotherapie	Keine	Kein Lokalrezidiv
G. M. 54	5345	T4N1Mx G3	Neg.	Schlecht diff. nekrotisierendes PECA	Radiochemotherapie	Keine	Lokalrezidiv, an TM verstorben
R. W. 70	53252	T1N0Mx G3	Neg	Schlecht diff. PECA	Tumorradi- kaloperation	Keine	Kein Rezidiv
B. R. 69	5373	T2N0Mx G2	Neg.	Mäßig diff. PECA	Tumorradi- kaloperation	Keine	Kein Rezidiv
H. H. 71	5374	T3N1Mx G3	Neg.	Schlecht diff. PECA	Radiochemotherapie	Keine	Sekundäres Basalzellkarzinom
B., H. 59	5375	T1N0Mx G2	Pos.	Mäßig diff., verhornendes PECA	Tumorradi- kaloperation	Lungenmetastasen	Lokalrezidiv
S. E. 52	5378	T2N0Mx G2	Pos.	Schlecht diff. PECA	Tumorradi- kaloperation	Keine	Kein Rezidiv
S. H. 64	5385	T4N1Mx G1	Neg.	Gut diff. verhornendes PECA	Tumorradi- kaloperation	Keine	Kein Lokalrezidiv
S. F. 38	5390	T4N2Mx G3	Neg.	Mäßig diff. PECA	Radiatio	Keine	Lokalrezidiv, an TM verstorben

V. H. G. 64	5397	T1N1Mx G3	Neg.	Schlecht diff PECA, V.a. AdenoCA		Keine	Kein Lokal- rezidiv
S. M. 86	5419	T1N0Mx G2	Neg.	Mäßig diff. PECA	Tumorradi- kaloperation	Lungen- metastasen	Lokalrezidiv
S. G. 47	5420	T4N1Mx G3	Pos.	Partiell verhornendes PECA	Radiochemotherapie, Afterloading	Lungen- metastasen	Lokalrezi- div, verstorben durch Suizid
M. C. 68	5422	T4N1Mx G2	Neg.	Kleinherdig verhornendes PECA	Tumorradikal- operation	keine	Kein Lokal- rezidiv
R. G. 69	5429	T1N0Mx G1	Pos.	Beginnend invasives PECA	Tumorradikal- operation	Keine	Kein Lokal- rezidiv
K. P. 59	5435	T4N1Mx G2	Neg.	Mäßig diff., teils verhornendes PECA	Tumorradikal- operation	keine	Kein Lokal- rezidiv
M. P. 55	5439	T1N1Mx G2	Neg.	Mäßig diff. verhornendes PECA	Tumorradikal- operation, Radiatio	Keine	Kein Lokal- rezidiv
M. E. 87	5461	T4N1Mx G3	Neg	Nicht verhornendes PECA	Radiatio	Keine	Kein Lokal- rezidiv
F. E. 84	5462	T1N0Mx G2	Neg.	Mäßig diff. PECA	Tumorradi- kaloperation	Keine	Kein Lokal- rezidiv, an Lungen- embolie verstorben
B. F. 65	5466	T1N1Mx G3	Neg.	Schlecht diff. PECA	Radiochemotherapie	Keine	Kein Lokal- rezidiv
B. G. 85	5498	T1N0Mx G3	Nicht unter- sucht	Schlecht diff. PECA	Tumorradi- kaloperation	Keine	Kein Lokalrezidiv
D. R. 61	5499	T4N1Mx	Pos.	PECA	Radiochemotherapie	Vorhanden	Lokalrezidiv
K.,W. 70	5502		Nicht unte- rsucht	Basalzellkarzinom	Tumorradi- kaloperation	Keine	Kein Lokal- rezidiv
M. C. 68	5503	T4N1Mx G2	Neg.	Mäßig diff. PECA	Tumorradi- kaloperation	Keine	Kein Lokal- rezidiv
K. E. 56	5504	T1N1M0	Nicht unter- sucht	PECA	Tumorradi- kaloperation	Keine	Kein Lokal- rezidiv
T. W. 64	5506	T4NxMx G2	Pos.	Mäßig diff. PECA	Radiochemotherapie	Vorhanden	Lokalrezidiv
H. H. 61	5511	T4N1Mx G2	Nicht unter- sucht	Mäßig diff verhornende PECA	Radiochemotherapie	Keine	Lokalrezidiv, verstorben an Herz- versagen
R. M. 37	5526	Normalpati- ent	Neg.				

V. P. 63	5522	T1N0Mx G2	Nicht unter- sucht	Mäßig diff. Verhornendes PECA	Tumorradikal- operation	Keine	Keine
V.E. 61	5526		Nicht unter- sucht	Basalzellkarzinom	Tumorradikal- operation	Keine	Kein Lokalrezidiv
A. B. 51	5529	T4N2Mx G3	Nicht unter- sucht	Stark entdiff. PECA	Radiochemotherapie	Keine	Kein Lokal- rezidiv
P. G. 50	5530	T1N0Mx G2	Nicht unter- sucht	Mäßig diff. PECA	Tumorradikal- operation	Keine	Kein Lokal- rezidiv
H. A. 45	5550	Normal- patient	Neg.				

Tabelle 1 Klinische Daten der Patienten

Zum Zeitpunkt der Beckenkampnpunktion hatten 14 Patienten ein T1/T2 Stadium, 15 wiesen einen T3/T4 Tumor auf. Die Patienten wurden in regelmäßigen Abständen im Rahmen der Tumornachsorge in einer speziellen Sprechstunde betreut und geringfügige Veränderungen dokumentiert. Im Verlauf der nun bis zu drei Jahre dauernden Nachbeobachtungszeit konnten bei 9 von 29 Plattenepithelkarzinom-Patienten (31%) ein Lokalrezidiv festgestellt werden. Bei 5 von 29 Patienten (17%) konnten Fernmetastasen diagnostiziert werden. Weder bei den Basalzellkarzinompatienten noch bei den gesunden Probanden konnte ein Rezidiv oder Metastasenbildung festgestellt werden. Drei der Tumorpatienten sind in der Zwischenzeit an nicht tumorassoziierten Erkrankungen verstorben, zwei sind infolge der Tumorerkrankung verstorben. 6 der 29 Karzinompatienten (20%) hatten CK-positive Zellen im KM.

4.2 Analyse der Beckenkammpunktate

Nach der Entnahme der Beckenkammpunktate (2-10 ml von jeder Seite) wurden die vollheparinisierten Proben sofort verwertet.

Der immunhistochemische Nachweis der disseminierten Tumorzellen wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper A45-B/B3 durchgeführt. Durch die APAAP-Technik wurde diese Bindung visualisiert und dann unter einem Konferenzmikroskop von 2 unabhängigen Beobachtern ausgewertet. Pro Patient werden 1 Million Zellen pro Beckenkammpunktationsseite ausgewertet.



Abb.3 CK-Positive Zelle im KM

Von den 29 Tumorpatienten wurden 22 (n=22) auf das Vorhandensein Zytokeratin-positiven Zellen untersucht. Bei den beiden Kontrollpatienten konnten keine CK-positiven Zellen in den Knochenmarkspunktaten nachgewiesen werden. 6 Tumorpatienten hatten CK-positive Zellen im KM (27%), während bei 16 Tumorpatienten (72%) keine CK-pos. Zellen nachgewiesen werden konnten. Bei beiden Patientengruppen lag ca. in der Hälfte der Fälle ein T1/ T2 Stadium vor, die andere Hälfte wies ein T3/T4 Stadium auf. Während bei der Gruppe der CK-negativen Patienten nur 3 Patienten ein Lokalrezidiv erlitten (19%), hatten die CK-positiven Patienten selbst in der kurzen Nachbeobachtungszeit von höchstens 3 Jahren zu 67 % ein Lokalrezidiv (4 Patienten). Weiterhin wiesen 67% der CK-positiven Patienten (4 Patienten) Fernmetastasen auf, während dies nur 6% bei den CK-neg. Patienten (1 Patient) taten.

Tabelle 2 zeigt die gefundenen Daten in der Übersicht.

	T1/2	T3/4	Lokal- rezidiv	Fern- meta- stasen
CK pos 27% (6)	50% (3)	50% (3)	67% (4)	67% (4)
CK neg 72% (16)	44% (7)	56% (9)	19% (3)	6% (1)

Tabelle 2 CK Status und klinische Daten der Patienten

Statistische Auswertung

1. Test auf Unabhängigkeit von CK Status und Tumorstadium T1/2 bzw. T3/4:
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 1.000$

Zwischen CK Status und Tumorstadium besteht keine signifikante Abhängigkeit.

2. Test auf Unabhängigkeit von CK Status und Auftreten eines Lokalrezidivs
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.054$

Es deutet sich an, dass Lokalrezidive bei Patienten mit positivem CK Status häufiger auftreten als bei Patienten mit negativem CK Status. Es besteht jedoch keine signifikante Abhängigkeit ($p=0.054$)

3. Test auf Unabhängigkeit von CK Status und Auftreten von Fernmetastasen
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.009$

Ob es zu Fernmetastasen kommt, hängt signifikant vom CK Status ab.

Trotz der geringen Fallzahlen läßt sich hier, der auch in vielen Studien belegte Trend verfolgen, daß CK-positive Zellen einen prognostisch signifikanten Faktor darstellen, der unabhängig vom TNM Stadium auf eine systemische Disseminierung hinweist und zu häufigen Rezidiven führt. Das Vorhandensein von Fernmetastasen hängt signifikant vom CK Status ab.

4.3 Tierexperimentelle Ergebnisse

Da es nur wenige Untersuchungen zum biologischen Verhalten und Metastasierungspotential der früh disseminierten Zellen gibt, wurde ein Xenotransplantationsmodell entwickelt, das in vivo ermöglichen sollte, das Verhalten und die Proliferationstendenz dieser Zellen näher zu analysieren.

Die entnommenen KM-Aspirate wurden sofort postoperativ zu gleichen Teilen geteilt, wobei der eine Teil dem Screening nach disseminierten Tumorzellen zugeführt wurde und der andere Teil den Mäusen transplantiert wurde. Insgesamt wurden 33 KM Aspirate (n=33) in die Mäuse transplantiert. Dazu wurden jeweils 10^7 mononukleäre Zellen 1:1 mit Matrigel gemischt und in die Nackenregion der nicht anästhesierten Mäuse injiziert.



Abb.4 Injektion des KM-Punktates in die NOD/SCID Maus

Je nach Anzahl der vorhandenen Knochenmarkszellen konnten 2-12 Mäuse transplantiert werden. Die Mäuse selbst wurden in zwei Gruppen unterteilt: Die eine Gruppe (B) wurde nach 4 Wochen getötet, die andere Gruppe (A) wurde gemäß ihrer natürlichen Lebenserwartung am Leben gelassen und in moribundem Stadium getötet. Sofort nach dem Tod wurden Blut, Leber, Lunge, Milz und Gehirn aus den Mäusen entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und teilweise in Formalin fixiert für weitere Analysen. Die Mäuse der Gruppe A wurden regelmäßig zweimal in der Woche inspiziert und palpable Tumoren in der Nackenregion mit Hilfe eines speziellen Lineals ausgemessen. Die gewonnenen Organe und Nackentumore wurden dann mit Hilfe verschiedener Methoden (Immunhistochemie, PCR und Pathohistologie) auf humane Zellen untersucht.



Abb. 5 Präparation des Nackentumors in der NOD/SCID Maus

Von den Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region konnten in den mit ihrem KM beimpften Mäusen in 65 % palpable Nackentumoren nachgewiesen werden. Weder bei den Basalzellkarzinompatienten noch bei den gesunden Kontrollpatienten konnten palpable Nackentumoren in den Mäusen nachgewiesen werden. Das Tumorstadium der Patienten hatte keinen Einfluß auf das Vorhandensein von Nackentumoren in den Mäusen. Jedoch zeigte sich, daß in 83% der CK-positiven Patienten ein palpabler Nackentumor in den Mäusen nachgewiesen wurde, während dies nur bei 56% der CK-negativen Patienten der Fall war.

4.3.1 Pathohistologische Untersuchungen

Fünfzehn gewachsene Nackentumoren (n=15) in den Mäusen von 10 verschiedenen Karzinompatienten wurden in Formalin fixiert, aufgeschnitten und nach einer HE-Färbung einer konventionellen histopathologischen Untersuchung durch die Pathologie der Charité unterzogen. In 14 Fällen wurde lediglich eine unspezifische Gewebsreaktion mit Bindegewebsproliferation in den Mausnackentumoren festgestellt. In einem Fall korreliert jedoch der klinische Verlauf mit dem Befund des Nackentumors in der Maus. In einem der untersuchten Nackentumore fand der Pathologe suspekten plattenepitheliale Zellen. Das KM Punktat des Patienten, D. R., Versuchsnummer 5499, in der Nod/SCID Maus führte in einer der 4 beimpften Mäuse zu einem tastbaren Nackentumor, der auch pathohistologisch untersucht wurde. Der Patient hatte zum Zeitpunkt der KM-Entnahme ein T4N1M0 Plattenepithelkarzinom des anterioren Mundbodens, im KM Punktat konnten disseminierte Tumorzellen nachgewiesen werden. Der Patient entwickelte schon 2 Jahre nach der Primärdiagnose ein Lokalrezidiv, sowie Fernmetastasen, was den aggressiven Charakter seines Tumors verdeutlicht. Die Abb. 6 zeigt den pathohistologischen Befund mit den suspekten Zellen.

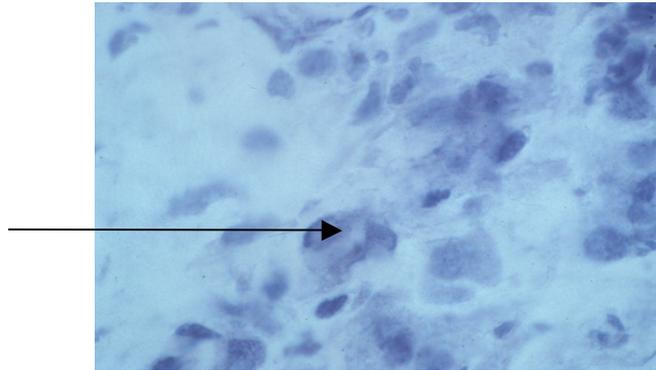


Abb.6 Nackentumor aus der Maus von Patient D.R., in HE Färbung, Versuchsnr. 5499

4.3.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Da die konventionelle Pathohistologie nur limitierte Aussagen über den Anteil an humanen epithelialen Zellen in den Organen und gewachsenen Maustumoren geben konnte, wurde eine immunhistochemische Analyse der Organe und wenn vorhanden der Nackentumore angeschlossen. Sofort nach dem Tod der Mäuse wurde das Gewebe schockgefroren, dann mittels eines Kryostaten aufgeschnitten und nach Trocknung gefärbt. Für die Färbung wurde der monoklonale Antikörper ber-EP4 verwendet. Dieser reagiert spezifisch mit dem Ep-Cam, EGP 40 oder 17-1A Antigen, einem epithelspezifischen interzellulären Adhäsionsmolekül. Dieses wird auf der Zelloberfläche der meisten menschlichen Epithelien und auf einer Vielzahl der Karzinome unter anderem auf Kolonkarzinomen, Lungenkarzinomen und auf Kopf-Hals-Karzinomen exprimiert. Dieser Antikörper reagiert humanspezifisch. Die Reaktion wurde mit Hilfe der Immunperoxidase Reaktion sichtbar gemacht. Kreuzreaktionen mit dem Mausgewebe konnten so ausgeschlossen werden. Als Negativkontrolle wurde immer epitheliales Gewebe aus gesunden NOD/SCID Mäusen sowie Schnitte ohne den Primärantikörper mitgefärbt. Eine Kreuzreaktion fand nicht statt. BerEP4 positive Zellen in den Mausorganen konnten in 21 % (6 Karzinompatienten) nachgewiesen werden.

Die Tabelle 3 zeigt eine Übersichtstabelle der gefundenen berEP4 positiven Zellen in den Mausorganen.

Versuchsnummer	BerEP4 pos. Mausorgane
5374	Gehirn
5375	Milz Lunge
5378	Milz Gehirn
5385	Milz Gehirn
5466	Milz
5506	Milz Nackentumor
5511	Milz

Tabelle 3 BerEP4 positive Organe in den NOD/SCID Mäusen

Bei den mit dem KM von Basalzellkarzinom und Normalpatienten konnten in keinem der untersuchten Mausorganen berEP4 positive Zellen nachgewiesen werden. Die Abb. 7 zeigt ein berEP4 positives Zellcluster in der Milz einer NOD/SCID Maus

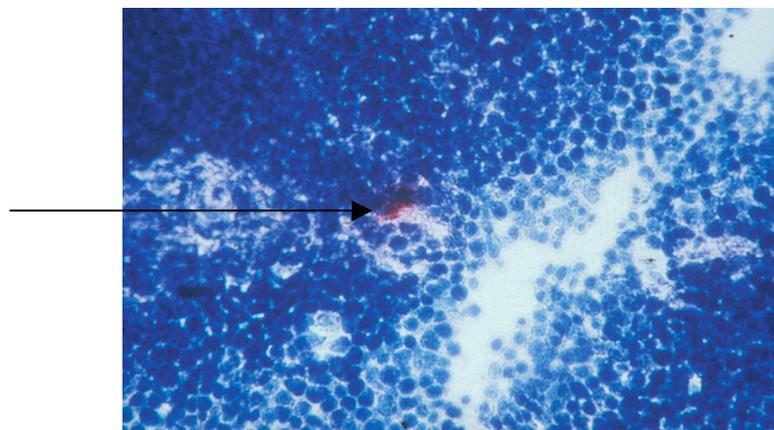


Abb.7 ber EP4 positives Zellcluster in der Nod/Scid Maus

Das Tumorstadium hatte keinen Einfluß auf den Nachweis von berEP4 positiven Zellen. Jedoch zeigte sich, daß bei den CK-positiven Patienten in 50 % der Fälle in den

Mausorganen berEP4-positive Zellen nachgewiesen werden konnten, während bei den CK-negativen Patienten dies nur in 19% der Fälle nachzuweisen war.

Da manche Karzinome auch eine Downregulation des 17-1A Antigens aufweisen können, wurden, wenn vorhanden, die Schnitte des Primärkarzinomes auf die Expression dieses Antigens untersucht. Die von uns untersuchten Primärkarzinomschnitte (n=20) waren alle positiv für das 17-1A Antigens, welches durch den mAb berEP4 detektiert wird.

4.3.3 PCR Analyse-Ergebnisse der humanspezifischen PCR (α -Satelliten DNS des Chromosoms 17)

Um noch eine spezifischere Analyse der Mausorgane und des Mausblutes vornehmen zu können, wurde eine humanspezifische DNS PCR angewendet, die schon von *Warburton et al.* 1991 beschrieben wurde [75]. Dabei wurden Primer verwendet, die spezifisch ein 850 basenpaarlanges Fragment der α - Satellitenregion des humanen Chromosoms 17 erkennen. Jedoch ermöglicht diese PCR nicht zwischen epithelialen und anderen humanen Zellen zu unterscheiden. Die humanspezifische PCR war bei 55 % der Mäuse positiv, die mit KM von Karzinompatienten beimpft wurden. Bei einem der Basalzellkarzinompatienten zeigte sich ein positiver Befund. Die mit KM von gesunden Patienten beimpften Mäuse wiesen keine PCR positiven Signale auf. Weder das Tumorstadium noch der CK-Status hatten signifikanten Einfluß auf den Nachweis humaner DNS in den Mäusen.

5.4 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

Um die Daten der Patienten in einer Übersicht zusammenzufassen, wurden nach unterschiedlichen Kriterien Tabellen zusammengestellt. Tabelle 4 zeigt sie oben schon beschriebenen Daten in der Übersicht.

	CK pos im KM	Lokal- rezidiv	Fern- metas- tasen	Nackentu- more in Maus	Human- spez. PCR	IH (ber EP 4)
SCC Pat (29)	20% (6)	31% (9)	17% (5)	65% (19)	55% (16)	21% (6)
Basalzell- karzinom (2)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	50% (1)	0% (0)
Kontrolle (2)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)

Statistische Auswertung

Für die statistischen Tests wurden die Gruppen Basalzellkarzinom und Kontrolle zusammengefasst (n=4).

1. Test auf Unabhängigkeit von Gruppenzugehörigkeit und CK pos im KM
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 1.000$

2. Test auf Unabhängigkeit von Gruppenzugehörigkeit und Lokalrezidiv
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.555$

3. Test auf Unabhängigkeit von Gruppenzugehörigkeit und Fernmetastasen
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 1.000$

4. Test auf Unabhängigkeit von Gruppenzugehörigkeit und Nackentumore in Maus
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.024$

5. Test auf Unabhängigkeit von Gruppenzugehörigkeit und Humanspez. PCR
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.335$

6. Test auf Unabhängigkeit von Gruppenzugehörigkeit und IH (ber EP 4)
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 1.000$

	CK pos im KM	Lokal- rezidiv	Fern- metas- tasen	Nackentu- more in Maus	Human- spez. PCR	IH (ber EP 4)
T1/T2 (14)	21% (3)	14% (2)	14% (2)	78% (11)	64% (9)	21% (3)
T3/T4 (15)	20% (3)	40% (8)	20% (3)	80% (7)	33% (5)	20% (3)

Statistische Auswertung

1. Test auf Unabhängigkeit von Tumorstadium und CK positiv im KM
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 1.000$
2. Test auf Unabhängigkeit von Tumorstadium und Lokalrezidiv
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.050$
3. Test auf Unabhängigkeit von Tumorstadium und Fernmetastasen
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 1.000$
4. Test auf Unabhängigkeit von Tumorstadium und Nackentumore in Maus
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.128$
5. Test auf Unabhängigkeit von Tumorstadium und Humanspez. PCR
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.143$
6. Test auf Unabhängigkeit von Tumorstadium und IH (ber EP 4)
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 1.000$

	CK pos im KM	Lokal- rezidiv	Fern- metas- tasen	Nackentu- more in Maus	Human- spez. PCR	IH (ber EP 4)
N0 (10)	30 % (3)	20% (2)	20% (2)	80% (8)	60% (6)	20% (2)
N1/ 2(19)	16% (3)	37% (7)	16% (3)	53% (10)	47% (9)	21% (4)

Statistische Auswertung

1. Test auf Unabhängigkeit von N-Stadium und CK pos im KM
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.633$
2. Test auf Unabhängigkeit von N-Stadium und Lokalrezidiv
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.431$
3. Test auf Unabhängigkeit von N-Stadium und Fernmetastasen
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 1.000$
4. Test auf Unabhängigkeit von N-Stadium und Nackentumore in Maus
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.234$
5. Test auf Unabhängigkeit von N-Stadium und humanspez. PCR
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.700$
6. Test auf Unabhängigkeit von N-Stadium und IH (ber EP 4)
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 1.000$

	T1/T2	T3/T4	Lokal- rezidiv	Fern- metas- tasen	Nacken- tumore in Maus	Human- spez. PCR	IH (berEp4)
CK pos (6)	50% (3)	50% (3)	67% (4)	67% (4)	83% (5)	67% (4)	50% (3)
CK neg (16)	44% (7)	56% (9)	19% (3)	6% (1)	56% (9)	68% (11)	19% (3)

Statistische Auswertung

1. Test auf Unabhängigkeit von CK Status und Tumorstadium T1/2 bzw. T3/4:
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 1.000$
2. Test auf Unabhängigkeit von CK Status und Auftreten eines Lokalrezidivs
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.054$
3. Test auf Unabhängigkeit von CK Status und Auftreten von Fernmetastasen
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.009$
4. Test auf Unabhängigkeit von CK Status und Nackentumore in Maus
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.351$
5. Test auf Unabhängigkeit von CK Status und Humanspez. PCR
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 1.000$
6. Test auf Unabhängigkeit von CK Status und IH (ber EP 4)
p-Wert des exakten Fisher-Tests: $p = 0.283$

Anmerkung: Die Hypothesen 1-3 (bzw. die entsprechenden Spalten) werden auch schon im Zusammenhang mit Tabelle 2 (CK Status und klinische Daten der Patienten) genannt.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß der immunhistochemische Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen auch bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen ein unabhängig vom Stadium und Lymphknotenstatus unabhängiger Prognosefaktor darstellt, obwohl die Anzahl der Patienten in dieser Untersuchung zu klein für eine exakte Auswertung ist. Patienten mit CK-positiven Zellen haben wesentlich früher Lokalrezidive und weisen in einem statistisch signifikanten Anteil ($p=0.009$) Fernmetastasen auf.

In dem oben beschriebenen Xenotransplantationsmodell wurde versucht, die Tumorbilogie der disseminierten Tumorzellen näher zu analysieren. Weitere Untersuchungen sollten angeschlossen werden, um die Charakteristika der einzelnen disseminierten Tumorzellen näher zu analysieren und noch weitere Kriterien zur Prognosebestimmung und der daraus resultierenden Therapiemodifikation zu bestimmen.

5. Diskussion

5.1 Minimale Resterkrankung bei Kopf-Hals-Karzinomen

Eine frühe Dissemination von Tumorzellen könnte entscheidend für eine folgende Metastasierung sein. Sie wird meist durch die konventionellen Staginguntersuchungen nicht detektiert. In den letzten Jahren wurden daher verschiedene immunhistochemische und molekularbiologische Assays entwickelt, die diese okkulten Tumorzellen in verschiedenen Organen nachweisen können. Unter den vielen untersuchten Organen hat das Knochenmark eine dominierende Position für die Detektion dieser Tumorzellen, da es zum einen der Diagnostik sehr leicht zugänglich ist, aber auch epitheliale Zellen in dem mesenchymalen Knochenmark physiologisch nicht vorkommen [55]. Die Entwicklung von Antikörpern gegen epitheliale Differenzierungsantigene, wie den Zytokeratinen als essentielle Bestandteile des epithelialen Zytoskelettes, eröffnete ein diagnostisches Fenster, disseminierte Tumorzellen schon bei der Erstdiagnose eines Karzinoms zu detektieren [42]. In unserer Untersuchung wurde ebenfalls Knochenmark für die Tumorzell-detektion verwendet. Das Knochenmark ist ein Ort, an dem ein besonders intensiver Austausch von Blutzellen und dem Interstitium stattfindet. Gerade für Karzinome, die in den Knochen metastasieren, wie z. B. das Mammakarzinom, hat sich das Knochenmark als ideale Untersuchungsquelle erwiesen. Jedoch konnten verschiedene Studien belegen, dass disseminierte Tumorzellen auch bei Karzinomen auftreten, die selten in den Knochen metastasieren, wie z. B. das Kolonkarzinom. Dies legt nahe, dass das Knochenmark eine gute Detektionsquelle für okkulte Tumorzellen auch bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen ist [51]. Immunhistochemische Analysen konnten zeigen, dass im Interstitium gelegene, CK positive Zellen zum großen Teil außerhalb der sinusoidalen Gefäße anzutreffen sind. Folglich müssen diese Zellen die Extravasion, einen der letzten Schritte der Metastasierungskaskade, erfolgreich durchlaufen haben [61]. Im Gegensatz dazu ist das leicht zugängliche, periphere Blut nur eine suboptimale Detektionsquelle. Die Detektion residualer Tumorzellen im Blut ist deutlich schwerer als im Knochenmark. Desweiteren bleibt die klinische Relevanz residualer Tumorzellen im Blut fraglich [65]. Neue Anreicherungstechniken werden es vielleicht möglich machen, residuale Tumorzellen auch im Blut leichter zu detektieren.

Die Detektion der MRD bleibt jedoch schwierig, und so ist es verständlich, dass man erst im letzten Jahrzehnt größere Fortschritte in der Forschung gemacht hat. In den

anfänglichen Studien von *Schlimok et al.* mußten 10^5 Knochenmarkszellen gescreent werden, um nur wenige disseminierte Tumorzellen zu detektieren [60]. Bei Kopf-Hals-Karzinom-Patienten ist die Zahl der disseminierten Tumorzellen sogar noch geringer und wenigstens eine Million Knochenmarkszellen müssen untersucht werden.

In unserer Untersuchung wurde für die Detektion der residualen Tumorzellen ein immunhistochemischer Nachweis gewählt. Ein Panzytokeratin Antikörper A 45/B-B3 wurde mit Hilfe der APAAP-Technik visualisiert. Verschiedene methodische Untersuchungen konnten zeigen, dass man mit immunhistochemischen Methoden eine 95%ige Chance hat, eine Tumorzelle in 2×10^6 Knochenmarkszellen zu finden [48]. Zytokeratine haben sich als integrale Bestandteile des Zytoskelettes epithelialer Zellen als vielversprechend für die immunhistochemische Detektion residualer Tumorzellen erwiesen. Sie werden auch von Tumorzellen stabil exprimiert und sind mit spezifischen monoklonalen Antikörpern an einzelnen Karzinomzellen eindeutig nachweisbar. Ihre Spezifität ist im Vergleich mit sogenannten Zellmembranantigenen ungleich höher. Eine ektopische Expression von Zytokeratinproteinen sowie die ektopische Expression oder illegitime mRNA Expression von Zytokeratinen ist allerdings nicht vollständig auszuschließen [37]. Zahlreiche Studien an einer großen Anzahl von Kontrollpatienten mit benignen Erkrankungen konnten zeigen, dass man nur äußerst selten eine Zytokeratinexpression bei den Knochenmarkszellen findet, wenn man sie immunhistochemisch mit dem oben genannten Antikörper untersucht [55]. Eine Limitation der immunhistochemischen Analysen ist die subjektive Auswertung der zytologischen Präparate. Wir versuchten durch die Analyse von 2 voneinander unabhängigen Untersuchern in einem Konferenzmikroskop die Methode zu objektivieren. Außerdem wurden die Kriterien genau definiert: 1. Die Zelle muss intakt sein und 2. eine deutliche Färbung aufweisen. Ein vielversprechender Ansatz ist es, ein automatisiertes Scannersystem zu verwenden (ACIS), um objektivierbare Kriterien anzulegen. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist es, dass die Patienten sich einer invasiven Diagnostik, der Beckenkammpunktion, unterziehen müssen. Außerdem müssen die Proben zügig verarbeitet werden, und die Methode ist sehr arbeits- und zeitaufwendig [23].

Eine auf den ersten Blick etwas weniger arbeitsintensive Prozedur ist die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT PCR). Brakenhoff et al. haben eine Methode entwickelt, bei der das E 48 Antigen amplifiziert wird und dann in einem Blot mit einer radiomarkierten E48 cDNA visualisiert wird [23]. Dabei wird eine

reproduzierbare Sensitivität von einer Tumorzelle in ungefähr 2×10^7 weißen Blutzellen erreicht. Eines der Hauptprobleme ist bei der RT PCR die Reproduzierbarkeit, die immer durch externe Standards und viele Leerkontrollen überprüft werden sollte. Ein weiterer Nachteil bei diesen RT PCR Assays ist die illegitime Expression von Markergenen in Blut- oder Knochenmarkzellen. Viele Markergene werden bei Kopf-Hals-Karzinomen auch in unterschiedlichem Ausprägungsgrad exprimiert, was die Detektion von residualen Tumorzellen mit immunhistochemischen und molekularbiologische Techniken im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten deutlich erschwert.

Bei ca. 20-30 % der Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten im klinischen Stadium M0 konnte mit Hilfe der immunhistochemischen Methode eine minimale Tumorzell dissemination nachgewiesen werden. *Gath et al.* konnten in einer Untersuchung (n=149) nachweisen, dass 20,1% der Kopf-Hals-Karzinom Patienten mit einer Frequenz von 1-20 Zellen in 10^6 Zellen residuale Tumorzellen im Knochenmark aufwiesen. Von diesen Patienten konnten 57 nachbeobachtet werden und es zeigte sich, daß etwa 70 % der Patienten, bei denen residuale Tumorzellen nachweisbar waren, ein Rezidiv erlitten. Bei den Patienten, bei denen keine CK-positiven Zellen im KM nachweisbar waren, hatten nur 37 % ein Rezidiv [23]. In unserer Untersuchung hatten 27 % der Patienten CK positive Zellen im Knochenmark. Es wiesen auch 73% der Patienten schon in der kurzen Nachbeobachtungszeit ein Rezidiv auf, was in etwa den obengenannten Daten entspricht. Statistisch signifikant war jedoch, das gehäufte Auftreten von Fernmetastasen ($p=0.009$)

Trotzdem bleiben offene Fragen zum biologischen Verhalten der disseminierten Tumorzellen, wie infiltrieren und disseminieren sie, was bestimmt ihr Schicksal, wohin migrieren sie, und wo werden sie adhären.

5.2 Biologisches Verhalten der disseminierten Tumorzellen im Xenotransplantationsmodell

Um das Metastasierungspotential der residualen Tumorzellen zu charakterisieren, wurde das oben beschriebene Xenotransplantationsmodell in der Nod/Scid Maus entwickelt. Diese Mäuse sind stark immunsupprimiert und daher ein ideales Studienmodell für metastasierende Tumoren [63]. Zu bedenken ist aber, dass damit wichtige Interaktionen, die bei der Metastasierung mit dem Immunsystem stattfinden, beeinflusst werden. Man erhält ein Modell, das nur in Teilen Aufschluss über das reale

Metastasierungsverhalten beim Menschen gibt. Es konnte gezeigt werden, dass gerade bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen das Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielt [80]. Unsere Untersuchungen zeigten, dass in der Nackenregion der Mäuse durch die Beckenkammaspirate Tumore entstehen können. Dieselbe Versuchsanordnung wurde bei Patienten mit Mammakarzinomen durchgeführt. Hierbei wurden die Beckenkammaspirate ebenfalls in die Nackenregion injiziert, jedoch kam es zu keiner Tumorbildung (*Fichtner I. et al. Unveröffentlichte Daten*). In einem der untersuchten Fälle T. W., Versuchsnr. 5506, Tumorstadium T4NxMx, konnten CK-positive Zellen im KM nachgewiesen werden, die humanspezifische PCR sowie die Immunhistochemie waren positiv. In 2 von 3 beimpften Mäusen konnten palpable Nackentumoren nachgewiesen werden. Im Verlauf der Nachbeobachtungszeit von nun zwei Jahren und 6 Monaten konnte bei dem Patienten schon ein Lokalrezidiv sowie Fernmetastasen diagnostiziert werden. In einem weiteren Fall (D., R. Versuchsnr. 5499, T4N1M0) korreliert der aggressive klinische Verlauf (Lokalrezidiv mit Fernmetastasen innerhalb von 2 Jahren) mit dem Nackentumorwachstum der Maus. In diesem Fall wurden 4 Mäuse mit KM beimpft, in einer Maus kam es zu einem Tumorwachstum im Nacken. In diesem Fall ergab die pathohistologische Untersuchung des Nackentumors karzinomverdächtige Zellen. Einzuwenden gilt aber, dass der klinische Verlauf nur zum Teil den zu erwartenden Ergebnissen entspricht. Möglicherweise könnte das die Hypothese festigen, daß die Karzinome und die daraus entstehenden Metastasen ein ganz unterschiedliches tumorbiologisches Verhalten aufweisen und auch die früh disseminierten Tumorzellen eine sehr heterogene Population von Zellen sind, die ganz unterschiedliche Proliferations- und Invasionstendenzen zeigen können.

Es lässt sich spekulieren, dass Tumorzellen eher in der Region des ursprünglichen Tumors proliferieren können (sogenanntes Homing Prinzip), und es deswegen zu keinem Tumorwachstum residualer Tumorzellen bei Patienten mit Mammakarzinomen in der Nod/Scid Maus kam. Bei den Kontrollpatienten und den Patienten mit dem Basalzellkarzinom, einem semimalignen Tumor, der zwar infiltrativ und destruierend wächst, der aber nur in den seltensten Fällen Metastasen bildet, wurde kein Tumorwachstum bei den Mäusen beobachtet.

Bei mit den Knochenmarksaspiraten beimpften Mäusen wurden in 65 % ein Tumorwachstum in der Nackenregion beobachtet. Bei den CK-positiven Patienten war sogar in 83 % der beimpften Mäuse ein Nackentumor palpabel.

Insgesamt erscheint der Prozentsatz der gewachsenen Tumoren in der Nackenregion höher als erwartet. Wenn man davon ausgeht, dass bei 20-30 % der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen residuale Tumorzellen nachgewiesen werden können, erscheint der Prozentsatz von 65 % viel zu hoch. Man muss davon ausgehen, dass durch die Injektion von menschlichen Zellen und Fremdmaterial (Matrigel) es in einem gewissen Prozentsatz auch zu einer Fremdkörperreaktion in der Nackenregion dieser immunsupprimierten Tiere kommt. Die humanspezifische PCR war in einem ähnlichen Prozentsatz (67/68%) positiv wie die Nackentumorbildungsrate in den Mäusen (65%). Dies scheint darauf hinzuweisen, dass humane Zellen zur Nackentumorbildung geführt haben. Diese Untersuchung kann leider nicht beweisen, ob es disseminierte Tumorzellen mit einem Metastasierungspotential waren oder lediglich Fibroblasten, die durch eine Fremdkörperreaktion entstanden waren.

Weiterhin muss man bedenken, dass auch eine Epstein Barr Virus (EBV)-Infektion durch die Knochenmarkaspirate auf die Mäuse übertragen werden kann und zu einer unspezifischen Reaktionsbildung und damit zu einem Tumorwachstum hätte führen können. Screening Untersuchungen der Patienten auf EBV sind nicht erfolgt.

Die konventionellen pathohistologischen Untersuchungen zeigten auch, dass ein Teil der gewachsenen Maustumore lediglich eine unspezifische Fremdkörperreaktion darstellt. Desweiteren konnten mit Hilfe der immunhistochemischen Analysen mit dem mAb berEp4 in den Mausorganen nur bei 6 Patienten epitheliale Zellen nachgewiesen werden. Doch auch hier zeichnet sich ab, dass bei Patienten mit CK-positiven Zellen im Knochenmark in 50 % der Fälle ber Ep4 positive Zellen in den untersuchten Mausorganen nachgewiesen werden konnten. Der Nachweis war nur in 19 % der CK-negativen Patienten der Fall möglich.

Gerade Kopf-Hals-Karzinome sind sehr instabil in der Expression ihrer Markergene und weisen häufig ein unterschiedliches Expressionsmuster z.B. des 17-1A Antigenes auf [23]. Jedoch zeigten alle von uns untersuchten Primärkarzinomschnitte eine deutliche Expression dieses durch den berEp4 AK nachgewiesenen Antigenes auf. Man kann jedoch davon ausgehen, dass die disseminierten Tumorzellen ihr Antigenprofil im Vergleich zu dem Primärkarzinom noch einmal deutlich verändert haben können und so der Nachweis einer einzelnen Tumorzelle in einem Organ oder dem Knochenmark deutlich erschwert ist [7]. Leider weisen die Zytokeratine, ein immunhistochemisch idealer Marker für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region, bei der Untersuchung eine deutliche Kreuzreaktion mit dem Mausgewebe auf. Im Gegensatz zu den berEP4

AK konnten wir aber keinen humanspezifischen Zytokeratinantikörper finden. In den Kontrollen zeigte sich immer eine positive Kreuzreaktion mit dem Mausegewebe.

Nackentumoren bei den Mäusen (in 56 % der Fälle) bildeten sich auch bei Patienten, bei denen keine residualen Tumorzellen im Knochenmark gefunden werden konnten. Der Prozentsatz liegt deutlich niedriger als bei den Patienten, bei denen CK positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden konnten. Das könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass in dem untersuchten Anteil keine residualen Zellen vorhanden waren, jedoch in dem injizierten Anteil solche gefunden wurden.

Der hohe Prozentsatz von 56 % und die durchgeführten Untersuchungen deuten daraufhin, dass es in einem Großteil der Fälle zu einer Fremdkörperreaktion gekommen ist, wobei die Ursache dafür nicht bekannt ist. Es lässt sich allerdings auch ein spekulatives Denkmodell aufstellen. Wenn man davon ausgeht, dass in ca. 50% eine Fremdkörperreaktion bei der Nackentumorbildung auftritt und in ca 80 % der CK-positiven Patienten in der Maus ein Nackentumor gebildet wurde, entspräche das, alle Daten zusammengefasst, einer „Tumorbildungsrate“ von 30 %. Dies ist jedoch eine sehr spekulative Aussage, obwohl sie dem Prozentsatz der nachgewiesenen residualen Tumorzellen bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen entspricht.

5.3 Metastasierungspotential einzelner disseminierter Tumorzellen

Die humanspezifische PCR war bei den Mäusen, die mit Knochenmark von CK-positiven und CK-negativen Patienten beimpft wurden, in einem ähnlichen Prozentsatz (67 bzw. 68 %) positiv. Dies beschreibt jedoch nur den Nachweis humaner Zellen und nicht deren biologische Potenz. Es scheint zu einer Immunreaktion der stark immunsupprimierten Mäuse zu kommen. Zu erwarten wäre ein Prozentsatz von nahezu 100%.

Ein Erklärungsversuch für das inhomogene Verhalten der residualen Tumorzellen in unserem Xenotransplantationsmodell bei der Metastasierung könnte das nonproliferative Verhalten, sog. „Dormancy“ sein. In Zellkulturexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass diese disseminierten Tumorzellen ein zeitlich limitiertes proliferatives Potential haben [52]. Es konnte gezeigt werden, dass es eine niedrige Frequenz von disseminierten Tumorzellen gibt, welche Proliferationsmarker wie z.B. Ki-67 oder p120 exprimieren [35]. Wenn man davon ausgeht, dass nur wenige der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ein proliferatives Potential haben, also

sich die meisten in einem schlafenden Stadium (G0 Phase) befinden, ist es plausibel, dass nicht bei allen CK-positiven Patienten ein Tumorwachstum bei den Mäusen auftrat.

Neueste Ergebnisse konnten bei Mammakarzinomen veranschaulichen, dass das systemische Auswandern von Tumorzellen wahrscheinlich ein schon früh stattfindender Prozess bei der Metastasierung ist. Meist führt dann erst das Verlassen der mitotisch inaktiven Latenzphase zur Metastasierung. Trotzdem haben größere Tumoren ein höheres Metastasierungsrisiko als kleinere. Man spekuliert, daß große Tumoren die Mikroumgebung der einzelnen disseminierten Tumorzellen beeinflussen und es so zu einem Wachstum und dem Verlassen des „Schlafzustandes“ kommt [33]. Bei dem hier untersuchten kleinen Patientenkollektiv kam es bei 14 % der Patienten mit einem T1/T2 Stadium zu einem Lokalrezidiv, jedoch wiesen auch 14 % Fernmetastasen auf. Bei Patienten mit einem T3/T4 Stadium rezidierte der Tumor in 40 % lokal, die Fernmetastasierungsrate lag nur wenig höher als bei den frühen Tumorstadien bei 20 %. Waren CK positive Zellen im KM nachweisbar, kam es in jeweils 67 % zu einem Lokalrezidiv und zu Fernmetastasen; der Verlauf der Erkrankung war deutlich verschlimmert. Der CK Status hängt signifikant ($p=0.009$) mit dem Auftreten von Fernmetastasen zusammen. Für verlässliche statistische Aussagen ist die untersuchte Fallzahl der Patienten zu gering und auch die Nachbeobachtungszeit zu kurz. Ein Trend lässt sich aber veranschaulichen.

Einer der Hauptgründe, warum Plattenepithelkarzinome der oralen Schleimhaut mit einer frühen Infiltration und Disseminierung verbunden sind, und eine relative Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika aufweisen, könnte mit den Charakteristika der Zellen verbunden sein, von denen sie abstammen. Die orale Schleimhaut bildet eine Schutzschicht, die die innere von der äußeren Umgebung trennt. Schon allein bei der Nahrungsaufnahme wird die Schleimhautschicht häufig beschädigt, jedoch haben orale Keratinozyten die Eigenschaft, Wunden sehr schnell zu heilen. Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die plattenepithelialen Tumorzellen ähnliche Systeme für die Infiltration, Migration und Invasion benutzen wie die normalen Keratinozyten bei der Wundheilung. Spekulativ könnte man behaupten, dass das häufig beobachtbare Wachstum möglicherweise tatsächlich eine aberrante Form der Wundheilung darstellt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass trotz der unterschiedlichen Ergebnisse, die Injektion von KM Aspiraten von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen in der

Nackenregion von NOD/SCID Mäusen zu einer Tumorbildung geführt hat, die bei einem vergleichbaren Ansatz bei Mammakarzinompatienten nicht vorgekommen ist. Durch weitere Sequenzierungsanalysen könnte es durch Erstellung eines genetischen Codes für den Primärtumor und für die gewachsenen Tumoren möglich sein, diese Analysen weiter zu spezifizieren.

Weiterhin bleibt eine wichtige Frage unbeantwortet. Wie soll man diese Zellen behandeln? Möglicherweise hilft eine biologische Charakterisierung dieser Zellen, um effektive Therapieoptionen in der Zukunft zu eröffnen. Außerdem wurden in den letzten Jahren hoffnungsvolle neue Technologien entwickelt. Diese könnten dazu beitragen, die bei der Metastasierung ablaufenden Prozesse näher zu beleuchten. Vielleicht führt die Kombination des biologischen Wissens mit neuen innovativen Konzepten zu einer verbesserten Überlebensrate der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region.

6. Zusammenfassung

Obwohl die therapeutischen Optionen (Operationstechniken, Radiotherapie und Chemotherapie) in den letzten Jahrzehnten deutlich modifiziert wurden, hat sich die Überlebensrate von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen nicht verbessert. Häufig kommt es zu Lokalrezidiven, Zweittumoren oder Fernmetastasen. Man geht davon aus, dass Tumorresiduen im Körper verbleiben, die nach einer gewissen Latenzphase zu einem Wiederauftreten der Tumorerkrankung führen. Man muss vielleicht von einer „systemischen Krankheit“ ausgehen, was auch dem klinischen Bild dieser Tumorerkrankung entspricht.

In dieser Dissertation wurden Beckenkammaspirate von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen gewonnen. Diese wurden geteilt; der 1. Teil wurde mit einer immunhistochemischen Methode auf das Vorhandensein von einzelnen disseminierten Tumorzellen untersucht, der 2. Teil wurde in die Nackenregion von Nod/Scid Mäusen injiziert. CK positive Zellen konnten in 27% der Beckenkammaspirate der Karzinompatienten nachgewiesen werden. Fanden sich CK positive Zellen, kam es signifikant häufiger zu Fernmetastasen ($p=0.009$). Es deutet sich an, dass Lokalrezidive bei Patienten mit positivem CK Status häufiger auftreten als bei Patienten mit negativem CK Status. Es besteht jedoch keine signifikante Abhängigkeit ($p=0.054$). In 65 % der Fälle kam es zu einer Nackentumorbildung in den Versuchstieren. Fanden sich CK positive Zellen im Knochenmark kam es sogar in 85% zu einem Nackentumorwachstum in den Mäusen. Die gewachsenen Tumoren in der Nackenregion wurden weiter analysiert. In einigen Mausorganen konnten auch menschliche epitheliale Zellen nachgewiesen werden.

Der sehr hohe Prozentsatz des Nackentumorwachstums ist sicher auch durch Fremdkörperreaktionen und Bindegewebsproliferationen bedingt. Die anschließenden Analysen ergaben ein sehr heterogenes Bild. Zusammenfassend kann man feststellen, dass nicht nur die Prognose vom Vorhandensein einzelner disseminierter Tumorzellen bestimmt wird, sondern auch häufiger Nackentumoren gebildet wurden und positive Zellen in den Mausgeweben gefunden werden konnten.

In einem der beschriebenen Fälle (CK positiv, T4NxMx) kam es schon nach kurzer Zeit zu einem Rezidiv sowie Fernmetastasen. In den mit Beckenkammaspiraten beimpften Mäusen kam es zu einem Wachstum von Nackentumoren. Der immunhistochemische

Nachweis in den Mausorganen und die humanspezifische PCR waren positiv. Hier korreliert der ungünstige klinische Verlauf mit den zu erwartenden Laborergebnissen. In unserem Xenotransplantationsmodell konnten wir veranschaulichen, dass es zu einem Tumorwachstum in der Nackenregion der stark immunsupprimierten Mäuse kam. Weitere Untersuchungen, die das Zellprofil, Mutationen und die Proliferationskapazität dieser einzelnen disseminierten Zellen zum Gegenstand haben, sollten angeschlossen werden. Mit ihnen lassen sich die biologische Kapazität und der Zeitpunkt der Metastasierung weiter erforschen. Durch neue Erkenntnisse des Metastasierungsverhaltens sowie eines erweiterten Tumorstagings durch die Untersuchung von Knochenmark erkrankter Patienten können in der Zukunft gängige Therapieschemata ersetzt und ergänzt werden. Vielleicht wird durch neue Chemotherapien, die auch den systemischen Charakter dieser Erkrankung zu erfassen, es möglich, vorhandene Therapiekonzepte zu verbessern und dadurch ein Rezidiv oder eine Metastasierung erfolgreich zu verhindern.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Adelstein DJ, Saxton JP, Lavertu P, et al. A phase III randomized trial comparing concurrent chemotherapy and radiotherapy with radiotherapy alone in resectable stage III and IV squamous cell head and neck cancer: preliminary results. *Head Neck* 1999; 19: 567-75
- 2 Bataini JP, Asselain P, Jaulerry F, et al. A multivariate primary tumor control analysis in 465 patients treated by radical radiotherapy for cancer in the tonsillar region: Clinical and treatment parameters as prognostic factors. *Radiother Oncol* 1989; 14: 265-277
- 3 Bishop, JM. Molecular Themes in Oncogenesis, *Cell* 1991; 64: 235-248
- 4 Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer Statistics, *CA Cancer J Clin* 1992; 42: 19-38
- 5 Boyd D. Invasion and metastasis, *Cancer Metas Rev* 1996;15: 77-89
- 6 Braun S, Pantel K, Müller P, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, stage II or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 525-533
- 7 Braun S, Pantel K. Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow. *Cancer and Metastasis Reviews* 1999; 18: 75-90
- 8 Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 798-802
- 9 Brennan JA, Mao L, Hruban RH, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332: 429-35
- 10 Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, et al. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Brit J Cancer* 1995; 71: 278-81
- 11 Burkhardt R, Frisch B, Kettner G. The clinical study of micro-metastatic cancer by bone biopsy. *Bull Cancer* 1980; 67:291-305
- 12 Campion, MJ. Progressive potential of mild cervical dysplasia: prospective cytological colposcopic and virological study. *Lancet* 1986; 2: 237-240
- 13 Chaiwun B, Saad AD, Groshen S, et al. Immunocytochemical detection of occult carcinoma in bone marrow and blood: critical analysis of efficiency of separation, preparation and limits of detection in a model system. *Diagn Oncol* 1992; 2: 267-726
- 14 Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3774-3781

- 15** Cote RJ, Beattie EJ, Chaiwun B, et al. Detection of occult bone marrow micrometastasis in patients with operable lung carcinoma. *Ann Surg* 1995; 222: 415-423
- 16** Cote RJ, Rosen PP, Lersser ML, et al. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastasis. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1749-1756
- 17** Crile G. Excision of cancer of the head and neck – with special reference to the plan of dissection based on one hundred and thirty-two operations. *J Am Med Assoc* 1906; 47: 1780-1787
- 18** Dearnaley DP, Sloane JP, Ormerod MG, et al. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* 1981; 44: 85-90
- 19** Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1652-1658
- 20** Dietmeier W, Hartmann A, Wallinger S, et al. Multiple mutation analysis in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol* 1999; 154: 83-95
- 21** Folkman J. What is evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;2: 4-6
- 22** Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 1998; 279: 514-519
- 23** Gath HJ, Brakenhoff RH. Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer and metastasis review* 1999; 18: 109-126
- 24** Gath HJ, Heissler E, Hell B, et al. Immunocytologic detection of isolated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Int J Oral Maxillofacial Surg* 1995; 24: 351-355
- 25** Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D, et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1991; 325:1525-1533
- 26** Gunn J, Mc Call JL, Yun K, Wright PA. Detection of micrometastasis in colorectal cancer patients by K19 and K20 reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1996; 75: 611-616
- 27** Hagios, C., Locher, A. Bissell, M.J. Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol.Sci.* 1998; 353 (1370): 857-870
- 28** Hanahan D, Folkman J. Patterns and mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364

- 29** Harbeck N, Untsch M, Pache L, Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* 1994; 69: 566-571
- 30** Harnden, DG. *Carcinogenesis: Oxford Textbook of Pathology*, Oxford University Press 1992; Vol.1: 633-671
- 31** Horch H., Bier J. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*, 4. Auflage 2007, Elsevier Urban & Fischer
- 32** Howaldt HP, Kainz M. Projektbericht des Zentralregisters des Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreises für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich 1997
- 33** Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 58-68
- 34** Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25
- 35** Izbicki JR, Hosch S, Hossfeld DK, et al. Minimale residuale Tumorerkrankung bei soliden epithelialen Tumoren. *Dt. Ärzteblatt* 2000; 97: 1158-1163
- 36** Jennings CD, Food KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancies. *Blood* 1997; 90: 2863-2892
- 37** Krismann M, Todt B, Schröder J. Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2769-2774
- 38** Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, et al. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer* 1993; 71: 452-456
- 39** Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, et al. Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer. *Lancet* 1992; 340: 685-689
- 40** Liotta LA, Steeg PS, Stetler Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64:327-336
- 41** Mac Kenzie, I.C. Ordered structure of the mammalian skin. *Nature* 1969; 222: 881-882
- 42** Mansi JL, Berger U, Easton D, et al. Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases. *Br J Med* 1987; 295: 1093-1096
- 43** Mansi JL, Easton D, Berger U, et al. Bone marrow micrometastases in primary breast cancer. Prognostic significance after 6 years follow-up. *Eur J Cancer* 1991; 27:1552-1555

- 44** Mc Indoe, WA. The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 451-456
- 45** Moll R, Franke WW, Schiller DL, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31: 11-24
- 46** Nishijima W, Takooda S, Tokida N et al. Analyses of distant metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck and lesions above the clavicle at autopsy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119: 65-68
- 47** Nowell, PC. The clonal evolution of tumor cell evolution. *Science* 1976; 194: 23-28
- 48** Osborne Mp, Wong GY, Asina S, et al. Sensitivity of immunocytological detection of breast cancer cells in human bone marrow. *Cancer Res* 1991; 67: 2706-2709
- 49** Paget S. The distribution of secondary tumor growth in cancer of the breast. *Lancet* 1889; 1:571-573
- 50** Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4: 448-456
- 51** Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; 13:1113-1124
- 52** Pantel K, Dickmanns A, Zippelius A, et al. Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1162-1168
- 53** Pantel K, Izbicki J, Passlick B, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumor cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastasis. *Lancet* 1996; 347:649-653
- 54** Pantel K, Riethmüller G. Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213 (Pt3):1-18
- 55** Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 1994; 3: 165-173
- 56** Pantel K, Schlimok G, Braun S, et al. Differential expression of proliferation associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1419-1424
- 57** Posner MR, Herhock DM, Blajman CR, et al. Cisplatin and fluororacil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007; 357 (17): 1705-1715
- 58** Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 1983; 2:1271-1274

- 59** Ruud P, Fodstad O, Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer* 1999; 80: 119-25
- 60** Schlimok G, Funke I, Holzmann B, et al. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with 17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 84: 8672-8676
- 61** Schlimok G. Mikrometastasen epithelialer Tumoren im Knochenmark: Immunzytochemischer Nachweis und in vivo Markierung mit Hilfe monoklonaler Antikörper. 1988; Habilitationsschrift
- 62** Schmitt M, Janicke F, Graeff H. Tumor associated proteases. *Fibrinolysis* 1992; 4 Suppl: 3-26
- 63** Shultz, LD, Schweitzer PA, Christainson SW, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J of Immunology* 1995; 180-191
- 64** Sidransky D. Nucleic acid based methods for the detection of cancer. *Science* 1997; 278:1054-1059
- 65** Soeth E, Vogel I, Roder C, et al. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1997; 57: 3106-3110
- 66** Stetler-Stevenson WG. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 541-574
- 67** Stupp R, Weichselbaum RR, Vokes EE. Combined modality therapy of head and neck cancer. *Semin Oncol* 1994; 21: 349-358
- 68** Tada M, Omata M, Kawai S, et al. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2472—2474
- 69** Traweek ST, Liu J, Battifora H. Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with the polymerase chain reaction *Am J Pathol* 1993; 142:1111-18
- 70** Uhr JW, Scheuerman RH, Street NE, et al. Cancer dormancy: opportunities for therapeutic approaches. *Nature Med* 1997; 3:505-509)
- 71** Vassalli JD, Saurat JH. Cuts and scraps? Plasmin heals. *Nature Med* 1996; 2:284-285
- 72** Vernham GA, Crowther JA. Head and neck carcinoma – stage at presentation. *Clin Otolaryngol* 1994; 19: 120-124
- 73** Vikram B. Changing patterns of failure in advanced head and neck cancer. *Arch Otolaryngol* 1984; 110: 564-565

- 74** Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippmann SM, Hong KW. Medical progress; head and neck cancer. *N Eng J med* 1993; 328:184-194
- 75** Warburton PE, Greig GM, Haaf T, Huntingdon FW. PCR amplification of chromosome specific alpha satellite DNS. Definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis. *Genomics* 1991; 11: 324-333
- 76** Watt FM, Jones PH Expression and function of keratinocyte integrins. *Development Suppl* 1993; 185-192
- 77** Wendt TG, Grabenbauer GG, Rodel CM, et al. Simultaneous radiochemotherapy versus radiotherapy alone in advanced head and neck cancer: a randomized multicenter study. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1318-24
- 78** Wolf GT, Carey TE, Schmaltz SP, et al. Altered integrin expression predicts outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck region. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1566-1577
- 79** Wyld DK, Selby P, Perren TJ, et al. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer* 1998; 79: 288-293
- 80** Young MR, Wright MA, Lozano Y, et al. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer. *Int J Cancer* 1996; 67:333-338.
- 81** Zbären P, Lehmann W. Frequency and sites of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. An analysis of 101 cases at autopsy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987; 113: 762-764
- 82** Zelefsky MJ, Raben A, Strong EW et al. Long term results of postoperative radiotherapy for squamous cell cancers of the head and neck. Proceedings of the fourth international conference of head and neck cancer, Toronto; 1996; Abstract 289
- 83** Zippelius A, Kufer P, Honold G, et al. Limitation of reverse transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic tumor cells in bone marrow. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2701-2708
Zwicky CS, Maddocks AB, Andersen N, Gribben JG Eradication of polymerase chain reaction immunoglobulin gene rearrangement in non Hodgkin's lymphoma is associated with decrease relapse after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 88: 3314-3322

Anhang:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Universitätsklinikum Charité, Campus Virchow Klinikum, der Humboldt-Universität zu Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. mult. Jürgen Bier angefertigt. Mein Dank gilt Prof. Bier für die wohlwollende Unterstützung und den gewährten Freiraum im Rahmen meiner ärztlichen Tätigkeit. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Martin Klein bedanken, der freundlicherweise nach dem Tod von Prof. Bier die Betreuung der Arbeit übernommen hat. Mein besonderer Dank gilt ferner Herrn Dr. Dr. Hans Joachim Gath für die Anregung des Themas, für viele weiterführende Hinweise und für die fachliche und persönliche Unterstützung. Frau Dr. Iduna Fichtner und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für die Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen sowie Prof. Dr. Klaus Pantel und seiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei der Aufarbeitung der Knochenmarkpunktate. MTA Frau Kruse-Boitschenko stand mir immer hilfsbereit zur Seite, wofür ich an dieser Stelle ebenfalls herzlich danke. Meinem Mann danke ich für sein liebevolles tägliches Erinnern und seine kompetente Unterstützung während dieser Zeit.

Publikationsverzeichnis

Poster

Deutschland

„Tumor angiogenesis and minimal residual disease in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck region“

Rein K., Heissler. E., Raguse J. D., Jehle M. A., Pantel K., Bier J., Gath H.J.

2. International Symposium on Minimal Residual Disease, Berlin 1998.

„Hochmalignes B-Zell-Lymphom der Mundhöhle- ein Fallbeispiel“

Rein K., Lethaus B., Weingart, D.

Jahrestagung der DGZMK, 2004, Stuttgart

„Neurofibrom im Unterkiefer-pathohistologische und chirurgische Aspekte“

Schulze, K., Bublitz, R., Küper, R., Bosse, A., Weingart, D., Jundt, G.

Jahrestagung der DGZMK, 2005, Berlin

USA

„Minimal residual disease in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck region in a xenotransplant model“

Gath H. J., Rein K., Pantel K., Becker M., Fichtner I.

AACR (American Association of Cancer Research) Special Conference: Mouse Models of Cancer, La Jolla, USA 2000.

„Anti-angiogenic treatment of head and neck cancer – a case report“

Gath H. J., Rein K., Raguse J. D., Switala A., Stroszinski C., Oettle H.

AACR (American Association of Cancer Research) Special Conference: Angiogenesis and Cancer, Traverse City, USA 2000.

„Cell-matrix adhesion in oral squamous cell carcinomas (SCC) and influence of estradiol on cell matrix adhesion in oral carcinoma cell lines“

Rein K., Raguse J. D., Jehle M. A., Metelmann H. R., Bier J. Gath H. J.

91th AACR (American Association of Cancer Research) Annual Meeting, San Francisco, USA 2000.

„Phenotypic profiling of squamous cell carcinomas of the head and neck (SSCHN) region: Correlation to bone marrow micrometastasis“

Gath H. J., Rein K., Bier J., Pantel K.

91th AACR (American Association of Cancer Research) Annual Meeting, San Francisco, USA 2000.

„Minimal residual disease in head and neck cancer patients“

Gath H. J., Rein K., Raguse J. D., Heissler E., Bier J., Riethmüller G., Pantel K.

AACR (American Association of Cancer Research) Special Conference: Molecular aspects of metastasis, Aspen-Snowmass, USA 1999.

„Influence of estrogens on cell matrix adhesion in oral carcinoma cell lines“

Rein K., Raguse J. D., Bier J., Gath H. J.

AACR (American Association of Cancer Research) Special Conference: Molecular aspects of metastasis, Aspen-Snowmass, USA 1999.

„Minimal residual disease of patients with squamous cell carcinomas in the head and neck (SCCHN) in a xenotransplant model system“

Gath H. J., Fichtner I., Rein K., Elbe B., Becker M., Bier J., Pantel K.

90th AACR (American Association of Cancer Research) Annual Meeting, Philadelphia, USA 1999.

Vorträge

Deutschland

„Expression potentieller therapeutischer Antigene in Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region in Relation zu disseminierten Tumorzellen im Knochenmark“

Rein K., Gath H. J., Raguse J. D., Bier J.

51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Marburg 2001.

„Antiangiogenetische Therapie mit einem $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ Integrin Antagonisten (Cilengitide) bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren“

Rein K., Raguse J. D., Bier J., Oettle H.

51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Marburg 2001.

„Einsatz von rekombinanten humanem Erythropoetin (r-HU-EPO) zur Behandlung der Tumoranämie unter Radiochemotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich“

*Raguse J. D., Oettle H., **Rein K.**, Bier J., Gath H. J.*

51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Marburg 2001.

„Komplikationen durch Arteriosklerose in der Mikrochirurgie: Eine histopathologische Untersuchung an Gefäßstilen in der Spenderregion“

*Hölzle F., Wolff K. D., Klein M., **Rein K.**, Schwertner O., Bier J.*

38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Berlin 2000.

„Immunsupportive Ernährung zur Therapieunterstützung bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich“

*Raguse J. D., **Rein K.**, Oettle H., Hölzle F., Bier J., Gath H. J.*

38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Berlin 2000.

„Behandlung der Tumoranämie bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region mit rekombinanten Erythropoetin (r-HU-EPO)“

*Raguse J. D., **Rein K.**, Oettle H., Hölzle F., Bier J., Gath H. J.*

38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Berlin 2000.

„Gemcitabine in der zytostatischen Therapie von multipel vorbehandelten Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich“

*Raguse J. D., **Rein K.**, Oettle H., Gath H. J.*

37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Berlin 1999.

„Einfluß von Estradiol auf die Zellmatrixadhäsion in oralen Karzinomzelllinien“

***Rein K.**, Raguse J. D., Bier J., Gath H. J.*

37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Berlin 1999.

„Cytostatic therapy with gemcitabine (Gem) for patients with squamous cell carcinoma of the head-neck (SCCHN) after multiple previous treatments“

Raguse J. D., Rein K., Oettle H., Bier J., Gath H. J.

VI. Symposium on Research in Head and Neck Cancer, Düsseldorf 1999.

„Influence of estradiol on cell matrix adhesion in oral carcinoma cell lines“

Rein K., Raguse J. D., Bier J., Gath H. J.

VI. Symposium on Research in Head and Neck Cancer, Düsseldorf 1999.

„Minimal Residual disease in head and neck cancer patients“

Gath H. J., Rein K., Raguse J. D., Heissler E., Oettle H., Bier J.,

VI. Symposium on Research in Head and Neck Cancer, Düsseldorf 1999.

„Investigation of minimal residual disease in the bone marrow of head and neck tumor patients using a NOD/SCID mouse xenotransplantation system“

Becker M., Elbe B., Gath H. J., Rein K., Fichtner I.

10. AEK Symposium, Heidelberg 1999.

„Rehabilitation nach tumorbedingter Exenteratio orbitae mit der enossal verankerten Epithese“

Menneking H., Klein M., Rein K., Hell B.

36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Berlin 1998.

„Die Rolle biotechnologisch hergestellter Haut (Dermagraft) in der Versorgung epithelialer Defekte“

Gath H. J., Heissler E., Klein M., Rein K., Bier J.

36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Berlin 1998.

„Minimal residual disease of patients with squamous cell carcinomas in the head and neck region“

Gath H. J., Heissler E., Jehle M., Rein K., Moormann P., Pantel K., Bier J.

Head and Neck Research Workshop, Washington/Virginia, USA 1998.

„Hochmalignes B-Zell-Lymphom der Mundhöhle- ein Fallbeispiel“

Rein K., Lethaus B., Weingart, D.

Jahrestagung der DGZMK, 2004, Stuttgart

„Neurofibrom im Unterkiefer-pathohistologische und chirurgische Aspekte“

Schulze, K., Bublitz, R., Küper, R., Bosse, A., Weingart, D., Jundt, G.

Jahrestagung der DGZMK, 2005, Berlin

Schweiz:

„Zytostatische Therapie mit einem Nukleosid Antimetabolit (Gemcitabine) bei Patienten mit ausbehandelten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs“

Raguse J. D., Rein K., Oettle H., Bier J., Gath H. J.

49. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Basel 1999.

USA:

„Treatment of tumor anemia in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck region (SCCHN) with a recombinant human erythropoetin“

Raguse J. D., Oettle H., Rein K., Zarrinbal R., Hell B., Bier J., Gath H. J.

5th International Conference of Head and Neck Cancer, San-Francisco 2000.

„Application of a tissue engineered dermal replacement (Dermagraft) in patients with head and neck tumors“

Gath H. J., Rein K., Zarrinbal R., Hell B., Bier J.

5th International Conference of Head and Neck Cancer, San-Francisco 2000.

„Minimal Residual Disease in head and neck cancer patients“

Gath H. J., Rein K., Raguse J.D., Hell B., Oettle H., Bier J.

5th International Conference of Head and Neck Cancer, San-Francisco 2000.

Publikationen

Deutschland: "Hochmalignes B-Zell-Lymphom der Mundhöhle- ein Fallbeispiel"

Rein K., Lethaus B., Weingart, D.

Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift, Supplement 2004, D21

„Neurofibrom im Unterkiefer-chirurgische und pathohistologische Aspekte“

Schulze, K., Bublitz, R., Küper, R., Bosse, A., Weingart, D., Jundt, G.

Quintessenz 2006; 57(6): 599-602

Erklärung

„Ich, Dr. med. Katharina Schulze, geb. 31.12.1969 in Öhringen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

„Minimale Resterkrankung bei Patienten mit Plattenepitelkarzinomen der Kopf-Hals-Region in einem Xenotransplantationsmodell“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige Hilfe) Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe. “