

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

DISSERTATION

**Immunhistochemischer Nachweis der CD44-Spleißvarianten CD44v3,
CD44v5, CD44v7 und CD44v10 auf Plattenepithelkarzinomen im Kopf-
Hals-Bereich unter Berücksichtigung ihrer quantitativen Verteilung in
Abhängigkeit von der Entfernung zum Tumorzentrum**

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

von

**Ralf-Roger Grunert
aus Ravensburg**

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. B. Hoffmeister
2. Prof. Dr. med. H. Lobeck
3. Prof. Dr. Dr. H.-R. Metelmann

Datum der Promotion: 18. 09. 2009

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	9
1.1. Epidemiologie der Krebserkrankung	9
1.2. Metastasen, Rezidive und Zweittumoren als wichtigste Ursachen der Letalität	11
1.3. Die Adhäsionsmoleküle	12
1.3.1. Die wichtige Funktion von Adhäsionsmolekülen bei der Ausbreitung der Tumoren und der Metastasierung	12
1.3.2. Übersicht wichtiger Adhäsionsmoleküle (außer CD44)	12
1.3.2.1. Selektine	14
1.3.2.2. Die Immunglobulin-Superfamilie	14
1.3.2.3. Cadherine	15
1.3.2.4. Integrine	15
1.3.2.5. Adressine	16
1.3.3. Die Familie der CD44-Glykoproteine	17
1.3.3.1. Bedeutung von CD44-Spleißvarianten für bestimmte Tumoren (ohne HNSCC)	21
1.3.3.1.1. Bedeutung der Spleißvariante CD44v2	21
1.3.3.1.2. Bedeutung der Spleißvariante CD44v3	22
1.3.3.1.3. Bedeutung der Spleißvariante CD44v4	22
1.3.3.1.4. Bedeutung der Spleißvariante CD44v5	22
1.3.3.1.5. Bedeutung der Spleißvariante CD44v6	23
1.3.3.1.6. Bedeutung der Spleißvariante CD44v7	25
1.3.3.1.7. Bedeutung der Spleißvariante CD44v8	25
1.3.3.1.8. Bedeutung der Spleißvariante CD44v9	25
1.3.3.1.9. Bedeutung der Spleißvariante CD44v10	26
1.3.3.2. Bedeutung und Vorkommen der CD44-Spleißvarianten auf Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) und benachbartem gesunden Gewebe	26
1.3.3.2.1. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v2	26
1.3.3.2.2. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v3	27
1.3.3.2.3. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v4	27
1.3.3.2.4. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v5	28
1.3.3.2.5. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v6	29
1.3.3.2.6. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v7	30

	Seite	
1.3.3.2.7.	Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v8	31
1.3.3.2.8.	Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v9	31
1.3.3.2.9.	Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v10	32
1.4.	Zielsetzung	33
2.	Material und Methoden	35
2.1.	Material	35
2.1.1.	Die Patienten und ihr Gewebe	35
2.1.2.	Primärantikörper	36
2.2.	Methoden	36
2.2.1.	Gewebeentnahme und Gewebeaufbewahrung	36
2.2.1.1.	Herstellung der Kryostatschnitte	37
2.2.1.2.	Herstellung der Paraffinschnitte	37
2.2.2.	Immunhistochemische Färbung	37
2.2.2.1.	Vorbereitung der Präparate	37
2.2.2.2.	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase-Reaktion (APAAP)	38
2.2.2.2.1.	Das allgemeines Prinzip der APAAP	38
2.2.2.2.2.	Durchführung der APAAP-Reaktion	39
2.2.3.	Lichtmikroskopische Auswertung	42
2.2.3.1.	Immunreaktives Bewertungsschema	42
2.2.3.2.	Durchführung der Beurteilung	43
2.2.4.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	43
3.	Ergebnisse	45
3.1.	Eigenschaften des Patientenkollektivs	45
3.1.1.	Charakterisierung der Tumorpatienten	45
3.1.2.	Charakterisierung der Kontrollpatienten	46
3.2.	Untersuchung der Expression der verschiedenen CD44-Spleiß- varianten	48
3.2.1.	Nachweis der Expression von CD44v3	48
3.2.1.1.	Expression von CD44v3 auf den Geweben der Tumorpatienten	48
3.2.1.1.1.	Expression von CD44v3 auf den Geweben des Tumorzentrums	48
3.2.1.1.2.	Expression von CD44v3 auf den Tumorrangeweben	51
3.2.1.1.3.	Expression von CD44v3 auf den tumorfernen Geweben	53
3.2.1.2.	Expression von CD44v3 auf den Kontrollgeweben	54
3.2.2.	Nachweis der Expression von CD44v5	56

	Seite	
3.2.2.1.	Expression von CD44v5 auf den Geweben der Tumorpatienten	56
3.2.2.1.1.	Expression von CD44v5 auf den Geweben des Tumorzentrums	56
3.2.2.1.2.	Expression von CD44v5 auf den Tumorrandgeweben	59
3.2.2.1.3.	Expression von CD44v5 auf den tumorfernen Geweben	61
3.2.2.2.	Expression von CD44v5 auf den Kontrollgeweben	62
3.2.3.	Nachweis der Expression von CD44v7	64
3.2.3.1.	Expression von CD44v7 auf den Geweben der Tumorpatienten	64
3.2.3.1.1.	Expression von CD44v7 auf den Geweben des Tumorzentrums	64
3.2.3.1.2.	Expression von CD44v7 auf den Tumorrandgeweben	67
3.2.3.1.3.	Expression von CD44v7 auf den tumorfernen Geweben	69
3.2.3.2.	Expression von CD44v7 auf den Kontrollgeweben	71
3.2.4.	Nachweis der Expression von CD44v10	73
3.2.4.1.	Expression von CD44v10 auf den Geweben der Tumorpatienten	73
3.2.4.1.1.	Expression von CD44v10 auf den Geweben des Tumorzentrums	73
3.2.4.1.2.	Expression von CD44v10 auf den Tumorrandgeweben	75
3.2.4.1.3.	Expression von CD44v10 auf den tumorfernen Geweben	77
3.2.4.2.	Expression von CD44v10 auf den Kontrollgeweben	79
3.3.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	81
3.3.1.	Unterschiede zwischen der Expression der einzelnen CD44-Spleißvarianten auf den Geweben der Tumorpatienten	81
3.3.1.1.	Mittlere immunreaktive Expressionswerte der CD44-Spleißvarianten auf den Geweben der Tumorpatienten	82
3.3.1.2.	Statistischer Vergleich der PP- und immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Geweben der Tumorpatienten	84
3.3.1.3.	Untersuchung einer Beziehung zwischen der CD44-Expression auf den Geweben der Tumorpatienten zum Tumorstadium und Differenzierungsgrad der Tumoren	90
3.3.1.3.1.	Korrelation zwischen der CD44-Expression und dem Tumorstadium	90
3.3.1.3.2.	Korrelation zwischen der CD44-Expression und dem Differenzierungsgrad der Tumoren	92
3.3.1.4.	Untersuchung einer prognostischen Bedeutung der CD44-Expression durch einen Vergleich mit dem weiteren Krankheitsverlauf in Kaplan-Meier-Kurven	94
3.3.1.4.1.	Vergleich der CD44-Expression auf dem Karzinom im Tumorzentrum mit dem weiteren Krankheitsverlauf in Kaplan-Meier-Kurven	94

	Seite	
3.3.1.4.2.	Vergleich der CD44-Expression auf dem Karzinomrest im Tumor- randgewebe mit dem weiteren Krankheitsverlauf in Kaplan-Meier- Kurven	98
3.3.2.	Unterschiede zwischen der Expression der einzelnen CD44-Spleiß- varianten auf den Geweben der Kontrollpatienten	101
3.3.2.1.	Mittlere immunreaktive Expressionswerte der CD44-Spleißvarianten auf den Kontrollgeweben	102
3.3.2.2.	Statistischer Vergleich der PP- und immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Kontrollgeweben (auf Kryostat- schnitten)	103
3.3.3.	Statistischer Vergleich der Expression der einzelnen CD44-Spleiß- varianten zwischen den Tumor- und den Kontrollgeweben	104
3.3.3.1.	Statistischer Vergleich der PP- und immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Geweben der Tumorpatienten mit den PP- und immunreaktiven Scorewerten von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Kontrollgeweben (auf Kryostatschnitten)	104
4.	Diskussion	106
4.1.	Patientendaten und Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich und Vergleich mit den entsprechenden Daten der Kontrollpatienten	106
4.2.	Bedeutung des Adhäsionsmoleküls CD44 in der Progression und Metastasierung von Kopf-Hals-Tumoren	108
4.3.	Bewertung der immunreaktiven Scorewerte (IRS, vgl. Tabelle 8) der vier untersuchten Spleißvarianten von CD44: CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10	110
4.4.	Diskussion der Expression von CD44v3 auf Kopf-Hals-Tumoren	112
4.4.1.	Nachweis von CD44v3 im Tumorzentrum von Kopf-Hals-Tumoren	112
4.4.2.	Nachweis von CD44v3 im Tumorrand und im tumorfernen Gewebe von Kopf-Hals-Tumoren	113
4.4.3.	Einschätzung der nachgewiesenen Expression von CD44v3 auf den Kontrollgeweben im Vergleich zu den Ergebnissen der Tumorgewebe	115
4.5.	Diskussion der Expression von CD44v5 in Kopf-Hals-Tumoren	115
4.5.1.	Nachweis von CD44v5 im Tumorzentrum von Kopf-Hals-Tumoren	116
4.5.2.	Nachweis von CD44v5 im Tumorrand und in den tumorfernen Gewe- ben von Kopf-Hals-Tumoren	118

	Seite	
4.5.3.	Einschätzung der nachgewiesenen Expression von CD44v5 auf den Kontrollgeweben im Vergleich zu den Ergebnissen der Tumorgewebe	119
4.6.	Diskussion der Expression von CD44v7 in Kopf-Hals-Tumoren	119
4.6.1.	Immunhistochemischer Nachweis von CD44v7 im Tumorzentrum von Kopf-Hals-Tumoren	120
4.6.2.	Immunhistochemischer Nachweis von CD44v7 im Tumorrand und im tumorfernen Gewebe von Kopf-Hals-Tumoren	122
4.6.3.	Einschätzung der nachgewiesenen Expression von CD44v7 auf den Kontrollgeweben im Vergleich zu den Ergebnissen der Tumorgewebe	123
4.7.	Diskussion der Expression von CD44v10 in Kopf-Hals-Tumoren	124
4.7.1.	Immunhistochemischer Nachweis von CD44v10 im Tumorzentrum von Kopf-Hals-Tumoren	125
4.7.2.	Immunhistochemischer Nachweis von CD44v10 im Tumorrand und im tumorfernen Gewebe von Kopf-Hals-Tumoren	126
4.7.3.	Einschätzung der nachgewiesenen Expression von CD44v10 auf den Kontrollgeweben im Vergleich zu den Ergebnissen der Tumorgewebe	127
4.8.	Kann der Nachweis der Spleißvarianten CD44v3, CD44v5, CD44v7 oder CD44v10 die Diagnostik oder Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich unterstützen?	128
5.	Zusammenfassung	131
6.	Literaturverzeichnis	134
7.	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	145
7.1.	Abbildungsverzeichnis	145
7.2.	Tabellenverzeichnis	146
8.	Abkürzungsverzeichnis	149
9.	Lebenslauf	151
10.	Danksagung	152
11.	Erklärung	153

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie der Krebserkrankung

Etwa 10 Millionen Menschen (5,3 Millionen Männer und 4,7 Millionen Frauen) erkrankten im Jahr 2000 weltweit neu an Krebs und schätzungsweise 15 Millionen Menschen werden im Jahr 2020 neu an Krebs erkranken [175]. Etwa 6,2 Millionen Menschen sind im Jahr 2000 weltweit an Krebs gestorben, wobei Lungenkrebs die häufigste Krebs-Todesursache war. Männer erkranken häufiger an Krebs als Frauen. Die Erkrankungsrate bei Frauen steigt jedoch durch zunehmenden Tabakkonsum kontinuierlich an [175]. In reicheren Ländern treten Prostata-, Brust- und Darmkrebs häufiger auf als in ärmeren Ländern. Dagegen erkranken die Menschen in ärmeren Ländern häufiger an Krebserkrankungen der Leber, des Magens und des Gebärmutterhalses. Ursächlich sind häufig Infektionen. Die besten Heilungschancen haben Brust-, Gebärmutterhals-, Prostata-, Darm- und Hautkrebs, vorausgesetzt sie werden früh genug erkannt [175]. 12,6 Prozent aller Todesfälle in der Welt sind durch Krebs verursacht. Damit sterben im Durchschnitt weltweit mehr Menschen an Krebs als an AIDS, Tuberkulose und Malaria zusammen. Krebs ist in den Industrienationen die zweithäufigste Todesursache und in den Entwicklungsländern eine der drei häufigsten Todesursachen bei Erwachsenen [175]. In Deutschland erkranken jährlich schätzungsweise 420.000 Menschen neu an Krebs und etwa 208.000 Menschen versterben jährlich an Krebs. Während die Männer in der Gesamtzahl der Neuerkrankungen die Frauen leicht überragen (218.000 Männer und 206.000 Frauen), sind bei den unter 60-Jährigen die Frauen deutlich häufiger betroffen (48.000 Männer und 58.000 Frauen).

Die Inzidenz der Krebsneuerkrankungen steigt an, was in den letzten Jahren allerdings eher einer verbesserten Diagnostik als einer zunehmenden Erkrankungshäufigkeit zugeschrieben wird. Die Mortalitätsrate ist dagegen im Sinken begriffen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Männern 46%, bei Frauen 58%. Die mittleren Überlebenschancen von Männern und Frauen mit Krebserkrankungen gleicher Lokalisation unterscheiden sich mit Ausnahme von Tumoren der Mundhöhle und des Rachens nur wenig voneinander. Während die Inzidenz der Tumoren des Mund- und Rachenraumes während den 1970er - und 1980er Jahren, vor allem bei Männern, deutlich zugenommen hat, nimmt sie seit den 1990er Jahren für beide Geschlechter eher ab. Seit Ende der 1990er Jahre nimmt auch die Sterblichkeitsrate der Frauen an diesen Tumoren ab [106]. Schätzungsweise 7.800 Männer und 2.600 Frauen erkranken jährlich neu an Tumoren im Kopf-Hals-Bereich (Mundhöhle und Rachen). Männer erkranken somit dreimal häufiger an diesen Tumoren als Frauen. Bei Männern machen diese Tumoren ca. 3,6%, bei Frauen ca. 1,3% aller bösartigen Neubildungen aus. Das mittlere Erkrankungsalter der Männer liegt bei 61 -, das der Frauen bei 69 Jahren. Die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate bei Tumoren der

Mundhöhle und des Rachens beträgt für Männer 46% und für Frauen 60% und liegt somit im Mittel der Überlebensraten aller Krebserkrankungen [106]. Im Vergleich mit den EU-Ländern liegt die Inzidenz dieser Tumoren im mittleren Bereich. Sie wird für beide Geschlechter von den Raten in Frankreich übertroffen. Die niedrigsten Inzidenzraten werden für Männer in Griechenland und für Frauen in Lettland berechnet [106].

Die Tabellen 1 und 2 zeigen die Lokalisation und den prozentualen Anteil der häufigsten Krebsformen im Vergleich zur Gesamtzahl aller Krebsneuerkrankungen bzw. die Lokalisation und den prozentualen Anteil der Sterbefälle an den häufigsten Krebsformen im Vergleich zur Gesamtzahl der Krebssterbefälle im Jahr 2002 in Deutschland.

Tabelle 1: Lokalisation und prozentualer Anteil der häufigsten Krebsformen zur Gesamtzahl der Krebsneuerkrankungen 2002 in Deutschland: 208.215 Krebs-Neuerkrankungen bei Männern und 206.000 Krebs-Neuerkrankungen bei Frauen [106]

Männer		Frauen	
Organ / Region	Prozent	Organ / Region	Prozent
Prostata	22,3	Brustdrüse	26,8
Darm	16,3	Darm	17,4
Lunge	14,9	Lunge	6,1
Harnblase	8,6	Gebärmutterkörper	5,5
Magen	5,1	Eierstöcke	4,8
Niere	4,7	Magen	4,0
Mund-Rachen	3,6	M. Melanom der Haut	3,7
Bauchspeicheldrüse	2,8	Harnblase	3,5
Malignes Melanom der Haut	2,8	Mund-Rachen	1,3

Tabelle 2: Lokalisation und prozentualer Anteil der Sterbefälle der häufigsten Krebsformen zur Gesamtzahl der Sterbefälle 2002 in Deutschland: 109.631 Krebssterbefälle bei Männern und 99.945 Krebssterbefälle bei Frauen [106]

Männer		Frauen	
Organ / Region	Prozent	Organ / Region	Prozent
Lunge	26,3	Brustdrüse	17,8
Darm	12,8	Darm	14,9
Prostata	10,4	Lunge	10,4
Magen	6,0	Bauchspeicheldrüse	6,7
Bauchspeicheldrüse	5,6	Eierstöcke	5,9
Nieren	3,5	Magen	5,8
Mund-Rachen	3,4	Leukämien	3,4
Leukämien	3,2	Non-Hodgkin-Lymphome	2,7
Speiseröhre	3,2	Mund-Rachen	1,0

Primäre maligne Tumoren von Kopf und Hals sind gewöhnlich zu etwa 40% in der Mundhöhle, zu 25% im Larynx, zu 15% im Oro- und Hypopharynx und zu 10% in den Speicheldrüsen lokalisiert. Die meisten (80 - 95 %) dieser Tumoren sind Plattenepithelkarzinome (HNSCC = head neck squamous cell carcinoma), die übrigen Adenokarzinome der Speicheldrüsen, Schilddrüsenkarzinome, nasopharyngeale Lymphome und andere seltene Tumoren [41]. Während die Inzidenz von Schilddrüsen-, Knochen-, Weichgewebs-, Speicheldrüsen-, Zungen-, Tonsillen-

und Nasentumoren ansteigt, fällt die Rate der Lippen-, Hypo- und Oropharynx-, (Hals-)Ösophagus- und Kehlkopftumoren. Die Sterblichkeitsrate war bei allen diesen Tumoren, mit Ausnahme einer stabilen Sterblichkeitsrate bei Kehlkopftumoren, etwas im Sinken begriffen [41].

Erste Symptome oraler Kopf-Hals-Tumoren sind Heiserkeit, Fremdkörpergefühl, Schluckstörungen und Schmerzen beim Essen. Zwischen dem Auftreten der ersten Symptome eines Mundhöhlenkarzinoms und der Diagnosestellung vergehen drei Monate und mehr [48], was zum einen am verspäteten Aufsuchen des Arztes durch den Patienten, zum anderen an einer falschen ärztlichen Diagnose bei der Erstvorstellung des Patienten liegt. Als Risikofaktoren der Kopf-Hals-Tumoren gelten in den Industrieländern besonders Tabak und Alkohol in den Entwicklungsländern vor allem Tabak und Betel-Kauen [22]. Viren werden ebenfalls als eine Ursache von Karzinomen des Oropharynx diskutiert [30]. Eine signifikant geringere Inzidenz der durch Rauchen und Alkohol verursachten Tumoren fand Grundmann [70] bei Mormonen.

1.2. Metastasen, Rezidive und Zweittumoren als wichtigste Ursachen der Letalität

Häufig besteht die einzige Chance bösartige Tumoren zu heilen in der frühen Entdeckung und vollständigen Entfernung [34], bevor sich durch Disseminierung einzelner Tumorzellen oder Zellkonglomerate Metastasen gebildet haben [60]. Die Fähigkeit maligner Tumoren zu metastasieren, stellt nach wie vor ein Kernproblem in der Tumorthherapie dar. Mit der Metastasierung in andere Gewebe entsteht aus einem zunächst lokal begrenzten Prozess eine systemische Krankheit.

Die Metastasen werden häufig mit dem Primärtumor diagnostiziert; es können jedoch auch Monate oder Jahre nach der Diagnose des Primärtumors, seiner chirurgischen Entfernung und dem Auftreten von Metastasen liegen. In seltenen Fällen wird die Metastase vor dem Primärtumor diagnostiziert. Während der Primärtumor mit den modernen Operationstechniken oft relativ problemlos entfernt werden kann, stellt die Beseitigung der Metastasen meist ein unlösbares Problem dar. Dies bedeutet, dass eigentlich nicht der Primärtumor sondern die Metastasen für den Tod des Patienten verantwortlich sind [49]. Bei den Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich kommt es trotz chirurgischer Intervention und der Anwendung von Radio- und Chemotherapie häufig zu einem erneuten Auftreten des Tumors. 40% der behandelten Patienten entwickeln innerhalb von 2 Jahren (bzw. fast 50% der Patienten innerhalb von 5 Jahren) ein Rezidiv [33].

Fast 50% der Patienten mit mehr als 3 Lymphknotenmetastasen entwickeln Fernmetastasen, dabei steigt das individuelle Risiko um das ca. 3-fache, wenn der Tumor den Lymphknoten

durchbrochen hat [111]. Ist ein Rezidiv aufgetreten oder hat eine Metastasierung begonnen, sinkt die Überlebenschance deutlich. Zusätzlich besteht das Risiko des Auftretens multipler weiterer Primärtumoren im Epithel des Kopf-Hals-Bereiches, des Ösophagus und der Lungen. Pro Jahr entwickeln 2 - 3% der erfolgreich behandelten Patienten mit Tumoren im Kopf- Hals-Bereich erneut dort Tumoren [117].

1.3. Die Adhäsionsmoleküle

1.3.1. Die wichtige Funktion von Adhäsionsmolekülen bei der Ausbreitung der Tumoren und der Metastasierung

Adhäsionsprozesse sind die Grundlage für Gewebedifferenzierung, für den Aufbau von Gewebestrukturen und von Organmanifestation. Beim Prozess der Tumormetastasierung handelt es sich um einen komplexen Vorgang, der auf molekularer Ebene noch nicht genau geklärt ist. Er erfordert von den transformierten Zellen diverse neue Fähigkeiten. Dazu gehört das Loslösen vom Primärtumor, was durch einen erhöhten mechanischen Druck im Tumor, das Freisetzen lytischer Enzyme und eine erhöhte Motilität der Tumorzellen erleichtert wird. Weiterhin gehören dazu das Eindringen in benachbarte Gewebe, in Blut- und Lymphgefäße (Intravasation), das Festsetzen im Zielorgan (Arretierung) und die weitere Proliferation der Tumorzellen zu Tochtergeschwülsten [77] unter Umgehung des physiologischen "Apoptose-Programmes" [44]. So umfasst der Prozess des invasiven Wachstums und der Metastasierung diverse komplexe und spezifische Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Matrix-Interaktionen. Dabei müssen die Zellen auf ihrer Wanderschaft in der Lage sein, spezifische und unspezifische Attacken des Immunsystems zu überstehen [144]. Wie schaffen es also die Tumorzellen, all diese schwierigen Aufgaben zu erfüllen?

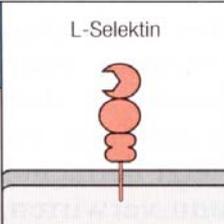
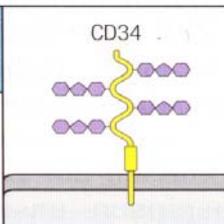
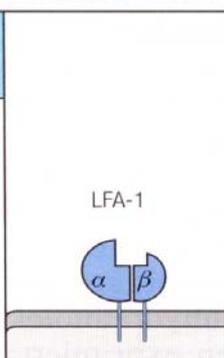
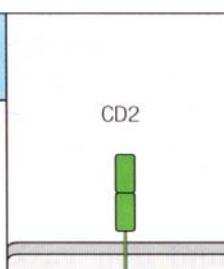
Wie man inzwischen weiß, unterscheiden sich die Tumorzellen von ihren nichttransformierten Vorläuferzellen oft erheblich in der Art und Ausprägung ihrer Adhäsionsmoleküle. Die Adhäsionsmoleküle vermitteln die Bindung von Zelle zu Zelle und leiten so Signale in das Zellinnere weiter. Sie vermitteln die Bindung an die extrazelluläre Matrix und haben so unter anderem Einfluss auf die Beweglichkeit der Zellen, zum Beispiel durch die Bindung an Hyaluronsäure [206].

1.3.2. Übersicht wichtiger Adhäsionsmoleküle (außer CD44)

Verschiedene Strukturfamilien der Adhäsionsmoleküle spielen bei der Leukozyten- und auch der Tumorzellwanderung und bei ihrer Zielortbestimmung (homing) eine wichtige Rolle. So scheint es gerechtfertigt anzunehmen, dass gerade eine veränderte Expression der Adhäsionsmoleküle für die metastatischen Eigenschaften vieler maligner Tumoren verantwortlich ist.

Abbildung 1 vermittelt eine Übersicht über die Gewebeverteilung und die Liganden wichtiger Adhäsionsmoleküle

Abbildung 1: Die Gewebeverteilung und Liganden wichtiger Adhäsionsmoleküle [91] (vgl. 8. Abkürzungsverzeichnis)

		Name	Gewebeverteilung	Ligand
Selektine binden Kohlenhydrate lösen Leukozyten- Endothel-Wechsel- wirkung aus		L-Selektin (MEL-14, CD62L)	naive und Gedächtnislymphocyten, Neutrophile, Monocyten, Eosinophile	GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1
		P-Selektin (PADGEM, CD62P)	aktiviertes Endothel	Sialyl-Lewis-x
		E-Selektin (ELAM-1, CD62E)	aktiviertes Endothel	Sialyl-Lewis-x
mucinähnliche vaskuläre Adressine binden an L-Selektin lösen Leukozyten- Endothel-Wechsel- wirkung aus		CD34	Endothel	L-Selektin
		GlyCAM-1	Venolen mit hohem Endothel	L-Selektin
		MAdCAM-1	Venolen lymphatischen Schleimhautgewebes	L-Selektin, VLA-4
Integrine binden an Zelladhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrix starke Bindung		$\alpha_4\beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD18)	Lymphocyten	ICAMs
		$\alpha_M\beta_2$ (Mac-1, CR3, CD11b/CD18)	Makrophagen	ICAMs, iC3b
		$\alpha_X\beta_2$ (CR4, p150,95, CD11c/CD18)	dendritische Zellen, Makrophagen	iC3b
		$\alpha_4\beta_1$ (VLA-4, LPAM-1, CD49d/CD29)	Lymphocyten, Monocyten	VCAM-1
		$\alpha_5\beta_1$ (VLA-5, CD49d/CD29)	T-Zellen?	Fibronektin
		$\alpha_4\beta_7$ (LPAM-2)	B-Zellen	MAdCAM-1
Immunglobulin-superfamilie verschiedene Funktionen bei der Zelladhäsion Ziel für Integrine		CD2 (LFA-2)	T-Zellen	LFA-3
		ICAM-1 (CD54)	aktivierte Gefäße, Lymphocyten	LFA-1
		ICAM-2 (CD102)	ruhende Gefäße	LFA-1
		ICAM-3 (CD50)	antigenpräsent. Zellen	LFA-1
		LFA-3 (CD58)	Lymphocyten, antigenpräsentierende Zellen	CD2
		VCAM-1 (CD106)	aktiviertes Endothel	VLA-4

Die Nomenklatur ist verwirrend, da die meisten Adhäsionsmoleküle durch monoklonale Antikörper oder Tests von Zell-zu-Zell-Wechselwirkungen definiert wurden. Biochemisch wurden sie erst später charakterisiert, weshalb aus dem Namen nicht unbedingt ersichtlich ist, zu welcher Strukturfamilie sie gehören.

Zu den vier Hauptgruppen der Zell-Adhäsionsmoleküle zählen die Selektine, die Immunglobulin-Superfamilie, die Cadherine und die Integrine.

1.3.2.1. Selektine

Die Selektine gehören zur kleinsten und jüngsten Strukturfamilie der Adhäsionsmoleküle [192]. Sie besteht aus drei Mitgliedern: L-, E- und P-Selektin. Sie werden entweder auf Leukozyten (L-Selektin) oder dem vaskulären Endothel (P- und E-Selektine) exprimiert. Selektine sind Zelloberflächenmoleküle ähnlicher Grundstruktur, die sich in der lektinähnlichen Kette in ihrem extrazellulären Bereich unterscheiden. Alle drei Selektine binden im Gegensatz zu Mitgliedern der anderen drei Hauptgruppen, die über Protein-Protein-Bindungen agieren, an spezifische Zuckerguppen. L-Selektin bindet an den Kohlenhydratanteil von muzinähnlichen Molekülen, die man als vaskuläre Adressine bezeichnet und die auf dem vaskulären Endothel exprimiert werden. Die Selektine spielen eine wichtige Rolle beim Leukozyten-Homing. So ist die Funktion der Selektine unverzichtbar bei der Extravasation neutrophiler Granulozyten, wie in mehreren Blockierungsexperimenten der L- und E-Selektin-Moleküle mit monoklonalen Antikörpern nachzuweisen war [193]. Die Wechselwirkung zwischen L-Selektin und den vaskulären Adressinen ist zwar verantwortlich für das spezifische Homing nativer T-Zellen in lymphatischen Organen, befähigt diese Zellen jedoch nicht, die Endothelbarriere zum lymphatischen Gewebe zu durchbrechen. Dafür sind Vertreter der Integrin- und Immunglobulin-Superfamilie erforderlich. Diese spielen auch eine wichtige Rolle bei den nachfolgenden Interaktionen der Leukozyten mit den antigenpräsentierenden Zellen und den späteren Zielzellen.

1.3.2.2. Die Immunglobulin-Superfamilie

Die Immunglobulin-Superfamilie besteht aus einer Gruppe funktionell unterschiedlicher Moleküle mit einer variablen Anzahl extrazellulärer immunglobulinähnlicher Domänen [15]. Viele Adhäsionsmoleküle der Zelloberfläche sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, zu der auch die Antigenrezeptoren der T- und B-Zellen und die konstante Domäne der MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex)-Moleküle gehören. Drei sehr ähnliche interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM), ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3, binden an das Leukozytenfunktion-assoziierte-1-Integrin (LFA-1-Integrin). ICAM-1 und ICAM-2 werden sowohl auf Epithel exprimiert als auch auf den antigenpräsentierenden Zellen. Eine Bindung an diese Moleküle befähigt die Leukozyten, durch die Gefäßwände zu wandern. ICAM-3 wird nur auf Leukozyten exprimiert und hat wahrscheinlich einen großen Anteil an der Adhäsion zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen [14, 86]. Entzündungsmediatoren wie Interferon- γ , Interleukin-1 und Tumor-Nekrosefaktor- α führen zu einer deutlichen Steigerung der Expression von ICAM-1 [191]. ICAM-1 könnte möglicherweise als Tumormarker beim Pankreaskarzinom von Bedeutung sein. Zum Beispiel führt eine Verminderung der Expression von ICAM-1 durch TGF-Beta 1 (transforming growth

factor-beta 1) auf Pankreaskarzinomzellen zu einer Erhöhung der Lebermetastasierungsrate [159].

1.3.2.3. Cadherine

Cadherine sind Calcium-abhängige Transmembrannglykoproteine, die homophile Zell-zu-Zell-Adhäsion vermitteln. Sie scheinen unter anderem bei der Organisation des Ablaufs der Embryogenese und an der Stabilisierung und Erhaltung der Polarität erwachsenen Gewebes beteiligt zu sein [3]. Der Genlocus (beim Menschen) befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 16 und umfasst 16 Exons mit einer Länge von 10 Kilobasen [12].

Drei wichtige Unterfamilien sind gut charakterisiert, das epitheliale Cadherin (E-Cadherin), das plazentare Cadherin (P-Cadherin) und das neurale Cadherin (N-Cadherin). Weitere Cadherine sind das muskuläre Cadherin (M-Cadherin), das OB-Cadherin in Osteoblasten und das LI-Cadherin in Leber- und Darmzellen [16].

Vor allem E-Cadherin scheint bei Metastasierungsprozessen epithelialer Tumoren eine wichtige Rolle zu spielen. Bei Invasionsexperimenten verschiedener humaner epithelialer Zelllinien an einer künstlichen Kollagenmembran und am embryonalen Hühnerherzen korrelierte die Expression von E-Cadherin invers mit der Invasivität. Zelllinien die E-Cadherin exprimierten waren deutlich weniger invasiv als E-Cadherin-negative Zellen. Eine E-Cadherin-negative humane Mammakarzinom-Zelllinie zeigte nach Transfektion mit einer Maus-cDNA für E-Cadherin eine deutlich geringere Invasivität im Kollagengel als die nicht-transfizierte Zelllinie. Mit Antikörpern gegen das jetzt exprimierte Maus-E-Cadherin konnte der vorherige invasive Phänotyp wieder etabliert werden [55]. Auch bei einem in-vitro-Testsystem konnte der Nachweis erbracht werden, dass der Verlust der E-Cadherin Expression mit einer Steigerung der Invasivität einhergeht. So wurden epidermale Maus-Keratinocyten-Zelllinien, die verschiedene Stadien der epidermalen Karzinogenese repräsentieren, nach subkutaner Injektion in eine Nacktmaus auf ihre Tumorigenität hin untersucht. Auch hier wurde eine zur Tumorigenität inverse Ausprägung der E-Cadherine festgestellt. Durch die Transfektion einer E-Cadherin-cDNA in eine E-Cadherin-negative, hochmaligne epitheloide Zelllinie konnte deren Tumorigenität in der Nacktmaus partiell reduziert werden [132].

Parallele Ergebnisse wurden in vivo bei humanen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches gefunden. Die E-Cadherin Expression war invers zum Grad der Tumordedifferenzierung und zum Auftreten von Lymphknotenmetastasen [160].

1.3.2.4. Integrine

Die Integrine umfassen eine große Molekülfamilie, die an der zellulären Antwort auf immunologische und inflammatorische Reize beteiligt sind. Ebenso bedeutsam sind sie für viele Aspekte des Gewebeaufbaues und der Zellwanderung während der Entwicklung. Integrine sind hetero-

dimere Transmembranglykoproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Die verschiedenen Untergruppen der Integrine unterscheiden sich grob definiert durch ihre unterschiedliche β -Kette. Es sind 16 α - und 8 β -Untereinheiten beschrieben, aus deren unterschiedlichen Kombinationen sich zwar theoretisch mehr als 100 Heterodimere bilden können, von denen aber bislang nur 20 beschrieben wurden [3, 85, 86]. Sie sind intrazellulär mit Komponenten des Zytoskeletts verbunden und binden extrazellulär an verschiedene Liganden (Vitronectin, Kollagene, Fibronectin, Laminin und VCAM [85]. Damit stellen die Integrine eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der Zellumgebung her.

Manche Experimente weisen aber auch darauf hin, dass die Integrine nicht nur Adhäsion bedingen sondern auch Signale weiterleiten, die das Zellwachstum und die Zellbeweglichkeit beeinflussen [16]. Zum Beispiel befähigen $\beta 1$ -Ketten-enthaltende Integrine in Kooperation mit CD44-Varianten Zellen an Osteopontin zu binden und stimulieren so die Zellbeweglichkeit [95]. Die Mitglieder der $\beta 1$ -Unterfamilie werden auch als VLA-Proteine bezeichnet. Sie vermitteln unter anderem Bindungen an Kollagen, Fibronectin und Laminin. Hinweise auf eine Beteiligung von $\beta 1$ -Integrinen am Metastasierungsprozeß brachten Blockierungsexperimente mit monoklonalen Antikörpern. Monoklonale Antikörper gegen VLA-Proteine konnten die Zellmigration und Invasion von Tumorzellen durch Basalmembranen in vitro blockieren [204].

Für das VLA-2-Integrin konnte in einem Metastasierungsexperiment nachgewiesen werden, dass ein positiver Zusammenhang zwischen der VLA-2-Integrin-Expression und dem metastatischen Potential der VLA-2-exprimierenden Tumorzellen besteht: Durch die Transfektion der cDNA für die $\alpha 2$ -Untereinheit in humane VLA-2-negative Rhabdomyosarkomzellen konnte eine Expression von VLA-2 an der Zelloberfläche erreicht werden. Im spontanen Metastasierungsexperiment zeigten die Tiere, denen die VLA-2 tragenden Zellen injiziert worden waren, mehr Tumoren in der Lunge und zusätzlich auch in anderen Organen als die Tiere, denen die VLA-2-negativen, unveränderten Rhabdomyosarkomzellen injiziert worden waren. Da alle Versuchstiere an der Injektionsstelle Tumoren ähnlicher Größe entwickelten, ist die beobachtete Metastasierung wohl nicht auf eine unterschiedliche Proliferation und Tumorigenität zurückzuführen [32]. VLA-Proteine sind ebenfalls an Metastasierungsvorgängen beim Menschen beteiligt [211].

1.3.2.5. Adressine

Adressine sind muzinähnliche Moleküle (stark O-glykosylierte Proteine, reich an Serin und Threonin), deren sialylierte Carbohydate an Selektine aber auch Integrine binden, um so Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel zu ermöglichen. Glycam-1 und CD34 werden auf postkapillären Venolen mit hohem Endothel exprimiert. Sie helfen dort nativen T-Lymphozyten über eine Bindung an L-Selektin beim Eindringen in die peripheren Lymphknoten [172, siehe auch 1.3.2.1.]. MAdCAM-1 wird auf dem Endothel der Schleimhautvenolen exprimiert und steuert den

Eintritt der B-Lymphozyten über eine Bindung an ($\alpha 4\beta 7$ -)Integrine in das lymphatische Schleimhautgewebe [125, siehe auch Abb. 1].

1.3.3. Die Familie der CD44-Glykoproteine

Die Mitglieder der CD44-Familie gehören zu einer Gruppe heterogener Glykoproteine, die sich in ihrem Glykosylierungsprofil und der primären Aminosäuresequenz unterscheiden. Ihre Bezeichnung CD44 (cluster of differentiation 44) entstammt der Nomenklatur der Lymphozytenantigene. Sie sind typische Transmembranproteine mit einem intrazellulären und einem extrazellulär gelegenen Glykoprotein-Anteil, welche durch ein hydrophobes, in die Zellmembran integriertes Zwischenstück verbunden sind. Das humane CD44-Gen enthält mindestens 20 verschiedene Exons, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11pter-p13) lokalisiert sind [162, 186]. CD44 wird von den unterschiedlichsten Zellen exprimiert. Dazu gehören hämatopoetische Zellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Gliazellen und Tumorzellen [208]. Lange Zeit war CD44 unter verschiedenen Bezeichnungen bekannt:

“Lymphozyten-Homing-Rezeptor” (gp90 Hermes); “Phagocytic glycoprotein 1” (pgp-1); “Extracellular matrix receptor III” (ECMRIII) und “Hyaluronate receptor” (H-CAM). Die Isolierung der cDNA dieser Adhäsionsmoleküle zeigte einen identischen Aufbau [56, 202, 207].

Der Vergleich der CD44-Moleküle bei der Maus [207], beim Hamster [87], bei der Ratte [74] und beim Menschen [63, 173] zeigte eine weitgehende Übereinstimmung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz [56, 207]. Das humane CD44-Glykoprotein besteht aus einer C-terminalen zytoplasmatischen Region (70 Aminosäuren (AS)), einem transmembranen Anteil (21 AS) und einer N-terminalen extrazellulären Region (270 AS) [72]. Der N-terminale Anteil bildet N-glykosylierte Doppelschleifen, die durch drei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [37]. CD44 wird posttranslational durch N- und O-Glykosylierung sowie durch Anlagerung von Chondroitinsulfat- und Heparansulfatseitenketten über kovalente Bindungen modifiziert [27, 90]. Jalkanen et al [90] beschreiben ein 76 kD-Vorläuferprotein, das entweder in die 85-95 kD-Form oder in eine Chondroitinsulfat-Seitenketten-enthaltende 180-200 kD-Form umgewandelt wird.

Hauptbindungspartner der Adhäsionsmoleküle ist die Hyaluronsäure [6]. Ebenfalls ein wichtiger Bindungspartner, besonders für alle Metastasierungsvorgänge, scheint Osteopontin zu sein [195].

Aber auch andere Substanzen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Kollagen Typ 1 und Typ 4 [56] und ein sulfathaltiges Proteoglykan sind als Bindungspartner beschrieben worden [114]. Der zytoplasmatische Anteil des Moleküls hat eine Verbindung zu Strukturen des Zytoskeletts wie Aktin, Vimentin [109] und Ankyrin, welches besonders wichtig für die Signalweiterleitung der CD44-vermittelten Zellaktivierung ist [20, 21]. Die durch die Adhäsion vermittelten Zellinteraktionen spielen eine Rolle bei der Lymphozytenaktivierung [57], der Lymphozytendifferenzierung [209] und Lymphozytenwanderung [90], bei Entzündungsreaktionen [198], z.B. die

Aktivierung peripherer Blutmonozyten zu Gewebsmakrophagen [115], bei der Geweberegeneration, Embryonalentwicklung [153] und der Tumorausbreitung [205, 210].

Die CD44-Moleküle bilden eine Vielzahl von Isoformen, die sich in ihrer Struktur und Funktion unterscheiden. Die verschiedenen CD44-Moleküle entstehen durch drei verschiedene Mechanismen: durch alternatives Spleißen varianter Exons [89], durch Spleißen der intrazellulär gelegenen Domäne [63] und durch proteolytische Abspaltung eines extrazellulären Molekülanteiles der Glykoproteine, wodurch lösliche CD44-Varianten erzeugt werden [62, 63]. Allerdings scheinen nicht alle Zellarten lösliche CD44-Varianten zu produzieren. So geben z.B. neutrophile Granulozyten lösliche Varianten ab, nicht aber Lymphozyten, wenn sie in der Kultur stimuliert werden. Ebenfalls konnten lösliche CD44-Varianten aus Kulturen von Keratinozyten und Karzinomzellen gewonnen werden. Inwieweit die beim Menschen im Blut, Serum und Harn nachweisbaren löslichen Varianten [2] eine biologische Bedeutung haben ist nicht bekannt [114].

Aber möglicherweise könnten diese Moleküle oder die auf peripheren Blutzellen befindlichen CD44-Varianten das bisher unbefriedigende Tumorscreening bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich mittels Serummarkern [143] sinnvoll ergänzen oder generell helfen, Tumorverläufe (Vorkommen, Metastasen, Rezidive, das Ansprechen auf die Therapie) besser zu beurteilen [98, 121, 150].

Man kennt bisher 10 variante (und 10 konstante) Exons [130], die durch "alternatives Spleißen" in den extrazellulären Anteil der 85-95 kD-Form des CD44-Moleküls, welche man als Standardform (CD44s) bezeichnet, eingefügt werden [152, 186]. Sie inserieren dort zwischen den Standard-Exons S5 und S6. Die Zahl der möglichen varianten Isoformen ist nicht bekannt. Obwohl multiple Kombinationen von varianten Exons beschrieben sind, werden einige dieser Kombinationen bevorzugt auf bestimmten Gewebetypen exprimiert, wie zum Beispiel die epitheliale Form (Exon CD44v8-v10), der Keratinozyten-Typ (CD44v3-v10) sowie die sogenannten metastasierungsassoziierten Typen (CD44v4-v7 und v6-v7) [27, 208]. Man geht davon aus, dass die Translation der varianten Exons in der Regel der 3'-5'-Verknüpfung folgt.

Abbildung 2 zeigt Beispiele unterschiedlicher CD44-Varianten, die durch alternatives Spleißen der prä-mRNA des auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 liegenden Gens (20 Exons) entstehen können. Die extrazelluläre Region umfasst die Standard-Exons CD44s1 - s7 und verschiedene Anteile der varianten Exons CD44v2 - v10, die transmembranöse Domäne das Standard-Exon S8 und die zytoplasmatische Region entweder das für 3 Aminosäuren kodierende Standard-Exon S9 oder das für 70 Aminosäuren kodierende Exon S10. Das variante Exon v1 ist beim Menschen ein Stop-Codon und wird deshalb nicht transkribiert [82].

Abbildung 2: Beispiele unterschiedlicher CD44-Varianten (Schema) [entnommen aus 178]

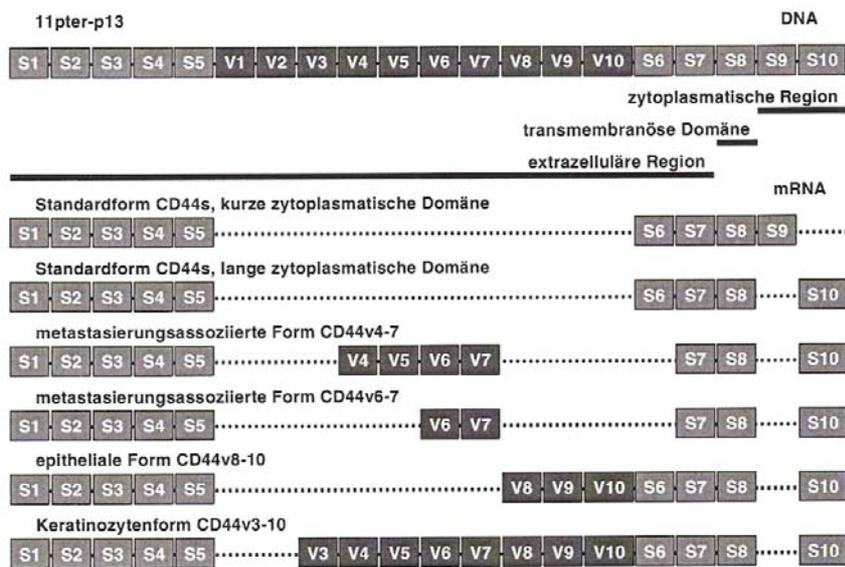
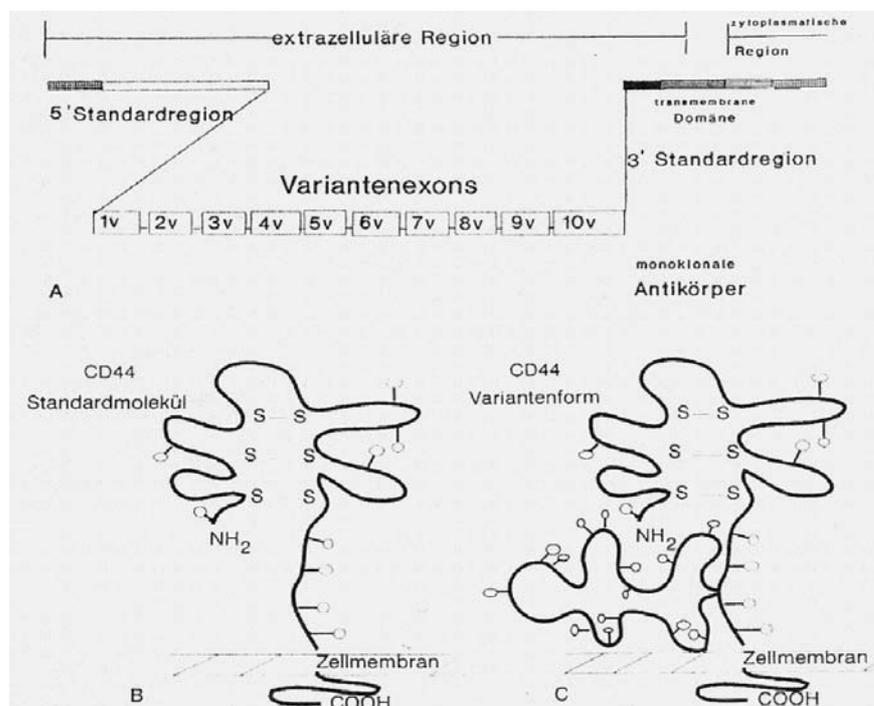


Abbildung 3 zeigt eine weitere schematische Darstellung der CD44-Standard- und Variantenregion bzw. des CD44-Standard- und Variantenmoleküls.

Abbildung 3: Schematische Darstellung der CD44-Standard- und Variantenregion (A). Struktur des CD44-Standard- und Variantenmoleküls (B und C) [modifiziert nach 72] [aus 181]



Mit der Entdeckung der varianten Isoformen konnten zunächst widersprüchliche Ergebnisse über Expressionsmuster und Funktion von CD44 aufgeklärt werden, da verschiedene Arbeitsgruppen unterschiedliche CD44-Isoformen untersucht hatten. Aber auch verschiedene Aktivierungszustände eines CD44-Variantmoleküls, die durch Reaktionen von Kohlenwasserstoffseitenketten im N-terminalen Bereich des CD44-Moleküls bedingt sind, spielen für die Bindungsfähigkeit dieses Moleküls eine wichtige Rolle [29]. So kann die gleiche Molekülvariante je nach Aktivierungsgrad an Hyaluronsäure binden oder auch nicht. Ob diese besagten Kohlenwasserstoffseitenketten dabei eigener Bestandteil der CD44-Variantmoleküle oder Bestandteil von Nachbarmolekülen sind, ist noch nicht geklärt [113].

Ein ganz wichtiger Aspekt bei der Untersuchung der CD44-Spleißvarianten darf aber nicht vergessen werden: Aufgrund der hohen strukturellen Variabilität der CD44-Moleküle, welche bestimmte variante Epitope maskieren kann, muss bei deren Untersuchung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern auch immer mit falsch-negativen Ergebnissen gerechnet werden [119]. Dass variante Formen von CD44 im Metastasierungsprozeß eine entscheidende Rolle spielen können, wird aus Experimenten in einem Rattensystem abgeleitet.

Aus den Zellen eines metastasierenden Pankreasadenokarzinoms der Ratte konnte die nicht-metastasierende Variante BSp73-AS und die lymphogen metastasierende Variante BSp73-ASML etabliert werden [123]. Später gelang es mit vier monoklonalen, gegen die metastasierende Tumorvariante BSp73-ASML gerichteten Antikörpern, die Metastasierung vorübergehend zu blockieren [146]. Während drei dieser Antikörper das Wachstums des Tumors über die Aktivierung von Immunmechanismen verzögerten, hatte der monoklonale Antikörper 1.1ASML eine direkte Wirkung auf den Tumor, nämlich eine Bindung an ein zugehöriges Oberflächenmolekül. Bei der Klonierung des von 1.1ASML erkannten Oberflächenmoleküls stellte sich heraus, dass es sich dabei um eine CD44-Isoform mit den zusätzlichen Exons v4-v7 (CD44v) handelt [74]. So lag die Vermutung nahe, dass CD44-Variantenmoleküle (CD44v) eine Funktion bei der Metastasierung haben. Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, wurden nicht-metastasierende BSp73-Zellen mit der cDNA von CD44v4 - v7 transfiziert, worauf die Transfektanten ein BSp73-ASML-ähnliches Metastasierungsverhalten zeigten [74]. Eine weitere CD44-Variante, die die Exons v6 und v7 enthält, verlieh den ursprünglich nicht-metastasierenden BSp73-ASML-Zellen ebenfalls das Potential zur Metastasierung [152]. So hatten nicht-metastasierende Tumorzellen durch die Übertragung eines einzigen Gens die Fähigkeit zur Metastasierung erlangt.

Nachdem man erkannt hatte, dass die Interaktionen zwischen den einzelnen Zellen bzw. der Zellen mit der extrazellulären Matrix als entscheidende Faktoren für die Tumorzellendifferenzierung und die Metastasierungskaskade verantwortlich sind, richtete sich das Interesse auf die

vermittelnden Adhäsionsmoleküle. Die veränderte Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle vollzieht sich offenbar in einem selektiven Prozess dahingehend, dass nur eine ganz bestimmte Subpopulation der Tumorzellen die Fähigkeit erwirbt, sich über Zell-Zell- / Zell-Matrix-Interaktionen aus dem Tumorzellverband zu lösen, durch die Basalmembran zu invadieren, in der extrazellulären Matrix zu migrieren oder in Blut- und Lymphgefäße zu disseminieren [183].

Seit Beginn der 90er Jahre ist man bemüht, durch die Untersuchung der verschiedenen Tumoren die Bedeutung der unterschiedlichen CD44-Spleißvarianten zur biologischen Charakterisierung der Tumoren und ihrer prognostische Bedeutung beizutragen. Interessante Erkenntnisse konnten so von verschiedenen Autoren gewonnen werden. Einige dieser Ergebnisse werden nachfolgend vorgestellt.

1.3.3.1. Bedeutung von CD44-Spleißvarianten für bestimmte Tumoren (ohne HNSCC)

1.3.3.1.1. Bedeutung der Spleißvariante CD44v2

Matsumura et al [121] untersuchten den Urin von Patienten mit und ohne Blasenkarzinom. Dabei fanden sie die Spleißvariante CD44v2 im Urin von 91% der Tumorpatienten aber nur bei 7% der Kontrollpatienten. Patienten mit CD44v2-positiven Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus haben nach Gotoda et al [66] eine signifikant bessere Prognose als Patienten mit CD44v2-negativen Ösophaguskarzinomen. Die Untersuchung von Haruyama et al [78] an kolorektalen Karzinomen ergab eine signifikante positive Korrelation zwischen der Expression von CD44v2 und der Rezidivrate bzw. einer schlechteren Prognose bei Patienten mit einem Karzinom der Duke-Klassifikation Stadium B (aber nicht Duke-C). Weitere ausführliche Untersuchungen bei kolorektalen Karzinomen stammen von Weg-Remers et al [196]. Dabei verglichen die Autoren die CD44v2-Expression auf normaler Darmmukosa, auf Adenomen und auf Karzinomen unterschiedlichen Stagings und Gradings nach den UICC-Richtlinien [200]. Die Autoren kamen zu folgenden Ergebnissen: CD44v2 wurde nur auf etwa 6% der normalen Mukosa exprimiert. Dagegen fand sich eine signifikant erhöhte Expression auf 27% der Adenome. 16% der Karzinome exprimierten CD44v2, wobei zwischen normaler Mukosa und Karzinom einerseits und Karzinom und Adenom andererseits keine signifikanten Unterschiede vorlagen. Signifikante Unterschiede zur normalen Mukosa fanden sich in Abhängigkeit vom Tumorstaging (aber nicht vom Tumorgrading). Eine ähnlich hohe CD44v2-Expression wie bei den kolorektalen Adenomen wiesen die Autoren auf 29% der Stage-I-Karzinome (T1-2N0M0) nach. Eine deutlich reduzierte Expression zeigte sich bei fortgeschrittenen Tumoren: Reduktion der Expression bei 5% der UICC-Staging II-Karzinome, bei 18% der UICC-Staging III-Karzinome und bei 17% der UICC-Staging IV-Karzinome. Keine der untersuchten Metastasen der primären Adenokarzinome zeigte eine Expression von CD44v2 (siehe auch 1.3.3.1.4. und 1.3.3.1.5.).

Gotoda et al [67] untersuchten auf Pankreaskarzinomen die Spleißvariante CD44v2. CD44v2 war nur auf den Tumorzellen (bei etwa 40% der untersuchten Tumoren) zu finden und war mit einer geringeren Überlebensrate der Patienten korreliert. Eine signifikante Korrelation bestand zwischen der CD44v2-Expression und der Gefäßinvasion durch den Tumor (siehe auch 1.3.3.1.5.). Tokue et al [185] fanden CD44v2 auf gut 20% der untersuchten Mammakarzinome. Die Expression von CD44v2 korrelierte mit einer geringeren Überlebensrate der Patienten und einem geringeren Differenzierungsgrad der Karzinome (siehe auch 1.3.3.1.5.).

1.3.3.1.2. Bedeutung der Spleißvariante CD44v3

Eine vermehrte Expression der Variante v3 im Endometrium der Frau könnte auf ein Karzinom hinweisen [155]. CD44-Moleküle mit den Varianten CD44v3 - v10 finden sich häufig bei Adenokarzinomen aus dem gynäkologischen Bereich [13]. Eine verminderte Expression der Spleißvariante CD44v3 erhöht die Wahrscheinlichkeit einer bereits erfolgten Metastasierung bei der Diagnosestellung eines Prostatakarzinoms [1]. Simon et al [169] fanden bei Plattenepithelkarzinomen der Haut die gleiche CD44v3-Expression wie im normalen Epithel.

1.3.3.1.3. Bedeutung der Spleißvariante CD44v4

Nach Böttger et al [19] ist eine Minderexpression von CD44v4 beim Adenokarzinom des Ösophagus (Barrett's Ösophagus) mit einer signifikant verminderten Lebenserwartung der Patienten korreliert. Somit könnte die Spleißvariante CD44v4 ein unabhängiger prognostischer Faktor für dieses Karzinom sein, der bereits präoperativ bestimmt werden kann. Einen signifikanten Einfluss von CD44v4 auf die Prognose des duktales Pankreaskarzinoms konnten Böttger et al [18] allerdings nicht nachweisen. Nach Simon et al [169] gibt es ebenfalls keine Unterschiede zwischen der Expression von CD44v4 auf normalem Epithel und der Expression auf Plattenepithelkarzinomen der Haut.

1.3.3.1.4. Bedeutung der Spleißvariante CD44v5

Seiter et al [165] untersuchten Proben der gesunden Haut, von Basalzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen der Haut. Mit Ausnahme des Stratum corneum waren in allen anderen epithelialen Schichten der gesunden Haut die varianten Exons CD44v5, CD44v6, CD44v7, CD44v8 und CD44v10 nachzuweisen. Die Farbintensität (SI) der einzelnen Epitope war dabei unterschiedlich, ebenso nahm die Farbintensität von innen nach außen hin ab. Bei Basalzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen der Haut ähnelte das Färbeverhalten (SI) mit den jeweiligen Antikörpern dem des gesunden Epithels, allerdings mit einer Tendenz zur geringeren Ausprägung. Die geringere Expression korrelierte nicht mit dem Differenzierungsgrad des Tumors. Alle 24 Plattenepithelkarzinome exprimierten CD44v5. Im Vergleich mit den Plattenepithelkarzinomen war die Expression der CD44-Varianten bei den 3 Basalzellkarzinomen deutli-

cher reduziert. Nur auf 46% (17 von 37) der Proben war CD44v5 nachzuweisen. Während die angefärbten und nicht-angefärbten Zellen bei den Plattenepithelkarzinomen eher diffus verteilt waren, war die Anfärbung der Basalzellkarzinome sehr heterogen. Eine Korrelation zwischen dem histologischen Subtyp und dem Färbeverhalten bestand nicht. Drlicek et al [42] fanden keine Korrelation zwischen der CD44v5-Expression und dem Wachstum von Lungenkarzinomen. Auch Hanak [76] fand keine direkte Beziehung zwischen der CD44v5-Ausprägung und dem kolorektalen Tumorwachstum, ebenso wenig zwischen dem Wachstum von Mammakarzinomen und der CD44v5-Expression. Tempfer et al [180] fanden CD44v5 bei 56% der untersuchten Mammakarzinome und bei 94% der axillären Lymphknotenmetastasen. Eine Expression von CD44v5 schien mit einer etwas geringeren 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten verbunden zu sein. Die Daten waren aber statistisch nicht signifikant. Müller et al [127] konnten keinen Zusammenhang zwischen der Prognose des Magenkarzinoms und der CD44v5-Expression nachweisen. Endo und Terada [43] beobachteten eine inverse Korrelation zwischen der CD44v5-Expression und der Überlebenszeit der Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom. Im Gegensatz dazu beschrieben Griffioen et al [68] bei frühen kolorektalen Karzinomen eine Überexpression von CD44v5. Weg-Remers et al [196] verglichen die CD44v5-Expression auf normaler Darmmukosa und auf kolorektalen Adenomen mit der Expression auf kolorektalen Karzinomen (siehe auch 1.3.3.1.1.). Die Expression auf Adenomen (33%) und kolorektalen Karzinomen (29%) war gegenüber der Expression auf normaler Mukosa (3%) signifikant erhöht. Ein statistischer Unterschied der CD44v5-Expression auf Karzinomen unterschiedlicher UICC-Stadien konnte nicht gefunden werden. 33% der Metastasen zeigten eine CD44v5-Expression (siehe auch 1.3.3.1.5.). Nach Böttger et al ist die Expression von CD44v5 auf Adenokarzinomen des Ösophagus (Barrett's Ösophagus) [19] und auf duktalem Pankreaskarzinomen [18] kein prognostischer Marker für den weiteren Krankheitsverlauf (siehe auch 1.3.3.1.3). Im Gegensatz dazu kommen Schröder et al [161] zu dem Schluss, dass die CD44v5-Expression ein wichtiger Marker für die Ausbreitung des Ovarialkarzinoms ist.

1.3.3.1.5. Bedeutung der Spleißvariante CD44v6

Alle von Seiter et al [165] untersuchten Plattenepithelkarzinome und etwa 54% der Basalzellkarzinome exprimierten das Exon CD44v6. Eine Korrelation zwischen dem histologischen Subtyp und dem Färbeverhalten war nicht nachzuweisen (siehe auch 1.3.3.1.3.). Tempfer et al [180] wiesen CD44v6 auf 24% der untersuchten Mammakarzinome und auf 92% der axillären Lymphknotenmetastasen nach. Eine Expression von CD44v6 schien mit einer geringeren 5-Jahres-Überlebensrate verbunden zu sein. Die Daten waren aber statistisch nicht signifikant. Tokue et al [185] fanden CD44v6 auf gut 70% der untersuchten Mammakarzinome. Eine signifikante Korrelation zwischen Expression von CD44v6 und der Überlebensrate der Patienten konnte nicht nachgewiesen werden ($p = 0,06$). Braun et al [25] fanden bei der immunhistoche-

mischen Bewertung des Färbeindex der CD44v6-Expression auf Mammakarzinomzellen eine positive Korrelation zur Tumorausdehnung und dem Metastasierungsverhalten. Im Gegensatz zu diesen Befunden bestand nach Hanak [76] kein Zusammenhang zwischen der CD44v6-Expression und der Ausdehnung von Mammakarzinomen. Dies korreliert mit den Befunden von Friedrichs et al [53, 54] an Mammakarzinomen und Koretz et al [101], Hanak [76] bzw. Gotley et al [65] an kolorektalen Karzinomen. Die Untersuchungen von Haruyama et al [78] an kolorektalen Karzinomen (des Stadiums B und C nach der Duke-Klassifikation) ergaben auch keinen Zusammenhang zwischen der Expression von CD44v6 und dem weiteren Tumorgeschehen (siehe auch 1.3.3.1.1.). Allerdings wiesen Griffioen et al [68], Finke et al [50] und Wimmenauer et al [199] in ihren Arbeiten eine positive Korrelation zwischen der CD44v6-Expression und dem Tumorstadium von kolorektalen Karzinomen nach. In den Untersuchungen von Weg-Remers et al [196] wurde die CD44v6-Expression auf normaler Darmmukosa, auf kolorektalen Adenomen und auf kolorektalen Karzinomen miteinander verglichen (siehe auch 1.3.3.1.1.). Die Expression auf Adenomen und kolorektalen Karzinomen der UICC-Stadien I - III variierte zwischen 45% und 57% und war somit signifikant höher als auf der normalen Mukosa (6%). Im Gegensatz zu nicht-metastasierenden Karzinomen war die Expression auf metastasierten Karzinomen signifikant reduziert. Nur einer (UICC-Stadium IV) von 12 metastasierten Primärtumoren und nur eine von 6 Metastasen exprimierte CD44v6. Dämmrich et al [40] wiesen auf Metastasen von Magenkarzinomen eine erhöhte CD44v6-Expression nach und folgerten daraus, dass CD44v6 die Metastasierungsneigung fördere. Müller et al [127] konnten keinen Zusammenhang zwischen der CD44v6-Expression und der Prognose des Magenkarzinoms erkennen. Eine erhöhte Expression von CD44v6 korreliert nach Endo und Terada [43] signifikant mit dem Vorliegen einer vasculären Invasion beim Leberzellkarzinom. Eine vermehrte Expression von CD44v6 im Endometrium könnte nach Saegusa et al [155] auf ein frühes Endometriumkarzinom hinweisen. Nach Legras et al [110] korreliert eine starke Expression von CD44v6 mit einer kürzeren Überlebenszeit von Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie. Weder Drlicek et al [42] noch Penno et al [140] fanden eine Korrelation zwischen der CD44v6-Expression und dem Wachstum von Lungenkarzinomen. Koyama et al [105] beobachteten auf Adenokarzinomen des Ösophagus eine verminderte Expression von CD44v6 im Vergleich zum Normalgewebe. Nach Böttger et al hat die Expression von CD44v6 beim Adenokarzinom des Ösophagus (Barrett's Ösophagus) [19] und duktales Karzinom des Pankreas [18] keinen Einfluss auf die Prognose des Krankheitsverlaufes (siehe auch 1.3.3.1.3). Auf normalem Plattenepithel und auf primären Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus wiesen Koyama et al [105] eine gleichzeitige Expression von CD44v6 und CD44v9 nach. Nach Bestrahlung war die CD44v6-Expression auf den primären Plattenepithelkarzinomen signifikant reduziert. Eine verminderte Expression der Spleißvariante CD44v6 (und CD44s) ist nach Aaltomaa et al [1] mit einer verminderten Überlebensrate der Patienten mit einem Prostatakarzinom verbunden. Gotoda et al [67] untersuchten die Spleißvarian-

te CD44v6 auf Pankreaskarzinomen. CD44v6 war nur auf den Tumorzellen (bei etwa 50% der untersuchten Tumoren) zu finden. Die Expression von CD44v6 war mit einer geringeren Überlebensrate der Patienten korreliert.

1.3.3.1.6. Bedeutung der Spleißvariante CD44v7

Nur ca. 67% (16 von 24) der Plattenepithelkarzinome der Haut exprimierten nach Seiter et al [165] CD44v7 auf einem Teil der Tumorzellen. Dagegen konnten die Autoren CD44v7 auf allen Basalzellkarzinomen nachweisen: Bei 24% der Basalzellkarzinome waren alle Tumorzellen angefärbt, bei 76% der Basalzellkarzinome nicht alle. Eine Korrelation zwischen dem histologischen Subtyp und dem Färbeverhalten bestand nicht (siehe auch 1.3.3.2.1. und 1.3.3.2.2.). Endo und Terada [43] beobachteten eine inverse Korrelation zwischen der CD44v7-8-Expression und der Überlebenszeit der Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom. Nach Böttger et al besteht weder zwischen der Expression von CD44v7 auf Adenokarzinomen des Ösophagus (Barrett's Ösophagus) [19] noch auf duktalem Karzinomen des Pankreas [18] ein Zusammenhang mit der Prognose und dem weiteren Krankheitsverlauf (siehe auch 1.3.3.1.3). Tempfer et al [180] fanden CD44v7-8 auf 15% der untersuchten Mammakarzinome und auf 89% der axillären Lymphknotenmetastasen. Eine statistisch signifikante Korrelation zur Tumorentwicklung wurde nicht gefunden.

1.3.3.1.7. Bedeutung der Spleißvariante CD44v8

Ähnlich wie CD44v7, ließen sich CD44v7-8 von Seiter et al [165] auf ca. 88% (21 von 24) der untersuchten Plattenepithelkarzinome und auf ca. 92% (34 von 37) der Basalzellkarzinome nachweisen. Auch hier bestand keine Korrelation zwischen dem histologischen Subtyp und dem Färbeverhalten (siehe auch 1.3.3.1.2., 1.3.3.1.3. und 1.3.3.1.4.). Die Arbeit von Korabiowska et al [99] weist auf eine positive Korrelation zwischen der Menge an CD44v7-8 (nicht jedoch allein CD44v7) und dem Metastasierungsverhalten von Melanomen im Kopf-Hals-Bereich hin. Endo und Terada [43] beschrieben für CD44v7-8 eine inverse Korrelation zwischen der Expression und der Überlebenszeit der Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom. Tempfer et al [180] fanden CD44v7-8 auf 15% der untersuchten Mammakarzinome und auf 89% der axillären Lymphknotenmetastasen. Eine statistisch signifikante Korrelation zur Tumorentwicklung konnte nicht nachgewiesen werden.

1.3.3.1.8. Bedeutung der Spleißvariante CD44v9

Friedrich et al [53] fanden bei ihren Untersuchungen keine Korrelation zwischen der CD44v9-Expression und der Prognose des Mammakarzinoms. Bei kurativ operierten Patienten mit einem primären Magenkarzinom mit einer positiven CD44v9-Expression beobachteten Mayer et al [124] häufiger Rezidive und eine kürzere Gesamtüberlebenszeit der Patienten im Vergleich

zu den Patienten mit einer negativen CD44v9-Expression. Koyama et al [105] wiesen auf normalem Plattenepithel und auf primären Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus eine gleichzeitige Expression von CD44v9 und CD44v6 nach. Nach Bestrahlung der primären Plattenepithelkarzinome fanden die Autoren eine unveränderte CD44v9-Expression (jedoch eine signifikant reduzierte Expression von CD44v6). Terpe [182] wies eine signifikante Korrelation zwischen dem Tumorgrading und der CD44v9-Expression auf Nierenzellkarzinomen nach. Omar-Opyene et al [137] wiesen in einem Metastasierungsexperiment an Pankreaskarzinomzellen in vitro die metastasierungsfördernde Wirkung einer die Spleißvariante CD44v9 enthaltenden CD44-Isoform (CD44v7-10) nach. Durch Blockade des Exons CD44v9 verloren die beiden Tumorzell-Stämme bis zu 78% ihres metastatischen Potentials.

1.3.3.1.9. Bedeutung der Spleißvariante CD44v10

Simon et al [169] konnten keinen Unterschied zwischen der Expression von CD44v10 auf der gesunden Haut und auf Plattenepithelkarzinomen der Haut finden. Ähnlich wie für CD44v7-8, ließ sich CD44v10 von Seiter et al [165] auf ca. 88% (21 von 24) der untersuchten Plattenepithelkarzinome der Haut und auf ca. 86% (32 von 37) der Basalzellkarzinome nachweisen. Zwischen dem histologischen Subtyp und dem Färbeverhalten war keine Korrelation zu finden (siehe auch 1.3.3.1.2., 1.3.3.1.3., 1.3.3.1.4. und 1.3.3.1.5.). Nach Koretz et al [100] korrelierte eine generalisierte, über den Tumor verteilte CD44v10-Expression bei kolorektalen Karzinomen mit einer schlechteren Prognose. Eine fehlende oder nur fokale CD44v10-Expression bzw. die Expression des Standardmoleküls von CD44 (CD44s) in den gleichen Karzinomen schien auf einen protektiven Effekt vor einer Tumormetastasierung hinzuweisen. Dagegen fanden Endo und Terada [43] eine inverse Korrelation zwischen der CD44v10-Expression und der Überlebenszeit von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom. Nach Böttger et al besteht weder zwischen der Expression von CD44v10 beim Adenokarzinom des Ösophagus (Barrett's Ösophagus) [19] noch beim duktalem Pankreaskarzinoms [18] ein Zusammenhang zur Prognose und dem weiteren Krankheitsverlauf (siehe auch 1.3.3.1.3).

1.3.3.2. Bedeutung und Vorkommen der CD44-Spleißvarianten auf Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Hals- Bereich (HNSCC) und benachbartem gesunden Gewebe

1.3.3.2.1. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v2

In ihren Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs fanden Kanke et al [94] CD44v2 auf 59% der untersuchten (N = 89) Tumoren. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Mindereexpression von CD44v2 und einem geringeren Differenzierungsgrad der Tumoren, nicht aber zur Tumorgröße oder zum Lymphknotenstatus. Ebenfalls korrelierte eine Mindereexpression von CD44v2 mit einer geringeren Überlebenszeit der Patienten.

Zusätzlich schien die Expression von CD44v2 in den Lymphknotenmetastasen ($p = 0.08$) vermindert zu sein. Der Lymphknotenstatus und die Minderexpression von CD44v2 waren in dieser Studie unabhängige Faktoren für die Prognose.

1.3.3.2.2. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v3

In ihren Untersuchungen konnten Hyckel et al [84] für CD44v3 weder eine signifikante Korrelation zum Tumorgrading noch zur Metastasierungsneigung nachweisen. Franzmann et al [52] fanden mittels PCR das Exon CD44v3 enthaltende CD44-Moleküle bei 80% (4 von 5) der untersuchten Tumoren und nur auf 25% (2 von 8) der Epithelien in den mikroskopisch als tumorfrei beurteilten Tumorrändern. Ebenfalls konnten die Autoren mit einem Antikörper gegen CD44v3 das Wachstum einer humanen Tumorzelllinie (FaDu, hypopharyngeales HNSCC) in vitro deutlich verzögern. Nach Meinung der Autoren weist dies deutlich auf eine tumorfördernde Rolle der CD44v3 enthaltenden Spleißvariante hin. Wang et al [194] wiesen in ihrer Studie darauf hin, dass durch CD44v3 das Hyaluronsäure-induzierte Wachstum der Tumorzellen gefördert werde, da in einem Hyaluronsäure-armen Medium die Blockade des Exons CD44v3 mit einem entsprechenden Antikörper keinen Einfluss auf das in-vitro-Wachstum der untersuchten Tumorzelllinie habe. Gleiches gilt für die Hyaluronsäure-induzierte in vitro Zellbeweglichkeit. Fonseca et al [51] untersuchten die Expression von CD44v3 in der tiefen invasiven Front von 56 Zungenrandkarzinomen und verglichen diese Expression mit der auf der umliegenden normalen Mukosa. Diese zeigte eine starke Expression von CD44v3 in den tieferen Epithelschichten. Auf 37,5% der untersuchten Tumoren konnte eine Minderexpression von CD44v3 ($< 10\%$) im Vergleich zur Mukosa nachgewiesen werden. Es bestand aber keine Korrelation zum Lymphknotenstatus oder Tumorgrading. Zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich des Tumorgradings kamen auch Hudson et al [83], die bei oralen Plattenepithelkarzinomen ebenfalls keine Korrelation zwischen einer Minderexpression von CD44v3 und einer abnehmenden Tumordifferenzierung fanden.

1.3.3.2.3. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v4

Stoll [178] konnte CD44v4 (und ebenso CD44v5, -v6, -v7 und -v9) auf der Zellmembran des normalen Epithels und des Tumorgewebes nachweisen. Bei über 99% der untersuchten Tumoren ($N = 107$) war bei mindestens 50% der Tumorzellen eine positive membranöse Anfärbung zu verzeichnen. Eine verminderte Expression im Tumor gegenüber dem Normalgewebe war nur vereinzelt festzustellen. Stoll konnte weder eine signifikante Korrelation zur Überlebenszeit der Patienten nachweisen noch eine Korrelation zwischen einer Expressionsminderung und dem Ausmaß der Metastasierung. Fonseca et al [51] untersuchten die tiefe invasive Front von 56 Zungenrandkarzinomen und verglichen die Expression von CD44v4-v5 in der Tumorfrente mit der Expression auf der umliegenden normalen Mukosa. Die Mukosa zeigte eine starke Expression von CD44v4-5 in den tieferen Epithelschichten. Im Vergleich hiermit war auf 67,9% der un-

tersuchten Tumoren eine Mindereexpression von CD44v4-5 (< 10%) nachzuweisen. Dies korrelierte signifikant mit dem Tumorgrading (Minderdifferenzierung) und einem expansiveren (nicht invasiven) Wachstum, nicht aber mit dem Lymphknotenstatus. Zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich des Tumorgradings kamen auch Hudson et al [83], die bei oralen Plattenepithelkarzinomen ebenfalls eine Korrelation zwischen der Mindereexpression von CD44v4-5 und einer abnehmenden Tumordifferenzierung fanden (siehe auch 1.3.3.2.2.).

1.3.3.2.4. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v5

Herold-Mende et al [80] untersuchten auf 22 Gefrierschnitten tumorfreier Patienten Plattenepithel der Lippe, Zunge, Gingiva, des Hartgaumens, Mundbodens, der Wangenschleimhaut und des Rachens (APAAP-Methode). 17 Gefrierschnitte enthielten normales Plattenepithel, 5 Gefrierschnitte enthielten hyperplastisches Epithel unterschiedlicher Ausprägung. Zusätzlich wurde dysplastisches Gewebe mit unterschiedlichem Dysplasiegrad aus dem Tumorrandgebiet von 5 Tumorpatienten (meist aus dem Hypopharynx) in die Untersuchung einbezogen. Die Verteilung der jeweiligen CD44-Spleißvariante (CD44v5, -v6, -v7, -v7-v8 und -v10) war auf jeder Gewebeart gleich. CD44v5 war über alle Zelllagen verteilt. Die Spleißvariante fand sich im Stratum basale, im Stratum suprabasale, im Stratum spinosum und in den unteren Zelllagen des Stratum corneum. Zum Vergleich wurden Gefrierschnitte von 55 primären Plattenepithelkarzinomen von 41 Männern und 14 Frauen und 29 Lymphknotenmetastasen von 26 Männern und 3 Frauen herangezogen. 12 Plattenepithelkarzinome entstammten der Zunge, 5 der Mundhöhle, 35 dem Pharynx und 31 dem Larynx. Die 55 Primärtumoren entsprachen der folgenden Tumorklassifikation nach den UICC-Richtlinien: 29-mal T1-4, N0M0 und 26-mal T1-4, N1-3, M0. Die meisten Lymphknotenmetastasen (24 von 29) stammten von Patienten mit einem Tumor der Größe T4. 10-mal war der Lymphknotenstatus N1, 11-mal N2 und 8-mal N3. Das Expressionsmuster von CD44v5 (gemessen an PP = prozentualen Anteil markierter Zellen) beim primären Plattenepithelkarzinom und den Metastasen entsprach dem des gesunden Plattenepithels. Im Randbereich der Primärtumoren, die metastasiert hatten, wurde gelegentlich eine Mindereexpression von CD44v5 (gemessen an PP) festgestellt. Stoll [178, vgl. 177] fand CD44v5 auf der Zellmembran aller untersuchter Schnitte des normalen Epithels und des Tumorgewebes exprimiert (siehe auch 1.3.3.2.3.). Über 99% der untersuchten Tumoren (N =107) zeigten bei mindestens 50% der Tumorzellen eine positive membranöse Anfärbung. Eine verminderte Expression im Tumor gegenüber dem Normalgewebe war nur vereinzelt festzustellen, so dass bezüglich der Überlebenszeit keine signifikante Korrelation gefunden werden konnte. Eine Korrelation zwischen einer Expressionsminderung und dem Ausmaß der Metastasierung ließ sich nicht nachweisen.

1.3.3.2.5. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v6

Heider et al [79] untersuchten primäre Plattenepithelkarzinome aus dem Larynx, Pharynx, der Mundhöhle (N = 34) und entsprechende Lymphknotenmetastasen (N = 53). Sie wiesen CD44v6 auf 100% der Primärtumoren und auf etwa 98% der Lymphknotenmetastasen nach. Die Expression auf diesen Geweben war ähnlich oder sogar stärker als auf dermalen Keratinozyten. Unterschiede der Expression zwischen den Primärtumoren und den Lymphknotenmetastasen konnten die Autoren nicht nachweisen. Herold-Mende et al [80] fanden CD44v6 auf Gefrierschnitten des gesunden und dysplastischen Plattenepithels (siehe auch bei 1.3.3.2.4.) im Stratum basale, im Stratum suprabasale und im Stratum spinosum. Das Expressionsmuster von CD44v6 (gemessen an PP) beim primären Plattenepithelkarzinom und den Metastasen entsprach ebenfalls (wie bei CD44v5) dem des gesunden Plattenepithels. Van Hal et al [189] untersuchten über 250 orale Tumoren und eine größere Anzahl normaler oraler Mukosa. Die CD44v6-Expression war auf den Tumoren und der normalen Mukosa identisch. Auf 97% der Tumoren fanden die Autoren eine hohe und homogene Anfärbung (mehr als 50% CD44v6-positive Tumorzellen), sehr ähnlich den Ergebnissen auf normaler Mukosa. Im Vergleich der positiven Zellen mit dem Tumorgrading fanden die Autoren keinen signifikanten Unterschied. Eine Verminderung der positiven Zellen mit steigendem Grading konnte wenn, dann nur marginal nachgewiesen werden. Zu anderen Ergebnissen kamen Fabricius et al [47, vgl. 46] ebenfalls auf Gefrierschnitten mit einer anderen Fixierung. Die Autoren untersuchten Gewebeschnitte von 60 Patienten mit primärem Plattenepithelkarzinom des Differenzierungsgrades G1-G3 und der Tumorgroße T1-T4 mittels APAAP-Methode. Es wurde sowohl die Anzahl der angefärbten Zellen (PP) als auch die Farbintensität (SI) gewertet und daraus ein immunreaktiver Score (IRS) berechnet. Die Plattenepithelkarzinome stammten aus dem Mundboden, der Zunge, der Wangenschleimhaut, dem Ohr, der Lippe und den Tonsillen. G1-Tumoren (N=6) hatten CD44v6 zu 90% und mehr exprimiert. Auf den G2- (N=35) und G3-Tumoren (N=19) war die Prozentzahl der CD44v6-Antigen-tragenden Zellen gegenüber den G1-Tumoren herunterreguliert: Nur auf ca. 40% der G2- und G3-Tumoren wurde CD44v6 zu 90% und mehr exprimiert (also wie bei den G1 Tumoren). Bei 50 - 60% der Gewebeschnitte war die Anzahl der CD44v6-positiven Tumorzellen geringer (zwischen 50 - 90%). Gewebeschnitte, bei denen weniger als 50% der Tumorzellen CD44v6-positiv waren, fanden sich hauptsächlich bei den G3-Tumoren, kaum bei den G2- und nicht bei den G1-Tumoren. Gewebeschnitte, bei denen weniger als 10% der Tumorzellen CD44v6 exprimierten, fanden sich nur noch bei den G3-Tumoren. Die durchschnittliche Anzahl CD44v6-positiver Zellen betrug etwa 90% bei G1-Tumoren, etwa 80% bei G2-Tumoren und etwa 75% bei G3-Tumoren. Die aus diesen Ergebnissen abzuleitende "Herunterregulation" der CD44v6-Expression (PP und IRS) war zwischen G1- und G3-Tumoren statistisch signifikant. Im Gegensatz zum Tumorgrading ließ sich keine Abhängigkeit der CD44v6-Antigenexpression von der Tumorausbreitung bzw. vom Metastasierungsgrad nachweisen. Auch Simon

et al [169] fanden keine Korrelation zwischen dem Metastasierungsverhalten und der CD44v6-Expression. Nach Durchführung der APAAP-Reaktion mit den CD44v6-Antigenen war eine starke Farbintensität zu beobachten, die vom Tumorgrading unabhängig war. Hyckel et al [84] dagegen fanden eine signifikante Korrelation zwischen der CD44v6-Expression und dem Tumorgrading. Nach ihren Untersuchungen nimmt die Expression von CD44v6 von G1- zu G3-Tumoren signifikant ab. Eine Korrelation zur Metastasierungsneigung konnten die Autoren aber nicht nachweisen. Dies geht mit den Untersuchungen von Fabricius et al [45] konform, die bei Patienten mit CD44v6-positiven Zellen in tumornahen karzinomfreien Lymphknoten (N=29) eine längere Überlebenszeit fanden als bei Patienten mit CD44v6-negativen Lymphknoten und dies als Zeichen aktivierter T-Zellen deuteten. Auch Spafford et al [171] beschreiben eine reduzierte Überlebenszeit ihrer Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Larynx bei einer verminderten CD44v6-Expression. Dagegen weist die Studie von Kainz et al [92] auf einen beschleunigenden Effekt von CD44v6 auf die Lymphknotenmetastasierung zervikaler Plattenepithelkarzinome hin.

Stoll [178] fand bei seinen Untersuchungen an normalem Epithel und an Plattenepithelkarzinomen CD44v6 auf den Zellmembranen beider Gewebearten und zwar auf allen untersuchten Gewebeschnitten (siehe auch 1.3.3.2.3.). Bei über 99% der untersuchten Tumoren (N = 107) zeigten mindestens 50% der Tumorzellen eine positive membranöse Anfärbung. Eine verminderte Expression im Tumor gegenüber dem Normalgewebe war nur vereinzelt festzustellen, so dass bezüglich der Überlebenszeit keine signifikante Korrelation gefunden werden konnte. Eine Korrelation zwischen einer Expressionsminderung und dem Ausmaß der Metastasierung ließ sich ebenfalls nicht feststellen. Kanke et al [93] fanden CD44v6 auf gut 95% der untersuchten Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. Eine prognostische Bedeutung bezüglich des Tumorverlaufs ließ sich allerdings nicht ableiten. Fonseca et al [51] untersuchten die tiefe invasive Front von 56 Zungenrandkarzinomen und verglichen die Expression von CD44v6 im Tumor mit der Expression auf der umliegenden normalen Mukosa. Auf 33,9% der untersuchten Tumoren war eine Minderexpression von CD44v6 (< 10%) nachzuweisen. Eine signifikante Korrelation zum Tumorgrading oder zum Lymphknotenstatus konnte nicht nachgewiesen werden. Zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich des Tumorgradings kamen auch Hudson et al [83], die bei oralen Plattenepithelkarzinomen ebenfalls eine Korrelation zwischen der Minderexpression von CD44v6 und einer abnehmenden Tumordifferenzierung fanden (siehe auch 1.3.3.2.2.).

1.3.3.2.6. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v7

CD44v7 wurde von Herold-Mende et al [80] auf den Gefrierschnitten des gesunden und dysplastischen Plattenepithels (siehe auch 1.3.3.2.4.) nur in den basalen Schichten des Stratum basale und Stratum suprabasale nachgewiesen. Die durchschnittliche Expression von CD44v7 (gemessen an PP) beim primären Plattenepithelkarzinom und den Lymphknotenmetastasen

war im Gegensatz zum gesunden Plattenepithel deutlich verringert. Im Vergleich zwischen Primärtumoren und dem Metastasengewebe war der Antigenverlust, erkennbar an einem geringeren prozentualen Anteil markierter Zellen (PP) auf dem Metastasengewebe insgesamt deutlicher ausgeprägt. Während bei den Primärtumoren die Anfärbbarkeit (PP) nur reduziert war, waren mit den unterschiedlichen CD44v7-Antikörpern bis zu 41% der Metastasen nicht anzufärben und auf den weiteren Tumormetastasen waren mehrheitlich nur einzelne Zellen angefärbt. Nach Kuo et al [108] ist die 5-Jahres-Überlebenszeit der Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen mit einer CD44v7-8-Expression gegenüber den Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen ohne CD44v7-8-Expression signifikant verlängert. Stoll [178] wies auf allen untersuchten Gewebeschnitten CD44v7 auf der Zellmembran normaler Epithelien und von Karzinomgewebe nach (siehe auch 1.3.3.2.3.). Eine verminderte Expression im Tumor hatte einen negativen Einfluss auf die Überlebenszeit bzw. das rezidivfreie Überleben nach Kaplan und Meier. Eine Korrelation zwischen einer Expressionsminderung und dem Ausmaß der Metastasierung ließ sich allerdings nicht feststellen.

1.3.3.2.7. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v8

CD44v7-8 konnten Herold-Mende et al [80] (siehe auch 1.3.3.2.4.) auf den Gefrierschnitten normaler und dysplastischer Plattenepithelien im Stratum basale, im Stratum suprabasale und im Stratum spinosum nachweisen. Die durchschnittliche Expression von CD44v7-8 (gemessen an PP) war auf primären Plattenepithelkarzinomen und auf Lymphknotenmetastasen (wie bei CD44v7) im Gegensatz zum gesunden Plattenepithel deutlich verringert. Verglich man die Expression auf den Primärtumoren mit der Expression auf den Metastasen, war der prozentuale Anteil markierter Zellen auf den Metastasen deutlich geringer. Die Anfärbbarkeit der Primärtumoren war nur reduziert, wohingegen, je nach Antikörper, bis zu 41% der Metastasen nicht mit den Antikörpern reagierten. In den weiteren Metastasen waren mehrheitlich nur einzelne Zellen angefärbt. Auch Hudson et al [83] fanden bei oralen Plattenepithelkarzinomen eine Korrelation zwischen der Minderexpression von CD44v8 und einer abnehmenden Tumordifferenzierung (siehe auch 1.3.3.2.2.). Nach Kuo et al [108] haben Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen, die CD44v7-8 exprimieren, eine günstigere Prognose als Patienten mit CD44v7-8-negativen Plattenepithelkarzinomen.

1.3.3.2.8. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v9

Franzmann et al [52] wiesen auf oralen Plattenepithelkarzinomen die Spleißvarianten CD44v9-10 nach. Stoll et al [177] und Stoll [178] fanden, dass das normale orale Epithel und das Tumorgewebe CD44v9 (siehe auch 1.3.3.2.3.) auf den Zellmembranen exprimieren. Eine verminderte Expression im Tumor hatte einen negativen Einfluss auf die Überlebenszeit bzw. das rezidivfreie Überleben der Patienten nach Kaplan und Meier. Eine Korrelation zwischen einer Expres-

sionsminderung und dem Ausmaß der Metastasierung ließ sich allerdings nicht feststellen. Dagegen fanden Sato et al [158] eine deutliche Korrelation zwischen der Mindereexpression von CD44v9 und einer vermehrten Metastasierungsrate. Sie untersuchten 120 primäre Zungenkarzinome: Tumoren mit verminderter CD44v9 Expression metastasierten häufiger als die mit einer stärkeren Expression. Ebenfalls sank die Überlebenszeit der Patienten mit reduzierter CD44v9-Expression. Eine Korrelation zwischen dem histologischen Grading und der CD44v9-Expression lag nicht vor. Weitere Untersuchungen von Sato et al [156 und 157] an oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien zeigten, dass die Invasivität von stärker CD44v9-exprimierenden Tumorzellen in vitro durch Zugabe eines CD44v9-Antikörpers signifikant anstieg. Ebenfalls, aber nicht signifikant, stieg die Invasivität geringer CD44v9-exprimierender Tumorzellen. Dies wurde durch den Antikörper-verursachten Ausfall des durch CD44v9 bedingten Zellzusammenhaltes erklärt. Darüber hinaus konnte durch Transfektion des CD44v9-Gens in eine schwach CD44v9-exprimierende Zelllinie und die daraus resultierende CD44v9-Überexpression, deren Invasivität deutlich verringert werden.

1.3.3.2.9. Bedeutung und Vorkommen der Spleißvariante CD44v10

In den Untersuchungen von Herold-Mende et al [80] war CD44v10 auf den Gefrierschnitten des gesunden und dysplastischen Plattenepithels (siehe auch 1.3.3.2.4.) im Stratum basale, im Stratum suprabasale und im Stratum spinosum nachzuweisen. Die durchschnittliche Expression von CD44v10 (gemessen an PP) war bei primären Plattenepithelkarzinomen (wie bei CD44v7 und CD44v7-8) und den Metastasen (wie auch bei CD44v7), im Gegensatz zum gesunden Plattenepithel, deutlich verringert. Verglich man die Primärtumoren mit dem Metastasengewebe, war der Antigenschwund auf den Metastasen wiederum deutlich höher.

Wie diese zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der gleichen Tumorart und der gleichen CD44-Varianten zeigen, werden sicher weitere Untergruppierungen der Antikörper und Beobachtungen an einem möglichst großen Patientenkollektiv nötig sein, um die Widersprüche aufzuklären. Wie die Arbeit von Endo und Terada [43] (allerdings beim Leberzellkarzinom) eindrücklich zeigt, kann das gleichzeitige Vorkommen bestimmter Spleißvarianten „synergistisch“ die Lebenserwartung signifikant gegenüber dem alleinigen Vorkommen einer einzelnen Spleißvariante senken. Ähnliche Synergismen aber ebenso gegenteilige Mechanismen im Zusammenwirken der unterschiedlichen CD44-Spleißvarianten sind auch für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich denkbar.

1.4. Zielsetzung

Ziel und Aufgabe dieser Arbeit war es, die Verteilung der Expression der CD44-Spleißvarianten CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10 in den Geweben von Patienten unserer Klinik mit und ohne einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich immunhistochemisch in der APAAP zu untersuchen.

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Doktoranden-Tumorprojektes durchgeführt, in dem an den gleichen Geweben immunhistochemisch p53, bcl-2, mdm-2 [112] und α_2 -Makroglobulin-Rezeptoren [10] sowie humane Papillomviren [104] in der PCR untersucht wurden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression der CD44-Spleißvarianten CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und den Tumorrangewebe lichtmikroskopisch bewertet, dokumentiert und miteinander verglichen werden. Zum weiteren Vergleich wurden Gewebeschnitte von tumorfreien Patienten aus vergleichbaren Lokalisationen untersucht.

Ebenfalls gehörte es zu dieser Arbeit, anhand der Klinikkrankenakten von allen 40 Patienten (Patienten mit und ohne Karzinom) die Raucher- und Alkoholanamnese als Risikofaktoren der Kopf-Hals-Tumoren zu erfassen.

Von den 20 Karzinompatienten sollte in dieser Arbeit Gewebe aus 3 Regionen untersucht werden: aus dem Tumorzentrum, aus dem unmittelbar intraoperationem deklarierten Tumorrangewebe und aus einem tumorfernen Gewebebereich, von den 20 Patienten ohne eine maligne Erkrankung jeweils ein Gewebematerial. Nach einer entsprechenden Anfertigung der Gewebeschnitte sollte in allen Geweben überprüft werden, ob Karzinomgewebe, normales Plattenepithel, Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven oder Gefäße vorhanden bzw. mit unseren Antikörpern anzufärben waren. In allen normalen Epithelien und Karzinomgeweben sollte die CD44-Expression nach den Vorschlägen von Remmele [147, 148] anhand der Färbeintensität (SI) und des prozentualen Anteils gefärbter Zellen (PP) nach mehrmaliger lichtmikroskopischer Beurteilung durch Schätzung ermittelt und aus der Multiplikation beider Befunde ein immunreaktiven Scorewert (IRS) errechnet werden.

Durch die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, folgende Fragen zu beantworten:

1. Welche der vier untersuchten CD44-Spleißvarianten (CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10) werden auf den unterschiedlichen Gewebearten exprimiert?
2. Bestehen Unterschiede zwischen der Expression der CD44-Spleißvarianten auf dem Karzinomgewebe und dem normalen Plattenepithelgewebe im Tumorzentrum, im Tumorrand und im tumorfernen Bereich dieser Patienten?
3. Gibt es Unterschiede der Expression der CD44-Spleißvarianten auf dem Karzinomgewebe des Tumorzentrums im Vergleich mit dem Tumorrand?
4. Gibt es einen Unterschied in der Expression der CD44-Spleißvarianten auf den Epithelien im Tumorzentrum, Tumorrand und im tumorfernen Bereich?
5. Unterscheidet sich die Expression der CD44-Spleißvarianten auf dem Karzinomgewebe der Tumorpatienten von der Expression auf den Epithelgeweben der Kontrollpatienten?
6. Unterscheidet sich die Expression der CD44-Spleißvarianten auf den Epithelgeweben der Tumorpatienten von der Expression auf den Epithelgeweben der Kontrollpatienten?
7. Gibt es einen Unterschied der immunreaktiven Scorewerte (IRS) oder der prozentualen Anteile gefärbter Zellen (PP) in Abhängigkeit vom Tumorgrading bzw. Tumorstaging?
8. Ist die Ermittlung der immunhistochemischen Scorewerten (IRS) besser geeignet die Unterschiede in der Expression der vier CD44-Spleißvarianten darzustellen als die Ermittlung der prozentualen Anteile gefärbter Zellen (PP-Werte)?
9. Gibt es Anhaltspunkte für die Eignung der untersuchten Spleißvarianten CD44v3, CD44v5, CD44v7 oder CD44v10 für die Anwendung in Diagnostik und Therapie der Kopf-Hals-Tumoren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Die Patienten und ihr Gewebe

Das in dieser Arbeit untersuchte Gewebe entstammt einem Kollektiv von 40 Patienten der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin - Campus Virchow-Klinikum. Die untersuchten Proben entstammten den im Rahmen der Therapie entnommenen Geweben, wozu die Zustimmung der Patienten vorlag.

Von 20 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) wurde im Rahmen der Tumordiagnostik Tumor- und Tumorrandgewebe einschließlich der für die Spezialuntersuchungen dieser Arbeit notwendigen Gewebe entnommen. Um zu untersuchen, ob nicht nur ein qualitativer Unterschied zwischen den Geweben der einzelnen Patienten sondern auch ein quantitativer Unterschied der Antigenverteilung in Abhängigkeit von der Lokalisation besteht, wurden intraoperativ jeweils 3 Gewebeproben entnommen: Eine Probe aus der Region des Tumorzentrums, welche immer Karzinom enthielt, eine Probe aus dem Tumorrandgebiet, die nicht immer karzinomfrei war und eine aus einer tumorfreien weiter entfernten Region. Von weiteren 20 Patienten ohne Tumoren wurden ebenfalls mit Zustimmung der Patienten Kontrollgewebe bei anderweitigen Operationen, hauptsächlich operativen Zahnentfernungen gewonnen. Die relevanten Patientendaten bzw. die Entnahmelokalisation der entsprechenden Gewebeproben sind den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen.

Tabelle 3: Untersuchte Gewebe der Tumorpatienten einschließlich der Lokalisation des Tumorzentrums

Patienten-Code	Lokalisation	Gewebeprobe aus einem Rezidiv	Patienten-Code	Lokalisation	Gewebeprobe aus einem Rezidiv
005	Zunge	nein	271	Mundboden	nein
007	Mundschleimhaut über dem Kiefer	nein	382	Ohr	ja
013	Zungenrand	nein	385	Ohrknorpel	nein
086	Mundboden	ja	412	Lippe	nein
128	Zunge / Mundboden	nein	460	Planum buccale	nein
148	Tonsille links	nein	461	Mundboden	nein
158	Mundschleimhaut über dem Kiefer bis Planum buccale	nein	466	Mundboden / Zunge	nein
175	Mundboden	ja	473	Mundboden	nein
180	Mundschleimhaut über dem Kiefer	ja	198	Zunge	nein
209	Mundboden	nein	020	Zungenrand	nein

Tabelle 4: Untersuchte Gewebe der Kontrollpatienten einschließlich der Lokalisation des Gewebes

Patienten-Code	Lokalisation	Patienten-Code	Lokalisation
015	Uvula/Gaumen	423	Mundschleimhaut
023	Gaumen	426	Zunge
039	Ohrmuschel	427	Mundschleimhaut
082	Uvula	430	Mundschleimhaut
162	Mundschleimhaut	431	Mundschleimhaut
168	Mundschleimhaut	433	Planum buccale
173	Mundschleimhaut	436	Mundschleimhaut
212	Mundschleimhaut	437	Mundschleimhaut
240	Ohrmuschel	438	Mundschleimhaut
336	Mundschleimhaut	479	Mundschleimhaut

2.1.2. Primärantikörper

In dieser Arbeit waren alle gegen humane CD44-Spleißvarianten eingesetzten Primärantikörper ausschließlich monoklonale Antikörper der Maus der Immunglobulinklasse IgG2b (CD44v3) und IgG1 (CD44v5, CD44v7, CD44v10), siehe Tabelle 5.

Als Kontrollserum (Negativ-Serum, N-S) wurde in dieser Arbeit normales Maus-IgG ohne CD44-Antigenität eingesetzt.

Tabelle 5: Primärantikörper

Antikörper	Cat.Nr.	Klon	Gebrauchs- verdünnung	Hersteller
CD44v3	BB A 11	3G5	1 : 10	R&D Systems, Abingdon, England
CD44v5	BMS 115	VFF-8	1 : 20	Bender MedSystems, Wien, Österreich
CD44v7	BMS 117	VFF-9	1 : 100	Bender MedSystems, Wien, Österreich.
CD44v10	BMS 119	VFF-14	1 : 200	Bender MedSystems, Wien, Österreich
Maus- Immunglobulin (Negativ-Serum)	X0931	–	1 : 10	Dako, Glostrup, Dänemark

2.2. Methoden

2.2.1. Gewebeentnahme und Gewebeaufbewahrung

In dieser Arbeit wurde bevorzugt Kryogewebe eingesetzt, da an den gleichen Geweben auch molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden sollten. Die Gewebeproben wurden von 1994 - 1996 in unserer Klinik gesammelt. Die Aufbewahrung der direkt im Operationssaal entnommenen Gewebe erfolgte für maximal 30 Minuten bis zur weiteren Verarbeitung in isotoner Kochsalzlösung oder in RPMI-Medium. Anschließend wurden die Gewebeproben zu ca. 4 x 4 mm großen Stücken zerkleinert, in Röhrchen mit "Einfríermedium" (Leica-Instrument,

Nussloch) in Flüssigstickstoff für 2 Minuten schockgefroren und bei -80° C aufbewahrt. Das Gewebe von 2 Patienten wurde in 10%-igem Formalin konserviert und in Paraffin eingebettet.

2.2.1.1. Herstellung der Kryostatschnitte

Von den Gewebeproben der 18 Tumorpatienten und aller Kontrollpatienten wurden am Kryostat (Leica, Bensheim) ausreichend viele 4 – 6 µm dicke Gewebeschnitte auf beschichteten Objektträgern (Super Frost Plus, Menzel, Braunschweig) hergestellt. Die Gewebeschnitte wurden maximal 12 Stunden an der Luft getrocknet und bis zum Zeitpunkt der immunhistochemischen Färbung bei - 20°C eingefroren.

2.2.1.2. Herstellung der Paraffinschnitte

Die Gewebe von 2 Tumorpatienten standen für diese Arbeit nur Formalin-fixiert zur Verfügung und wurden zu Paraffinschnitten verarbeitet. Die Gewebe wurden an einem Automaten in 4%-igem Formalin fixiert, in Ethanol und Xylol dehydriert, in Paraffin eingebettet und bis zum Schneiden in 2 – 4 µm dicke Schnitte bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Schnitte wurden im warmen Wasserbad auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Lagerung dieser Präparate erfolgte bis zur Färbung bei Zimmertemperatur.

2.2.2. Immunhistochemische Färbung

2.2.2.1. Vorbereitung der Präparate

Die bei -20°C aufbewahrten Kryoschnitte wurden zur Schonung des Gewebes vor der Färbung sehr langsam aufgetaut und luftgetrocknet. Die Paraffinschnitte wurden über Nacht bei 56°C im Trockenschrank aufbewahrt und über folgende Behandlungskette entparaffiniert und rehydriert:

Eintauchen in	
Xylol, Küvette 1	10 Minuten
Xylol, Küvette 2	10 Minuten
Ethanol 100%	5 Minuten
Ethanol 90%	2 Minuten
Ethanol 80%	1 Minuten
Ethanol 70%	1 Minuten
Methanol	10 Minuten
Aqua tridest	5 Minuten

Da die Antigene in den Paraffinschnitten durch die Formalinfixierung und weitere Behandlung teilweise verändert beziehungsweise “maskiert” werden, folgte vor der immunhistochemischen

Färbung eine Demaskierung durch Mikrowellenbehandlung. Dazu wurden die Schnitte 4 mal 5 Minuten in Zitronensäurepuffer bei 600 Watt [166] in der Mikrowelle erhitzt, wobei nach jedem Zyklus der verdampfte Zitronensäurepuffer aufgefüllt wurde. Danach wurden die Schnitte 25 Minuten lang in Zitronensäurepuffer abgekühlt. Diese Vorbehandlung hatte sich in Vorversuchen für die Darstellung der CD44-Epitope [46] als optimal erwiesen.

Zitronensäurepuffer:

975 ml	Aqua tridest
2,1 g	Zitronensäuremonohydrat (Merck, Darmstadt)
25 ml	1 Mol NaOH

Einstellung auf pH 6 mit 1 Mol HCl

2.2.2.2. Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase-Reaktion (APAAP)

Um die Untersuchungen durchführen zu können, bedurfte es einer Methode, auf unterschiedlichen Gewebeschnitten möglichst spezifisch die Antigene nachzuweisen. Die Methode der Wahl war die APAAP-Reaktion.

2.2.2.2.1. Das allgemeine Prinzip der APAAP

Mit der APAAP-Methode [38], einer Immunperoxidase-Färbemethode, kann man hochspezifisch zelluläre Antigene auf Paraffinschnitten, Kryostatschnitten, Abklatschpräparaten, Ausstrichen und Zytozentrifugenpräparationen lokalisieren und sichtbar machen.

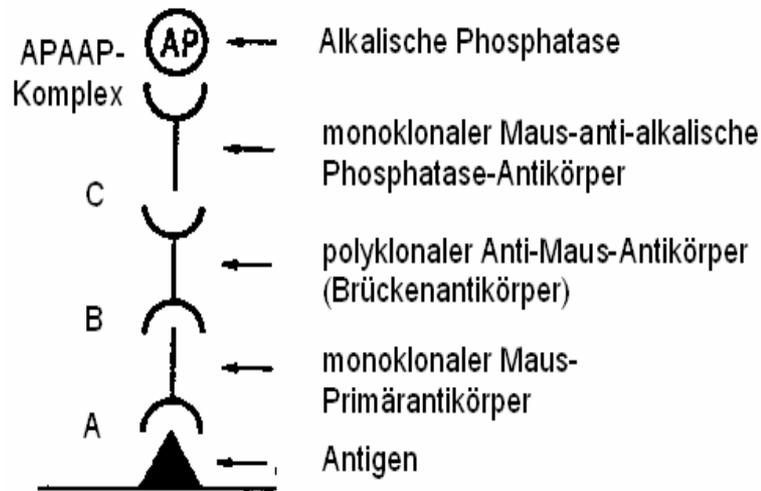
Für diese Reaktion werden drei Reagenzien gebraucht:

1. der Primärantikörper, in dieser Arbeit ausschließlich ein monoklonaler Antikörper der Maus.
2. der Sekundärantikörper oder so genannter Brückenantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers und den APAAP-Komplex gerichtet ist und einer anderen Tierspezies entstammt, in unserem Fall ein polyklonaler Antikörper vom Kaninchen.
3. der APAAP-Komplex, bestehend aus intestinaler alkalischer Phosphatase von Kälbern und einem dagegen gerichteten monoklonalen Antikörper, wieder von der Maus.

Durch die Verwendung unkonjugierter monoklonaler Primärantikörper (MoAk) wird bei dieser Methode eine hohe Empfindlichkeit erzielt, was besonders bei formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben zum Tragen kommt. Man erreicht eine starke Anfärbung, obwohl ein Teil des Antigens durch Fixation und Gewebeaufbereitung zerstört wird [39].

Die entsprechenden Antigen-Antikörper-Reaktionen der APAAP-Methode laufen folgendermaßen ab (siehe Abbildung 4):

Abbildung 4: Schema der APAAP-Reaktion [nach 38]



Die auf den Objektträgern befindlichen Gewebsschnitte mit ihren Antigenen werden nach einer kurzen Fixierung (Kryoschnitte) bzw. Vorbehandlung (Paraffinschnitte) mit dem Primärantikörper inkubiert (A). Der Primärantikörper bindet hochspezifisch nur an das entsprechende Antigen. Nach Abspülen des nicht gebundenen Primärantikörpers wird der Brückenantikörper dazugegeben (B). Der Brückenantikörper wird im Überschuss dazugegeben, damit sich nur eines der beiden Fab-Fragmente an den Primärantikörper bindet. So kann er über sein zweites noch freies Fab-Fragment die Verbindung zum APAAP-Komplex vermitteln (C). Ist nun eine Verbindung zwischen APAAP-Komplex und gesuchtem Antigen mittels Brücken- und Primärantikörper hergestellt, wird das Substrat dazugegeben. Nach Zugabe des Substrates, z.B. Neufuchsin, entsteht überall, wo Substrat durch das lokal fixierte Enzym umgewandelt wird, eine Rotfärbung, wodurch das gesuchte Antigen markiert wird.

2.2.2.2. Durchführung der APAAP-Reaktion

Um das Eintrocknen der Schnitte bei Raumtemperatur zu verhindern, werden alle Schritte der APAAP-Reaktion in einer feuchten Kammer durchgeführt. Wie unter 2.2.2.1. beschrieben, wurden sowohl die Kryostatschnitte als auch die Paraffinschnitte vorbehandelt.

Nach einer 10-minütigen Fixierung bei -20°C , davon 9 Minuten in Methanol und 1 Minute in Aceton, werden die Schnitte nach der Fixierung (Kryoschnitte) bzw. Vorbehandlung (Paraffinschnitte) sowie nach jedem weiteren Reaktionsschritt gründlich in TBS-Puffer gespült.

TBS- Puffer (Trispuffer):

17,125 g Tris Hydrochlorid (Sigma, St. Louis, USA)

2,0 g Tris Base (Sigma, St. Louis, USA)

21,95 g NaCl (Merck, Darmstadt)

2,5 l Aqua tridest

Einstellung auf pH 7,5 mit 1 Mol HCl

Für die Verdünnung der Primäantikörper und des APAAP-Komplexes wurde Rinderserummedium, für den Brückenantikörper Humanserummedium eingesetzt (modifiziert nach Prof. Dr. Lobeck, ehemals Institut für Pathologie des Virchow-Klinikums, persönliche Mitteilung).

Rinderserummedium:

100 mg Natriumazid (Serva, Heidelberg)

10 ml RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin (Gibco BRL, Paisley, Scotland)

10 ml fetales Kälberserum (Gibco BRL, Paisley, Scotland)

90 ml Aqua tridest

Einstellung auf pH 7,5 mit 1 Mol HCl

Humanserummedium:

10 ml AB-Serum, bei 56°C 30 Minuten lang im Wasserbad inaktiviert

(Behring, Marburg)

70 ml RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin (Gibco BRL, Paisley, Scotland)

Einstellung auf pH 7,5 mit 1 Mol HCL

Von jedem Gewebestück wurden 5 aufeinander folgende Schnitte mit den monoklonalen Antikörpern gegen CD44v3, CD44v5, CD44v7, CD44v10 und mit einem Negativserum aus normalem Maus-IgG zur Kontrolle immunhistochemisch gefärbt. Zwischen allen Reaktionsschritten wurden die Gewebeschnitte jeweils gründlich mit TBS-Puffer gespült.

Die verdünnten Primäantikörper (siehe Tabelle 5) wurden bei Zimmertemperatur inkubiert, die Kryostatschnitte mit je 80 µl 30 Minuten, die Paraffinschnitte 45 Minuten mit je 150 µl. Im zweiten Schritt wurden die Kryostatschnitte 30 Minuten mit 80 µl und die Paraffinschnitte für 45 Minuten mit 150 µl verdünntem, vom Kaninchen stammenden polyklonalen Brückenantikörper (Tabelle 6) inkubiert.

Tabelle 6: Brückenantikörper

Antikörper	Code- Nr.	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-Immunglobulin	Z 0259	1 : 40	Dako, Glostrup, Dänemark

Im dritten Schritt wurden alle Schnitte mit dem verdünnten Maus-APAAP-Komplex (Tabelle 7) inkubiert, Kryostatschnitte 30 Minuten mit 80 µl und Paraffinschnitte 45 Minuten mit 150 µl.

Tabelle 7: APAAP-Komplex

Antikörper	Code- Nr.	Verdünnung	Hersteller
APAAP, monoklonaler Maus-Antikörper	D 0651	1 : 100	Dako, Glostrup, Dänemark

Um die noch ungebundenen Antigene weitgehend in die APAAP-Reaktion miteinzubeziehen, wurden die Schritte der Inkubation mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex mit verkürzter Zeitdauer (Kryostatschnitte je 10 Minuten und Paraffinschnitte je 15 Minuten) wiederholt.

Für die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion wurden die Schnitte 30 Minuten unter kontinuierlicher Bewegung in Küvetten mit dem Substrat inkubiert.

Substrat:

Lösung A:

- Entwickler-Tris-Puffer: 87,5 ml
 - 0,75 g Tris Hydrochlorid (Sigma, St. Louis, USA)
 - 2,45 g Tris Base (Sigma, St. Louis, USA)
 - 4,35 g NaCl (Merck, Darmstadt)
 - 500 ml Aqua tridest
- Propandiol-Stammlösung: 31,25 ml
 - 10,5 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (Merck-Schuchard, Hohenbrunn)
 - 500 ml Aqua tridest
- Lävamisolhydrochlorid (Sigma, St. Louis, USA): 100 mg

Lösung B:

- Naphthol-AS-Bi-Phosphat (Sigma, St. Louis, USA): 62,5 mg
- N, N-Dimethyl-Formamid (Sigma, St. Louis, USA): 0,5 ml

Lösung C:

- Neufuchsin 5% :		0,25 ml
5 g	Neufuchsin (Sigma, St. Louis, USA)	
100 ml	2 Mol HCl	
- Natriumnitrit ad Aqua tridest:		0,625 ml
0,1 g	Natriumnitrit (Sigma, St. Louis, USA)	
2,25 ml	Aqua tridest	

Die Lösungen A und C wurden vermischt, danach Lösung B dazugegeben. Nach Einstellung des pH-Wertes mit 2 Mol HCl auf 8,73 wurde das Substrat durch einen Faltenfilter in die entsprechenden Küvetten filtriert. Zur Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase in den Geweben wurde Lävamisol eingesetzt. Aus Neufuchsin und Naphthol entwickelte sich der Farbkomplex.

Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde die Schnitte mit Hämatoxylin (Dako, Glostrup, Dänemark) für 1 - 2 Minuten gefärbt und 5 - 10 Minuten in Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.3. Lichtmikroskopische Auswertung

2.2.3.1. Immunreaktives Bewertungsschema

Um eine einheitliche Beurteilung der Antigen-Antikörper-Reaktionen auf den Gewebeschnitten und einen Vergleich der Präparate untereinander durchführen zu können, wurde das Bewertungsschema von Remmele et al [147, 148] zu Hilfe genommen. Nach diesem wird die Färbeintensität (staining intensity, SI) der APAAP-Reaktion mit dem Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen (PP) zu einem immunreaktiven Score (IRS) multipliziert (siehe Tabelle 8).

Der IRS umfasst die qualitative und quantitative Verteilung der einzelnen Antikörper in den unterschiedlichen Geweben zur Erfassung der Expression der untersuchten CD44-Antigene.

Tabelle 8: Immunreaktiver Scorewert (IRS): SI (= Färbeintensität) x PP (= prozentualer Anteil Antikörper-positiver = angefärbter Zellen)

SI-Einteilung	PP-Einteilung	IRS
0 = keine Färbereaktion	0 = keine positiven Zellen	Hypothetischer Minimalwert: $0 \times 0 = 0$
1 = schwache Färbereaktion	1 = >0 - 25 % positive Zellen	
2 = deutliche Färbereaktion	2 = >25 - 50 % positive Zellen	
3 = starke Färbereaktion	3 = >50 - 75 % positive Zellen	
	4 = >75 - 100 % positive Zellen	hypothetischer Maximalwert: $3 \times 4 = 12$

2.2.3.2. Durchführung der Beurteilung

Die Beurteilung der Gewebeschnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen) bei 20- und 40-facher Vergrößerung. Um das Ergebnis der subjektiven Schätzung von SI und PP "objektiver" zu gestalten, wurde die Bewertung in zwei Bewertungsdurchgängen vorgenommen, wobei nur die Werte des letzten Durchganges als Ergebnisse für die Auswertung der Arbeit übernommen wurden. Es wurden zunächst die einzelnen Schnitte auf die vorhandenen Gewebeanteile und -arten durchgemustert und diese notiert. Danach wurde festgehalten, ob es zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion an diesen Geweben gekommen war. Der Prozentsatz des angefärbten Gewebeanteils (PP) des normalen Oberflächenepithels und des Tumorgewebes und die dazugehörige Färbeintensität (SI) wurden erfasst und daraus die immunreaktiven Scorewerte (siehe 2.2.3.8. und Tabelle 8) errechnet.

2.2.4. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Nach fachlicher Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie unseres Klinikums wurden für die Auswertung der Ergebnisse geeignete statistische Testmethoden ausgewählt [154].

Um die unterschiedliche Expression der einzelnen CD44-Spleißvarianten CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10 zu vergleichen, wurden aufgrund der fehlenden Normalverteilung neben dem Mittelwert mit Standardabweichung der Medianwert mit 25. und 75. Quartile als mittlere Tendenz der Expression ermittelt. Wegen des kleinen Patientenkollektives und der in der Regel fehlenden Normalverteilung der Stichprobenergebnisse wurden nichtparametrische Tests zur Bestimmung der Signifikanz der gefundenen Unterschiede eingesetzt.

Der Wilcoxon-Test diente dabei dem Vergleich miteinander verbundener Stichproben. Mit dem U-Test nach Mann und Whitney erfolgte der Stichprobenvergleich unabhängiger Parameter. Zur Untersuchung einer möglichen prognostischen Bedeutung der CD44-Expression für den weiteren Krankheitsverlauf wurden die Daten über den weiteren Verlauf der Erkrankung aus den Krankenakten tabellarisch erfasst und für die Erstellung von Kaplan-Meier-Kurven in 2 Gruppen, abhängig vom Median der IRS-Werte der CD44-Expressionen durch die einzelnen Antikörper im Tumorzentrum und im Karzinomrest des Tumorrandes, eingeteilt. War der IRS-Wert kleiner als der Medianwert, wurde die Gruppe 0 gewählt, war der IRS-Wert \geq dem Median, die Gruppe 1. Hierzu wurden die Daten aller 20 Tumorgewebe benutzt, unabhängig ob die erhobenen IRS-Werte von Kryostatschnitten (18 Schnitte) oder Paraffinschnitten (2 Gewebeschnitte) stammten.

Auch für den statistischen Häufigkeitsvergleich zwischen dem Differenzierungsgrad der Tumoren (Gewebe von G2-Tumoren / Gewebe von G3-Tumoren) und den CD44-Scorewerten im Exakten Test nach Fisher wurde wegen der geringen Patientenzahlen die gleiche Gruppierung in IRS unter dem Medianwert (Gruppe 0) und $IRS \geq$ dem Medianwert (Gruppe 1) vorgenommen.

Für alle statistischen Berechnungen wurde das Programm SPSS für Windows95/NT (13.0 Deutsch bzw. 15.0.1) eingesetzt [28]. Testergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Bei p-Werten ab 0,05 (bis 1) musste davon ausgegangen werden, dass die Differenz zwischen den geprüften Parametern nicht signifikant ist.

3. Ergebnisse

3.1. Eigenschaften des Patientenkollektives

3.1.1. Charakterisierung der Tumorpatienten

Die Gruppe der Tumorpatienten bestand aus 5 Frauen und 15 Männern im Alter zwischen 39 und 80 Jahren bei einem Mittelwert von 60 (\pm 9) Jahren. Das in dieser Arbeit untersuchte Gewebe stammte bei 16 Patienten (80%) von Primärtumoren, bei 4 Patienten (20%) von einem Tumorrezidiv. 12 Patienten (60%) hatten Lymphknotenmetastasen. 10 Tumoren (50%) waren entsprechend der histopathologischen Beurteilung G2-Tumoren und die anderen 10 (50%) waren G3-Tumoren.

Aus den anamnestischen Angaben in den Patientenakten konnten weiterhin die für Kopf-Hals-Tumoren bekannten Risikofaktoren entnommen werden: 70% der Tumorpatienten rauchten regelmäßig und 60% tranken täglich Alkohol.

In Tabelle 9 (vgl. Material und Methoden, Tabelle 3) wurden alle Daten zur Charakterisierung der Tumorpatienten wie Geschlecht, Alter, Trink- und Rauchgewohnheiten aus den Krankenakten zusammengestellt. Ebenfalls finden sich die die jeweiligen Tumoren betreffenden histologischen Befunde des Instituts für Pathologie des Klinikums mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren (Staging und Grading) und der TNM-Klassifizierung nach den UICC-Richtlinien

Tabelle 9: Patientendaten und Risikofaktoren aus den Krankenakten der Tumorpatienten (vgl. Material und Methoden, Tabelle 3)

Patienten-Code	Ge-Schlecht	Alter [Jahre]	TNM-Klassifikation [200]	Tumor-staging [200]	Grading [200]	Krebs-risiko Tab*	Krebs-risiko Alk*
005	M	39	pT3 / 4 pN1	III	G3	4	4
007	W	71	pT2 N2	IVA	G2	1	1
013	M	45	pT3 pN2	IVA	G3	4	4
086	M	53	pT4 pN0	IVA	G3	3	3
128	M	50	pT2 pN2b	IVA	G2	4	4
148	M	55	pT2 pN1	III	G3	4	1
158	W	76	pT3 pN1	III	G2	1	1
175	M	58	pT2 pN2	IVA	G3	3	4
180	M	66	pT1 pN0	I	G3	2	4
209	M	62	pT2 pN2	IVA	G3	1	1
271	W	73	pT1 pN0	I	G2	4	2
382	M	65	pT4 pN1	IVA	G3	3	1
385	M	58	pT4 pN1 pMx	IVA	G3	1	2
412	M	74	pT2 pN0	II	G2	1	1
460	W	80	pT3/4 pN1	III	G2	2	1

Fortsetzung von **Tabelle 9**

Patienten-Code	Ge-Schlecht	Alter [Jahre]	TNM-Klassifikation [200]	Tumor-staging [200]	Grading [200]	Krebs- risiko Tab*	Krebs- risiko Alk*
461	M	63	pT2 pN0	II	G2	4	4
466	M	57	pT4 pN2	IVA	G2	1	1
473	M	52	pT1 pN0	I	G2	3	4
198	M	55	pT4 pN0	IVA	G3	3	4
020	W	50	pT2 pN0	II	G2	4	4

m = männlich, w = weiblich, T = Tumorgroße, N = Lymphknotenstatus, G = Differenzierungsgrad (Grading) [200], * = Graduierung der Rauch- und Trinkgewohnheiten nach Arndt et al [5]:

Tabakkonsum (Krebsrisiko Tab):

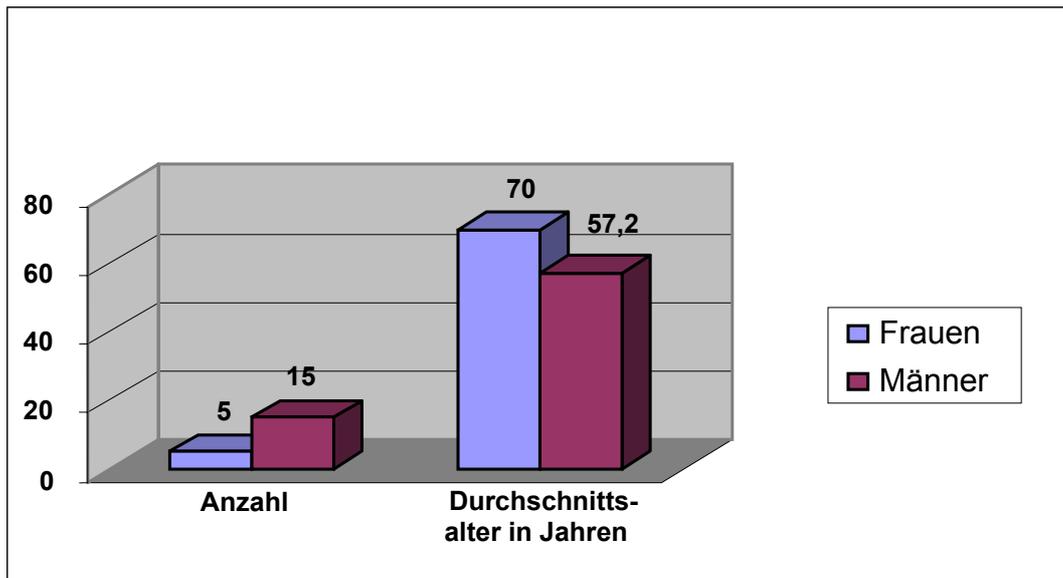
- 1 = Nichtraucher
- 2 = Raucher < 20 Zigaretten/Tag
- 3 = Raucher ca. 20 Zigaretten/Tag
- 4 = Raucher > 20 Zigaretten/Tag

Alkoholkonsum (Krebsrisiko Alk):

- 1 = Nichttrinker
- 2 = Trinkmenge < 70 g/Tag
- 3 = Trinkmenge ca. 70 g/Tag
- 4 = Trinkmenge > 70 g/Tag

In Abbildung 5 ist die Verteilung des Geschlechtes und Alters der Tumorpatienten zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme grafisch dargestellt.

Abbildung 5: Die Alters- und Geschlechtsverteilung der Tumorpatienten



3.1.2. Charakterisierung der Kontrollpatienten

Das Alter der tumorfreien Kontrollpatienten lag zwischen 7 und 64 Jahren, bei einem Mittelwert von 36 (± 17) Jahren. Der Tabak- und Alkoholkonsum der Kontrollpatienten (soweit angegeben) war gegenüber dem der Tumorpatienten deutlich geringer. In Tabelle 10 sind diese persönlichen Daten der Kontrollpatienten zusammengefasst.

Tabelle 10: Patientendaten und Risikofaktoren aus den Krankenakten der Kontrollpatienten (vgl. auch Material und Methoden, Tabelle 4)

Patienten-Code	Ge- schlecht	Alter	Krebs- risiko Tab*	Krebs- risiko Alk*
015	M	57	1	1
023	W	64	n.b.	n.b.
039	W	7	1	1
082	M	58	3	1
162	W	38	n.b.	n.b.
168	W	30	n.b.	n.b.
173	W	55	1	1
212	W	18	1	1
240	W	17	n.b.	n.b.
336	M	23	n.b.	n.b.
423	W	47	3	1
426	M	23	n.b.	n.b.
427	M	30	3	1
430	M	22	n.b.	n.b.
431	M	16	n.b.	n.b.
433	W	15	1	1
436	m	64	1	1
437	m	20	n.b.	n.b.
438	w	50	n.b.	n.b.
479	w	28	n.b.	n.b.

m = männlich, w = weiblich, n.b. = nicht bekannt

* = Graduierung der Rauch- und Trinkgewohnheiten nach Arndt et al [5]:

Tabakkonsum (Krebsrisiko Tab):

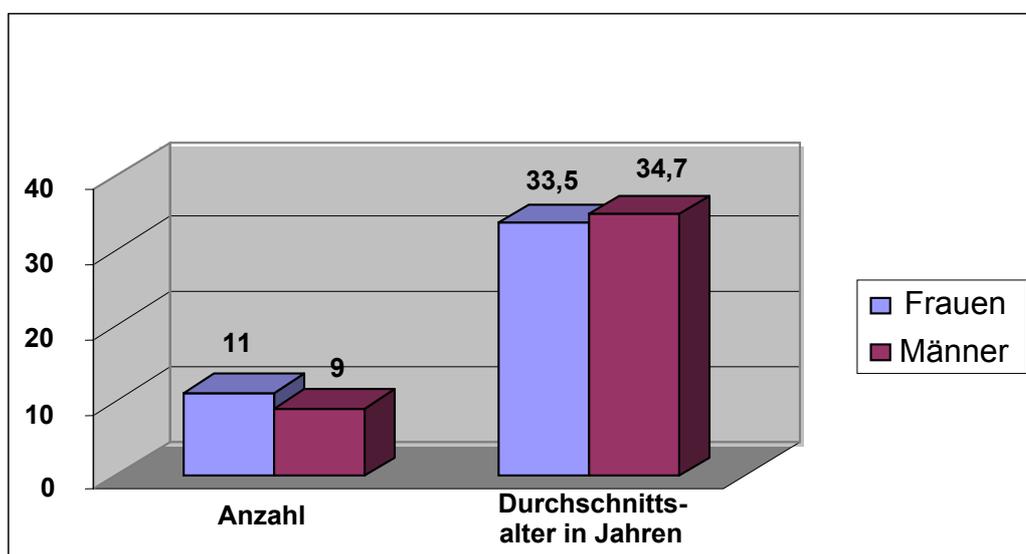
- 1 = Nichtraucher
- 2 = Raucher < 20 Zigaretten/Tag
- 3 = Raucher ca. 20 Zigaretten/Tag
- 4 = Raucher > 20 Zigaretten/Tag

Alkoholkonsum (Krebsrisiko Alk):

- 1 = Nichttrinker
- 2 = Trinkmenge < 70 g/Tag
- 3 = Trinkmenge ca. 70 g/Tag
- 4 = Trinkmenge > 70 g/Tag

In Abbildung 6 ist die Verteilung des Geschlechtes und Alters der Kontrollpatienten zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme grafisch dargestellt.

Abbildung 6: Die Alters- und Geschlechtsverteilung der Kontrollpatienten



3.2. Untersuchung der Expression der verschiedenen CD44-Spleißvarianten

Nach der immunhistochemischen Färbung in der APAAP (vgl. 2.2.2. und Abbildung 4) wurden alle Gewebeschnitte beider Patientengruppen (Tumor- und Kontrollpatienten) lichtmikroskopisch untersucht und bewertet (vgl. 2.2.3.). Es wurde kontrolliert, ob im Gewebeschnitt Karzinomgewebe (Ca), normales Plattenepithel (PE), Bindegewebe (BGW), Drüsengewebe (Dr), Muskelgewebe (Mu), Nerven (Ne) und Gefäße (Ge) vorhanden war und notiert, welche Gewebearten mit welchen Antikörpern angefärbt waren.

Als Hinweis auf eine CD44-Expression wurde im Karzinomgewebe, im nicht entarteten Plattenepithel der Gewebe der Karzinompatienten und im Plattenepithel der Kontrollgewebe die Intensität der Anfärbung (= Färbeindex = SI) und der prozentualen Anteil der angefärbten Zellen (PP) ermittelt (vgl. Material und Methoden 2.2.3.1. und Tabelle 9). Aus den notierten Werten wurde ein immunreaktiver Scorewert (IRS) berechnet (siehe Tabellen 11 - 26).

3.2.1. Nachweis der Expression von CD44v3

3.2.1.1. Expression von CD44v3 auf den Geweben der Tumorpatienten

3.2.1.1.1. Expression von CD44v3 auf den Geweben des Tumorzentrums

In Tabelle 11 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v3-Expression auf Karzinomgewebe und Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v3-Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Tumorzentrums wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphgewebe und Gefäßendothelien zusammengefasst.

Tabelle 11: Expression von CD44v3 im Tumorzentrum

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen	Fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS		
Kryostat-schnitte					
005	2	4	8	---	Plattenepithel, Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
007	1	1	1	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
013	2	3	6	---	Bindegewebe, Muskulatur
086	2	2	4	---	Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
128	2	4	8	---	Bindegewebe, Drüsen, Nerven
148	1	2	2	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Gefäßendothel, Lymphgewebe

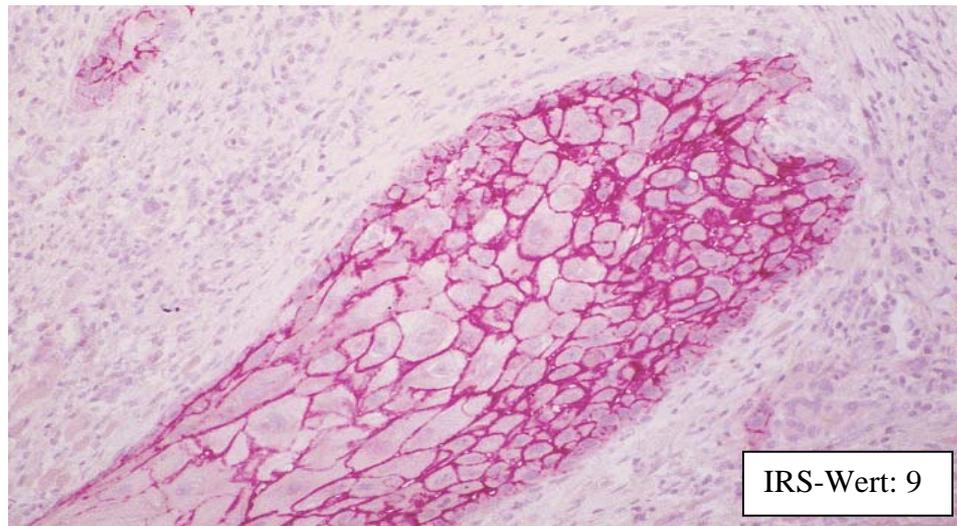
Fortsetzung von **Tabelle 11**

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen			Fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS				
Kryostat-schnitte							
158	1	1	1	---			Bindegewebe
175	2	2	4	---			Bindegewebe
180	2	1	2	---			Bindegewebe, Muskulatur
209	3	4	12	Plattenepithel (SI 2, PP 1, IRS 2,)			Bindegewebe, Gefäßendothel
271	2	1	2				Bindegewebe, Gefäßendothel
382	1	3	3	---			Bindegewebe
385	2	3	6	Drüsen (SI 1)			Bindegewebe
412	3	4	12	---			Bindegewebe
460	3	2	6	---			Bindegewebe, Gefäßendothel
461	3	3	9	---			Bindegewebe, Gefäßendothel
466	1	1	1	---			Bindegewebe
473	3	2	6	---			Bindegewebe, Gefäßendothel
				Nur Plattenepithel: SI PP IRS			
MW	2	2,39	5,17	1,5	1	1,5	
SD	0,77	1,14	3,57	0,71	0	0,71	
Median	2	2	5	1,5	1	1,5	
P ₂₅	1	1	2	1	1	1	
P ₇₅	3	3,25	8	2	1	2	
Paraffin-schnitte							
198	3	3	9	Plattenepithel (SI 3, PP 2, IRS 6), Drüsen (SI 1), Gefäßendothel (SI 1)			Bindegewebe, Muskulatur, Nerven,
020	3	3	9	Drüsen (SI 1), Gefäßendothel (SI 1)			Bindegewebe, Muskulatur, Nerven,
MW	3	3	9	Plattenepithel			
SD	0	0	0	nur auf 1 Präparat			
Median	3	3	9	vorhanden			
MW	3	3	9				
P ₂₅	3	3	9				
P ₇₅	3	3	9				

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Percentile

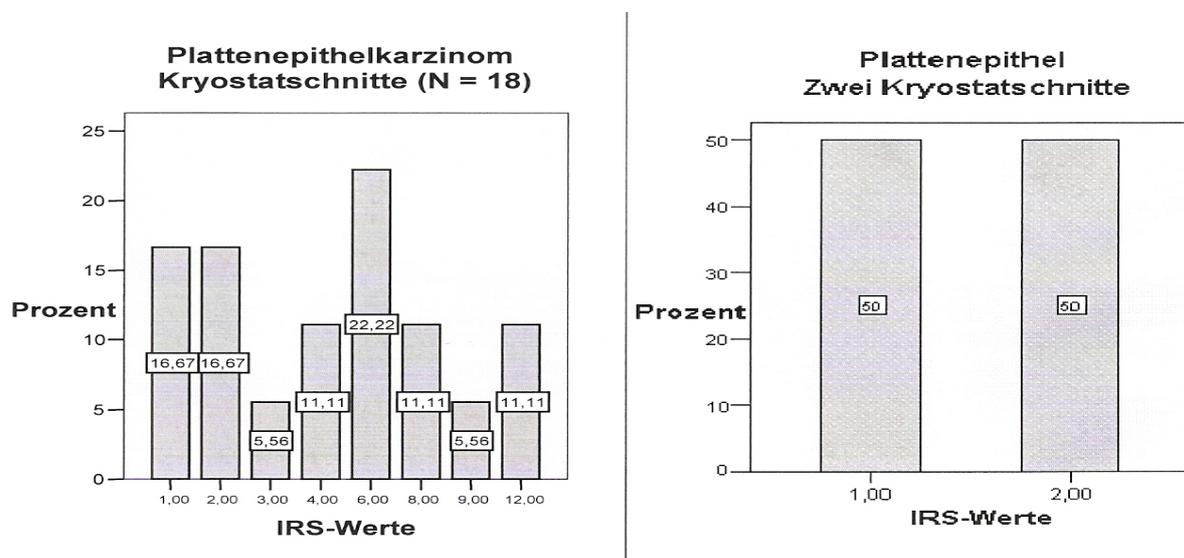
Abbildung 7 zeigt das mikroskopische Bild der Verteilung des Antikörpers CD44v3 auf dem Karzinomgewebe im Tumorzentrumsbereich. CD44v3 ist weit über die Oberfläche der Karzinomzellen verbreitet und die Expression von CD44v3 zeigt eine starke Farbreaktion (Rotfärbung).

Abbildung 7: Mikroskopisches Bild der Expression von CD44v3 auf dem Plattenepithelkarzinom im Tumorzentrum (Patient 198, APAAP-Methode (40x)) (vgl. Tabelle 11)



In Abbildung 8 ist die Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3 auf dem Karzinomgewebe und dem nicht entarteten Plattenepithel im Tumorzentrum grafisch verdeutlicht.

Abbildung 8: Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v3 auf dem Plattenepithelkarzinom und auf dem normalen Plattenepithel im Tumorzentrum



50% der IRS-Werte der Expression von CD44v3 auf dem Karzinom waren kleiner oder gleich 4 und 50% der Werte waren größer oder gleich 6 (Median 5, Mittelwert 5,17, siehe Tabelle 11). Die IRS-Werte des Karzinomgewebes auf den beiden Paraffinschnitten lagen jeweils bei 9 (siehe Tabelle 11).

Auf dem Plattenepithel im Tumorzentrum (Kryostatschnitte) waren die IRS-Werte 1 und 2 (Median und Mittelwert 1,5, (siehe Tabelle 11).

Auf dem einen Paraffinschnitt mit Plattenepithel betrug der IRS-Wert 6 (siehe Tabelle 11).

3.2.1.1.2. Expression von CD44v3 auf den Tumorrangewebe

In Tabelle 12 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v3-Expression auf Karzinomgewebe und Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v3-Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Tumorrangereiches wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphgewebe und Gefäßendothelien zusammengefasst.

Tabelle 12: Expression von CD44v3 im Tumorrangereich

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen	fehlende Anfärbungen	
	SI	PP	IRS			
Kryostat-schnitte	SI	PP	IRS			
005	----	----	---	---	Bindegewebe, Gefäßendothel Drüsen, Muskulatur, Nerven,	
007	2	2	4	---	Bindegewebe, Gefäßendothel	
013	---	----	---	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe	
086	3	2	6	---	Bindegewebe	
128	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2)	Bindegewebe, Muskulatur	
148	1	1	1	---	Bindegewebe, Lymphgewebe	
158	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2)	Bindegewebe, Drüsen, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel	
175	---	---	---	Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel	
180	2	3	6	---	Bindegewebe	
209	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2)	Bindegewebe, Nerven	
271	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2)	Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel	
382	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2), Drüsen (SI 3)	Bindegewebe, Gefäßendothel	
385	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1), Drüsen (SI 2)	Bindegewebe	
412	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 3, IRS 3), Drüsen (SI 2)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven	
460	2	2	4	---	Bindegewebe	
461	2	3	6	---	Bindegewebe	
466	2	3	6	---	Bindegewebe, Muskulatur	
473	---	---	---	Plattenepithel (SI 2, PP 2, IRS 4)	Bindegewebe, Gefäßendothel	
MW	2	2,29	4,71	2	2,22	4,67
SD	0,58	0,76	1,89	0,71	1,09	3,35
Median	2	2	6	2	2	4
P₂₅	2	2	4	1,5	1,5	2,5
P₇₅	2	3	6	2,5	3	6

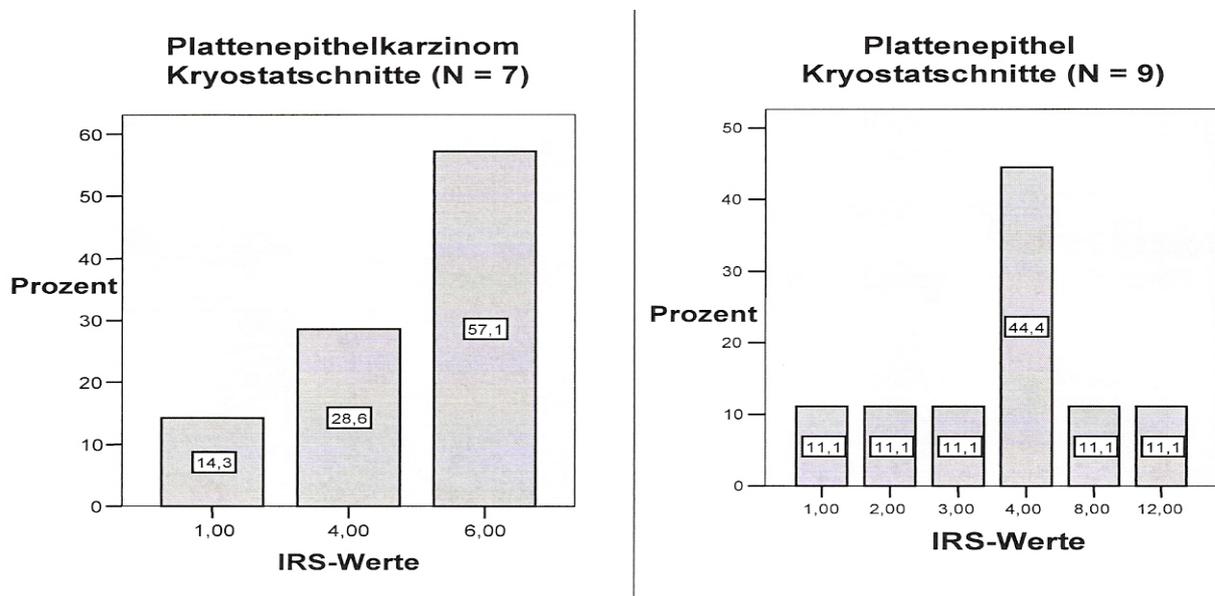
Fortsetzung von **Tabelle 12**

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen	fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS		
198	---	---	---	Plattenepithel (SI 2, PP 2, IRS 4), Gefäßendothel (SI 1)	Bindegewebe, Muskulatur Nerven
020	---	---	---	Gefäßendothel (SI 1)	Bindegewebe, Nerven

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

In Abbildung 9 ist die Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3 auf dem Karzinomgewebe und nicht entarteten Plattenepithel im Tumorrandbereich grafisch erfasst.

Abbildung 9: Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v3 auf dem Plattenepithelkarzinom und auf dem normalen Plattenepithel im Tumorrandbereich



Die IRS-Werte der Expression von CD44v3 auf dem Plattenepithelkarzinom (N = 7, Kryostat-schnitte) im Tumorrandbereich nehmen die Zahlen 1 (14% der Werte), 4 (29% der Werte) und 6 (57% der Werte) ein (Median 6, Mittelwert 4,71, siehe Tabelle 12).

Die beiden Paraffinschnitte enthielten kein Plattenepithelkarzinom.

Auf dem Plattenepithel (N = 9) entfallen je 11% der Scorewerte auf die Zahlen 1, 2, 3, 8 und 12, 44% haben den Wert 4 (Median 4, Mittelwert 4,67, siehe Tabelle 12).

Der IRS-Wert des Plattenepithels auf einem Paraffinschnitt beträgt 4.

3.2.1.1.3. Expression von CD44v3 auf den tumorfernen Geweben

In Tabelle 13 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v3-Expression auf dem nicht entarteten Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v3-Antikörpers mit den anderen Zell- und Gewebearten des tumorfernen Bereiches wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphozyten und Gefäßendothelien zusammengefasst.

Tabelle 13: Expression von CD44v3 im tumorfernen Bereich

Patienten-Code	Anfärbungen	fehlende Anfärbungen	
Kryostat-schnitte			
005	Lymphozyten (SI 2)	Bindegewebe	
007	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2)	Bindegewebe, Gefäßendothel	
013	---	Bindegewebe, Nerven,	
086	Plattenepithel (SI 2, PP 3, IRS 6), Drüsen (SI 2)	Bindegewebe, Nerven	
128	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel	
148	---	Bindegewebe, Drüsen, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel	
158	Plattenepithel (SI 2, PP 1, IRS 2)	Bindegewebe, Nerven, Drüsen	
175	Plattenepithel (SI 3, PP 4, IRS 12), Drüsen (SI 2)	Bindegewebe, Nerven	
180	Plattenepithel (SI 2, PP 2, IRS 4)	Bindegewebe	
209	---	Bindegewebe	
271	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel	
382	Plattenepithel (SI 1, PP 3, IRS 3)	Bindegewebe, Gefäßendothel	
385	Plattenepithel (SI 2, PP 2, IRS 4), Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Gefäßendothel	
412	Plattenepithel (SI 2, PP 4, IRS 8), Drüsen (SI 1)	Bindegewebe	
460	Plattenepithel (SI 3, PP 1, IRS 3), Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven	
461	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven	
466	Plattenepithel (SI 3, PP 3, IRS 9)	Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel	
473	Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Gefäßendothel	
MW	1,92	2,25	4,59
SD	0,79	1,14	3,48
Median	2	2	3,5
P ₂₅	1	1	2
P ₇₅	2,75	3	7,5

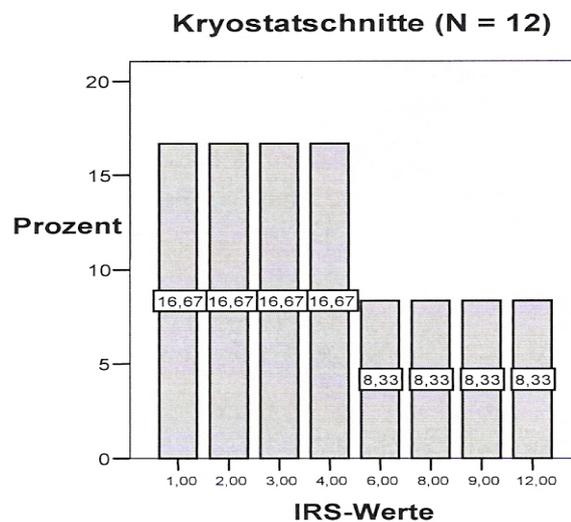
Fortsetzung zu **Tabelle 13**

Patienten-Code	Anfärbungen	fehlende Anfärbungen
Paraffin-schnitte		
198	Gefäßendothel (SI 1)	Bindegewebe, Muskulatur
020	Gefäßendothel (SI 1)	Bindegewebe

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

Die Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3 auf dem Plattenepithel im tumorfernen Bereich wird in der Abbildung 10 grafisch erfasst.

Abbildung 10: Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v3 auf dem Plattenepithel im tumorfernen Bereich



Jeweils fast 17% der immunreaktiven Scorewerte der Expression von CD44v3 auf dem Plattenepithel (N = 12, Kryostatschnitte) im tumorfernen Bereich entfallen auf die Zahlen 1, 2, 3 und 4, jeweils etwa 8% auf die Zahlen 6, 8, 9 und 12 (Median 3,5, Mittelwert 4,59, siehe Tabelle 13). Die Paraffinschnitte des tumorfernen Bereichs enthielten kein Plattenepithel.

3.2.1.2. Expression von CD44v3 auf den Kontrollgeweben

In Tabelle 14 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v3-Expression auf dem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v3-Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Kontrollgewebes wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven und Gefäßendothel zusammengefasst.

Tabelle 14: Expression von CD44v3 auf den Kontrollgeweben

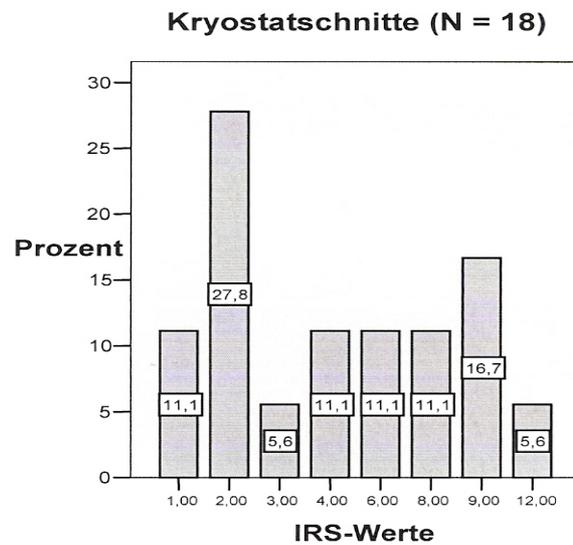
Patienten-Code	Plattenepithel			weitere Anfärbungen	fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS		
Kryostat-schnitte					
015	1	1	1	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
023	3	4	12	---	Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
039	2	3	6	Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
082	2	1	2	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
162	3	2	6	---	Bindegewebe, Muskulatur
168	1	2	2	---	Bindegewebe
173	2	1	2	---	Bindegewebe
212	---	---	---	Drüsen (SI 3)	Bindegewebe, Gefäßendothel
240	1	2	2	Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
336	2	2	4	---	Bindegewebe
423	3	3	9	---	Bindegewebe
426	3	1	3	---	Bindegewebe
427	---	---	---	---	Bindegewebe
430	2	1	2	Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
431	2	2	4	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
433	1	1	1	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
436	3	3	9	---	Bindegewebe
437	3	3	9	---	Bindegewebe, Gefäßendothel
438	2	4	8	---	Bindegewebe
479	2	4	8	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
MW	2,11	2,22	5		
SD	0,76	1,11	3,43		
Median	2	2	4		
P25	1,75	1	2		
P75	3	3	8,25		

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

Abbildung 11 zeigt die Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe. Die Scorewerte der Expression von CD44v3 auf dem Epithel der Kontrollgewebe (N = 18, Kryostatschnitte) haben zu jeweils 11% die Werte 1, 4, 6, und 8, jeweils gut 5% die Werte 3 und 12. 28% der Scorewerte betragen 2 und etwa 17% betragen 9 (Median 4, Mittelwert 5, siehe Tabelle 14).

Auf den beiden Paraffinschnitten fehlte das Plattenepithel.

Abbildung 11: Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v3 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe



3.2.2. Nachweis der Expression von CD44v5

3.2.2.1. Expression von CD44v5 auf den Geweben der Tumorpatienten

3.2.2.1.1. Expression von CD44v5 auf den Geweben des Tumorzentrums

In Tabelle 15 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v5-Expression auf Karzinomgewebe und normalem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v5-Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Tumorzentrums wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphgewebe und Gefäßendothelien zusammengefasst.

Tabelle 15: Expression von CD44v5 im Tumorzentrum

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen	fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS		
Kryostat-schnitte					
005	3	4	12	---	Plattenepithel, Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
007	1	1	1	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
013	3	4	12	---	Bindegewebe, Muskulatur
086	3	3	9	Gefäßendothel (SI 1)	Bindegewebe, Drüsen
128	3	4	12	---	Bindegewebe, Drüsen, Nerven
148	3	3	9	Plattenepithel (SI 3, PP 3, IRS 9)	Bindegewebe, Lymphgewebe
158	3	2	6	---	Bindegewebe
175	2	3	6	---	Bindegewebe
180	3	2	6	---	Bindegewebe, Muskulatur

Fortsetzung von **Tabelle 15**

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen			fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS				
Kryostat-schnitte							
209	3	4	12	Plattenepithel (SI 3, PP 1, IRS 3)			Bindegewebe, Gefäßendothel
271	3	2	6	---			Bindegewebe, Gefäßendothel
382	3	4	12	---			Bindegewebe
385	3	4	12	Drüsen (SI 3)			Bindegewebe
412	3	4	12	---			Bindegewebe
460	3	3	9	---			Bindegewebe, Gefäßendothel
461	3	3	9	---			Bindegewebe, Gefäßendothel
466	3	3	9	---			Bindegewebe
473	3	4	12	Drüsen (SI 2)			Bindegewebe, Gefäßendothel
				Nur Plattenepithel: SI PP IRS			
MW	2,83	3,22	9,39	3	2	6	
SD	0,51	0,94	3,24	0	1,41	4,24	
Median	3	3,5	10,5	3	2	6	
P ₂₅	3	2,75	6	3	1	3	
P ₇₅	3	4	12	3	3	9	
Paraffin-schnitte							
198	3	4	12	Plattenepithel (SI 3, PP 3, IRS 9), Drüsen (SI 1), Muskulatur (SI 1), Gefäßendothel (SI 1)			Bindegewebe, Nerven
020	3	4	12	Drüsen (SI 1), Muskulatur (SI 1), Nerven (SI 1), Gefäßendothel (SI 1)			Bindegewebe,
MW	3	4	12				
SD	0	0	0				
Median	3	4	12				
P ₂₅	3	4	12				
P ₇₅	3	4	12				

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefarbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert,
 --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

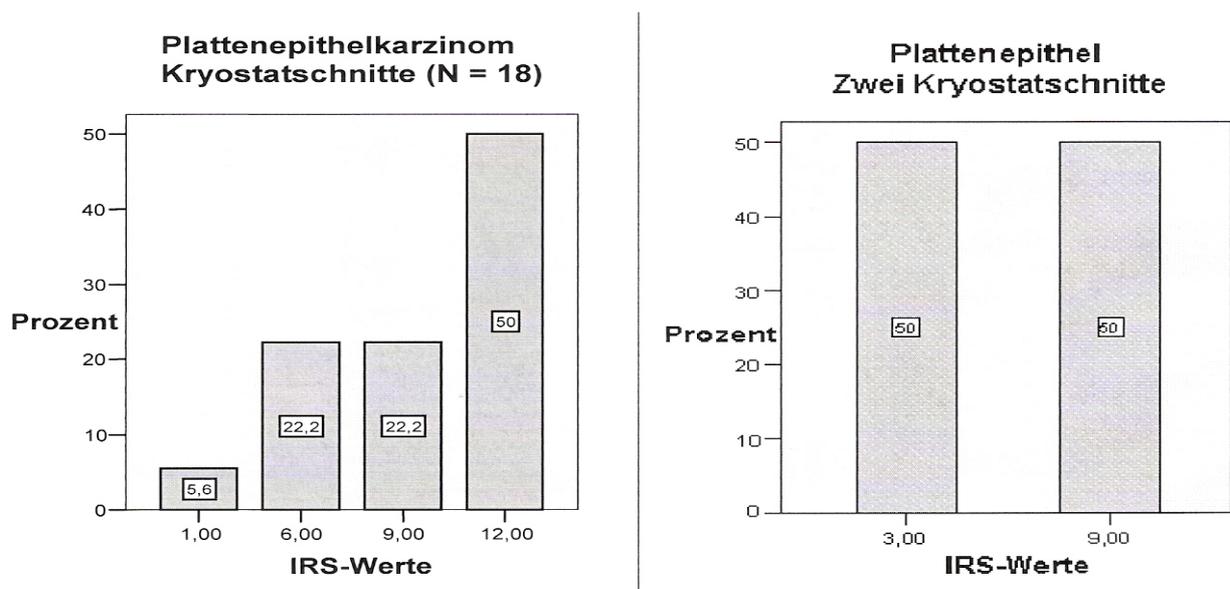
Abbildung 12 zeigt die Verteilung des Antikörpers CD44v5 auf dem Karzinomgewebe im Tumorzentrumsbereich. Die Expression von CD44v5 (Rotfärbung) ist intensiv, gleichmäßig und gut erkennbar über die Oberfläche der Karzinomzellen verteilt.

In Abbildung 13 ist die Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v5 auf dem Karzinom und dem normalen Plattenepithel im Tumorzentrum grafisch veranschaulicht.

Abbildung 12: Mikroskopisches Bild der Expression von CD44v5 auf dem Plattenepithelkarzinom im Tumorzentrum (Patient 198, APAAP-Methode (40x)) (vgl. Tabelle 15)



Abbildung 13: Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v5 auf dem Plattenepithelkarzinom und dem normalen Plattenepithel im Tumorzentrum



Jeweils 22% der IRS-Werte der Expression von CD44v5 auf dem Plattenepithelkarzinom (N = 18, Kryostatschnitte) sind 6 oder 9, gut 5% betragen 1. Weitere 50% der Werte betragen 12 (Median 10,5, Mittelwert 9,39, siehe Tabelle 15).

Auf den beiden Paraffinschnitten des Plattenepithelkarzinoms beträgt der IRS-Wert jeweils 12 (Median und Mittelwert 12, siehe Tabelle 15).

Auf dem Plattenepithel im Tumorzentrationbereich (Kryostatschnitte) sind die IRS-Werte 3 und 9 (Median und Mittelwert 6, siehe Tabelle 15).

Auf dem einen Paraffinschnitt beträgt der IRS-Wert des Plattenepithels 9 (siehe Tabelle 15).

3.2.2.1.2. Expression von CD44v5 auf den Tumorrangewebe

In Tabelle 16 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v5-Expression auf Karzinomgewebe und nicht entartetem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v5-Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Tumorrangereiches wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphgewebe und Gefäßendothel zusammengefasst.

Tabelle 16: Expression von CD44v5 im Tumorrangereich

Patienten-Code	Karzinom			Weitere Anfärbungen	Fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS		
Kryostat-schnitte					
005	---	---	---	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Drüsen, Gefäßendothel
007	3	4	12	---	Bindegewebe, Gefäßendothel
013	--	---	---	Plattenepithel (SI 3, PP 3, IRS 9)	Bindegewebe
086	3	4	12	---	Bindegewebe
128	--	---	---	Plattenepithel (SI 3, PP4, IRS 12)	Bindegewebe, Muskulatur
148	3	3	9	---	Bindegewebe, Lymphgewebe
158	---	---	---	Plattenepithel (SI 3, PP 3, IRS 9)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Drüsen, Gefäßendothel
175	---	---	---	Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
180	3	3	9	---	Bindegewebe
209	---	---	---	Plattenepithel (SI 3, PP 3, IRS 9)	Bindegewebe, Nerven
271	---	---	---	Plattenepithel (SI 2, PP3, IRS 6)	Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
382	---	---	---	Plattenepithel (SI 3, PP 4, IRS 12), Drüsen (SI 3)	Bindegewebe, Gefäßendothel
385	---	---	---	Plattenepithel (SI 3, PP 4, IRS 12), Drüsen (SI 2)	Bindegewebe
412	---	---	---	Plattenepithel (SI 3, PP 4, IRS 12), Drüsen (SI 2)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
460	3	3	9	---	Bindegewebe
461	3	4	12	---	Bindegewebe
466	3	4	12	---	Bindegewebe, Muskulatur
473	---	---	---	Plattenepithel (SI 3, PP 3, IRS 9)	Bindegewebe, Gefäßendothel
MW	3	3,57	10,71	2,98 3,44 10	
SD	0	0,53	1,6	0,33 0,53 2,12	
Median	3	4	12	3 3 9	
P25	3	3	9	3 3 9	
P75	3	4	12	3 4 12	

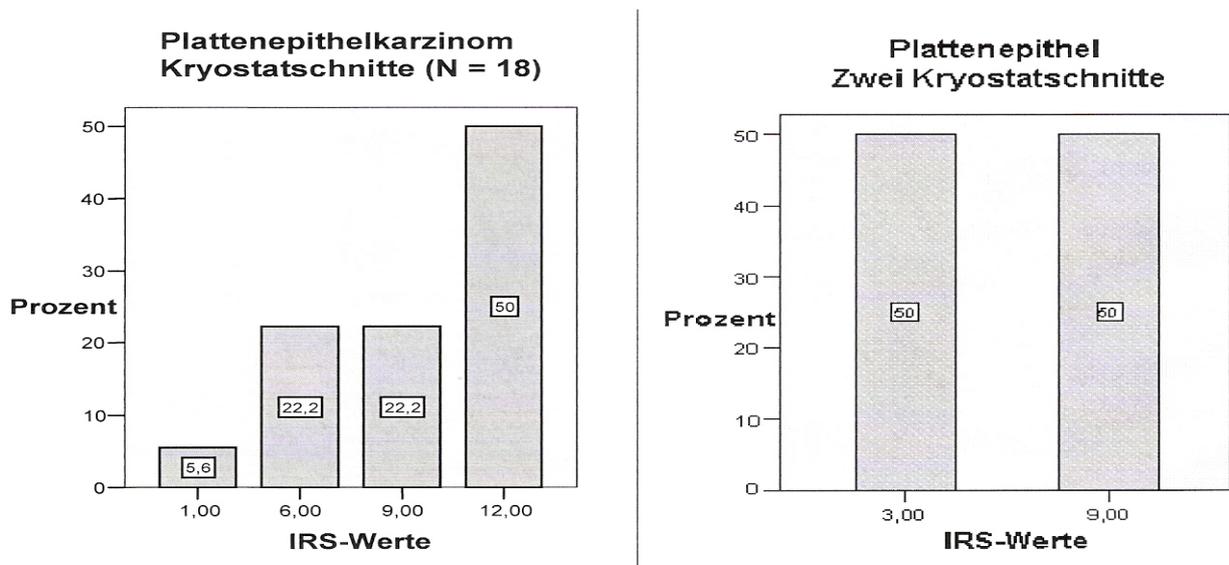
Fortsetzung von **Tabelle 16**:

Patienten-Code	Karzinom			Weitere Anfärbungen	Fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS	Nur Plattenepithel: SI PP IRS	
198	---	---	---	Plattenepithel (SI 3, PP 2, IRS 6), Muskulatur (SI 1), Gefäßendothel (SI 1)	Bindegewebe, Nerven
020	---	---	---	Gefäßendothel (SI 1) Nerven (SI 1)	Bindegewebe,

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert,
 --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

In Abbildung 14 ist die Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v5 auf dem Karzinomgewebe und dem nicht entarteten Plattenepithel im Tumorrandbereich grafisch erfasst.

Abbildung 14: Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v5 auf dem Plattenepithelkarzinom und auf dem normalen Plattenepithel im Tumorrandbereich



Die IRS-Werte der Expression von CD44v5 auf dem Plattenepithelkarzinom (N = 7, Kryostatschnitte) des Tumorrandbereichs nehmen die Zahlen 9 (etwa 43% der Werte) und 12 (etwa 57% der Werte) ein (Median 12, Mittelwert 10,71, siehe Tabelle 16).

Auf beiden Paraffinschnitten des Tumorrandbereichs war kein Plattenepithelkarzinom enthalten. Auf dem Plattenepithel des Tumorrandbereichs (N = 9, Kryostatschnitte) nehmen die IRS-Werte die Zahlen 6 (11% der Werte), 9 und 12 (jeweils 44% der Werte) an (Median 9, Mittelwert 10, siehe Tabelle 16).

Der IRS-Wert auf dem Plattenepithel eines Paraffinschnittes beträgt 6 (siehe Tabelle 16).

3.2.2.1.3. Expression von CD44v5 auf den tumorfernen Geweben

In Tabelle 17 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v5-Expression auf normalem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v5-Antikörpers mit den anderen Zell- und Gewebearten des tumorfernen Bereiches wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphozyten und Gefäßendothelien zusammengefasst.

Tabelle 17: Expression von CD44v5 im tumorfernen Bereich

Patienten-Code	Anfärbungen	fehlende Anfärbungen
Kryostat-schnitte		
005	Lymphozyten (SI 2)	Bindegewebe
007	Plattenepithel (SI 2, PP 3, IRS 6)	Bindegewebe, Gefäßendothel
013	---	Bindegewebe, Nerven
086	Plattenepithel (SI 3, PP 4, IRS 12), Drüsen (SI 3)	Bindegewebe, Nerven
128	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
148	Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
158	Plattenepithel (SI 3, PP 4, IRS 12)	Bindegewebe, Drüsen, Muskulatur, Gefäßendothel
175	Plattenepithel (SI 3, PP 4, IRS 12), Drüsen (SI 3)	Bindegewebe, Nerven
180	Plattenepithel (SI 3, PP 4, IRS 12)	Bindegewebe
209	Drüsen (SI 3)	Bindegewebe, Gefäßendothel
271	Plattenepithel (SI 3, PP 3, IRS 9), Drüsen (SI 3)	Bindegewebe
382	Plattenepithel (SI 2, PP 4, IRS 8), Drüsen (SI 2)	Bindegewebe, Muskulatur
385	Plattenepithel (SI 3, PP 4, IRS 12)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
412	Plattenepithel (SI 3, PP 4, IRS 12)	Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
460	Plattenepithel (SI 3, PP 3, IRS 9), Drüsen (SI 2)	Bindegewebe, Gefäßendothel
461	Plattenepithel (SI 2, PP 2, IRS 4)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
466	Plattenepithel (SI 3, PP 4, IRS 12)	Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
473	Drüsen (SI 2)	Bindegewebe, Gefäßendothel

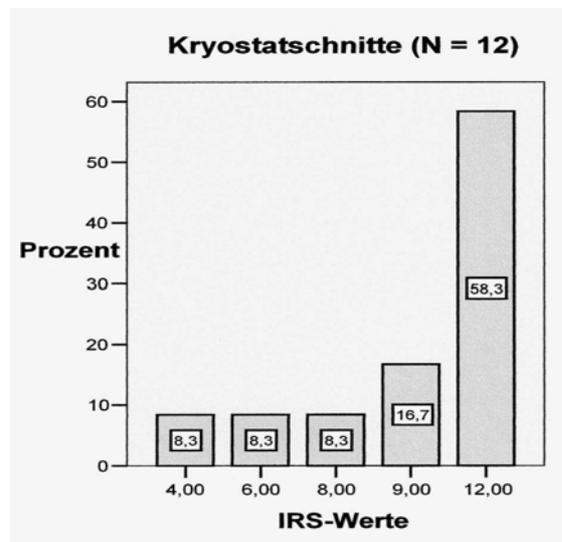
Fortsetzung von **Tabelle 17**:

Patienten-Code	Anfärbungen			Fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS	
	Nur Plattenepithel:			
MW	2,79	3,58	10	
SD	0,45	0,67	2,8	
Median	3	4	12	
P ₂₅	2,25	3	8,25	
P ₇₅	3	4	12	
Paraffin-schnitte				
198	Muskulatur (SI 1), Gefäßendothel (SI 1)			Bindegewebe
020	Gefäßendothel (SI 1)			Bindegewebe

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

Abbildung 15 zeigt die Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v5 auf dem normalen Plattenepithel im tumorfernen Bereich.

Abbildung 15: Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v5 auf dem Plattenepithel im tumorfernen Bereich



Jeweils 8% der immunreaktiven Scorewerte der Expression von CD44v5 auf dem Plattenepithel des tumorfernen Bereichs (N = 12, Kryostatschnitte) entfallen auf die Zahlen 4, 6 und 8, 17% auf die Zahl 9 und 58% der Werte auf die Zahl 12 (Median 12, Mittelwert 10, siehe Tabelle 17). Die Paraffinschnitte enthielten kein Plattenepithel.

3.2.2.2. Expression von CD44v5 auf den Kontrollgeweben

In Tabelle 18 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v5-Expression auf normalem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v5-

Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Kontrollgewebes wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven und Gefäßendothel zusammengefasst.

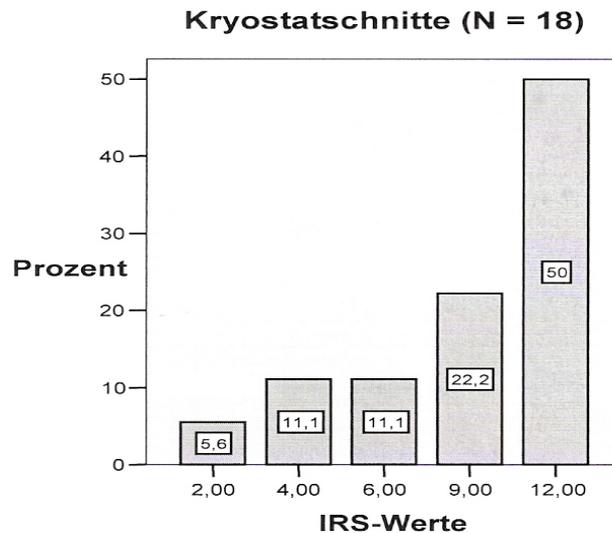
Tabelle 18: Expression von CD44v5 auf den Kontrollgeweben

Patienten-Code	Plattenepithel			weitere Anfärbungen	fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS		
Kryostat-schnitte					
015	2	2	4	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
023	3	4	12	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
039	3	3	9	Drüsen (SI 2)	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
082	3	2	6	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
162	3	3	9	---	Bindegewebe, Muskulatur
168	3	3	9	---	Bindegewebe
173	3	3	9	---	Bindegewebe
212	---	---	---	Drüsen (SI 3)	Bindegewebe, Gefäßendothel
240	3	4	12	Drüsen (SI 2)	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
336	3	4	12	---	Bindegewebe
423	3	4	12	---	Bindegewebe
426	3	2	6	---	Bindegewebe
427	---	---	---	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
430	2	2	4	Drüsen (SI 2)	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
431	3	4	12	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
433	2	1	2	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
436	3	4	12	---	Bindegewebe
437	3	4	12	---	Bindegewebe, Gefäßendothel
438	3	4	12	---	Bindegewebe
479	3	4	12	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
MW	2,83	3,17	9,22		
SD	0,38	0,99	3,41		
Median	3	3,5	10,5		
P25	3	2	6		
P75	4	4	12		

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

In Abbildung 16 ist die Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v5 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe dargestellt. 50% der Scorewerte sind 9 oder kleiner, wobei gut 5% der Werte auf die Zahl 2, jeweils 11% auf die Zahlen 4 und 6 und 22% auf die Zahl 9 entfallen. 50% der Kryostatschnitte haben den Scorewert 12 (Median 10,5, Mittelwert 9,22, siehe Tabelle 18).

Abbildung 16: Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v5 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe



3.2.3. Nachweis der Expression von CD44v7

3.2.3.1. Expression von CD44v7 auf den Geweben der Tumorpatienten

3.2.3.1.1. Expression von CD44v7 auf den Geweben des Tumorzentrums

In Tabelle 19 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v7-Expression auf dem Karzinomgewebe und normalen Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v7-Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Tumorzentrums wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphgewebe und Gefäßendothelien zusammengefasst.

Tabelle 19: Expression von CD44v7 im Tumorzentrum

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen	Fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS		
Kryostat-schnitte					
005	1	3	3	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
007	1	1	1	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
013	1	2	2	---	Bindegewebe, Muskulatur
086	1	1	1	---	Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
128	1	1	1	---	Bindegewebe, Drüsen, Nerven
148	1	1	1	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Gefäßendothel, Lymphgewebe
158	0	0	0	---	Bindegewebe
175	2	1	2	---	Bindegewebe,
180	1	1	1	---	Bindegewebe, Muskulatur

Fortsetzung von **Tabelle 19**

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen			Fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS				
Kryostat-schnitte							
209	1	1	1	---			Plattenepithel (SI 0, PP 0, IRS 0), Bindegewebe, Gefäßendothel
271	1	1	1	---			Bindegewebe, Gefäßendothel
382	1	1	1	---			Bindegewebe
385	1	2	2	Drüsen (SI 1)			Bindegewebe
412	2	2	4	---			Bindegewebe
460	1	1	1	---			Bindegewebe, Gefäßendothel
461	1	2	2	---			Bindegewebe
466	1	1	1	---			Bindegewebe
473	1	2	2	---			Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
				Nur Plattenepithel: SI PP IRS			
MW	1,06	1,33	1,5	0,5	0,5	0,5	
SD	0,42	0,69	0,92	0,71	0,71	0,71	
Median	1	1	1	0,5	0,5	0,5	
P25	1	1	1	0	0	0	
P75	1	2	2	1	1	1	
Paraffin-schnitte							
198	1	1	1	Plattenepithel (SI 2, PP 1, IRS 2), Drüsen (SI 1)			Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
020	1	1	1	---			Bindegewebe, Drüsen, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
MW	1	1	1				
SD	0	0	0				
Median	1	1	1				
P ₂₅	1	1	1				
P ₇₅	1	1	1				

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

Abbildung 17 zeigt die Verteilung des Antikörpers CD44v7 auf dem Karzinomgewebe im Tumorzentrumsbereich. Die Expression von CD44v7 (Rotfärbung) ist schwach und nur über die Oberfläche weniger Karzinomzellen verteilt. Der schwarze Pfeil in Abbildung 17 zeigt auf eine CD44v7-positive Karzinomzelle

Abbildung 18 zeigt die Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v7 auf dem Karzinomgewebe und dem nicht entarteten Plattenepithel im Tumorzentrum.

Abbildung 17: Mikroskopisches Bild der Expression von CD44v7 auf dem Plattenepithelkarzinom im Tumorzentrum (Patient 198, APAAP-Methode (40x)) (vgl. Tabelle 19)

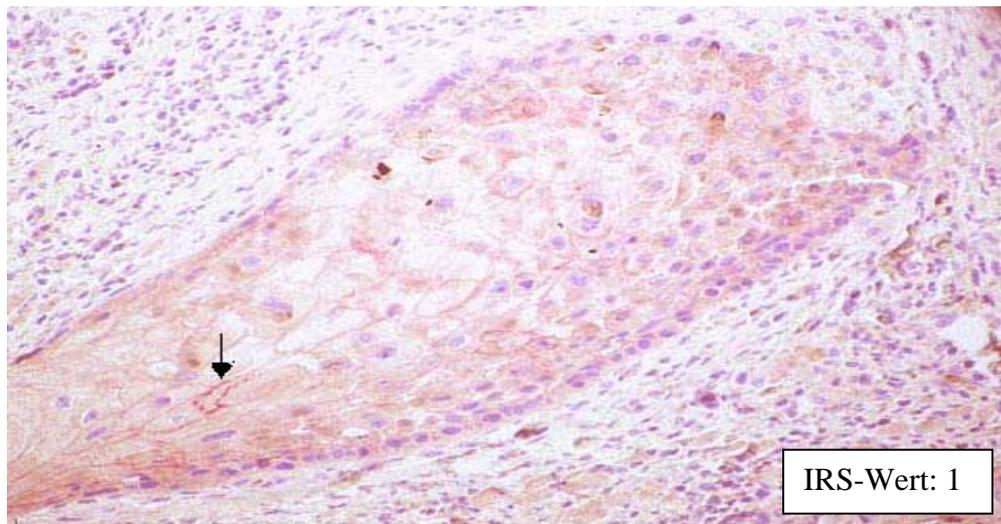
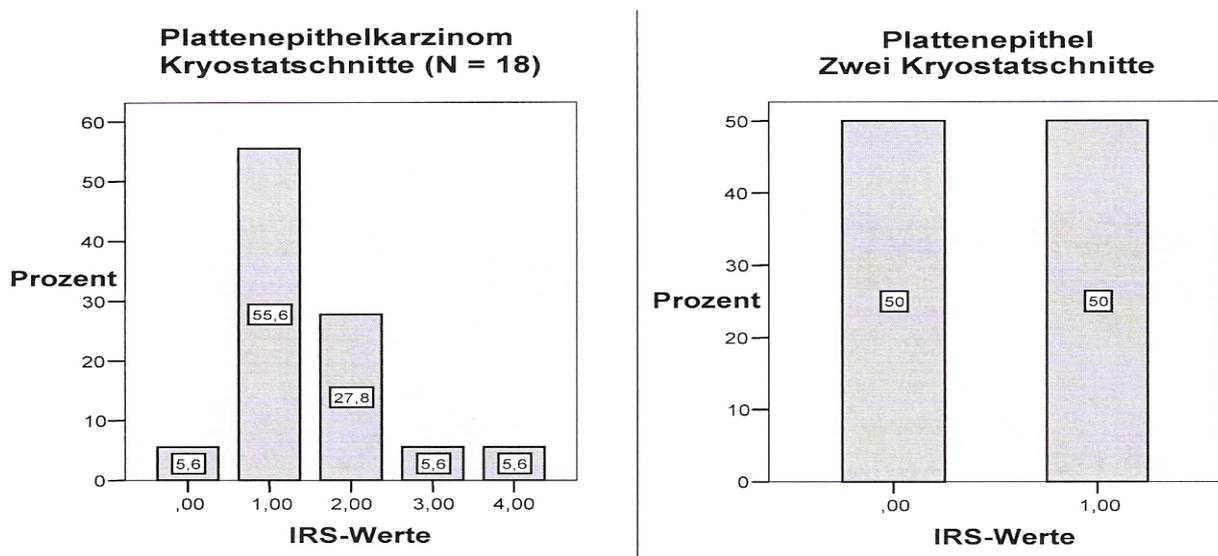


Abbildung 18: Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v7 auf dem Plattenepithelkarzinom und dem normalen Epithel im Tumorzentrum



Bei ca. 55% der 18 Kryostatschnitte war der immunreaktive Scorewert der CD44v7-Expression auf dem Plattenepithelkarzinom im Tumorzentrum 1. Ungefähr 5% der Schnitte des Karzinoms zeigten keine CD44-Expression (Scorewert 0). Bei 29% lag der Scorewert bei 2 und bei jeweils ca. 5% bei einem Wert von 3 und 4 (Median 1, Mittelwert 1,5, siehe Tabelle 19).

Auf beiden Paraffinschnitten des Plattenepithelkarzinoms liegt jeweils ein Scorewert von 1 vor (Median und Mittelwert 1, siehe Tabelle 19).

Auf den beiden Kryostatschnitten des Plattenepithels sind die Scorewerte 0 und 1 (Median und Mittelwert 0,5, siehe Tabelle 19).

Auf dem einen Paraffinschnitt des Plattenepithels beträgt der Scorewert 2 (siehe Tabelle 19).

3.2.3.1.2. Expression von CD44v7 auf den Tumorrangeweben

In Tabelle 20 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v7-Expression auf Karzinomgewebe und normalem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v7-Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Tumorrangebereiches wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphgewebe und Gefäßendothelien zusammengefasst.

Tabelle 20: Expression von CD44v7 im Tumorrangebereich

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen	Fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS		
Kryostat-schnitte					
005	---	---	---	---	Bindegewebe, Drüsen, Muskulatur, Gefäßendothel, Nerven
007	0	0	0	---	Bindegewebe, Gefäßendothel
013	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe
086	0	0	0	---	Bindegewebe
128	--	---	---	Plattenepithel (SI 2, PP 1, IRS 2)	Bindegewebe, Muskulatur
148	1	1	1	---	Bindegewebe, Lymphgewebe
158	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Drüsen, Muskulatur, Gefäßendothel, Nerven
175	---	---	---	---	Bindegewebe, Drüsen
180	1	1	1	---	Bindegewebe
209	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Nerven
271	---	---	---	---	Plattenepithel (SI 0, PP 0, IRS 0) Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
382	---	---	---	Plattenepithel (SI 2, PP 3, IRS 6)	Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
385	---	---	---	Plattenepithel (SI 2, PP 2, IRS 4), Drüsen (SI 1)	Bindegewebe

Fortsetzung von **Tabelle 20**

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen			Fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS	SI	PP	IRS	
412	---	---	---	Plattenepithel (SI 2, PP 3, IRS 6), Drüsen (SI 1)			Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
461	1	1	1	---			Bindegewebe
466	2	2	4	---			Bindegewebe, Muskulatur
460	1	1	1	---			Bindegewebe
473	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)			Bindegewebe, Gefäßendothel
				Nur Plattenepithel: SI PP IRS			
MW	0,86	0,86	1,14	1,33	1,44	2,44	
SD	0,69	0,69	1,35	0,71	1,01	2,3	
Median	1	1	1	1	1	1	
P25	0	0	0	1	1	1	
P75	1	1	1	2	2,5	5	
Paraffin-schnitte	SI	PP	IRS				
198	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)			Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
020	---	---	---	---			Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

In Abbildung 19 ist die Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v7 auf dem Karzinomgewebe und dem nicht entarteten Plattenepithel im Tumorrandbereich grafisch dargestellt.

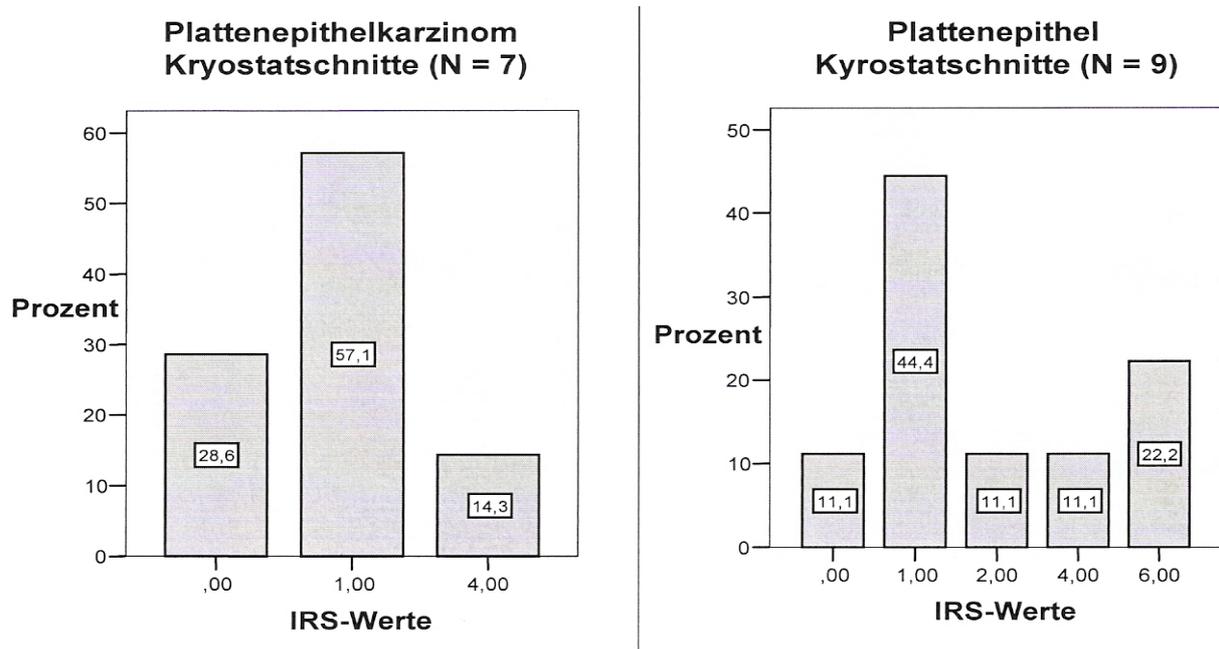
Von den immunreaktiven Scorewerten der Expression von CD44v7 auf dem Plattenepithelkarzinom (N = 7, Kryostatschnitte) im Tumorrandbereich nehmen gut 28% die Zahl 0 ein, 57% die Zahl 1 und etwa 14% die Zahl 4 (Median 1, Mittelwert 1,14, siehe Tabelle 20).

Auf beiden Paraffinschnitten des Tumorrandbereichs war kein Karzinom enthalten.

Auf gut 44% der Kryostatschnitte des Plattenepithels (N = 9) liegt ein IRS-Wert von 1 vor, auf 11% der Kryostatschnitte ein IRS-Wert von 2, auf 11% ein Wert von 4 und auf 22% ein Wert von 6. Auf den restlichen 11% der Kryostatschnitte konnte CD44v7 auf dem Plattenepithel nicht nachgewiesen werden (Median 1, Mittelwert 2,44, siehe Tabelle 20).

Der immunreaktive Scorewert des Plattenepithels auf dem Paraffinschnitt beträgt 1.

Abbildung 19: Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v7 auf dem Plattenepithelkarzinom und auf dem normalen Epithel im Tumorrandbereich



3.2.3.1.3. Expression von CD44v7 auf den tumorfernen Geweben

In Tabelle 21 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v7-Expression auf normalem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v7-Antikörpers mit den anderen Zell- und Gewebearten des tumorfernen Bereiches wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphozyten und Gefäßendothelien zusammengefasst.

Tabelle 21: Expression von CD44v7 im tumorfernen Bereich

Patienten-Code	Anfärbungen	Fehlende Anfärbungen
Kryostat-schnitte		
005	---	Bindegewebe, Lymphozyten
007	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS1)	Bindegewebe, Gefäßendothel
013	---	Bindegewebe, Nerven
086	Plattenepithel (SI 3, PP 3, IRS 9), Drüsen (SI 2)	Bindegewebe, Nerven
128	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
148	---	Bindegewebe, Gefäßendothel, Drüsen, Muskulatur, Nerven,

Fortsetzung von **Tabelle 21**

Patienten-Code	Anfärbungen	Fehlende Anfärbungen
Kryostat-schnitte		
175	Plattenepithel (SI 3, PP 3, IRS 9), Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Nerven
180	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe
209	---	Bindegewebe
271	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
382	Plattenepithel (SI 0, PP 0, IRS 0)	Bindegewebe, Gefäßendothel
385	Plattenepithel (SI 2, PP 3, IRS 6), Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Gefäßendothel
412	Plattenepithel (SI 1, PP 4, IRS 4), Drüsen (SI 1)	Bindegewebe
460	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Drüsen, Muskulatur
461	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
466	Plattenepithel (SI 2, PP 2, IRS 4)	Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
473	---	Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
	Nur Plattenepithel: SI PP IRS	
MW	1,42 1,75 3,17	
SD	0,9 1,22 3,24	
Median	1 1 1	
P ₂₅	1 1 1	
P ₇₅	2 3 5,5	
Paraffin-schnitte		
198	---	Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
020	---	Bindegewebe, Gefäßendothel

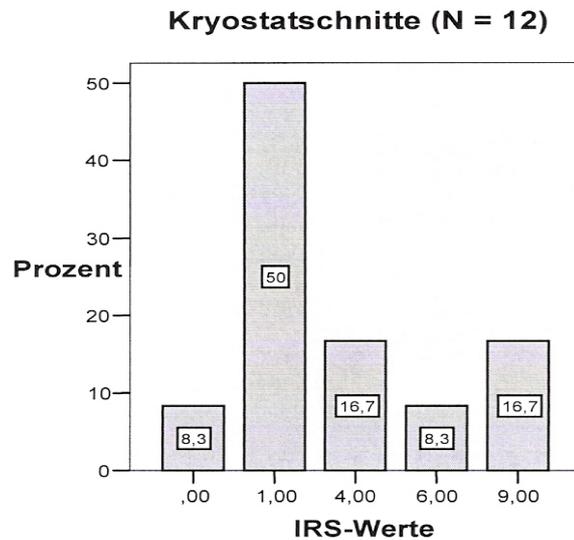
SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefarbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

Die Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v7 auf dem nicht entarteten Plattenepithel im tumorfernen Bereich wird in Abbildung 20 grafisch dargestellt.

Auf gut 8% der 12 Kryostatschnitte wurde das Epithel nicht angefarbt. 50% der IRS-Werte sind 1, weitere fast 42% verteilen sich auf die Zahlen 4 (17%), 6 (8%) und 9 (17%) (Median 1, Mittelwert 3,17, siehe Tabelle 21).

Auf den Paraffinschnitten war kein Plattenepithel vorhanden.

Abbildung 20: Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v7 auf dem Plattenepithel im tumorfernen Bereich



3.2.3.2. Expression von CD44v7 auf den Kontrollgeweben

In Tabelle 22 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v7-Expression auf normalem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v7-Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Kontrollgewebes wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven und Gefäßendothel zusammengefasst.

Tabelle 22: Expression von CD44v7 auf den Kontrollgeweben

Patienten-Code	Plattenepithel			Weitere Anfärbungen	Fehlende Anfärbung
	SI	PP	IRS		
Kryostat-schnitte					
015	1	1	1	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
023	2	2	4	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
039	2	3	6	---	Bindegewebe, Drüsen, Nerven, Gefäßendothel
082	0	0	0	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
162	1	1	1	---	Bindegewebe, Muskulatur
168	0	0	0	---	Bindegewebe
173	1	1	1	---	Bindegewebe
212	---	---	---	---	Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
240	1	1	1	---	Bindegewebe, Drüsen, Nerven, Gefäßendothel
336	2	3	6	---	Bindegewebe
423	3	3	9	---	Bindegewebe
426	2	1	2	---	Bindegewebe

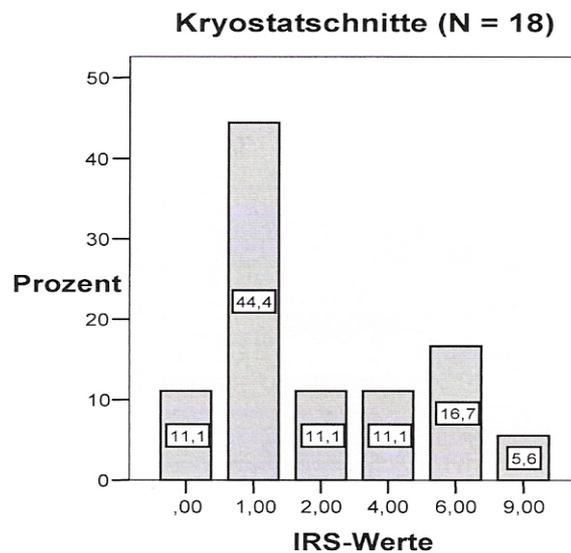
Fortsetzung von **Tabelle 22**

Patienten-Code	Plattenepithel			Weitere Anfärbungen	Fehlende Anfärbung
	SI	PP	IRS		
Kryostat-schnitte					
427	---	---	---	---	Bindegewebe
430	1	1	1	---	Bindegewebe, Drüsen, Nerven, Gefäßendothel
431	1	2	2	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
433	1	1	1	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
436	2	2	4	---	Bindegewebe
437	1	1	1	---	Bindegewebe, Gefäßendothel
438	1	1	1	---	Bindegewebe
479	2	3	6	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
MW	1,33	1,5	2,61		
SD	0,77	0,99	2,60		
Median	1	1	1		
P25	1	1	1		
P75	2	2,25	4,5		

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

In Abbildung 21 sind die immunreaktiven Scorewerte von CD44v7 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe grafisch erfasst.

Abbildung 21: Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v7 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe



Auf 11% der 18 Kryostatschnitte wurde das vorhandene Epithel mit CD44v7 nicht angefärbt (IRS-Wert 0). Bei gut 44% beträgt der IRS-Wert 1. 45% der Werte entfallen auf die Zahlen 2 und 4 (jeweils 11%), 6 (fast 17%) und 9 (gut 5%) (Median 1, Mittelwert 2,61, siehe Tabelle 22).

3.2.4. Nachweis der Expression von CD44v10

3.2.4.1. Expression von CD44v10 auf den Geweben der Tumorpatienten

3.2.4.1.1. Expression von CD44v10 auf den Geweben des Tumorzentrums

In Tabelle 23 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v10-Expression auf Karzinomgewebe und auf normalem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v10-Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Tumorzentrums wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphgewebe und Gefäßendothelien zusammengefasst.

Tabelle 23: Expression von CD44v10 im Tumorzentrum

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen			fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS				
Kryostat-schnitte							
005	1	2	2	---			Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
007	1	1	1	Nerven (SI 1)			Bindegewebe, Gefäßendothel
013	0	0	0	---			Bindegewebe, Muskulatur
086	1	2	2	Drüsen (SI 1), Gefäßendothel (SI 1)			Bindegewebe
128	1	1	1	Nerven (SI 1)			Bindegewebe, Drüsen
148	1	1	1	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)			Bindegewebe, Gefäßendothel, Lymphgewebe
158	1	1	1	---			Bindegewebe
175	1	2	2	---			Bindegewebe
180	1	1	1	---			Bindegewebe, Muskulatur
209	0	0	0	---			Plattenepithel (SI 0, PP 0, IRS 0), Bindegewebe, Gefäßendothel
271	1	1	1	---			Bindegewebe, Gefäßendothel
382	1	2	2	---			Bindegewebe
385	1	2	2	Drüsen (SI 1)			Bindegewebe
412	2	3	6	---			Bindegewebe
460	1	2	2	---			Bindegewebe
461	2	3	6	---			Bindegewebe, Gefäßendothel
466	1	3	3	---			Bindegewebe
473	1	2	2	---			Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
				Nur Plattenepithel: SI PP IRS			
MW	1	1,61	1,94	0,5	0,5	0,5	
SD	0,49	0,92	1,66	0,71	0,71	0,71	
Median	1	2	2	0,5	0,5	0,5	
P ₂₅	1	1	1	0	0	0	
P ₇₅	1	2	2	1	1	1	

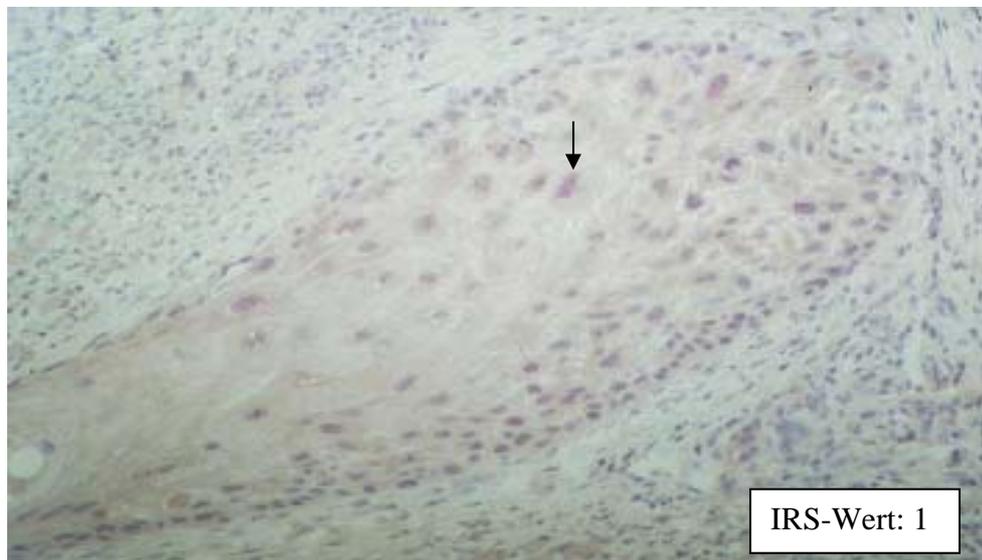
Fortsetzung von **Tabelle 23**

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen	fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS		
Paraffin-schnitte					
198	1	1	1	---	Plattenepithel (SI 0, PP 0, IRS 0), Bindegewebe, Gefäßendothel, Muskulatur, Drüsen, Nerven
020	1	1	1	---	Bindegewebe, Gefäßendothel, Muskulatur, Drüsen, Nerven,
MW	1	1	1		
SD	0	0	0		
Median	1	1	1		
P ₂₅	1	1	1		
P ₇₅	1	1	1		

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

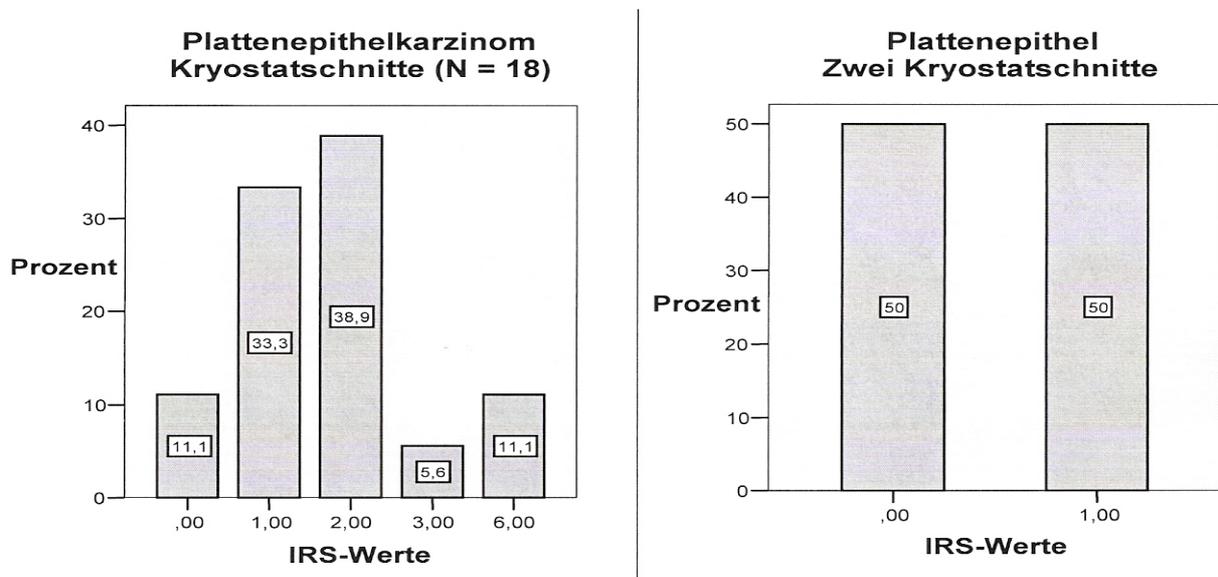
Abbildung 22 zeigt die Verteilung des Antikörpers CD44v10 auf dem Karzinomgewebe im Tumorzentrum. Die Expression von CD44v10 (Rotfärbung) ist schwach und nur punktuell auf den Karzinomzellen zu finden. Der schwarze Pfeil in Abbildung 22 zeigt auf den CD44v10-positiven Zellkern einer Karzinomzelle.

Abbildung 22 : Mikroskopisches Bild der Expression von CD44v10 auf dem Plattenepithelkarzinom im Tumorzentrum (Patient 198, APAAP-Methode (40x)) (vgl. Tabelle 23)



In Abbildung 23 sind die immunreaktiven Scorewerte von CD44v10 auf dem Karzinomgewebe und Plattenepithel im Tumorzentrum grafisch erfasst.

Abbildung 23: Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v10 auf dem Plattenepithelkarzinom und auf dem normalen Epithel im Tumorzentrum



Von den 18 Kryostatschnitten mit Plattenepithelkarzinom vom Tumorzentrum zeigten 11% keinen Expression von CD44v10 (IRS-Wert 0). Weitere 33,3% haben einen immunreaktiven Scorewert von 1, 40% einen Wert von 2, gut 5 % den Wert 3 und 11 % der Gewebeschnitte einen Wert von 6 (Median 2, Mittelwert 1,94, siehe Tabelle 23).

Auf beiden Paraffinschnitten des Plattenepithelkarzinoms ist ein IRS-Wert von 1 (Median und Mittelwert 1, siehe Tabelle 23) zu finden.

Auf den beiden Kryostatschnitten des Plattenepithels im Tumorzentrum sind die IRS-Werte 0 und 1 (Median und Mittelwert 0,5, siehe Tabelle 23).

Auf dem einen Paraffinschnitt mit Plattenepithel war mit CD44v10 keine Anfärbung zu erzielen (IRS-Wert 0, siehe Tabelle 24).

3.2.4.1.2. Expression von CD44v10 auf den Tumorrangewebe

In Tabelle 24 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v10-Expression auf Karzinomgewebe und normalem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v10-Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Tumorrangereiches wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphgewebe und Gefäßendothelien zusammengefasst.

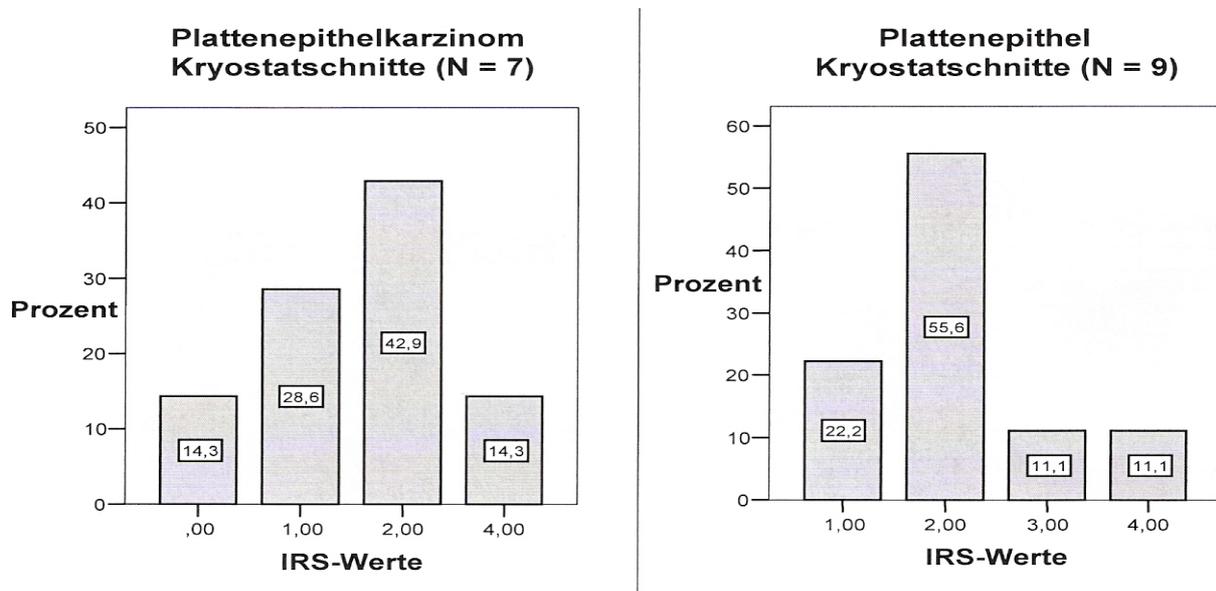
In Abbildung 24 sind die immunreaktiven Scorewerte von CD44v10 auf dem Karzinomgewebe und dem normalen Plattenepithel im Tumorrangereich grafisch dargestellt.

Tabelle 24: Expression von CD44v10 im Tumorrandbereich

Patienten-Code	Karzinom			weitere Anfärbungen			fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS				
Kryostat-schnitte							
005	---	---	---	Nerven (SI 1)			Bindegewebe, Drüsen, Muskulatur, Gefäßendothel
007	0	0	0	---			Bindegewebe, Gefäßendothel
013	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)			Bindegewebe
086	1	1	1	---			Bindegewebe
128	--	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2)			Bindegewebe, Muskulatur
148	1	1	1	---			Bindegewebe, Lymphgewebe
158	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2), Nerven (SI 1)			Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
175	---	---	---	Drüsen (SI 1)			Bindegewebe
180	1	2	2	---			Bindegewebe
209	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2), Nerven (SI 1)			Bindegewebe
271	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2)			Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
382	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2)			Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
385	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1), Drüsen (SI 1)			Bindegewebe
412	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 3, IRS 3), Drüsen (SI 1), Nerven (SI 1)			Bindegewebe, Muskulatur
460	1	4	4	---			Bindegewebe
461	1	2	2	---			Bindegewebe
466	1	2	2	---			Bindegewebe, Muskulatur
473	---	---	---	Plattenepithel (SI 2, PP 2, IRS 4)			Bindegewebe, Gefäßendothel
				Nur Plattenepithel: SI PP IRS			
MW	0,86	1,71	1,71	1,11	1,89	2,11	
SD	0,38	1,26	1,26	0,33	0,60	0,93	
Median	1	2	2	1	2	2	
P ₂₅	1	1	1	1	1,5	1,5	
P ₇₅	1	2	2	1	2	2,5	
Paraffin-schnitte							
198	---	---	---	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)			Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
020	---	---	---	---			Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefarbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

Abbildung 24: Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v10 auf dem Plattenepithelkarzinom und Plattenepithel im Tumorrandbereich



Fast 29% der immunreaktiven Scorewerte der CD44v10-Expression auf dem Plattenepithelkarzinom (N = 7, Kryostatschnitte) im Tumorrandbereich haben den Wert 1, 43% den Wert 2 und gut 14% den Wert 4. Auf ca. 14% der Gewebeschnitte war das Plattenepithelkarzinom nicht angefärbt (Median 2, Mittelwert 1,71, siehe Tabelle 24).

Die beiden Paraffinschnitten des Tumorrandbereichs (N = 2) enthielten kein Plattenepithelkarzinom.

Auf 22% der Kryostatschnitte des Plattenepithels im Tumorrandbereich (N = 9) ist der IRS-Wert 1, auf 56% der Gewebeschnitte 2 und auf jeweils 11% ist der IRS-Wert 3 oder 4 (Median 2, Mittelwert 2,11, siehe Tabelle 24).

Der immunreaktive Scorewert auf dem Plattenepithel eines Paraffinschnittes beträgt 1 (siehe Tabelle 24).

3.2.4.1.3. Expression von CD44v10 auf den tumorfernen Geweben

In Tabelle 25 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v10-Expression auf normalem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v10-Antikörpers mit den anderen Zell- und Gewebearten des tumorfernen Bereiches wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven, Lymphozyten und Gefäßendothelien zusammengefasst.

In Abbildung 25 ist die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v10 auf dem normalen Plattenepithel im tumorfernen Bereich grafisch dargestellt.

Tabelle 25: Expression von CD44v10 im tumorfernen Bereich

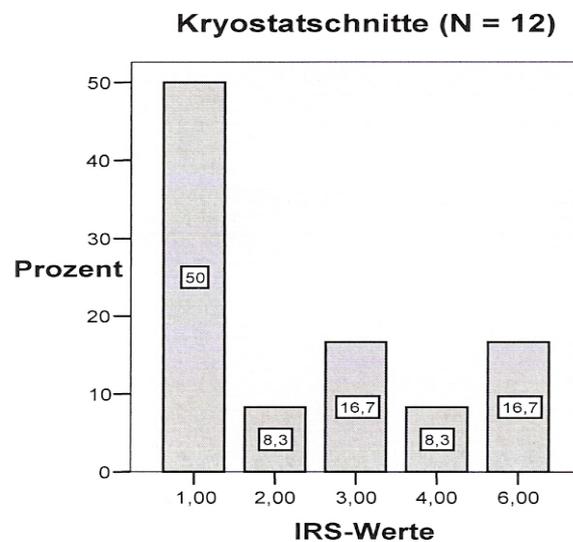
Patienten-Code	Anfärbungen	fehlende Anfärbungen
Kryostat-schnitte		
005	---	Bindegewebe, Lymphozyten
007	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Gefäßendothel
013	---	Bindegewebe, Nerven
086	Plattenepithel (SI 2, PP 3, IRS 6), Drüsen (SI 2), Nerven (SI 1)	Bindegewebe
128	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
148	---	Bindegewebe, Gefäßendothel, Drüsen, Muskulatur, Nerven,
158	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Drüsen, Muskulatur, Gefäßendothel
175	Plattenepithel (SI 2, PP 2, IRS 4), Nerven (SI 1)	Bindegewebe, Drüsen
180	Plattenepithel (SI 1, PP 3, IRS 3)	Bindegewebe
209	---	Bindegewebe
271	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1), Nerven (SI 1)	Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
382	Plattenepithel (SI 1, PP 3, IRS 3)	Bindegewebe, Gefäßendothel
385	Plattenepithel (SI 2, PP 3, IRS 6), Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Gefäßendothel
412	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1), Drüsen (SI 1)	Bindegewebe
460	Plattenepithel (SI 1, PP 2, IRS 2), Drüsen (SI 1)	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven
461	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1), Nerven (SI 1)	Bindegewebe, Muskulatur
466	Plattenepithel (SI 1, PP 1, IRS 1)	Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
473	---	Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
	Nur Plattenepithel: SI PP IRS	
MW	1,25 1,83 2,5	
SD	0,43 0,94 1,93	
Median	1 1,5 1,5	
P ₂₅	1 1 1	
P ₇₅	1,75 3 3,75	

Fortsetzung von **Tabelle 25**:

Patienten-Code	Anfärbungen	Fehlende Anfärbungen
Paraffin-schnitte		
198	---	Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel
020	---	Bindegewebe, Gefäßendothel

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefärbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

Abbildung 25: Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v10 auf normalem Plattenepithel im tumorfernen Bereich



50% der IRS-Werte der Expression von CD44v10 auf den Kryostatschnitten des Plattenepithels (N = 12) im tumorfernen Bereich sind 1, jeweils gut 8% sind 2 und 4 und fast 17% jeweils 3 und 6 (Median 1,51, Mittelwert 2,5, siehe Tabelle 25).

Auf den Paraffinschnitten war kein Plattenepithel vorhanden.

3.2.4.2. Expression von CD44v10 auf den Kontrollgeweben

In Tabelle 26 sind die ermittelten immunhistochemischen Scorewerte der CD44v10-Expression auf normalem Plattenepithel sowie weitere vorhandene bzw. fehlende Reaktionen des CD44v10-Antikörpers mit den anderen Gewebearten des Kontrollgewebes wie Bindegewebe, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Nerven und Gefäßendothel zusammengefasst.

In Abbildung 26 sind die IRS-Werte von CD44v10 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe grafisch erfasst.

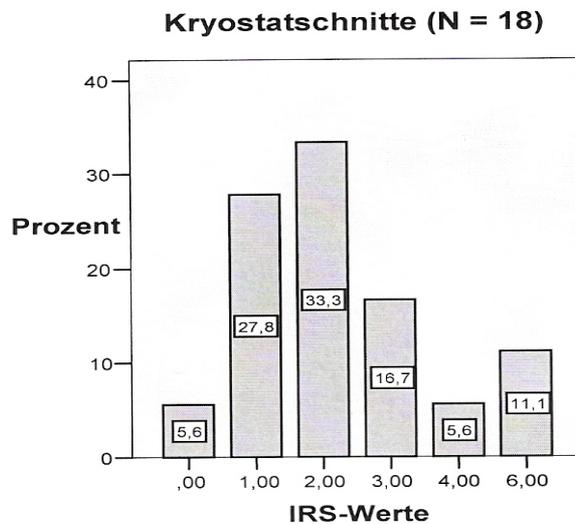
Tabelle 26: Expression von CD44v10 auf den Kontrollgeweben

Patienten-Code	Plattenepithel			weitere Anfärbungen	fehlende Anfärbungen
	SI	PP	IRS		
Kryostat-schnitte					
015	1	1	1	Nerven (SI 1)	Bindegewebe, Muskulatur
023	1	2	2	---	Bindegewebe, Muskulatur, Nerven, Gefäßendothel
039	1	2	2	Nerven (SI 1)	Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
082	1	1	1	---	Bindegewebe, Nerven, Gefäßendothel
162	1	3	3	---	Bindegewebe, Muskulatur
168	0	0	0	---	Bindegewebe
173	1	2	2	---	Bindegewebe
212	---	---	---	---	Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
240	1	1	1	Nerven (SI 1)	Bindegewebe, Drüsen, Gefäßendothel
336	2	2	4	---	Bindegewebe
423	1	2	2	---	Bindegewebe
426	2	3	6	---	Bindegewebe
427	---	---	---	---	Bindegewebe
430	1	1	1	---	Bindegewebe, Drüsen, Nerven, Gefäßendothel
431	2	3	6	Nerven (SI 1)	Bindegewebe, Gefäßendothel
433	1	3	3	Nerven (SI 1)	Bindegewebe, Gefäßendothel
436	1	3	3	---	Bindegewebe
437	1	1	1	---	Bindegewebe, Gefäßendothel
438	1	2	2	---	Bindegewebe
479	1	2	2	Nerven (SI 1)	Bindegewebe, Gefäßendothel
MW	1,11	1,89	2,33		
SD	0,47	0,90	1,64		
Median	1	2	2		
P ₂₅	1	1	1		
P ₇₅	1	3	3		

SI = Färbeindex, PP = Prozentsatz angefarbter Zellen, IRS = immunreaktiver Scorewert, --- = nicht vorhanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, P = Perzentile

Auf gut 5% der 18 Kryostatschnitte der Kontrollgewebe konnte keine Expression von CD44v10 auf dem Plattenepithel nachgewiesen werden. Bei 28% der Gewebeschnitte beträgt der IRS-Wert 1, bei über 33% 2 und bei fast 17% 3. Fast 6% der Schnitte haben einen IRS-Wert von 4, die restlichen 11% einen Wert von 6 (Median 2, Mittelwert 2,33, siehe Tabelle 26).

Abbildung 26: Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v10 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe



3.3. Statistische Auswertung der Ergebnisse

3.3.1. Unterschiede zwischen der Expression der einzelnen CD44-Spleißvarianten auf den Geweben der Tumorpatienten

Wie unter 2.2.4. beschrieben, setzten wir für die statistische Auswertung das Programm SPSS ein. Die auf den Geweben der Tumorpatienten ermittelten Ergebnisse (vgl. Tabellen 3 und 9) wurden in den folgenden Tabellen und Abbildungen zusammengestellt einschließlich der Mittelwerte mit Standardabweichung sowie der Medianwerte mit den Perzentilen 25% und 75%. Die weiteren statistischen Berechnungen wurden wegen der geringen Fallzahl der Paraffinschnitte ausschließlich mit den Kryostatschnitten durchgeführt

Tabelle 27 führt auf, in welchen Tabellen und Abbildungen die immunhistochemischen Daten von den Geweben der Tumorpatienten zusammengestellt sind.

Tabelle 27: Übersicht über die Dokumentation der Ergebnisse von den Geweben der Tumorpatienten

Spleißvariante	Karzinom im TZ	Epithel im TZ	Karzinom im TR	Epithel im TR	Epithel im Tf
CD44v3	Tab 11, Abb 7, Abb 8	Tab 11	Tab 12, Abb 9	Tab 12, Abb 9	Tab 13, Abb 10
CD44v5	Tab 15, Abb 12, Abb 13	Tab 15, Abb 13	Tab 16, Abb 14	Tab 16, Abb 14	Tab 17, Abb 15
CD44v7	Tab 19, Abb 17, Abb 18	Tab 19, Abb 18	Tab 20, Abb 19	Tab 20, Abb 19	Tab 21, Abb 20
CD44v10	Tab 23, Abb 22, Abb 23	Tab 23, Abb 23	Tab 24, Abb 24	Tab 24, Abb 24	Tab 25, Abb 25

TZ = Tumorzentrum, TR = Tumorrand, Tf = tumorfernes Gewebe, Tab = Tabelle, Abb = Abbildung

3.3.1.1. Mittlere immunreaktive Expressionswerte der CD44-Spleißvarianten auf den Geweben der Tumorpatienten

Die Tabellen 28 bis 30 zeigen in einer Zusammenfassung die mittleren immunreaktiven Scorewerte (Mittelwert und Median) aller untersuchten Spleißvarianten neben dem Anteil nachgewiesener Expression auf den einzelnen Geweben. Die mittleren IRS-Werte bzw. Medianwerte von CD44v5 waren am höchsten (fett markiert). In Tabelle 28 werden die Ergebnisse der Expression der Antikörpern CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den verschiedenen Geweben des Tumorzentrums miteinander verglichen; in Tabelle 29 auf den verschiedenen Geweben des Tumorrandes und in Tabelle 30 auf den verschiedenen Geweben des tumorfernen Bereichs.

Tabelle 28: Gegenüberstellung der Mittel- und Medianwerte der immunreaktiven Scores (IRS) der Expression von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 im Tumorzentrumgewebe

	CD44v3		CD44v5		CD44v7		CD44v10	
	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)
Ca (Kryostat)	18 / 18	5,17 5	18 / 18	9,39 10,5	17 / 18 (94%)	1,5 1	17 / 18 (94%)	1,94 2
Ca (Paraffin)	2 / 2	9 9	2 / 2	12 12	2 / 2	1 1	2 / 2	1 1
PE (Kryostat)	2 / 3 (67%)	1,5 1,5	2 / 3 (67%)	6 6	1 / 2 (50%)	0,5 0,5	1 / 2 (50%)	0,5 0,5
PE (Paraffin)	1 / 1	6 6	1 / 1	9 9	1 / 1	2 2	0 / 1	0 0
BGW (Kryostat)	0 / 18	---	0 / 18	---	0 / 18	---	0 / 18)	---
BGW (Paraffin)	0 / 1	---	0 / 2	---	0 / 2	---	0 / 2	---
Drüsen (Kryostat)	1 / 3 (33%)	---	2 / 4 (50%)	---	1 / 4 (25%)	---	2 / 4 (50%)	---
Drüsen (Paraffin)	1 / 2 (50%)	---	1 / 2 (50%)	---	1 / 2 (50%)	---	0 / 2	---
Muskel (Kryostat)	0 / 3	---	0 / 3	---	0 / 3	---	0 / 3	---
Muskel (Paraffin)	0 / 1	---	0 / 2	---	0 / 1	---	0 / 2	---
Nerven (Kryostat)	0 / 3	---	0 / 3	---	0 / 3	---	2 / 3 (66,6%)	---
Nerven (Paraffin)	0 / 1	---	0 / 2	---	0 / 2	---	0 / 2	---
Gefäße (Kryostat)	0 / 8	---	1 / 7 (14%)	---	0 / 7	---	1 / 7 (14%)	---
Gefäße (Paraffin)	1 / 2 (50%)	---	1 / 2 (50%)	---	0 / 2	---	0 / 3	---
Lymphge (Kryostat)	0 / 1	---	0 / 1	---	0 / 1	---	1 / 1 (100%)	---

Ca = Karzinom, PE = Plattenepithel, BGW = Bindegewebe, Drüsen = Drüsengewebe, Muskel = Muskulatur, Gefäße = Gefäßendothelien, Lymphge = Lymphgewebe, Kryostat = Kryostatschnitte, Paraffin = Paraffinschnitte, IRS = immunreaktiver Scorewert, MW = Mittelwert, M = Medianwert, --- = kein IRS-Wert berechnet

Tabelle 29: Gegenüberstellung der Mittel- und Medianwerte der immunreaktiven Scores (IRS) der Expression von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Tumorrangewebe

	CD44v3		CD44v5		CD44v7		CD44v10	
	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)
Ca (Kryostat)	7 / 7	4,71 6	7 / 7	10,71 12	5 / 7 (71%)	1,14 1	6 / 7 (86%)	1,71 2
Ca (Paraffin)	N = 0	---	N = 0	---	N = 0	---	N = 0	---
PE (Kryostat)	9 / 9	4,67 4	9 / 9	10 9	8 / 9 (89%)	2,44 1	9 / 9	2,11 2
PE (Paraffin)	1 / 1	4 4	1 / 1	6 6	1 / 1	1 1	1 / 1	1 1
BGW (Kryostat)	0 / 18	---	0 / 18	---	0 / 18	---	0 / 18	---
BGW (Paraffin)	0 / 2	---	0 / 2	---	0 / 2	---	0 / 2	---
Drüsen (Kryostat)	4 / 6 (67%)	---	4 / 6 (67%)	---	2 / 6 (33%)	---	3 / 6 (50%)	---
Drüsen (Paraffin)	N = 0	---	N = 0	---	N = 0	---	N = 0	---
Muskel (Kryostat)	0 / 6	---	0 / 7	---	0 / 6	---	0 / 6	---
Muskel (Paraffin)	1 / 1	---	1 / 1	---	0 / 1	---	0 / 1	---
Nerven (Kryostat)	0 / 5	---	0 / 5	---	0 / 4	---	4 / 4	---
Nerven (Paraffin)	0 / 2	---	0 / 2	---	0 / 2	---	0 / 2	---
Gefäße (Kryostat)	0 / 7	---	0 / 7	---	0 / 6	---	0 / 6	---
Gefäße (Paraffin)	2 / 2	---	2 / 2	---	0 / 2	---	0 / 2	---
Lymphge (Kryostat)	0 / 1	---	0 / 1	---	0 / 1	---	1 / 1 (100%)	---

Ca = Karzinom, PE = Plattenepithel, BGW = Bindegewebe, Drüsen = Drüsengewebe, Muskel = Muskulatur, Gefäße = Gefäßendothelien, Lymphge = Lymphgewebe, Kryostat = Kryostatschnitte, Paraffin = Paraffinschnitte, IRS = immunreaktiver Scorewert, MW = Mittelwert, M = Medianwert, --- = kein IRS-Wert berechnet

Tabelle 30: Gegenüberstellung der Mittel- und Medianwerte der immunreaktiven Scores (IRS) der Expression von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den tumorfernen Geweben

	CD44v3		CD44v5		CD44v7		CD44v10	
	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)
PE (Kryostat)	12 / 12	4,59 3,5	12 / 12	10 12	12 / 12	3,17 1	12 / 12	2,5 1,5
PE (Paraffin)	N = 0	---	N = 0	---	N = 0	---	N = 0	---
BGW (Kryostat)	0 / 18	---	0 / 18	---	0 / 18	---	0 / 18	---
BGW (Paraffin)	0 / 2	---	0 / 2	---	0 / 2	---	0 / 2	---

Fortsetzung von **Tabelle 30**

	CD44v3		CD44v5		CD44v7		CD44v10	
	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)
Drüsen (Kryostat)	6 / 8 (75%)	---	8 / 8 (89%)	---	4 / 8 (50%)	---	4 / 8 (50%)	---
Drüsen (Paraffin)	N = 0	---						
Muskel (Kryostat)	0 / 6	---	0 / 8	---	0 / 7	---	0 / 7	---
Muskel (Paraffin)	0 / 1	---	1 / 1	---	0 / 1	---	0 / 1	---
Nerven (Kryostat)	0 / 9	---	0 / 7	---	0 / 7	---	4 / 8 (50%)	---
Nerven (Paraffin)	N = 0	---						
Gefäße (Kryostat)	0 / 8	---	0 / 9	---	0 / 9	---	0 / 11	---
Gefäße (Paraffin)	2 / 2	---	2 / 2	---	0 / 2	---	0 / 2	---
Lymphozy (Kryostat)	1 / 1 (100%)	---	1 / 1 (100%)	---	0 / 1	---	0 / 1	---

Ca = Karzinom, PE = Plattenepithel, BGW = Bindegewebe, Drüsen = Drüsengewebe, Muskel = Muskulatur, Gefäße = Gefäßendothelien, Lymphozy = Lymphozytäre Infiltrate, Kryostat = Kryostatschnitte, Paraffin = Paraffinschnitte, IRS = immunreaktiver Scorewert, MW = Mittelwert, M = Medianwert
 --- = kein IRS-Wert berechnet

3.3.1.2. Statistischer Vergleich der PP- und immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Geweben der Tumorpatienten

Wie in zwei vorangegangenen Dissertationen an den gleichen Gewebeproben ermittelt wurde, waren die Scores der Färbeintensität (SI) von p53, mdm-2 und bcl-2 [112] sowie des α -Makroglobulin-Rezeptors [10] weniger repräsentativ für die Expression als die PP- bzw. die IRS-Werte, in denen die SI-Werte enthalten sind. Aus diesem Grund beschränkten wir uns in dieser Arbeit auf die PP- bzw. IRS-Werte, um den statistischen Vergleich durchzuführen.

Tabelle 31 fasst die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der IRS-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Epithelien in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation (Tumorzentrum, Tumorrand und tumorferner Bereich) zusammen (die auffälligsten aber nicht signifikanten Werte sind unterstrichen).

Es ließen sich **keine signifikanten Unterschiede zwischen den Scorewerten der unterschiedlichen Lokalisationen** nachweisen: Die vier untersuchten Expressionen von CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10 zeigten auf den verschiedenen Geweben keine signifikanten Unterschiede. Die größten wenn auch nicht signifikanten Unterschiede bestanden zwischen der Expression von CD44v5 auf dem Karzinom des Tumorzentrums und auf dem Karzinomrest im

Tumorrandgewebe ($p = 0,059$) sowie zwischen der Expression von CD44v7 auf dem Karzinom des Tumorzentrums und auf dem Plattenepithel des tumorfernen Gewebes ($p = 0,089$):

Tabelle 31: Vergleich der immunreaktiven Scorewerte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Epithelien unterschiedlicher Gewebebereiche

Wilcoxon-Test		CD44- v3	CD44- v5	CD44- v7	CD44- v10
Vergleich der IRS-Werte von	N	p =	p =	p =	p =
Ca im TZ mit PE im TZ	18 2	0,180	0,317	0,317	1,000
Ca im TZ mit PE im TR	18 9	0,153	0,317	0,196	0,314
Ca im TZ mit PE im Tf	18 12	0,929	0,257	<u>0,089</u>	1,000
Ca im TZ mit Ca im TR	18 7	0,309	<u>0,059</u>	0,705	0,518
Ca im TR mit PE im TR	7 9	nicht	genü	gend	Fälle
Ca im TR mit PE im Tf	7 12	0,343	0,285	0,180	0,914
PE im TZ mit PE im TR	2 9	keine	Statis	tik ber	echnet
PE im TZ mit PE im Tf	2 12	nicht	genü	gend	Fälle
PE im TR mit PE im Tf	9 12	0,317	1,000	0,581	0,891

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = nicht entartetes Epithel, TZ = Gewebe des Tumorzentrums, TR = Gewebe des Tumorrandes, Tf = tumorfernes Gewebe, N = Anzahl

Tabelle 32 fasst die statistischen Ergebnisse des Vergleichs der PP-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf dem Plattenepithelkarzinom und nicht entarteten Epithel in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation (Tumorzentrum, Tumorrand und tumorfernen Bereich) zusammen (die beiden auffälligsten Werte sind unterstrichen).

Beim statistischen Vergleich der PP-Werte ist eine sehr ähnliche Tendenz wie für die IRS-Werte zu erkennen. Die PP-Werte von CD44v5 auf dem Karzinom im Tumorzentrum sind höher als im Randbereich ($p = 0,059$) bzw. die Scorewerte von CD44v7 auf dem Karzinom des Tumorzentrums sind höher als auf dem normalen Plattenepithel des Tumorrandes ($p = 0,083$). Die beiden Unterschiede sind aber statistisch nicht signifikant.

In Tabelle 33 sind die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der immunreaktiven Scorewerte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und den normalen Epithelien im Tumorzentrum zusammengefasst.

Tabelle 32: Vergleich der PP-Werte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Epithelien unterschiedlicher Gewebereiche

Wilcoxon-Test		CD44- v3	CD44- v5	CD44- v7	CD44- v10
Vergleich der PP-Werte von	N	p =	p =	p =	p =
Ca im TZ mit PE im TZ	18 2	0,180	0,317	0,317	1,000
Ca im TZ mit PE im TR	18 9	0,236	0,655	0,739	0,096
Ca im TZ mit PE im Tf	18 12	0,470	0,099	<u>0,083</u>	0,665
Ca im TZ mit Ca im TR	18 7	0,194	<u>0,059</u>	0,317	0,739
Ca im TR mit PE im TR	7 9	nicht	genü	gend	Fälle
Ca im TR mit PE im Tf	7 12	0,257	0,414	0,180	1,000
PE im TZ mit PE im TR	2 9	keine	Statis	tik ber	echnet
PE im TZ mit PE im Tf	2 12	nicht	genü	gend	Fälle
PE im TR mit PE im Tf	9 12	0,157	0,102	0,705	0,783

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = nicht entartetes Epithel, TZ = Gewebe des Tumorzentrums, TR = Gewebe des Tumorrandes, Tf = tumorfernes Gewebe, PP = Prozentsatz angefarbter Zellen, N = Anzahl

Tabelle 33: Vergleich der immunreaktiven Scorewerte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und den Epithelien des Tumorzentrums (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test

Vergleich der IRS-Werte von	N	auf dem	Relation	p =
CD44v5 mit CD44v3	18 18	Ca im TZ	v5 > v3	<u>0,000</u>
CD44v3 mit CD44v7	18 18	Ca im TZ	v3 > v7	<u>0,000</u>
CD44v3 mit CD44v10	18 18	Ca im TZ	v3 > v10	<u>0,001</u>
CD44v5 mit CD44v7	18 18	Ca im TZ	v5 > v7	<u>0,000</u>
CD44v5 mit CD44v10	18 18	Ca im TZ	v5 > v10	<u>0,000</u>
CD44v7 mit CD44v10	18 18	Ca im TZ	v7 = v10	0,191
CD44v5 mit CD44v3	2 2	PE im TZ	v5 = v3	0,180
CD44v3 mit CD44v7	2 2	PE im TZ	v3 = v7	0,317
CD44v3 mit CD44v10	2 2	PE im TZ	v3 = v10	0,317
CD44v5 mit CD44v7	2 2	PE im TZ	v5 = v7	0,180
CD44v5 mit CD44v10	2 2	PE im TZ	v5 = v10	0,180
CD44v7 mit CD44v10	2 2	PE im TZ	v7 = v10	1,000

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = nicht entartetes Epithel, TZ = Gewebe des Tumorzentrums, N = Anzahl

Die IRS-Werte von CD44v5 auf den Plattenepithelkarzinomen im Tumorzentrum sind signifikant größer als die Werte von -v3, -v7 und -v10. Die IRS-Werte von CD44v3 sind signifikant größer als die Werte von -v7 und -v10. Zwischen den IRS-Werten von CD44v7 und -v10 gibt es keinen signifikanten Unterschied. Es ließen sich keine signifikante Unterschiede zwischen den immunreaktiven Scorewerten der einzelnen CD44v-Antikörper auf dem normalen Epithel im Tumorzentrum nachweisen.

Tabelle 34 fasst die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der PP-Werte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Epithelien im Tumorzentrum zusammen.

Tabelle 34: Vergleich der PP-Werte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und den Epithelien des Tumorzentrums (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test

Vergleich der PP-Werte von	N	auf dem	Relation	p =
CD44v3 mit CD44v5	18 18	Ca im TZ	v3 < v5	0,001
CD44v3 mit CD44v7	18 18	Ca im TZ	v3 > v7	0,001
CD44v3 mit CD44v10	18 18	Ca im TZ	v3 > v10	0,042
CD44v5 mit CD44v7	18 18	Ca im TZ	v5 > v7	0,000
CD44v5 mit CD44v10	18 18	Ca im TZ	v5 > v10	0,000
CD44v7 mit CD44v10	18 18	Ca im TZ	v7 = v10	0,236
CD44v3 mit CD44v5	2 2	PE im TZ	v3 = v5	0,317
CD44v3 mit CD44v7	2 2	PE im TZ	v3 = v7	0,317
CD44v3 mit CD44v10	2 2	PE im TZ	v3 = v10	0,317
CD44v5 mit CD44v7	2 2	PE im TZ	v5 = v7	0,180
CD44v5 mit CD44v10	2 2	PE im TZ	v5 = v10	0,180
CD44v7 mit CD44v10	2 2	PE im TZ	v7 = v10	1,000

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = nicht entartetes Epithel, TZ = Gewebe des Tumorzentrums, N = Anzahl

Die PP-Werte von CD44v5 auf dem Plattenepithelkarzinom im Tumorzentrum sind signifikant größer als die Werte von -v3, -v7 und -v10. Die PP-Werte von CD44v3 sind signifikant größer als die Werte von -v7 und -v10. Zwischen den PP-Werten von CD44v7 und -v10 gibt es keine signifikanten Unterschiede. Ebenfalls lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den PP-Werten der einzelnen CD44v-Antikörper auf dem normalen Epithel im Tumorzentrum nachweisen.

Tabelle 35 fasst die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der IRS-Werte der Antikörper CD44v3,-v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Epithelien im Tumorrand zusammen.

Tabelle 35: Vergleich der immunreaktiven Scorewerte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und den Epithelien des Tumorrandes (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test

Vergleich der IRS-Werte von	N	auf dem	Relation	p =
CD44v5 mit CD44v3	7 7	Ca im TR	v5 > v3	<u>0,017</u>
CD44v3 mit CD44v7	7 7	Ca im TR	v3 > v7	<u>0,027</u>
CD44v3 mit CD44v10	7 7	Ca im TR	v3 > v10	<u>0,034</u>
CD44v5 mit CD44v7	7 7	Ca im TR	v5 > v7	<u>0,016</u>
CD44v5 mit CD44v10	7 7	Ca im TR	v5 > v10	<u>0,018</u>
CD44v7 mit CD44v10	7 7	Ca im TR	v7 = v10	<u>0,336</u>
CD44v5 mit CD44v3	9 9	PE im TR	v5 > v3	<u>0,011</u>
CD44v3 mit CD44v7	9 9	PE im TR	v3 > v7	<u>0,011</u>
CD44v3 mit CD44v10	9 9	PE im TR	v3 > v10	<u>0,034</u>
CD44v5 mit CD44v7	9 9	PE im TR	v5 > v7	<u>0,006</u>
CD44v5 mit CD44v10	9 9	PE im TR	v5 > v10	<u>0,008</u>
CD44v7 mit CD44v10	9 9	PE im TR	v7 = v10	0,609

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = nicht entartetes Epithel, TR = Gewebe des Tumorrandes, N = Anzahl

Auch im Tumorrandbereich sind die IRS-Werte von CD44v5 auf dem Plattenepithelkarzinom signifikant größer als die Werte von CD44v3, -v7 und -v10. Ebenso sind die IRS-Werte von CD44v3 auf dem Plattenepithelkarzinom signifikant größer als die Werte von -v7 und -v10. Zwischen den IRS-Werten von CD44v7 und -v10 ist kein signifikanter Unterschied festzustellen. Gleiches gilt für die IRS-Werte der CD44-Antikörper auf dem normalen Plattenepithel im Tumorrandbereich.

Tabelle 36 fasst die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der PP-Werte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Epithelien im Tumorrand zusammen.

Auch die PP-Werte von CD44v5 auf den Plattenepithelkarzinomen des Tumorrandes sind signifikant größer als die Werte von -v3, -v7 und -v10. Während die PP-Werte von CD44v3 auf den Plattenepithelkarzinomen signifikant größer sind als die Werte von -v7, besteht im Gegensatz zu den IRS-Werten zwischen den PP-Werten von CD44v3 und -v10 kein (signifikanter) Unter-

schied. Zwischen den PP-Werten von CD44v7 und -v10 ist, wie bei den IRS-Werten, auf dem Plattenepithelkarzinom und auf den normalen Plattenepithelien im Tumorrandbereich ebenfalls kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Tabelle 36: Vergleich der PP-Werte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und den Epithelien des Tumorrandes (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test

Vergleich der PP-Werte von	N	auf dem	Relation	p =
CD44v5 mit CD44v3	7 7	Ca im TR	v5 > v3	0,024
CD44v3 mit CD44v7	7 7	Ca im TR	v3 > v7	0,023
CD44v3 mit CD44v10	7 7	Ca im TR	v3 = v10	0,279
CD44v5 mit CD44v7	7 7	Ca im TR	v5 > v7	0,016
CD44v5 mit CD44v10	7 7	Ca im TR	v5 > v10	0,033
CD44v7 mit CD44v10	7 7	Ca im TR	v7 = v10	0,059
CD44v5 mit CD44v3	9 9	PE im TR	v5 > v3	0,016
CD44v3 mit CD44v7	9 9	PE im TR	v3 > v7	0,008
CD44v3 mit CD44v10	9 9	PE im TR	v3 = v10	0,317
CD44v5 mit CD44v7	9 9	PE im TR	v5 > v7	0,007
CD44v5 mit CD44v10	9 9	PE im TR	v5 > v10	0,006
CD44v7 mit CD44v10	9 9	PE im TR	v7 = v10	0,206

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = nicht entartetes Epithel, TZ = Gewebe des Tumorzentrums, TR = Gewebe des Tumorrandes, Tf = tumorfernes Gewebe, N = Anzahl

Tabelle 37 fasst die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der IRS-Werte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf dem normalen Epithel im tumorfernen Bereich zusammen.

Tabelle 37: Vergleich der immunreaktiven Scorewerte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Epithelien des tumorfernen Bereiches (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test

Vergleich der IRS-Werte von	N	auf dem	Relation	p =
CD44v5 mit CD44v3	12 12	PE im Tf	v5 > v3	0,003
CD44v3 mit CD44v7	12 12	PE im Tf	v3 = v7	0,072
CD44v3 mit CD44v10	12 12	PE im Tf	v3 = v10	0,065
CD44v5 mit CD44v7	12 12	PE im Tf	v5 > v7	0,002
CD44v5 mit CD44v10	12 12	PE im Tf	v5 > v10	0,002
CD44v7 mit CD44v10	12 12	PE im Tf	v7 = v10	0,263

PE = nicht entartetes Plattenepithel, Tf = tumorferner Bereich, N = Anzahl

Die immunreaktiven Scorewerte von CD44v5 auf den tumorfernen Epithelien sind signifikant größer als die Werte von CD44v3, -v7 und -v10. Bei der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Scorewerten von CD44v3, -v7 und -v10 auf dem tumorfernen Epithel feststellen.

Tabelle 38 fasst die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der PP-Werte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den normalen Epithelien im tumorfernen Bereich zusammen.

Tabelle 38: Vergleich der PP-Werte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Epithelien des tumorfernen Bereiches (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test

Vergleich der PP-Werte von	N	auf dem	Relation	p =
CD44v5 mit CD44v3	12 12	PE im Tf	v5 > v3	0,004
CD44v3 mit CD44v7	12 12	PE im Tf	v3 = v7	0,096
CD44v3 mit CD44v10	12 12	PE im Tf	v3 = v10	0,262
CD44v5 mit CD44v7	12 12	PE im Tf	v5 > v7	0,003
CD44v5 mit CD44v10	12 12	PE im Tf	v5 > v10	0,002
CD44v7 mit CD44v10	12 12	PE im Tf	v7 = v10	0,832

PE = nicht entartetes Epithel, Tf = tumorferner Bereich, N = Anzahl

Die PP-Werte von CD44v5 auf dem tumorfernen Epithel sind signifikant größer als die Werte von CD44v3, -v7 und -v10. Zwischen den PP-Werten von CD44v3, -v7 und -v10 besteht kein signifikanter Unterschied.

3.3.1.3. Untersuchung einer Beziehung zwischen der CD44-Expression auf den Geweben der Tumorpatienten zum Tumorstadium und Differenzierungsgrad der Tumoren

3.3.1.3.1. Korrelation zwischen der CD44-Expression und dem Tumorstadium

Tabelle 39 fasst die statistischen Ergebnisse des Vergleichs der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf Plattenepithelkarzinomen des Stagings I oder II und nicht entarteten Plattenepithelien von Patienten mit einem Karzinom des Stagings I und II (siehe auch Tabelle 9) mit den entsprechenden Werten auf Plattenepithelkarzinomen und Epithelien von Patienten mit einem Karzinom des Stagings IVA unterschiedlicher Lokalisation zusammen.

Tabelle 39: Vergleich der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 bei unterschiedlichen Tumorstadien (nur auf Kryostatschnitten) (auffälligster Wert unterstrichen): U-Test

Vergleich der IRS-Werte von		CD44- v3	CD44- v5	CD44- v7	CD44- v10
auf dem	N	p =	p =	p =	p =
Ca des Stagings I oder II mit Ca des Stagings IVA jeweils aus dem TM-Zentrum	5 9	0,591	1,000	0,255	0,395
Ca des Stagings I oder II mit Ca des Stagings IVA jeweils aus dem TM-Rand	2 3	0,414	0,221	0,543	0,197
PE von Patienten mit Ca des Stagings I oder II mit PE von Patienten mit Ca des Stagings IVA jeweils aus dem TM-Zentrum	0 2		keine zuwen	Statist ig Fäll	ik, e
PE von Patienten mit Ca des Stagings I oder II mit PE von Patienten mit Ca des Stagings IV jeweils aus dem TM-Rand	3 5	0,751	0,327	0,539	<u>0,055</u>
PE von Patienten mit Ca des Stagings I oder II mit PE von Patienten mit Ca des Stagings IVA jeweils aus dem tumorfernen Bereich	4 6	0,238	0,631	0,268	0,137

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = Plattenepithel, TM = Tumor, Staging: UICC-Stadieneinteilung [200], N = Anzahl

Im Tumorrandbereich waren die IRS-Werte der CD44-Antikörper auf dem Epithel des Stagings I oder II größer als die Werte der CD44-Antikörper auf dem Epithel des Stagings IVA.

Bei der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ sind die IRS-Werte unserer CD44-Antikörper auf den Geweben des Tumorstagings I oder II nicht signifikant höher als bei den Geweben des Tumorstagings IVA. Allerdings sind die immunreaktiven Scorewerte auf dem normalen Plattenepithel im Tumorrandbereich bei Patienten des Tumorstagings I oder II deutlich, wenn auch nicht signifikant verschieden von den Werten der Patienten mit einem Tumorstaging IVA.

Tabelle 40 fasst die statistischen Ergebnisse des Vergleichs der PP-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf Plattenepithelkarzinomen des Stagings I oder II und nicht entarteten Plattenepithelien von Patienten mit einem Karzinom des Stagings I oder II (siehe auch Tabelle 9) mit den entsprechenden Werten auf Plattenepithelkarzinomen und Epithelien von Patienten mit einem Karzinom des Stagings IVA unterschiedlicher Gewebebereiche zusammen.

Bei der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ lässt sich kein signifikanter Unterschied bei den PP-Werten der untersuchten CD44-Antikörper auf den Geweben der Tumorpatienten des Stagings I oder II und den Geweben der Tumorpatienten mit dem Staging IVA feststellen.

Tabelle 40: Vergleich der PP-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 bei unterschiedlichen Tumorstadien (nur auf Kryostatschnitten): U-Test

Vergleich der PP-Werte von		CD44- v3	CD44- v5	CD44- v7	CD44- v10
auf dem	N	p =	p =	p =	p =
Ca des Stagings I oder II mit Ca des Stagings IVA jeweils aus dem TM-Zentrum	5 9	0,582	0,882	0,173	0,367
Ca des Stagings I oder II mit Ca des Stagings IVA jeweils aus dem TM-Rand	2 3	0,182	0,221	0,543	0,197
PE von Patienten mit Ca des Stagings I oder II mit PE von Patienten mit Ca des Stagings IVA jeweils aus dem TM-Rand	3 5	1,000	0,495	0,631	0,121
PE von Patienten mit Ca des Stagings I oder II mit PE von Patienten mit Ca des Stagings IVA jeweils aus dem tumorfernen Bereich	4 6	0,226	0,236	0,738	0,289

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = Plattenepithel, Staging: UICC-Stadieneinteilung [200], N = Anzahl

3.3.1.3.2. Korrelation zwischen der CD44-Expression und dem Differenzierungsgrad der Tumoren

Tabelle 41 fasst die statistischen Ergebnisse des Vergleichs der Höhe der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf Plattenepithelkarzinomen des Gradings 2 und nicht entarteten Plattenepithelien von Patienten mit einem Karzinom des Gradings 2 (siehe auch Tabelle 9) mit den entsprechenden Werten auf Plattenepithelkarzinomen und nicht entarteten Epithelien von Patienten mit einem Karzinom des Gradings 3 unterschiedlicher Gewebereiche zusammen.

Tabelle 41: Vergleich der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 bei unterschiedlichem Tumorgrading (nur auf den Kryostatschnitten)

U-Test		CD44- v3	CD44- v5	CD44- v7	CD44- v10
Vergleich der IRS-Werte von	N	p =	p =	p =	p =
Ca des Gradings 2 mit Ca des Gradings 3, jeweils aus dem TM-Zentrum	9 9	0,755	0,535	0,556	0,286
Ca des Gradings 2 mit Ca des Gradings 3 jeweils aus dem TM-Rand	4 3	1,000	0,307	0,554	0,459
PE von Patienten mit einem Ca des Gradings 2 mit PE von Patienten mit einem Ca des Gradings 3, jeweils aus dem Tumorzentrum	0 2		Keine zuwen	Statist ig Fäll	ik, e
PE der Patienten mit einem Ca des Gradings 2 mit PE der Patienten mit einem Ca des Gradings 3, jeweils aus dem Tumorrand	5 4	0,159	0,592	0,521	0,059 PE 2 > PE 3
PE der Patienten mit einem Ca des Gradings 2 mit PE der Patienten mit einem Ca des Gradings 3, jeweils aus dem tumorfernen Bereich	7 5	0,141	0,238	0,296	0,002 PE 3 > PE 2

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = Plattenepithel, Grading = Tumorgrading [200], N = Anzahl PE 2 / PE 3 = Scorewerte auf dem Epithel von Patienten mit einem Karzinom des Gradings 2 bzw. 3

Deutliche Unterschiede der immunreaktiven Scorewerte zwischen den einzelnen Antikörpern in Abhängigkeit vom Tumorgrading und der Tumorlokalisation konnten nur für den Antikörper CD44v10 auf dem nicht maligne entarteten Plattenepithel nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für den Bereich des Tumorrandes als auch für den tumorfernen Bereich.

Die immunreaktiven Scorewerte von CD44v10 auf dem tumorfernen Plattenepithel der Patienten mit einem Tumorgrading 2 sind signifikant kleiner als die Werte auf den tumorfernen Plattenepithelien der Patienten mit einem Tumorgrading 3 ($p = 0,002$). Für den Tumorrandbereich gelten beinahe umgekehrte (aber nicht signifikante) Verhältnisse. Hier sind die IRS-Werte auf den Plattenepithelien der Patienten mit Tumoren des Gradings 2 größer ($p = 0,059$).

Tabelle 42 fasst die statistischen Ergebnisse des Vergleichs der PP-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf Plattenepithelkarzinomen des Gradings 2 und normalen Plattenepithelien von Patienten mit einem Karzinom des Gradings 2 (siehe auch Tabelle 9) mit den entsprechenden Werten auf Plattenepithelkarzinomen und normalen Epithelien von Patienten mit einem Karzinom des Gradings 3 unterschiedlicher Lokalisation zusammen.

Tabelle 42: Vergleich der PP-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 bei unterschiedlichem Tumorgrading (auf den Kryostat- und Paraffinschnitten)

U-Test		CD44- v3	CD44- v5	CD44- v7	CD44- v10
Vergleich der PP-Werte von	N	p =	p =	p =	p =
Ca des Gradings 2 mit Ca des Gradings 3, jeweils aus dem TM-Zentrum	9 9	0,310	0,452	0,654	0,317
Ca des Gradings 2 mit Ca des Gradings 3 jeweils aus dem TM-Rand	4 3	0,445	0,307	0,554	0,459
PE von Patienten mit einem Ca des Gradings 2 mit PE von Patienten mit einem Ca des Gradings 3, jeweils aus dem Tumorzentrum	0 2		Keine zuwen	Statist ig Fäll	ik, e
PE der Patienten mit einem Ca des Gradings 2 mit PE der Patienten mit einem Ca des Gradings 3, jeweils aus dem Tumorrand	5 4	0,343	0,777	0,345	<u>0,079</u> PE 2 > PE 3
PE der Patienten mit einem Ca des Gradings 2 mit PE der Patienten mit einem Ca des Gradings 3, jeweils aus dem tumorfernen Bereich	7 5	0,130	0,051	0,600	<u>0,003</u> PE 3 > PE 2

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = Plattenepithel, Grading = Tumorgrading [200], N = Anzahl
PE 2 / PE 3 = Scorewerte auf dem Epithel von Patienten mit einem Karzinom des Gradings 2 bzw. 3

Wie bereits in Tabelle 41 für die immunreaktiven Scorewerte gezeigt, finden sich deutliche Unterschiede der PP-Werte der CD44-Expression in Abhängigkeit vom Tumorgrading nur beim Antikörper CD44v10.

Die PP-Werte von CD44v10 auf den tumorfernen Plattenepithelien der Patienten mit einem Karzinom des Tumorgradings 2 sind signifikant größer als die entsprechenden PP-Werte auf den tumorfernen Plattenepithelien der Patienten mit einem Tumorgrading 3. Umgekehrte aber nicht signifikante Differenzen ($p = 0,079$) gelten auf den Plattenepithelien im Tumorrandbereich; hier sind die PP-Werte bei den Patienten mit Tumoren des Gradings 3 größer.

In Tabelle 43 wurde im Exakten Test nach Fisher (vgl. 2.2.4.) untersucht, ob es einerseits einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des Tumorstagings (Staging I / II gegenüber Staging III / IV) und andererseits der Tumordifferenzierung (G2 gegenüber G3) und der Häufigkeit einer hohen oder niedrigeren CD44-Expression gibt.

Tabelle 43: Vergleich der Häufigkeit einer höheren CD44-Expression (IRS-Werte ab Medianwert) mit unterschiedlichem Staging und dem Tumorgrading [200]¹ (Tabelle 9)

Exakter Test nach Fisher (vgl. 2.2.4.)	CD44- v3	CD44- v5	CD44- v7	CD44- v10
	p =	p =	p =	p =
CD44-Expression bei unterschiedlichem Staging im				
Karzinom des Tumorzentrums	0.613	0.642	1.000	0.429
Plattenepithel des Tumorzentrums	1.000	1.000	1.000	1.000
Karzinom des Tumorrandgewebes	0.429	1.000	1.000	0.429
Plattenepithel des Tumorrandgewebes	1.000	1.000	0.300	0.475
Plattenepithel des tumorfernen Gewebes	1.000	1.000	1.000	0.545
CD44-Expression bei unterschiedlichem Grading im				
Karzinom des Tumorzentrums	1.000	0.653	1.000	1.000
Plattenepithel des Tumorzentrums	1.000	1.000	1.000	1.000
Karzinom des Tumorrandgewebes	1.000	0.486	1.000	0.486
Plattenepithel des Tumorrandgewebes	0.444	1.000	1.000	0.167
Plattenepithel des tumorfernen Gewebes	0.242	0.293	0.417	0.015

1) vgl. Tabellen 11 bis 13, 15 bis 17, 19 bis 21, 23 bis 25, fett = die CD44v10-Expression auf dem Plattenepithel im tumorfernen Bereich ist nicht vom Tumorgrading abhängig

3.3.1.4. Untersuchung einer prognostischen Bedeutung der CD44-Expression durch einen Vergleich mit dem weiteren Krankheitsverlauf in Kaplan-Meier-Kurven

3.3.1.4.1. Vergleich der CD44-Expression auf dem Karzinom im Tumorzentrum mit dem weiteren Krankheitsverlauf in Kaplan-Meier-Kurven

In Tabelle 44 wird erfasst, ob und nach welcher Zeit (in Monaten) nach der Gewebeentnahme ein Rezidiv bei den Tumorpatienten eingetreten ist. Für diese statistische Auswertung werden die IRS-Werte der einzelnen CD44-Spleißvarianten (auf dem Karzinom im Tumorzentrum) bis zum Medianwert auf den Wert 0 und die IRS-Werte \geq als der Medianwert auf den Wert 1 reduziert (vg. 2.2.4.).

Tabelle 44: Rezidivfreie Zeit bis zum Eintreten des ersten Krankheitsrückfalls nach Entnahme des untersuchten Gewebes zum Nachweis der CD44-Expression

Patienten-Code	Krankheitsrückfall (zensierte und unzensierte Fälle *)	Rezidivfreie Zeit (Monate)	CD44v3 Ca im TZ (M = 6), vgl. Tab.11	CD44v5 Ca im TZ (M = 10,5), vgl. Tab.15	CD44v7 Ca im TZ (M = 1) vgl. Tab.19	CD44v10 Ca im TZ (M = 1,5), vgl. Tab.23
005	ja (1)	7	1	1	1	1
007	nein (0)	11	0	0	1	0
013	ja (1)	20	1	1	1	0
086	ja (1)	5	0	0	1	1
128	nein (0)	86	1	1	1	0
148	nein (0)	120	0	0	1	0
158	nein (0)	60	0	0	0	0
175	ja (1)	7	0	0	1	1
180	ja (1)	7	0	0	1	0
209	ja (1)	20	1	1	1	0
271	nein (0)	25	0	0	1	0
382	ja (1)	6	0	1	1	1
385	ja (1)	8	1	1	1	1
412	nein (0)	55	1	1	1	1
460	ja (1)	3	1	0	1	1
461	nein (0)	23	1	0	1	1
466	ja (1)	3	0	0	1	1
473	nein (0)	70	1	1	1	1
020	ja (1)	7	1	1	1	0
198	nein (0)	150	1	1	1	0

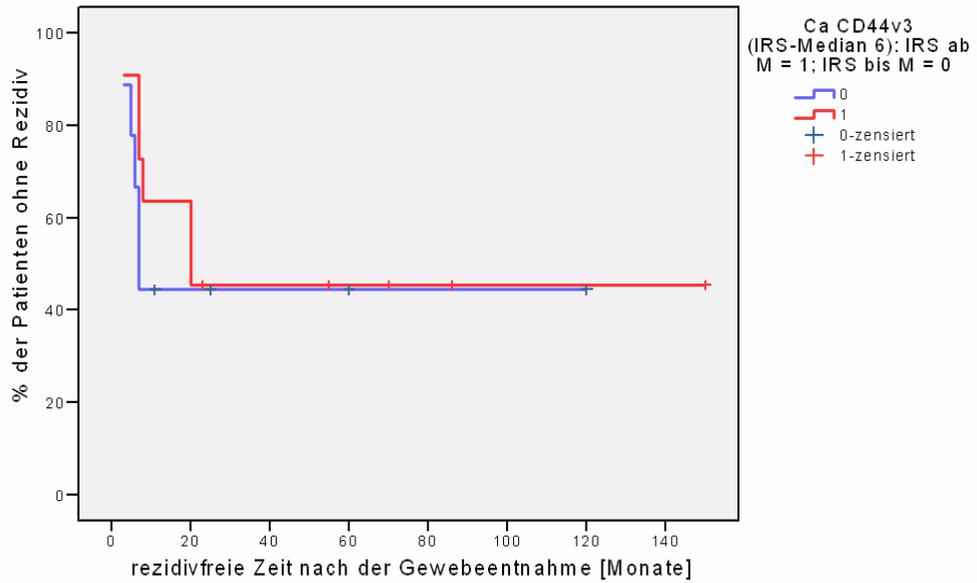
Bewertung nach dem Medianwert (M) der immunreaktiven Scorewerte:

IRS bis zum (<) Medianwert = 0, IRS ≥ Medianwert = 1, Ca = Karzinom, TZ = Tumorzentrum,

* zensierte Fälle (Status): 0 = bis zum Ende der möglichen Beobachtungszeit trat kein Krankheitsrückfall ein, unzensierte Fälle: 1 = während der Beobachtungszeit trat ein Krankheitsrückfall ein

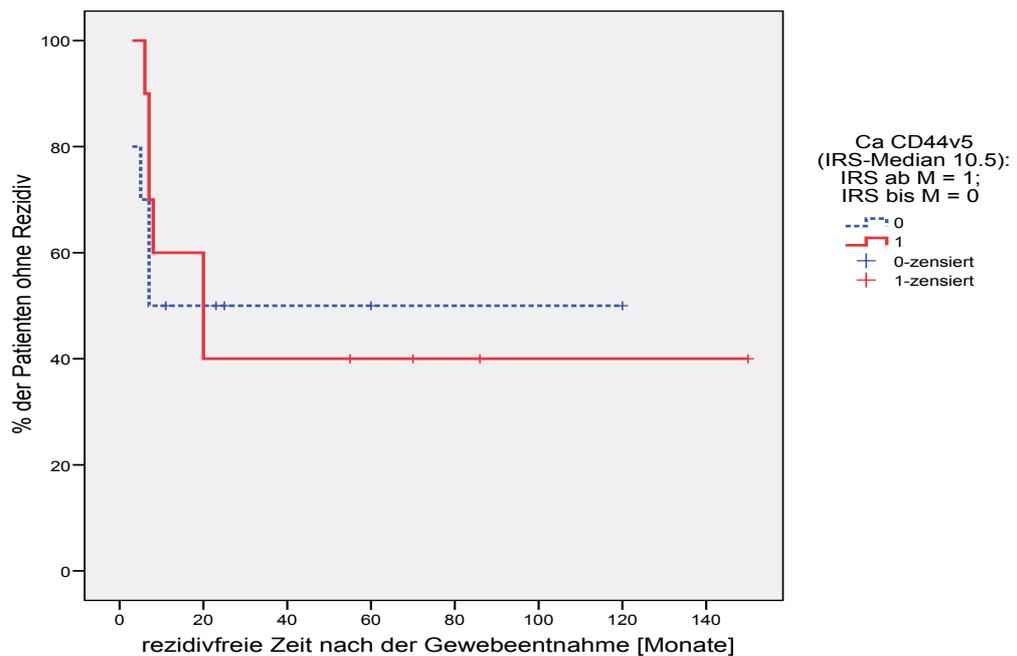
In Abbildung 27 sind die Kaplan-Meier-Kurven der Expression von CD44v3 auf dem Karzinomgewebe des Tumorzentrums grafisch erfasst. Der Unterschied der beiden Kurven ist nicht signifikant (Log Rank $p = 0.593$). Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs betrug bei der höheren CD44v3-Expression (N = 7) 74 ± 21 Monate, bei einer geringeren CD44v3-Expression (N = 13) 56 ± 19 Monate.

Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v3 auf dem Karzinomgewebe (Ca) im Tumorzentrum



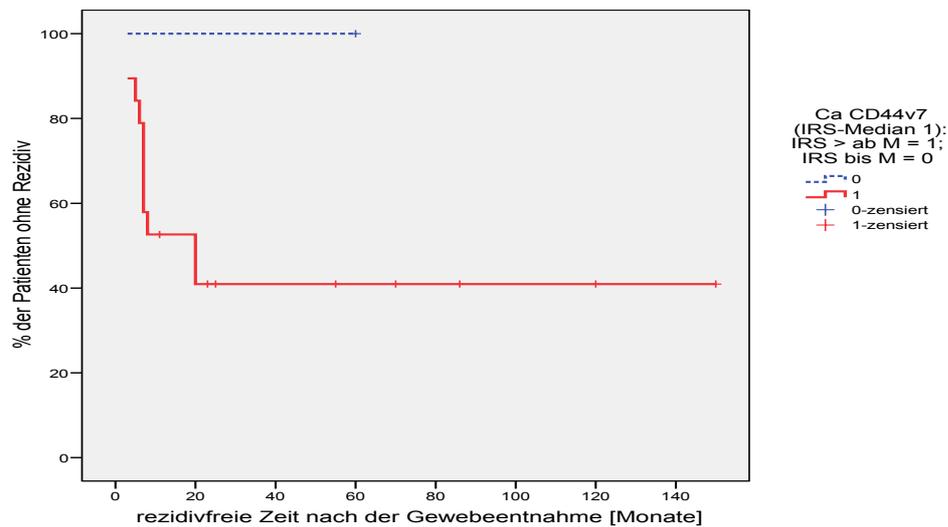
In Abbildung 28 sind die Kaplan-Meier-Kurven der Expression von CD44v5 auf dem Karzinomgewebe des Tumorzentrums grafisch erfasst. Der Unterschied der beiden Kurven ist nicht signifikant (Log Rank $p = 0.909$). Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs betrug bei der höheren CD44v5-Expression ($N = 10$) 67 ± 22 Monate, bei einer geringeren CD44v5-Expression ($N = 10$) 63 ± 18 Monate.

Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v5 auf dem Karzinomgewebe (Ca) des Tumorzentrums



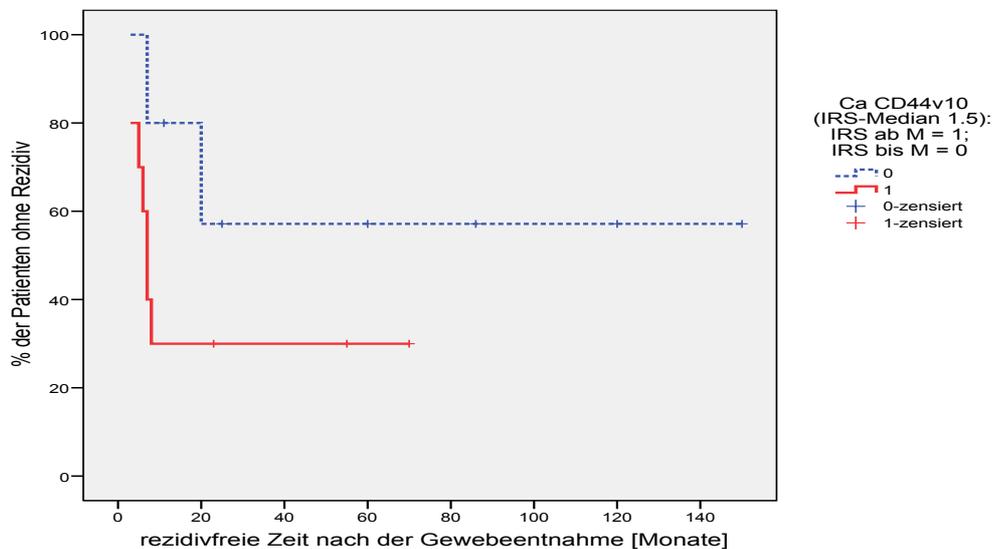
In Abbildung 29 sind die Kaplan-Meier-Kurven der Expression von CD44v7 auf dem Karzinomgewebe des Tumorzentrums grafisch erfasst. Der Unterschied der beiden Kurven ist nicht signifikant (Log Rank $p = 0.343$). Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs konnte nicht berechnet werden.

Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v7 auf dem Karzinomgewebe (Ca) des Tumorzentrums



In Abbildung 30 sind die Kaplan-Meier-Kurven der Expression von CD44v10 auf dem Karzinomgewebe des Tumorzentrums grafisch erfasst. Der Unterschied beider Kurven nähert sich der Signifikanz (Log Rank $p = 0.074$). Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs betrug bei der höheren CD44v10-Expression (N = 10) 25 ± 9 Monate, bei einer fehlenden oder geringen Expression von CD44v10 (N = 10) 92 ± 22 Monate.

Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v10 auf dem Karzinomgewebe (Ca) des Tumorzentrums



Insgesamt ergab die Auswertung der Kaplan-Meier-Kurven (Abbildungen 27-30), dass nur die Kurven der Expression von CD44v10 im Karzinomzentrum eine prognostische Aussage zulassen: bei Patienten mit einer fehlenden oder geringen CD44v10-Expression (bei insgesamt niedrigen CD44v10-Scorewerten) war die rezidivfreie Zeit nahezu signifikant verlängert.

3.3.1.4.2. Vergleich der CD44-Expression auf dem Karzinomrest im Tumorrandgewebe mit dem weiteren Krankheitsverlauf in Kaplan-Meier-Kurven

In Tabelle 45 wird erfasst, ob und nach welcher Zeit (in Monaten) nach der Gewebeentnahme ein Rezidiv bei den Tumorpatienten eingetreten ist. Für diese statistische Auswertung werden die IRS-Werte der einzelnen CD44-Spleißvarianten (auf dem Karzinomrest im Tumorrandgewebe) bis zum Medianwert auf den Wert 0 und die IRS-Werte \geq als der Medianwert auf den Wert 1 reduziert (vg. 2.2.4.).

Tabelle 45: Rezidivfreie Zeit bis zum Eintreten des ersten Krankheitsrückfalls nach Entnahme des untersuchten Gewebes zum Nachweis der CD44-Expression

Patienten-Code	Krankheitsrückfall (zensierte und unzensierte Fälle *)	Rezidivfreie Zeit [Monate]	CD44v3 Ca im TR (M = 6), vgl. Tab.12	CD44v5 Ca im TR (M = 12), vgl. Tab.16	CD44v7 Ca im TR (M = 1) vgl. Tab.20	CD44v10 Ca im TR (M = 2), vgl. Tab.24
005	ja (1)	7	--	--	--	--
007	nein (0)	11	0	1	0	0
013	ja (1)	20	--	--	--	--
086	ja (1)	5	1	1	0	0
128	nein (0)	86	--	--	--	--
148	nein (0)	120	0	0	1	0
158	nein (0)	60	--	--	--	--
175	ja (1)	7	--	--	--	--
180	ja (1)	7	1	0	1	1
209	ja (1)	20	--	--	--	--
271	nein (0)	25	--	--	--	--
382	ja (1)	6	--	--	--	--
385	ja (1)	8	--	--	--	--
412	nein (0)	55	--	--	--	--
460	ja (1)	3	0	0	1	1
461	nein (0)	23	1	1	1	1
466	ja (1)	3	1	1	1	1
473	nein (0)	70	--	--	--	--
020	ja (1)	7	--	--	--	--
198	nein (0)	150	--	--	--	--

Bewertung nach dem Medianwert (M) der immunreaktiven Scorewerte:

IRS bis zum (<) Medianwert = 0, IRS \geq Medianwert = 1, Ca = Karzinom, TR = Tumorrand, -- = TR ohne Ca, * zensierte Fälle (Status): 0 = bis zum Ende der möglichen Beobachtungszeit trat kein Krankheitsrückfall ein, unzensierte Fälle: 1 = während der Beobachtungszeit trat ein Krankheitsrückfall ein

Abbildung 31 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven der Expression von CD44v3 auf dem Karzinomgewebe des Tumorrandes (N = 7 Patienten mit Karzinom im Tumorrand). Der Unterschied der beiden Kurven ist nicht signifikant (Log Rank p = 0.424). Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs betrug bei der höheren CD44v3-Expression (N = 4) 10 ± 4 Monate, bei einer fehlenden oder geringen Expression von CD44v3 (N = 3) 81 ± 32 Monate.

Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v3 auf dem Karzinomrestgewebe (Ca) im chirurgischen Tumorrand (TR)

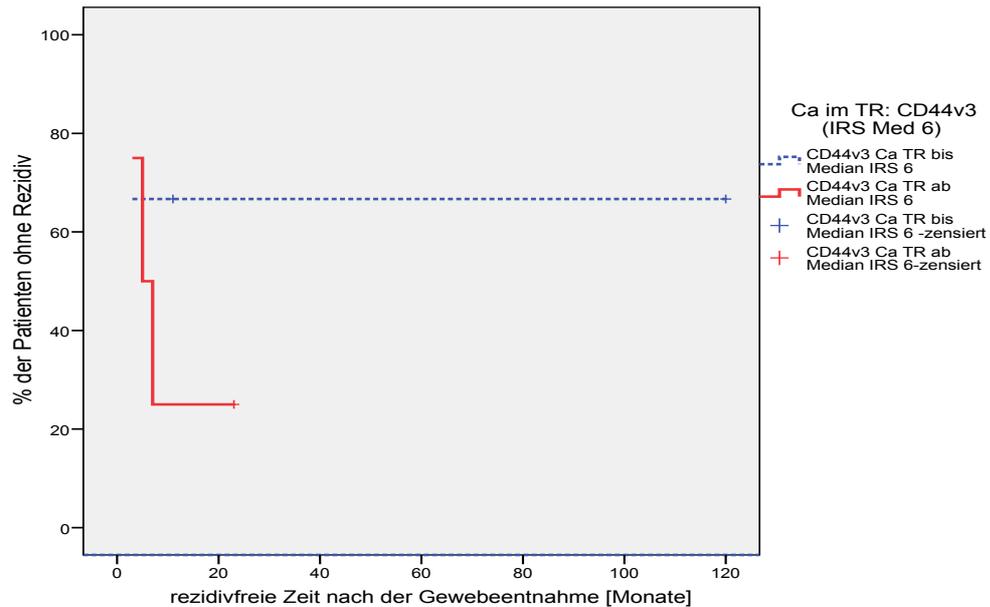


Abbildung 32 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven der Expression von CD44v5 auf dem Karzinomgewebe des Tumorrandes (N = 7 Patienten mit Karzinom im Tumorrand). Die beiden Kaplan-Meier-Kurven unterscheiden sich nicht signifikant (Log Rank p = 0.798). Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs war bei der höheren CD44v5-Expression (N = 4) mit 14 ± 5 Monaten kürzer als bei einer geringen Expression von CD44v5 (N = 3) mit 43 ± 31 Monaten.

Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v5 auf dem Karzinomrestgewebe (Ca) im chirurgischen Tumorrand (TR)

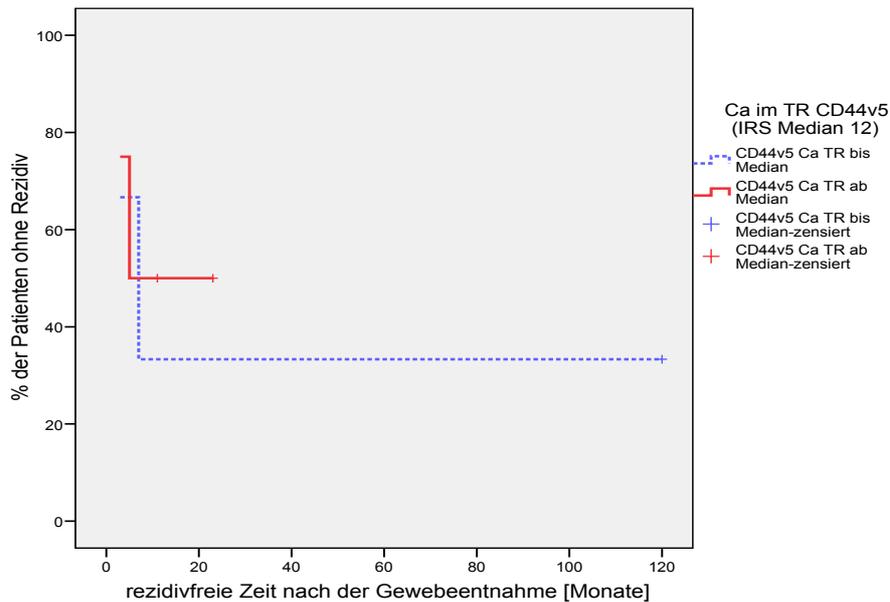


Abbildung 33 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven der Expression von CD44v7 auf dem Karzinomgewebe des Tumorrandes (N = 7 Patienten mit Karzinom im Tumorrand). Die beiden Kaplan-Meier-Kurven unterscheiden sich nicht signifikant (Log Rank $p = 0.800$). Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs war bei der höheren CD44v7-Expression (N = 5) mit 51 ± 25 Monaten deutlich länger als bei einer geringen Expression von CD44v7 (N = 2) mit 8 ± 2 Monaten.

Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v7 auf dem Karzinomrestgewebe (Ca) im chirurgischen Tumorrand (TR)

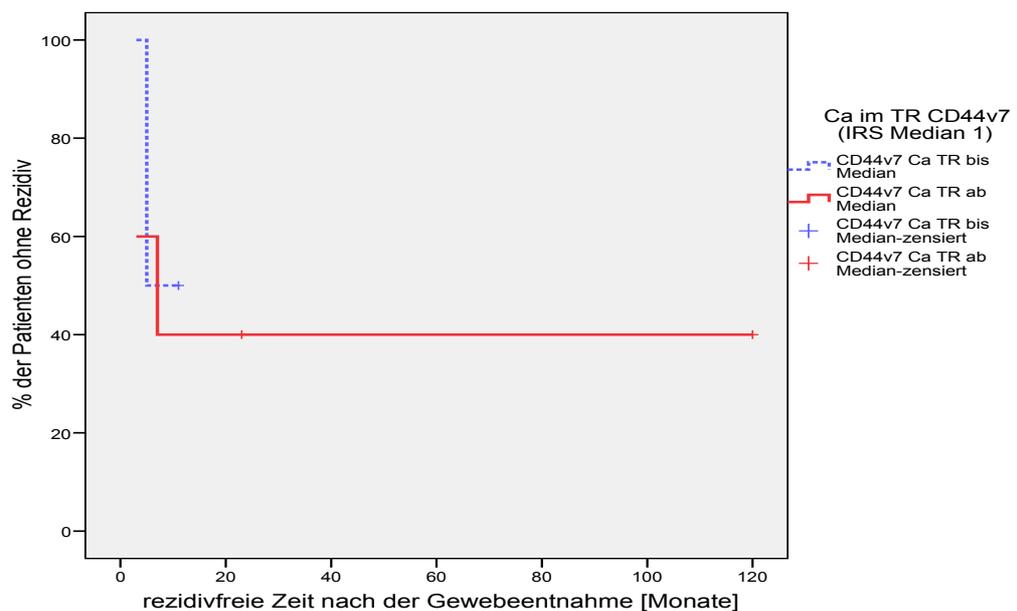
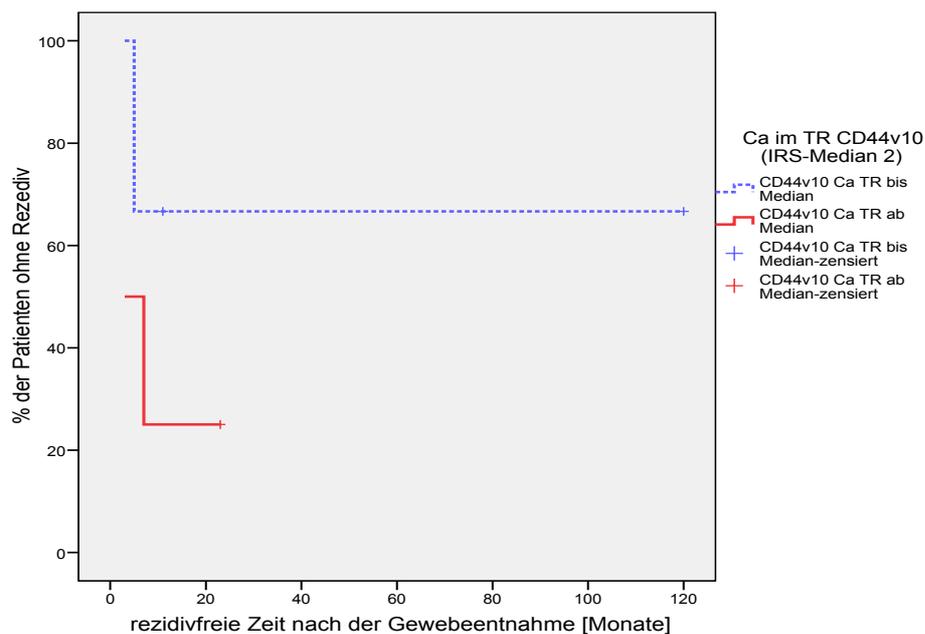


Abbildung 34 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven der Expression von CD44v10 auf dem Karzinomgewebe des Tumorrandes (N = 7 Patienten mit Karzinom im Tumorrand). Die beiden Kaplan-Meier-Kurven sind nicht signifikant verschieden (Log Rank p = 0.313). Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs war bei der höheren CD44v10-Expression (N = 4) mit 9 ± 4 Monaten deutlich kürzer als bei einer geringen Expression von CD44v10 (N = 3) mit 82 ± 31 Monaten.

Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v10 auf dem Karzinomrestgewebe (Ca) im chirurgischen Tumorrand (TR)



Die Kaplan-Meier-Kurven (Abbildungen 31 - 34) zeigen, dass bei Patienten mit höheren immunreaktiven Scorewerten von CD44v3, CD44v5 und CD44v10 im Karzinomrest des Tumorrandes die rezidivfreie Zeit reduziert war. Dies war bei den Kaplan-Meier-Kurven der Expression von CD44v7 umgekehrt.

3.3.2. Unterschiede zwischen der Expression der einzelnen CD44-Spleißvarianten auf den Geweben der Kontrollpatienten

Tabelle 46 führt auf, in welchen Tabellen und Abbildungen die immunhistochemischen Daten der Gewebe der Kontrollpatienten zusammengestellt sind.

Tabelle 46: Übersicht über die Dokumentation der Ergebnisse von den Geweben der Kontrollpatienten

Spleißvariante	Epithel der Kontrollgewebe
CD44v3	Tab 14, Abb 11
CD44v5	Tab 18, Abb 16
CD44v7	Tab 22, Abb 21
CD44v10	Tab 26, Abb 26

3.3.2.1. Mittlere immunreaktive Expressionswerte der CD44-Spleißvarianten auf den Kontrollgeweben

Die Tabellen 47 und 48 fassen die Ergebnisse der Anfärbung der Kontrollgewebe mit den Antikörpern CD44v3, -v5, -v7 und -v10 zusammen (markante Werte fett gedruckt).

Tabelle 47: Vergleich der Expression der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Kontrollgeweben

	CD44v3		CD44v5		CD44v7		CD44v10	
	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	IRS (MW) (M)
PE (Kryostat)	18 / 18	5 4	18 / 18	9,22 10,5	16 / 18 (89%)	2,61 1	17 / 18 (94%)	2,33 2
BGW (Kryostat)	0 / 20	---	0 / 20	---	0 / 20	---	0 / 20	---
Drüsen (Kryostat)	4 / 4	---	4 / 4	---	0 / 4	---	0 / 4	---
Muskel (Kryostat)	0 / 3	---	0 / 3	---	0 / 3	---	0 / 3	---
Nerven (Kryostat)	0 / 8	---	0 / 10	---	0 / 9	---	6 / 9 (66%)	---
Gefäße (Kryostat)	0 / 10	---	0 / 10	---	0 / 10	---	0 / 10	---

PE = Plattenepithel, BGW = Bindegewebe, Drüsen = Drüsengewebe, Muskel = Muskulatur, Gefäße = Gefäßendothelien, Kryostat = Kryostatschnitte, IRS = immunreaktiver Scorewert, MW = Mittelwert, M = Medianwert, --- = kein IRS-Wert berechnet

Tabelle 48: Vergleich der Expression der PP-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Kontrollgeweben (markante Werte fett gedruckt)

	CD44v3		CD44v5		CD44v7		CD44v10	
	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	PP (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	PP (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	PP (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	PP (MW) (M)
PE (Kryostat)	18 / 18	2,22 2	18 / 18	3,17 3,5	16 / 18 (89%)	1,5 1	17 / 18 (94%)	1,89 2
BGW (Kryostat)	0 / 20	---	0 / 20	---	0 / 20	---	0 / 20	---
Drüsen (Kryostat)	4 / 4	---	4 / 4	---	0 / 4	---	0 / 4	---
Muskel (Kryostat)	0 / 3	---	0 / 3	---	0 / 3	---	0 / 3	---

Fortsetzung von **Tabelle 48**

	CD44v3		CD44v5		CD44v7		CD44v10	
	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	PP (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	PP (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	PP (MW) (M)	Anzahl pos. Schnitte / Schnitte insgesamt	PP (MW) (M)
Nerven (Kryostat)	0 / 8	---	0 / 10	---	0 / 9	---	6 / 9 (66%)	---
Gefäße (Kryostat)	0 / 10	---	0 / 10	---	0 / 10	---	0 / 10	---

PE = Plattenepithel, BGW = Bindegewebe, Drüsen = Drüsengewebe, Muskel = Muskulatur, Gefäße = Gefäßendothelien, Kryostat = Kryostatschnitte, PP = prozentualer Anteil der Antikörper-positiven Zellen, MW = Mittelwert, M = Medianwert, --- = kein IRS-Wert berechnet

3.3.2.2. Statistischer Vergleich der PP- und der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Kontrollgeweben (auf Kryostatschnitten)

Tabelle 49 fasst die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelien der Kontrollgewebe zusammen.

Tabelle 49: Vergleich der IRS-Werte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelien der Kontrollgewebe (nur Kryostatschnitte): Wilcoxon-Test

Vergleich der IRS-Werte von	N	auf dem	p =
CD44v3 mit CD44v5	18 18	Plattenepithel	0,000
CD44v3 mit CD44v7	18 18	Plattenepithel	0,004
CD44v3 mit CD44v10	18 18	Plattenepithel	0,016
CD44v5 mit CD44v7	18 18	Plattenepithel	0,000
CD44v5 mit CD44v10	18 18	Plattenepithel	0,000
CD44v7 mit CD44v10	18 18	Plattenepithel	0,778

N = Anzahl

Die IRS-Werte von CD44v5 auf den Plattenepithelien der Kontrollgewebe sind signifikant größer als die Werte von CD44v3, -v7 und -v10. Die Scorewerte von CD44v3 sind signifikant größer als die Werte von CD44v7 und -v10. Zwischen CD44v7 und -v10 gibt es keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 50 fasst die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der PP-Werte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf dem normalen Plattenepithel der Kontrollgewebe zusammen.

Tabelle 50: Vergleich der PP-Werte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf dem normalen Plattenepithel der Kontrollgewebe: Wilcoxon-Test

Vergleich der PP-Werte von	N	auf dem	p =
CD44v3 mit CD44v5	18 18	Plattenepithel	0,001
CD44v3 mit CD44v7	18 18	Plattenepithel	0,012
CD44v3 mit CD44v10	18 18	Plattenepithel	0,281
CD44v5 mit CD44v7	18 18	Plattenepithel	0,000
CD44v5 mit CD44v10	18 18	Plattenepithel	0,004
CD44v7 mit CD44v10	18 18	Plattenepithel	0,117

PP = prozentualer Anteil der Antikörper-positiven Zellen, N = Anzahl

Die PP-Werte von CD44v5 auf den Plattenepithelien der Kontrollgewebe sind ebenfalls signifikant größer als die Werte von CD44v3, -v7 und -v10. Die Scorewerte von CD44v3 sind signifikant größer als die Werte von CD44v7 aber nicht als die Werte von CD44v10. Zwischen CD44v10 und -v7 gibt es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

3.3.3. Statistischer Vergleich der Expression der einzelnen CD44-Spleiß-varianten zwischen den Tumor- und den Kontrollgeweben

3.3.3.1. Statistischer Vergleich der PP- und immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Geweben der Tumorpatienten mit den PP- und immunreaktiven Scorewerten von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Kontrollgeweben (auf Kryostatschnitten)

Tabelle 51 fasst die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der IRS-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf Plattenepithelkarzinomen und normalen Epithelien unterschiedlicher Lokalisation mit den Plattenepithelien der Kontrollgewebe zusammen.

Tabelle 51: Vergleich der immunreaktiven Scorewerte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Plattenepithelien im Tumorzentrum, Tumorrand und tumorfernen Bereich mit den Plattenepithelien der Kontrollgewebe (markanter Wert unterstrichen)

U-Test		CD44v3	CD44v5	CD44v7	CD44v10
Vergleich der IRS-Werte von	N	p =	p =	p =	p =
Ca im TZ mit PE der Gewebe der Kontrollpatienten	18 18	0,987	0,905	0,475	0,331
PE im TZ mit PE der Gewebe der Kontrollpatienten	2 18	0,109	0,183	0,145	<u>0,069</u>
Ca im TR mit PE der Gewebe der Kontrollpatienten	7 18	1,000	0,427	0,122	0,801
PE im TR mit PE der Gewebe der Kontrollpatienten	9 18	0,938	0,782	0,957	0,557
PE im Tf mit PE der Gewebe der Kontrollpatienten	12 18	0,764	0,595	0,805	0,754

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = Plattenepithel, TZ = Tumorzentrum, TR = Tumorrand, Tf = tumorfernes Gewebe, N = Anzahl

Signifikante Unterschiede zwischen den immunreaktiven Scorewerten der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Plattenepithelien der Gewebe der Tumorpatienten und den Plattenepithelien der Kontrollgewebe konnten nicht nachgewiesen werden. Allerdings waren die immunreaktiven Scorewerte von CD44v10 auf dem normalen Plattenepithel des Tumorzentrums merklich kleiner als auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe ($p = 0,069$).

Tabelle 52 fasst die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der PP-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf Plattenepithelkarzinomen und normalem Epithel im Tumorzentrum, Tumorrand und tumorfernen Bereich mit dem Plattenepithel der Kontrollgewebe zusammen.

Tabelle 52: Vergleich der PP-Werte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Plattenepithelien im Tumorzentrum, Tumorrand und tumorfernen Bereich mit den Plattenepithelien der Kontrollgewebe (markanter Wert unterstrichen)

U-Test		CD44v3	CD44v5	CD44v7	CD44v10
Vergleich der PP-Werte von	N	p =	p =	p =	p =
Ca im TZ mit PE der Gewebe der Kontrollpatienten	18 18	0,658	0,891	0,700	0,368
PE im TZ mit PE der Gewebe der Kontrollpatienten	2 18	0,113	0,160	0,154	<u>0,065</u>
Ca im TR mit PE der Gewebe der Kontrollpatienten	7 18	0,777	0,427	0,139	0,678
PE im TR mit PE der Gewebe der Kontrollpatienten	9 18	0,979	0,655	0,867	0,210
PE im Tf mit PE der Gewebe der Kontrollpatienten	12 18	0,947	0,256	0,632	0,359

Ca = Plattenepithelkarzinom, PE = Plattenepithel, TZ = Tumorzentrum, TR = Tumorrand, Tf = tumorfernes Gewebe, PP = prozentualer Anteil der Antikörper-positiven Zellen, N = Anzahl,

Signifikante Unterschiede zwischen den PP-Werten der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Plattenepithelien der Gewebe der Tumorpatienten und den Plattenepithelien der Kontrollgewebe konnten nicht nachgewiesen werden. Allerdings waren die PP-Werte (wie bereits die immunreaktiven Scorewerte) von CD44v10 auf dem normalen Plattenepithel des Tumorzentrums deutlich kleiner als auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe ($p = 0,065$).

4. Diskussion

Fabricius et al [45 bis 47] hatten in unserer Klinik umfangreiche Untersuchungen über die Expressionsmuster und die Bedeutung der Spleißvariante CD44v6 auf primären Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, in deren regionalen Lymphknotenmetastasen und in nicht-metastatischen tumornahen Lymphknoten dieser Patienten durchgeführt. Dabei fanden Fabricius et al bei ihrer immunhistochemischen Untersuchung von 60 Patienten eine signifikante Minderexpression von CD44v6 auf G3-Tumoren gegenüber der Expression auf G1-Tumoren [47]. An einem weiteren Patientenkollekt von 20 Patienten konnte ein signifikant höherer immunreaktiver Scorewert der Expression von CD44v6 in den karzinombefallenen Lymphknoten als im Primärtumor (Grading 2 und 3; Grading 1 nicht untersucht) nachgewiesen werden [46]. Weitere Untersuchungen zeigten in 205 von 370 histopathologisch als tumorfrei geltenden Lymphknoten (von 41 Tumorpatienten) CD44v6-positive Zellen. Diese wurden als Ausdruck einer Aktivierung des Immunsystems interpretiert, da die Patienten mit den CD44v6-positiven Zellen weniger und spätere Rezidive hatten. Die Ergebnisse waren nicht signifikant [45].

In Anlehnung und Fortführung dieser Studie wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10 auf den gleichen Plattenepithelkarzinomen sowie den Geweben des chirurgischen Tumorrandes und des tumorfernen Gewebes im Kopf-Hals-Bereich (Tabellen 3 und 9) immunhistochemisch untersucht und mit der Expression der gleichen CD44-Spleißvarianten auf Normalgeweben aus den entsprechenden Bereichen (Tabellen 4 und 10) verglichen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, auf welchen Geweben die einzelnen CD44-Spleißvarianten exprimiert werden, ob es Unterschiede der Expression der untersuchten Spleißvarianten im Karzinom des Tumorzentrums oder Tumorrandes, im Epithel des Tumorzentrums, Tumorrandes oder tumorfernen Bereiches bzw. in den Kontrollgeweben gibt und welche Bedeutung der Nachweis der hier untersuchten CD44-Spleißvarianten hat.

4.1. Patientendaten und Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich und Vergleich mit den entsprechenden Daten der Kontrollpatienten

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Gewebe von 15 Männern und 5 Frauen mit Karzinomen (Tabelle 9 und Abbildung 5) und zur Kontrolle Gewebe von 9 männlichen und 11 weiblichen Patienten (Tabelle 10 und Abbildung 6). Die Altersverteilung und die geschlechtsspezifische Zusammensetzung der Tumorgruppe korreliert gut mit den Ergebnissen der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, wonach Männer durchschnittlich im Alter von 61 bzw.

Frauen im Alter von 69 Jahren an Tumoren im Kopf-Hals-Bereich erkranken, Männer dabei dreimal häufiger als Frauen [106].

Die Tumorgruppe und die Kontrollgruppe konnten bezüglich Alter und Geschlecht nicht abgeglichen werden. Die Zusammensetzung der Kontrollgruppe erfolgte in Abhängigkeit der individuell erforderlichen Operationsnotwendigkeit. Von dem bei diesen diagnostischen und / oder therapeutischen Eingriffen entnommenen Gewebe konnte, mit Einverständnis der Patienten, ein kleines Stückchen für unsere Untersuchungen bereitgestellt werden.

Die allgemein anerkannten Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome, den Alkohol- und Tabakkonsum [22], ermittelten wir im Zuge der Auswertung von Krankenakten der beiden Patientengruppen und bewerteten diese nach den Kriterien von Arndt et al [5]. Von den Krebspatienten rauchten und tranken 15% nicht. 70% rauchten Tabak und 60% tranken regelmäßig Alkohol. 86% der Raucher konsumierten jeweils 20 Zigaretten oder mehr pro Tag und 70% der Alkoholkonsumenten nahmen täglich mehr als 70 g Alkohol zu sich (Tabelle 9).

Nur von 9 der 20 Kontrollpatienten waren die Rauch- und Trinkgewohnheiten bekannt. Von diesen 9 Patienten trank keiner regelmäßig Alkohol und 6 Patienten (66%) rauchten nicht. Die 3 rauchenden Patienten konsumierten jeweils etwa 20 Zigaretten täglich (Tabelle 10). Die Unterschiede zwischen der Tumor- und der Kontrollgruppe lassen sich aufgrund unzureichender Daten statistisch nicht berechnen, aber ein geringerer regelmäßiger Alkoholkonsum ist für die Kontrollgruppe gesichert. Wenn alle Patienten der Kontrollgruppe, deren Daten nicht bekannt sind, rauchen würden, bestünde die Kontrollgruppe ebenfalls aus 70% Rauchern wie die Patienten der Tumorgruppe.

Andre et al [4] hatten in ihren Untersuchungen der Risikofaktoren von 299 Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor in Übereinstimmung mit unseren Patienten ähnliche Daten der Trink- und Rauchgewohnheiten ermittelt. Die Autoren konnten bei Rauchern, die mehr als 20 Zigaretten pro Tag rauchen, ein 13-mal höheres Krebsrisiko als bei Nichtrauchern feststellen sowie bei Trinkern von mehr als 1,5 Litern Alkohol pro Tag ein 34-mal höheres Risiko als bei Nichttrinkern. Von den Tumorpatienten in dieser Arbeit rauchten 5 von den 14 Rauchern (35%) etwa 20 Zigaretten und 7 (50%) sogar mehr als eine Schachtel Zigaretten täglich. Ebenfalls passend ist die Tatsache, dass 9 (70%) von den 12 Alkohol trinkenden Tumorpatienten täglich mehr als 70g Alkohol zu sich nahmen (Tabelle 9).

4.2. Bedeutung des Adhäsionsmoleküls CD44 in der Progression und Metastasierung von Kopf-Hals-Tumoren

Die Tumorzellen unterscheiden sich oft erheblich in der Art und Ausprägung ihrer Adhäsionsmoleküle (Punkt 1.3. und Abbildungen 1 bis 3) von ihren nicht transformierten Vorläuferzellen. Diese Änderungen werden von diversen Autoren für die Progression, Invasion und Metastasierung unterschiedlicher Tumoren verantwortlich gemacht [72 bis 75, 88, 116, 118, 129 bis 131, 138, 184, 209].

Zahlreiche Autoren hatten seit 1995 in umfangreichen Studien die Expression von CD44 und von CD44-Spleißvarianten auf Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich mit sehr gegensätzlichen Ergebnissen untersucht. Im Vordergrund vieler Untersuchungen stand eine Downregulierung der Expression von CD44 und der CD44-Spleißvarianten CD44v2 bis CD44v10 bei einer Tumorprogression, bei einer Entdifferenzierung oder bei einer Metastasierung der Kopf-Hals-Tumoren. Dagegen wiesen Piffko et al [141, 142] keinen Zusammenhang zwischen der Tumorprogression und den Scores von CD44v4, CD44v5, CD44v6 und CD44v9 nach. Dies Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Heider et al [79] überein. In unterschiedlich differenzierten Tumoren stellten sie keine veränderten CD44v6-Scores fest. Auch Stoll [178] konnte keine unterschiedliche CD44v7-Expression bei unterschiedlich differenzierten Tumoren nachweisen. Dagegen war in den Untersuchungen von Fonseca et al [51] bei abnehmender Differenzierung des Tumors die Expression von CD44v3, CD44v4, CD44v5 und CD44v6 erhöht und Stoll [178] fand eine zunehmende CD44v9-Expression bei abnehmender Tumordifferenzierung.

In bisher publizierten Studien wurde die Expression der CD44-Spleißvarianten neben dem Tumorzentrumgewebe nur im unmittelbaren Tumorrandgebiet und bisher in keiner Studie in einem vom Tumorzentrum entfernteren Gewebe desselben Patienten untersucht. Für die vorliegende Arbeit standen zum Nachweis der Spleißvarianten CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10 neben dem Tumorzentrum der chirurgische Tumorrand und ein ca. 1 1/2 bis 3 cm vom Tumorrand entferntes Gewebe desselben Patienten zur Verfügung. 7 der 20 chirurgischen Tumorrandgewebe enthielten noch Karzinomreste. Eine geringere und eine höhere Expression der 4 untersuchten Spleißvarianten auf den 20 Karzinomen des Tumorzentrums sowie auf den Karzinomresten im Tumorrand wurde in Kaplan-Meier-Kurven (vgl. Punkt 2.2.4.) hinsichtlich einer prognostischen Aussage untersucht: Punkt 3.3.1.4., Abbildungen 27 bis 30 (Karzinom im Tumorzentrum) sowie Abbildungen 31 bis 34 (Karzinomreste im Tumorrand).

Tabelle 53 zeigt eine Zusammenstellung der Studien, in denen bisher das Standardmolekül CD44s und die einzelnen CD44-Spleißvarianten auf Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich und ihre Beziehung zum Grading, zur Metastasierung und / oder zur Tumorprogression untersucht wurden.

Tabelle 53: Expression von CD44s (CD44-Standard) und der CD44-Spleißvarianten auf Geweben von HNSCC-Tumoren, insbesondere ihre Bedeutung für die Tumorprogression oder Metastasierung¹

Arbeiten (N = Gewebe von N Patienten)			
CD44s und CD44-Spleißvarianten	vorwiegend abnehmende CD44-Expression bei zunehmender Tumorprogression	annähernd gleich bleibende CD44-Expression oder wechselnde Expression (↓ oder ↑) bei Tumorprogression	Vorwiegend zunehmende CD44-Expression bei zunehmender Tumorprogression
CD44s	Herold-Mende et al (N = 55) [80] Spafford et al (N = 70) [171] Seelentag et al (N = 37) [163] Masuda et al (N = 38) [120] Carinci et al (N = 25) [31] Bankfalvi et al (N = 93) [8] Gonzalez-Moles et al (N = 56) [64] Kosunen et al (N = 138) [102, 103]	Hyckel et al (N = 25) [84] Hesse (N = 25) [81] Hudson et al (N = 13) [83] Kuo et al (N = 62) [108] Piffko et al (N = 100) [141]	
CD44v2	Kanke et al (N = 89) [94]	Bloor et al (N = 24); RT-PCR [17]	
CD44v3	Seelentag et al (N = 37) [163] Répássy et al (N = 12) [149] Bankfalvi et al (N = 93) [8]	Hyckel et al (N = 25) [84] Hesse (N = 25) [81] Hudson et al (N = 13) [83] Fonseca et al (N = 56) [51] Bloor et al (N = 24); RT-PCR [17] Reategui et al (N = 19) [145]	Wang et al (N = 9) [194]
CD44v4	Oliveira et al (N = 11) [136] Stoll (N = 107) [178] Bankfalvi et al (N = 93) [8]	Seelentag et al (N = 37) [163] Hudson et al (N = 13) [83] Piffko et al (N = 100) [141]	Fonseca et al (N = 56) [51]
CD44v5	Herold-Mende et al (N = 55) [80] Hudson et al (N = 13) [83] Oliveira et al (N = 11) [136] Stoll (N = 107) [178]	Piffko et al (N = 100) [142] Kuo et al (N = 62) [108] Piffko et al (N = 100) [141] Seelentag et al (N = 37) [163] Ostwald et al (N = 54) Bankfalvi et al (N = 93) [8] Bloor et al (N = 24); RT-PCR [17]	Fonseca et al (N = 56) [51]
CD44v6	Hyckel et al (N = 25) [84] Hesse (N = 25) [81] Spafford et al (N = 70) [171] Herold-Mende et al (N = 55) [80] Fabricius et al (N = 60) [47] Bahar et al (N = 38) [7] Kunishi et al (N = 25) [107] Répássy et al (N = 12) [149] Kanke et al (N = 89) [93] Stoll (N = 107) [178] Güler et al (N = 93) [71] Garcia-Montesinos-Perea et al (N = 79) [58]	Piffko et al (N = 100) [142] Heider et al (N = 49) [79] Seelentag et al (N = 37) [163] Hudson et al (N = 13) [83] Ostwald et al (N = 54) [138] Kuo et al (N = 62) [108] Piffko et al (N = 100) [141] van Hal et al (N = 277) [189] Bankfalvi et al (N = 93) [8] Xu et al (N = 151) [203]	Fonseca et al (N = 56) [51]

Fortsetzung von **Tabelle 53**

Arbeiten (N = Gewebe von N Patienten)			
CD44s und CD44-Spleißvarianten	vorwiegend abnehmende CD44-Expression bei zunehmender Tumorprogression	annähernd gleich bleibende CD44-Expression oder wechselnde Expression (↓ oder ↑) bei Tumorprogression	Vorwiegend zunehmende CD44-Expression bei zunehmender Tumorprogression
CD44v7	Herold-Mende et al (N = 55) [80] Kunishi et al (N = 62) [107] Kuo et al (N = 62) [108] Stoll et al (N = 91) [177] Stoll (N = 107) [178] Bankfalvi et al (N = 93) [8]	Piffko et al (N = 100) [141]	
CD44v8	Herold-Mende et al (N = 55) [80] Hudson et al (N = 13) [83] Kuo et al (N = 62) [108]		
CD44v9	Stoll et al (N = 91) [177] Sato et al (N = 120) [158] Stoll (N = 107) [178] Bankfalvi et al (N = 93) [8]	Seelentag et al (N = 37) [163] Piffko et al (N = 100) [141]	Ue et al (N = 40) [187]
CD44v10	Herold-Mende et al (N = 55) [80]		

1) Die Zeilen der in dieser Arbeit untersuchten Spleißvarianten wurden markiert.

4.3. Bewertung der immunreaktiven Scorewerte (IRS, vgl. Tabelle 8) der vier untersuchten Spleißvarianten von CD44: CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10

Der immunhistochemische Nachweis der CD44-Expression in dieser Arbeit erfolgte, wie in den zwei parallel hierzu experimentell durchgeführten Promotionsarbeiten von Bartel [10] und Lehmann [112], an den gleichen Schnitten mittels einer APAAP-Reaktion [38, vgl. Abbildung 4]. Durch die Verwendung monoklonaler Antikörper (Tabelle 5) wird bei dieser Methode eine hohe Empfindlichkeit erzielt. In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, welche Bedeutung die vier untersuchten CD44-Spleißvarianten haben, ob es zwischen den untersuchten Spleißvarianten Unterschiede der Expression gibt und ob sich die Expressionsmuster und Höhe der Scorewerte der CD44-Spleißvarianten in den Bereichen Karzinom des Tumorzentrums oder Karzinomanteile im Resektionsrand, im Epithel des Tumorzentrums, im Epithel des Tumorrandes oder im Epithel des tumorfernen Bereiches bzw. in den Kontrollgeweben unterscheiden. Für diesen Vergleich war der Einsatz eines semiquantitativen Verfahrens zur Ermittlung der Expressions-Scores notwendig. Es wurden nach Remmele et al [147, 148] immunreaktive Scorewerte (IRS) aus der Multiplikation der Färbeintensität (SI) und dem prozentualen Anteil der angefärbten Zellen (PP) auf den Karzinom- und Epithelgeweben einschließlich der Epithelien der Kontrollgewebe ermittelt: Punkt 2.2.3 und Tabelle 8. Dadurch ist ein statistischer Vergleich zwischen der Expression der einzelnen CD44-Spleißvarianten möglich. Bartel [10] hatte die gleichen Gewebe wie in dieser Arbeit zur Beurteilung von α_2 -Makroglobulin-Rezeptoren und Lehmann [112] zur Bewertung von mdm-2, bcl-2 und p53 eingesetzt. Anhand der Untersuchungen

in der vorliegenden Arbeit konnten wir in Übereinstimmung mit Bartel [10] feststellen, dass die Ermittlung von immunreaktiven Scorewerten aus der Färbeintensität und dem prozentualen Anteil positiver Zellen die Ergebnisse deutlicher macht, Dagegen stellte Lehmann [112] in ihrer Arbeit fest, dass nach ihren Untersuchungen die Erfassung der prozentualen Anteile positiver Zellen aussagekräftiger ist.

Diese Bewertung gestattete uns statistische Vergleiche zwischen den Expressionen der verschiedenen CD44-Spleißvarianten. Ein Vergleich der ermittelten prozentualen Anteile positiver Zellen (PP) mit den errechneten immunreaktiven Scores (IRS, vgl. Tabelle 8) ergab in Übereinstimmung mit Bartel [10], die α_2 -Makroglobulin-Rezeptoren auf den gleichen Geweben untersuchte, dass der Aussage der immunreaktiven Scorewerte etwas mehr Gewicht als die Ermittlung der PP-Werte zukommt (Tabelle 41 versus Tabelle 42). Im Gegensatz dazu kam Lehmann [112] in ihrer Arbeit beim immunhistochemischen Vergleich von mdm-2, bcl-2 und p53 in den gleichen Geweben zum Ergebnis, dass die Erfassung von PP aussagekräftiger ist.

Die Expression der Spleißvarianten CD44v3, CD44v5 und CD44v7 wiesen wir sowohl bei Krebszellen als auch bei Normalzellen auf der Zellmembran nach (Abbildungen 7, 12 und 17). Dagegen war CD44v10 (Abbildung 22) intrazellulär lokalisiert. Die mikroskopischen Bilder der vier untersuchten Spleißvarianten zeigen, dass alle vier Varianten, wenn auch in unterschiedlicher Häufigkeit und Intensität exprimiert waren: CD44v3: Grafiken in den Abbildungen 8 bis 10; CD44v5: Grafiken in den Abbildungen 13 bis 15; CD44v7: Grafiken in den Abbildungen 18 bis 20; CD44v10: Grafiken in den Abbildungen 23 bis 25. Die keratinisierte Mundschleimhaut und Hornperlen waren negativ. Piffko et al [142], Hesse [81], Ostwald et al [138], Kuo et al [108] und Oliveira et al [136] zeigten in ihren immunhistochemischen Bildern eine mit unseren Ergebnissen vergleichbare Markierung der Zellmembran. In den Untersuchungen von Herold-Mende [80] war aber auch CD44v10 auf der Zellmembran lokalisiert. In Übereinstimmung mit unseren Befunden konnten Oliveira et al [136] keinen Unterschied zwischen der Reaktivität der CD44-Antikörper auf Epithelien bzw. Karzinomen auf Gefrierschnitten und Paraffinschnitten feststellen.

Auf den oberflächlichen Epithelschichten wiesen wir keine Expression der untersuchten Spleißvarianten nach. Die nachgewiesene Expression auf den untersuchten Kontrollgeweben (keine mikroskopische Abbildungen) war in ähnlicher Intensität wie auf den Geweben der Tumorpatienten, CD44v10 intrazellulär (Abbildung 26) bzw. CD44v3, CD44v5 und CD44v7 auf der Zellmembran (siehe Abbildungen 11, 16 und 21, jeweils Grafiken) des basalen und suprabasalen Plattenepithels ausgeprägt. Dies stimmt mit den immunhistochemischen Bildern von Herold-Mende et al [80; bezüglich CD44v5 und CD44v7, aber nicht CD44v10], Hesse [81; CD44v3],

Kuo et al [108; CD44v5], Oliveira und Odell [135; CD44v3], Ostwald et al [138; CD44v5] und Piffko et al [142; CD44v5] überein.

4.4. Diskussion der Expression von CD44v3 auf Kopf-Hals-Tumoren

In den Tumorzentrum- und Tumorrand-Schnitten der Gewebe des Tumorpatienten Code 148 (Tabelle 3) mit einem Tonsillenkarzinom fehlte eine CD44v3-Expression auf lymphozytären Zellen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Roca et al [151] in Mammakarzinomgeweben (Tabellen 11 und 12). Dies steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von Stauder und Günthert [174], die wenig CD44v3 (neben CD44v6 und CD44v10) auf reaktiven Lymphozyten und in größerer Menge auf aktivierten T-Zell-Klonen nachwiesen. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Seiter et al [164] überein, die eine geringe CD44v3-Expression auf Blutlymphozyten und verstärkt auf infiltrierenden Lymphozyten bei Autoimmunerkrankungen der Haut nachwiesen. Und auch Wittig et al [201] stellten bei normalen Blutlymphozyten verglichen mit CD44s eine geringe Expression von CD44v3 fest, die nach Stimulation deutlich erhöht war. Stimulierte Lymphozyten von Autoimmunkranken zeigten eine deutlich geringe CD44v3-Expression. Wir konnten dagegen im Stroma des tumorfernen Gewebes des Patienten Code 005 (Tabelle 3) CD44v3-positive Lymphozyten im Sinne von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) nachweisen: Tabelle 13. Im Bindegewebe, in der Muskulatur und auf den Nerven wiesen wir keine CD44v3-Expression nach (Tabellen 11 bis 13).

CD44v3-Antikörper wurden in zahlreichen immunhistochemischen Studien von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen eingesetzt (siehe Tabelle 53).

4.4.1. Nachweis von CD44v3 im Tumorzentrum von Kopf-Hals-Tumoren

Die einzelnen Scorewerte von CD44v3 auf den einzelnen Tumorzentrumgeweben (alle Karzinome, 3 der 4 Präparate mit Plattenepithel und 2 von 4 Drüsenepithelien im gleichen Gewebstückchen) zeigen in dieser Arbeit eine heterogene Expression von CD44v3: Tabellen 11 und 28 sowie in der mikroskopischen Abbildung 7 und in der Grafik Abbildung 8. In einem der 10 Präparate mit Endothelien wiesen wir eine CD44v3-Expression nach.

Die immunreaktiven Scorewerte der CD44v3-Expression auf den Karzinomzellen und dem Plattenepithel im Tumorzentrum unterschieden sich in unseren Untersuchungen nicht signifikant (Wilcoxon: $p = 0.180$, Tabelle 31). Ebenso wenig stellten wir im U-Test einen signifikanten Unterschied zwischen der Höhe der CD44v3-Expression in gut differenzierten Karzinomen und schlechter differenzierten Karzinomen fest: Tabellen 41 und 42. Die Prüfung, ob zwischen dem

Tumorstaging oder dem Tumorgrading der untersuchten Gewebe (vgl. Tabelle 9) und der Häufigkeitsverteilung der IRS-Werte (Tabelle 11) ein Zusammenhang besteht, ergab im Exakten Test nach Fisher (vgl. Punkt 2.2.4.), dass beide Parameter von einander abhängen (Tabelle 43). Unsere Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Fonseca et al [51], die in Geweben mit einem Grading 1 bis Grading 3 eine abnehmende CD44v3-Expression nachwiesen. Und sie stimmen mit Répássy et al [149] sowie Wang et al [194] überein, die mit Zunahme der Tumorprogression eine reduzierte CD44v3-Expression feststellten. Hesse [81] wies nach, dass mit zunehmender Tumorprogression sowohl die Expression abnahm als auch die Expressionsmuster von CD44v3 diskontinuierlicher wurden. Allerdings konnte Hesse keinen eindeutigen Unterschied zwischen der CD44v3-Expression im Primärtumor und in der Metastase nachweisen. Hyckel et al [84] fanden in ihren immunhistochemischen Untersuchungen eine vom Grading und der Metastasierung der Tumoren unabhängige CD44v3-Expression. Dies Ergebnis deckt sich mit dem von Bloor et al [17]. Die Autoren untersuchten CD44v3 in der RT-PCR und fanden auch mit dieser Nachweismethode keinen Zusammenhang zur Tumorprogression. Dagegen konnten Bankfalvi et al [8] eine Abnahme der CD44v3-Expression in Lymphknotenmetastasen versus Primärtumoren bzw. in Tumorrezidiven versus Primärtumoren feststellen.

Die von uns erstellten Kaplan-Meier-Kurven (vgl. Punkte 2.2.4. und 4.2.) ergaben im Vergleich zwischen einer niedrigen und einer erhöhten CD44v3-Expression auf dem Karzinom keinen signifikant Unterschied (Abbildung 27, vgl. Punkt 3.3.1.4. und Tabelle 44). Patienten mit einer geringeren Expression von CD44v3 im Karzinomzentrum hatten aber eine kürzere rezidivfreie Zeit (56 ± 19 Monate) als Patienten, in deren Gewebe die Expression höher war (74 ± 21 Monate). An einer größeren Anzahl von Patienten konnten Bankfalvi et al [8] unsere Befunde bestätigen und bei 93 Patienten sogar einen signifikanten Unterschied (Log Rank $p = 0.031$) bei der Kaplan-Meier-Kurven nachweisen.

4.4.2. Nachweis von CD44v3 im Tumorrand und im tumorfernen Gewebe von Kopf-Hals-Tumoren

Auf allen 7 Karzinomresten, auf allen 10 Plattenepithelien und auf einem der 3 Drüsenepithelien des Tumorrandgewebes konnten wir eine CD44v3-Expression nachweisen. Vergleichbar damit war der Nachweis von CD44v3 auf allen 12 Plattenepithelien und 5 der insgesamt 6 Drüsenepithelien im tumorfernen Gewebe. Im Tumorrand war auf 2 von 9 Endothelien und im tumorfernen Gewebe auf 2 von 10 Endothelien eine CD44v3-Expression vorhanden. Im epithelfreien Tumorrand und epithelfreien tumorfernen Gewebe war der CD44v3-Nachweis negativ (Tabellen 12 und 13).

Die Ergebnisse der CD44v3-Expression auf den Tumorrandgeweben sind in den Tabellen 12 und 29 zusammengestellt, die Ergebnisse der CD44v3-Scores im tumorfernen Gewebe in den Tabellen 13 und 30. Aus den Häufigkeitsdiagrammen der CD44v3-Scorewerte in den Abbildungen 9 und 10 wird deutlich, dass CD44v3 auf den Karzinomzellen im Tumorrand höher als auf dem Plattenepithel exprimiert war. Die CD44v3-Expression im Karzinomrest des Tumorrandgewebes - sowohl der IRS- als auch der PP-Werte (Tabellen 31 und 32) - unterschied sich statistisch nicht von der Expression im Karzinomgewebe des Tumorzentrums (Wilcoxon: p (IRS) = 0.309 bzw. p (PP) = 0.194). Ebenso wenig unterschied sich die Expression von CD44v3 auf dem Plattenepithel des Tumorrandes von der Expression auf dem Plattenepithel im tumorfernen Gewebe (Wilcoxon: p (IRS) = 0.317; p (PP) = 0.157). Ein Vergleich der CD44v3-Scorewerte im Karzinom des Tumorrandgebietes bei Patienten mit einem Staging I / II gegenüber einem Staging III / IV bzw. Grading 2 (G2) gegenüber einem Grading 3 (G3) ergab im U-Test (Tabellen 39 bis 42), dass sich die Expression in keinem Fall signifikant unterscheidet (IRS / Staging: p = 0.414; IRS / Grading: p = 1.000; PP / Staging: p = 0.182; PP / Grading: p = 0.445). Der Vergleich der Häufigkeitsverteilung des Tumorstagings oder des Tumorgradings der untersuchten Gewebe (vgl. Tabelle 9) mit der Häufigkeit hoher CD44v3-IRS-Scores (Tabelle 12) im Exakten Test nach Fisher (vgl. Punkt 2.2.4.) ergab, dass zwischen dem Staging und den hohen Scorewerten auf dem Karzinom im Tumorrand (p = 0.429) und den Scorewerten auf dem Plattenepithel im Tumorrand (p = 1.000) ebenso ein Zusammenhang besteht wie zwischen dem Grading und den gleichen Parametern (p = 1.000 bzw. p = 0.444): Tabelle 43.

Die heterogene CD44v3-Expression unserer Untersuchungen stimmt vor allem mit den Ergebnissen von Reategui et al [145] überein. Diese Autoren hatten CD44v3 in der RT-PCR nachgewiesen. In 4 Tumorrandgeweben stellten sie reduzierte CD44v3-Spiegel, in 2 Tumorrandgeweben erhöhte CD44v3-Spiegel und in einem Tumorrandgewebe eine gleich bleibende Expression von CD44v3 im Vergleich zum Tumorgewebe fest. Bankfalvi et al [8] untersuchten immunhistochemisch neben 93 Karzinomen das unmittelbar angrenzende Tumorrandgewebe.

In Übereinstimmung mit unseren Befunden stellten die Autoren bei 56% der Gewebe keinen Unterschied zwischen der Expression von CD44v3 im Tumorrand und Tumorzentrum fest. Bei 18% der Tumorrandgewebe war die CD44v3-Expression reduziert und bei 26% erhöht. Dagegen konnten Seelentag et al [163] auf allen 74 unmittelbaren, aber tumorfreien Randgeweben eine hohe Expression von CD44v3 nachweisen, die sich nicht von der auf normalen Geweben (n = 5) unterschied.

Bankfalvi und Piffko [9] hatten in einer umfangreichen Studie prognostische und prädiktive Faktoren in der invasiven Tumorfront und die Feldkanzerisierung in der unmittelbaren Tumorumgebung untersucht. Sie stellten fest, dass neben Proliferationsmarkern, der Angiogenese u.a. auch die Expression von CD44 eine Bedeutung hat.

In Abbildung 31 (vgl. Tabelle 45) untersuchten wir in Kaplan-Meier-Kurven, ob die Expression von CD44v3 auf dem Karzinomrest des Tumorrangewebes (n = 7 von 20 Patienten) eine prognostische Aussage gestattet. Der Unterschied der beiden Kurven ist nicht signifikant. Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs war allerdings bei der höheren CD44v3-Expression deutlich kürzer (10 ± 4 Monate) als bei einer geringen Expression von CD44v3 (81 ± 32 Monate). Dies Ergebnis steht im Widerspruch zu unserer Untersuchung des Karzinomzentrums (Punkt 4.4.1.). Um die prognostische Aussage dieser Untersuchung zu erhärten und um den Widerspruch zu klären, muss dies an weiteren Patienten überprüft werden.

4.4.3. Einschätzung der nachgewiesenen Expression von CD44v3 auf den Kontrollgeweben im Vergleich zu den Ergebnissen der Tumorgewebe

18 der untersuchten 20 Kontrollgewebe (Tabelle 4) enthielten Plattenepithel, auf welchem wir CD44v3 nachweisen konnten. 4 der in den Schnitten enthaltenen Drüsengewebe wiesen ebenfalls eine CD44v3-Expression auf. Die immunreaktiven CD44v3-Scorewerte auf den Kontrollgeweben (Tabelle 10) sind in Tabelle 14 und in der Grafik Abbildung 11 zusammengestellt. Für die Bewertung konnten 18 der 20 Kontrollgewebe mit einem Plattenepithel verwendet werden. In den epithelfreien Kontrollgeweben fehlte eine CD44v3-Expression. Auch auf den Kontrollgeweben wiesen wir eine heterogene CD44v3-Expression mit Scorewerten zwischen 1 und 12 nach. Dies stimmt mit den Befunden von Seelentag et al [163] überein, die in der normalen Haut die gleiche CD44v3-Expression nachwiesen wie auf den Epithelien der Tumorrangewebe. Auch Oliveira und Odell [135] verglichen die CD44v3-Expression auf normaler Mukosa (N = 33) mit der Expression in chirurgischen tumorfreien Resektionsrändern und stellten ebenfalls vergleichbare Scorewerte fest. Dagegen wiesen Hudson et al [83] in normaler Mukosa eine hohe Expression von CD44v3 nach, während nur 5 der untersuchten 13 Karzinome und unabhängig vom Grading eine deutlich geringere CD44v3-Expression zeigten. Grimme et al [69] stellten in allen 15 untersuchten Hautproben eine CD44v3-Expression fest, aber auch in allen 13 Hauttumoren.

In allen anderen Schnitten der Kontrollgewebe fehlte im Bindegewebe, in der Muskulatur und auf den Nerven eine CD44v3-Expression: Tabelle 14. Dies weicht von den allerdings geringen Befunden in den Geweben der Tumorpatienten (Punkte 4.4.1. und 4.4.2.) ab.

4.5. Diskussion der Expression von CD44v5 in Kopf-Hals-Tumoren

Im Bindegewebe der untersuchten Gewebeschnitte wiesen wir nur im tumorfernen Gewebe des Patienten Code 005 (Tabelle 3) CD44v5-positive lymphozytäre Zellen im Sinne Tumor-infiltrierender Lymphozyten nach (vgl. 4.4.): Tabelle 17. Auch Piffko et al [142] beobachteten eine spezifische Immunreaktion von CD44v5 auf mononukleären Entzündungszellen (Lymphozyten

und Monozyten) im benachbarten Gewebe ihrer untersuchten Karzinome. Dagegen stellten Stauder und Günthert [174] weder auf reaktiven Lymphozyten noch auf aktivierten T-Zell-Klonen eine CD44v5-Expression fest. Dieselben Autoren wiesen dagegen auf Non-Hodgkin-Lymphomen eine deutliche Expression nach. In den Untersuchungen von Seiter et al [164] fehlte die CD44v5-Expression auf infiltrierenden Lymphozyten von autoimmunen und nichtautoimmunen Hautgeweben. Auf den anderen Gewebeschnitten der Tumorpatienten oder Kontrollpatienten konnten wir im Bindegewebe keine CD44v5-positive Zellen nachweisen (Tabellen 15 bis 18). In zahlreichen immunhistochemischen Studien von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches wurde die CD44v5-Expression mit teilweise widersprüchlichen Befunden nachgewiesen: Tabelle 53.

4.5.1. Nachweis von CD44v5 im Tumorzentrum von Kopf-Hals-Tumoren

Auf den Gewebeschnitten des Tumorzentrums war CD44v5 in unseren Untersuchungen auf allen 20 Karzinomen und auf allen drei Plattenepithelien im gleichen Gewebe nachweisbar. Stoll et al [176] wiesen auch auf fast allen Karzinomen CD44v5 nach: 105 von 107 Karzinomen waren CD44v5-positiv. Ebenso zeigten alle Epithelien in der Nähe des Karzinomgewebes eine Expression von CD44v5. Dagegen konnten Kuo et al [108] nur auf knapp 78% der Primärtumoren (N = 62) eine CD44v5-Expression nachweisen. Sowohl Kuo et al [108] als auch Stoll et al [176] setzten den gleichen CD44v5-Antikörper wie wir in unserer Studie ein (Bender Med-Systems, Österreich, vgl. Tabelle 5). Kuo et al und Stoll et al führten ihre Untersuchungen an Paraffinschnitten durch. Ihre unterschiedlichen Ergebnisse sind am ehesten auf das unterschiedliche Grading der Tumoren zurückzuführen. Kuo et al [108] untersuchten zu 79% G1-, zu 19% G2- und zu 2% G3-Tumoren, Stoll et al [176] 15% G1-, 71% G2- und 15% G3-Tumoren. In unserer Studie mit einer Gewebeentnahme aus drei Tumorbereichen stammten die Gewebe meist aus größeren Tumoren. G1-Tumorgewebe stand uns für unsere Untersuchungen nicht zur Verfügung. Wir untersuchten zu 50% G2- und zu 50% G3-Tumorgewebe (Tabelle 9).

Wir konnten das Oberflächenantigen CD44v5 in allen Schichten des Karzinoms und im Epithel in allen Schichten vom Stratum basale durch das Stratum suprabasale und Stratum spinosum hindurch bis zum Stratum corneum nachweisen. Dieses epitheliale CD44v5-Verteilungsmuster wird auch von Stoll et al [177] und Stoll [178] auf dem Epithel im Tumorzentrum beschrieben.

Die IRS-Werte der CD44v5-Expression in unseren Untersuchungen waren sehr breit verteilt: Tabellen 15 und 28, mikroskopische Abbildung 12, grafische Abbildung 13. Die weiteren untersuchten Gewebearten (Drüsen-, Nerven- und Bindegewebe, Gefäßendothelien, Lymphgewebe und Muskulatur) zeigten keine oder nur vereinzelt eine CD44v5-Expression.

Die immunreaktiven Scores und PP-Werte der CD44v5-Expression auf den Karzinomzellen und auf dem Plattenepithel des Tumorzentrums unterschieden sich nicht signifikant (Tabellen 31 und 32, Wilcoxon: p (IRS) = 0,317, p (PP) = 0,317). Dies deckt sich gut mit den Ergebnissen von Stoll et al [177], die 99 Plattenepithelkarzinome mit einem Grading von 1 bis 3 untersuchten. Der Vergleich der CD44v5-positiven Zellen (PP) erbrachte gleiche Ergebnisse für CD44v5 auf dem Karzinom und dem Epithel im Tumorzentrum mit einer Einschränkung: In 2 Fällen wurde bei schlecht differenzierten Tumoren eine reduzierte Anfärbung des Karzinoms gegenüber dem Epithel gefunden (= weniger als 50% der Tumorzellen waren CD44v5-positiv im Gegensatz zu dem dazugehörenden Epithel). Stoll [178] zeigte, dass bei 93% seiner 96 Tumoren mehr als 75% der Tumorzellen, bei 3% der Tumoren mehr als 50% (aber maximal 75%) und bei 6% der Tumoren weniger als 50% der Tumorzellen mit Anti-CD44v5 angefärbt waren. Wir stellten bei 50% unserer Tumoren (N = 10) 75% und mehr angefärbte Tumorzellen, bei 30% der Tumoren mehr als 50% bis maximal 75% angefärbte Tumorzellen und bei 20% der Tumoren weniger als 50% angefärbte Tumorzellen fest. Die Ergebnisse sind vergleichbar. Dennoch scheint bei Stoll [178] die CD44v5-Expression in den untersuchten Paraffinschnitten tendenziell höher als in unserer Studie an Gefrierschnitten zu sein.

In unserer Studie bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den IRS-Werten von CD44v5 auf besser differenziertem Karzinomgewebe (Grading 2, 9 Patienten) und Karzinomgeweben schlechterer Differenzierung (Grading 3, ebenfalls 9 Patienten): U-Test: p = 0,53, Tabelle 41 (Vergleich der PP-Werte in Tabelle 42). Diese Befunde decken sich insofern mit denen von Herold-Mende et al [80], als diese keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Expressionsmuster von CD44v5 auf Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen nachweisen konnten, obwohl die Metastasen häufig weniger gut differenziert waren als die Primärtumoren. Die Autoren stellten bei Patienten mit einem regionalen Lymphknotenbefall nur gelegentlich eine Minderexpression von CD44v5 in der Peripherie der Primärtumoren fest. Auch Kuo et al [108] stellten zwischen ihren Untersuchungen an 62 Primärtumoren und 20 Metastasen keinen Unterschied an der Anzahl CD44v5-positiver Zellen (PP) oder der Farbintensität (SI) fest.

Oliveira et al [136] wiesen dagegen eine signifikante Minderexpression von CD44v4/v5 auf Primärtumoren gegenüber Epithel in Tumornähe oder Tumorferne nach und eine weitere Minderexpression auf den zugehörigen Metastasen im Vergleich mit den Primärtumoren. Das kann an dem verwendeten anderen Antikörper gegen CD44v4/v5 liegen (vgl. unser Antikörper: Tabelle 5). Auch Bankfalvi et al [8] fanden keinen signifikanten Unterschied zwischen der CD44v5-Expression auf dem Karzinom und den zugehörigen Lymphknotenmetastasen bzw. sie stellten eine ähnliche Expression auf Lymphknotenmetastasen und Rezidiven fest. Piffko et al [142] fanden in ihrer Studie ebenfalls eine gleiche CD44v5-Expression auf den Karzinomen wie auf den zugehörigen Metastasen.

Im Exakten Test nach Fisher (vgl. Punkt 2.2.4.) ließ sich in unseren Befunden sowohl eine Abhängigkeit zwischen der Häufigkeit des Tumorstaging einerseits und dem Tumorgrading andererseits von der Häufigkeit einer höheren CD44v5-Expression (immunreaktive Scorewerte ab dem Medianwert) nachweisen (Tabelle 43). Ein besonders deutlicher Zusammenhang besteht zwischen der CD44v5-Expression auf dem Plattenepithel im Tumorzentrum und dem Tumorstaging bzw. dem Tumorgrading (p jeweils = 1). Nicht so deutlich ist der Zusammenhang zwischen der CD44v5-Expression auf dem Karzinom des Tumorzentrums und dem Staging ($p = 0.642$) bzw. dem Grading ($p = 0.653$).

Der Vergleich der CD44v5-Expression auf dem Karzinom im Tumorzentrum mit der weiteren Krankheitsentwicklung der Patienten in Kaplan-Meier-Kurven (vgl. Punkte 2.2.4. und 4.2.) lies keine prognostische Aussage zu. Die Kurven unterschieden sich im Log-Rank-Test nicht signifikant: Abbildung 28 (vgl. Tabelle 44 und Punkt 3.3.1.4.). Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs war bei Patienten mit einer höheren CD44v5-Expression im Karzinomgewebe mit 67 ± 22 Monaten nur unwesentlich länger als bei Patienten mit einer niedrigeren Expression (63 ± 18 Monate). Auch Bankfalvi et al [8] konnten aufgrund der geringen Unterschiede im Expressionsmuster von CD44v5 bei den untersuchten Tumoren im Kopf-Hals-Bereich keine prognostische Aussage treffen. Stoll et al [177] fanden in ihren Untersuchungen keine Korrelation zwischen der CD44v5-Expression und dem N- oder T-Status, wiesen aber eine Signifikanz ($p = 0,002$) der Kaplan-Meier-Kurven nach [176].

4.5.2. Nachweis von CD44v5 im Tumorrand und in den tumorfernen Geweben von Kopf-Hals-Tumoren

Auf 7 der Tumorrandgewebe konnte die Expression von CD44v5 in Karzinomrestgeweben untersucht werden. Daneben wurde die Expression auf 10 mikroskopisch noch nicht maligne entarteten Plattenepithelien der Tumorrandgewebe und 12 Plattenepithelien der tumorfernen Gewebe untersucht: Tabellen 16 und 17, Abbildungen 14 und 15. In den Karzinomresten des Tumorrandgewebes ließ sich CD44v5 immer und ebenso immer auf dem Plattenepithel nachweisen, darüber hinaus nur auf Drüsengewebe (auf 4 von 6 Schnitten mit Drüsengewebe). Auf den weiteren Gewebearten wie Bindegewebe, Muskulatur, Nerven und Gefäßendothel konnten wir keine CD44v5-positiven Zellen nachweisen.

Auf dem Plattenepithel des Tumorrandes wie des tumorfernen Bereiches stellten wir das gleiche Verteilungsmuster von CD44v5 vom Stratum basale durch das Stratum spinosum bis zum Stratum superficiale fest. Das Expressionmuster entsprach der Verteilung auf dem Epithel im Tumorzentrum (Punkt 4.5.1.). Unsere Befunde stimmen mit denen von Piffko et al [141] auf dem Epithel des Tumorrandgewebes überein. Piffko et al fanden das gleiche Verteilungsmuster

bei tumornahen Epitheldysplasien, während Bankfalvi et al [8] dagegen eine erhöhte CD44v5-Expression auf einer Mehrzahl von Plattenepitheldysplasien (26 von 32) nachwiesen. Kuo et al [108] konnten ebenfalls auf allen tumornahen Epithelien CD44v5 nachweisen

Die Prüfung der CD44v5-Expressionen auf dem Karzinomrest im Tumorrand (allerdings bei nur 7 Patienten) ergab keinen signifikanten Unterschied der Kaplan-Meier-Kurven (Abbildung 32, vgl. Tabelle 45). Bei einer geringeren Expression von CD44v5 war die rezidivfreie Zeit der Patienten deutlich (aber nicht signifikant) länger als bei einer höheren Expression: 43 ± 31 versus 14 ± 5 Monate.

4.5.3. Einschätzung der nachgewiesenen Expression von CD44v5 auf den Kontrollgeweben im Vergleich zu den Ergebnissen der Tumorgewebe

Sowohl Plattenepithelien (18 der untersuchten 20 Kontrollgewebe, Tabelle 4) als auch Drüsen-gewebe (4 der untersuchten 20 Kontrollgewebe) zeigten eine CD44v5-Expression (Tabellen 18, 51 und 52, Abbildung 16). Die immunreaktiven Scorewerte sind breit verteilt. Auch Kuo et al [108] konnten CD44v5 auf allen Kontrollepithelien nachweisen.

Wir konnten in Übereinstimmung mit Piffko et al [142] eine CD44v5-Expression durch alle Schichten des Epithels vom Stratum basale durch das Stratum spinosum bis zum Stratum cor-neum nachweisen. Die immunreaktiven Scorewerte (oder PP-Werte) auf den Epithelien unse-rer Kontrollgewebe unterschieden sich nicht signifikant von den immunreaktiven Scorewerten (oder PP-Werten) der CD44v5-Expression auf den Plattenepithelien des Tumorzentrums, des Tumorrandes oder des tumorfernen Bereiches (Tabellen 51 und 52). Dies stimmt mit den Un-tersuchungen von Piffko et al [142] überein.

Auf den weiteren Geweben der Kontrollpatienten (Bindegewebe, Nervengewebe, Gefäßendo-thelien und Muskulatur) wiesen wir keine CD44v5-Expression nach, im Gegensatz zu der ver-einzelt nachgewiesenen Expression in den Geweben der Tumorpatienten (Punkte 4.5.1. und 4.5.2.).

4.6. Diskussion der Expression von CD44v7 in Kopf-Hals-Tumoren

Entsprechend den Untersuchungen der anderen Spleißvarianten suchten wir nach CD44v7-ex-primierenden Zellen in den gleichen Geweben: Karzinom, Epithelien, Binde- und Nervengewe-be, Muskulatur, Drüsen- und Lymphgewebe, Gefäßendothel und Lymphozyten. Insgesamt wa-ren die Verteilung und das Färbemuster des in dieser Arbeit eingesetzten Anti-CD44v7-Antikör-pers (Tabelle 5) nicht sehr homogen und nicht sehr stark ausgeprägt. Dies deckt sich mit den

Ergebnissen von Piffko et al [141], die ebenfalls parallel CD44v5 und -v7 (und andere CD44-Spleißvarianten) in Tumorgeweben untersuchten. Eine CD44v7-Expression konnten wir mit dem von uns eingesetzten CD44v7-Antikörper nur im Karzinom, im Epithelgewebe und in den Drüsengeweben nachweisen. Wir konnten keine Tumor-infiltrierenden CD44v7-positiven lymphozytären Zellen in den Geweben nachweisen. Auch in dem Lymphgewebe des Tumorzentrums und des Tumorrandes eines Tonsillenkarzinoms (Tabellen 19 und 20) von Patient Code 148 sowie in den Lymphozyten des tumorfernen Gewebes (Tabelle 21) des Patienten Code 005 (Tabelle 3) fehlte eine CD44v7-Expression.

In Tabelle 53 sind die Untersuchungen von Kopf-Hals-Tumoren der Spleißvariante CD44v7 und ihre prognostische Einschätzung zusammengefasst.

4.6.1. Immunhistochemischer Nachweis von CD44v7 im Tumorzentrum von Kopf- Hals-Tumoren

In einem Karzinomgewebe (Tabelle 19, Patient Code 158) fehlte eine CD44v7-Expression. Auf den weiteren 19 Karzinomen war CD44v7 nur schwach bis mittelschwach exprimiert. Wir wiesen auf 65% unserer Karzinome eine geringe Anzahl positiv gefärbter Zellen (PP = 1) nach und nur auf 5% der Karzinome mehr als 50% CD44v7-positive Karzinomzellen. Dagegen fanden Stoll et al [177] bei 72% der Karzinome mehr als 75% CD44v7-positive Karzinomzellen (PP = 4) und bei etwa 8% der Karzinome weniger als 25% CD44v7-positive Karzinomzellen (PP = 1). Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Stoll et al stammte das untersuchte Gewebe von G2- und G3-Tumoren (in unseren Untersuchungen zu je 50%, bei Stoll et al etwa zu 73% von G2- , zu 23% von G3-Tumoren und etwa zu 14% von G1-Tumoren. Wir verglichen die Expression von CD44v7 auf Karzinomgewebe schlechterer Differenzierung (Grading 3, 9 Patienten) mit der Expression auf Karzinomgewebe besserer Differenzierung (Grading 2, 9 Patienten) und konnten statistisch keinen Unterschied zwischen den immunreaktiven Scorewerten bzw. den PP-Werten in Abhängigkeit vom Grading nachweisen (U-Test: p (IRS) = 0,556, p (PP) = 0,654, vgl. Tabellen 41 und 42). Die Auswertung unserer Daten im Exakten Test nach Fisher (vgl. Tabelle 43 und Punkt 2.2.4.) weist auf eine Korrelation zwischen der Häufigkeit der CD44v7-Expression und dem Tumorstaging einerseits und dem Tumorgrading andererseits hin. Diese ist besonders deutlich zwischen der CD44v7-Expression auf dem Plattenepithel im Tumorzentrumsgewebe (p jeweils = 1). Unsere Ergebnisse stimmen mit den Befunden von Stoll et al [176] an Paraffinschnitten von 107 Primärtumoren überein. Bei Stoll et al fehlte auf mehr als 10% der Primärtumoren CD44v7 (N = 12).

Die Ergebnisse von Piffko et al [141] an 100 Primärtumoren sind dagegen schwerer einzuordnen: 71% der untersuchten Tumoren zeigten keine oder nur eine schwache Expression von

CD44v7, 25% der Tumoren zeigten eine moderate und 4% eine starke Expression von CD44v7. Aus den Befunden der genannten Autoren und unserer eigenen Studie lässt sich schließen, dass nicht alle Karzinomzellen CD44v7 exprimieren und die meisten Tumoren nur eine geringe Expression zeigen. Bewertet man in unserer Studie die Farbintensität (SI, vgl. Tabelle 8) des verwendeten CD44v7-Antikörpers (Tabelle 5), war diese auf 90% der Tumoren schwach oder nicht vorhanden (1 Gewebeschnitt) und auf 10% der Gewebeschnitte mittelstark. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Piffko et al [141] bei ihren Untersuchungen an 100 Primärtumoren (APAAP / Paraffinschnitte). Die Unterschiede könnten durchaus durch die unterschiedliche Fallzahl (20 Tumoren versus 100 Tumoren) und Nachweismethodik (Kryostatschnitte versus Paraffinschnitte) begründet sein. Vergleicht man allerdings die Farbintensität von CD44v7 auf dem Karzinomgewebe des Tumorzentrums mit der Farbintensität auf dem Plattenepithel des Tumorrandes, so ist diese in den Untersuchungen von Piffko et al [141] auf dem Karzinom durchschnittlich etwas höher als im Epithel des Tumorrandes.

Das Oberflächenantigen CD44v7 war in allen Teilen des Karzinoms zu finden, allerdings waren die CD44v7-positiven Zellen nicht homogen über das Karzinomgewebe verteilt: Abbildung 17. Teilweise waren auch nur einzelne Karzinomzellen eines Gewebeschnittes angefärbt.

Ähnliche Ergebnisse erzielten Herold-Mende et al [80] an Gefrierschnitten von 55 Primärtumoren. Die Autoren fanden bei 18 der 55 Primärtumoren eine homogene (und schwächere) Anfärbung und auf 17 der Primärtumoren nur einzelne angefärbte Tumorzellen.

Herold-Mende et al [80] konnten eine Downregulation von CD44v7 auf den (eher schlechter differenzierten) Metastasen gegenüber den zugehörigen Primärtumoren nachweisen. Dies stützten auch Bankfalvi et al [8] mit ihren Ergebnissen. Sie wiesen ebenfalls in Metastasen und Rezidiven einen Verlust der Immunreaktivität von CD44v7 nach (APAAP, Bestimmung des prozentualen Anteils positiver Zellen).

Im Epithel ließ sich CD44v7 im Stratum basale und Stratum suprabasale nachweisen. In der vorliegenden Arbeit konnten wir CD44v7 nur auf 3 Plattenepithelien im Tumorzentrum untersuchen: Auf einem der Epithelien konnten wir CD44v7 nicht nachweisen, auf den beiden anderen war die Expression schwach bis mittelstark. Die immunreaktiven Scores und PP-Werte der CD44v7-Expression unserer Studie auf den Karzinomzellen und auf dem Plattenepithel des Tumorzentrums unterschieden sich statistisch nicht (Wilcoxon: p (IRS und PP) = 0,317, vgl. Tabellen 31 und 32).

In 5 Geweben war Drüsengewebe vorhanden, das nur in einem Schnitt eine schwache Expres-

sion von CD44v7 zeigte. Bindegewebe, Muskulatur, Nervengewebe und Gefäßendothelien wiesen keine CD44v7-positive Zellen auf: Tabelle 19.

Aus der nachgewiesenen CD44v7-Expression ergab sich in den Kaplan-Meier-Kurven (vgl. Punkt 2.2.4.) keine prognostische Aussage über die weitere Krankheitsentwicklung bei den Patienten. Die Unterschiede zwischen den Kaplan-Meier-Kurven einer höheren und einer niedrigeren Expression von CD44v7 im Tumorzentrum der Patienten waren nicht signifikant (Log Rank $p = 0,343$, Abbildung 29, vgl. Tabelle 43 und Punkt 3.3.1.4.) Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs konnte nicht berechnet werden (vgl. Tabellen 9, 19 und 44). Stoll et al [177] fanden eine signifikante Korrelation zwischen einer reduzierten Expression von CD44v7 auf den Karzinomzellen des Tumorzentrums mit einer reduzierten Überlebenszeit. In ihren Untersuchungen von 1998 fanden Stoll et al [176] eine signifikant schlechtere Überlebenschance ($p = 0,04$) für Patienten mit CD44v7-negativen Tumoren gegenüber Patienten mit CD44v7-positiven Tumoren.

4.6.2. Immunhistochemischer Nachweis von CD44v7 im Tumorrand und im tumorfernen Gewebe von Kopf-Hals-Tumoren

Wie auch in den Untersuchungen von CD44v3 (siehe 4.4.2) und CD44v5 (siehe 4.5.2.) im Tumorrandbereich, waren auch für den Nachweis von CD44v7 in 7 Tumorrandgeweben noch Karzinomreste enthalten. Eine CD44v7-Expression wiesen wir in 5 der 7 Karzinomrestgewebe nach. In 10 Tumorrandgeweben war Plattenepithel enthalten (vgl. Tabelle 20). In einem Plattenepithel fehlte die Expression von CD44v7. Die immunreaktiven Scorewerte variierten stark sowohl auf dem Karzinomgewebe des Tumorrandes als auch auf den Plattenepithelien: Tabelle 20 und Abbildung 19. Unsere Ergebnisse zeigen eine etwas höhere Farbintensität auf dem Epithel als auf dem Karzinomgewebe. Dies wird durch die Untersuchungen von Bankfalvi et al [8] bestätigt, die im Vergleich zum Epithel des Tumorrandes eine Minderexpression von CD44v7 (PP) in 34% der Karzinome (Primärtumoren) fanden, die nicht statistisch signifikant war. Auch wir fanden bei der statistischen Auswertung unserer Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl (PP) CD44v7-positiver Zellen im Epithel des Tumorrandes und der Anzahl CD44v7-positiver Tumorzellen im Karzinomgewebe: Tabelle 52.

Das Oberflächenantigen CD44v7 war in allen Teilen des Karzinomrestes sowie im Stratum basale, Stratum suprabasale und zusätzlich im Stratum spinosum des Epithels zu finden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Bankfalvi et al [8], die CD44v7 ebenfalls im Stratum basale, Stratum suprabasale und Stratum spinosum auf 89 von 93 Gewebeschnitten mit nichtneoplastischem Epithel vom Tumorrand nachwies. Piffko et al [141] konnten dagegen CD44v7 nur im Stratum basale des Epithels des Tumorrandes nachweisen. Dies kann mit unterschiedlichen

Dysplasiegraden des untersuchten Plattenepithels zusammenhängen. Stoll wies in seiner Habilitationsschrift [178, vgl. Stoll et al, 177] CD44v7 im Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum des tumornahen Epithel nach.

Unsere Untersuchung der weiteren Gewebearten ergab nur auf 2 von 6 Drüsengeweben eine CD44v7-Expression. Im Bindegewebe, in der Muskulatur, im Nervengewebe, in Gefäßendothelien und im lymphatischen Gewebe konnten wir keine CD44v7-Expression nachweisen.

Auf 11 der 12 Plattenepithelien des tumorfernen Bereiches auf Kryostatschnitte war das Epithel mit CD44v7 und stark gestreuten immunreaktiven Scorewerten angefärbt. In 3 der 4 Drüsengewebe war CD44v7 schwach bis mittelstark exprimiert. Die weiteren Gewebe- oder Zellarten (Bindegewebe, Muskulatur, Gefäßendothel, Nervengewebe und Lymphozyten) waren CD44v7-negativ (vgl. Tabelle 21 und Abbildung 20).

Der Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven (vgl. Punkt 2.2.4.) nach der Höhe der CD44v7-Expression auf dem Karzinomrest im Tumorrand (nur 7 Patienten) ergab keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 33, vgl. Tabelle 45). Bei einer geringeren Expression von CD44v7 war die rezidivfreie Zeit der Patienten deutlich (aber nicht signifikant) kürzer als bei einer höheren Expression: 8 ± 2 versus 51 ± 25 Monate.

4.6.3. Einschätzung der nachgewiesenen Expression von CD44v7 auf den Kontrollgeweben im Vergleich zu den Ergebnissen der Tumorgewebe

18 der in dieser Studie untersuchten 20 Kontrollgewebe (Tabelle 4) enthielten Plattenepithel. Unser Verteilungsspektrum der CD44v7-Expression auf dem Plattenepithel im Kontrollgewebe reichte vom Stratum basale durch das Stratum suprabasale bis ins Stratum spinosum (bei etwa 30% der Gewebeschnitte, vgl. Tabelle 22). Dagegen wiesen Herold-Mende et al [80] CD44v7 nur im Stratum basale und suprabasale der Epithelien von 22 Kontrollpatienten nach. Herold-Mende et al konnten auf dem Epithel der Kontrollpatienten eine höhere CD44v7-Expression als auf Primärtumoren nachweisen, was in unserer Studie nicht bestätigt werden konnte (weder durch die IRS- noch durch die PP-Werte): U-Test: p (IRS) = 0,475, p (PP) = 0,7, vgl. Tabellen 51 und 52. In Übereinstimmung mit Herold-Mende et al [80] konnten Kuo et al [108] mit einem Anti-CD44v7/8-Antikörper auf 100% der Kontrollepithelien (N = 10), aber nur auf 35,5% der untersuchten Primärtumoren (N = 62) eine Expression im Sinne einer Downregulierung nachweisen. Kuo et al [108] konnte die Expression von CD44v7/8 im Epithel der Kontrollgewebe im Stratum basale, Stratum suprabasale und Stratum spinosum nachzuweisen, dagegen die Expression von CD44v7 nur im Stratum basale und suprabasale.

Auf den weiteren Geweben (Bindegewebe, Muskulatur, Nervengewebe und Gefäßendothelien) konnte wir keine CD44v7-Expression nachweisen. Auch das Drüsengewebe zeigte im Kontrollgewebe keine CD44v7-Expression (vgl. Tabelle 22). Dies weicht von den Ergebnissen auf dem Drüsenanteil der Tumorgewebe ab (Punkte 4.6.1. und 4.6.2.).

4.7. Diskussion der Expression von CD44v10 in Kopf-Hals-Tumoren

Die Verteilung und das Färbeverhalten unseres Anti-CD44v10-Antikörpers (Tabelle 5) war, ähnlich wie bei CD44v7, inhomogen und schwach (maximaler Median des immunreaktiven Scorewertes und des PP-Wertes = 2). Während die Markierung der Antikörper gegen CD44v3, CD44v5 und CD44v7 in unseren Untersuchungen mit der Zellmembran verbunden und nach der Durchführung der APAAP diese Membranen perlchnurartig nachgezeichnet waren (vgl. Abbildungen 7, 12 und 17), fand unser Anti-CD44v10-Antikörper seine Reaktionspartner intrazellulär am bzw. im Zellkern (vgl. Abbildung 22). Wir setzten den einzigen kommerziellen Anti-CD44v10-Antikörper zum Zeitpunkt des experimentellen Teils der vorliegenden Studie von Bender MedSystems (Wien, Österreich, vgl. Tabelle 5), Klon VFF-14, ein. Unser Ergebnis steht im Gegensatz zu den bisher einzigen Untersuchungen der CD44v10-Expression von Kopf-Hals-Tumoren (Tabelle 53) von Herold-Mende et al [80] mit einem Anti-CD44v10-Antikörper (Klon VFF16). An Gefrierschnitten hatten die Autoren mit ihrem Antikörper ausschließlich eine Zellmembranmarkierung nachweisen können. Dieser Unterschied könnte durch den Einsatz unterschiedlicher Antikörper bedingt sein. Allerdings stellten u.a. Endo und Terada [43] mit „unseren“ Antikörper-Klon VFF-14 an Paraffinschnitten von hepatozellulären Karzinomen und Mizera-Nyczak et al [126] an Gefrierschnitten von Lungenkarzinomen mit dem gleichen Antikörper-Klon in Übereinstimmung mit Herold-Mende et al [80] vorwiegend eine membranöse Markierung fest. Beham-Schmid et al [11] verglichen beide Antikörper-Klon VFF14 und VFF16 an Paraffin- und Gefrierschnitten u.a. von malignen Lymphomen und stellten sowohl eine membranöse als auch eine zytoplasmatische Markierung fest. Wodurch die unterschiedliche Markierung der Zellen in unserer Studie an Kopf-Hals-Tumoren im Vergleich zu Herold-Mende et al [80] bedingt ist, können nur weitere Untersuchungen an entsprechenden Patienten-geweben offenbaren.

Mit dem von uns eingesetzten CD44v10-Antikörper konnten wir, ebenso wie mit unseren CD44v3-, -v5- und -v7-Antikörpern, Karzinomgewebe, Plattenepithel, Drüsengewebe und vereinzelt Nervengewebe anfärben. Im Tumorzentrum- und Tumorrandgewebe (Tabellen 23 und 24) des Patienten Code 148 (Tabelle 3) wiesen wir außerhalb des Tonsillenkarcinoms CD44v10-positive Einzelzellen im benachbarten Lymphgewebe nach. Am ehesten möchten wir diese Zellen als disseminierte Tumorzellen des Tonsillenkarcinoms deuten, obwohl die Beurteilung unserer kleinen Gefrierschnitte keine klare Abgrenzung zu CD44v10-positiven Tumor-infil-

trierenden Lymphozyten gestattet. Wimmenauer et al [199] beschrieben in kolorektalen Karzinomen und Weimann et al [197] in Melanomen eine Markierung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten durch die beiden Anti-CD44v10-Antikörper- Klone VFF14 und VFF16. Im tumorfernen Gewebe des Patienten Code 005 (Tabelle 3) wiesen wir Lymphozyten nach, die aber keine CD44v10-Expression zeigten (Tabelle 25).

Aus der Auflistung in Tabelle 53 von Untersuchungen der CD44v10-Expression auf Kopf-Hals-Tumoren wird deutlich, das sich nur Herold-Mende et al [80] damit befasst haben.

4.7.1. Immunhistochemischer Nachweis von CD44v10 im Tumorzentrum von Kopf-Hals-Tumoren

Die Expression von CD44v10 war in allen Teilen des Karzinoms auf allen 20 Karzinomschnitten nur schwach nachweisbar und nicht sehr homogen verteilt. Teilweise waren auch nur wenige Karzinomzellen eines Gewebeschnittes angefärbt (vgl. Abbildung 22, vgl. Tabelle 24). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Herold-Mende et al [80]. Auf 21 der untersuchten 55 Primärtumoren wiesen die Autoren eine homogene Anfärbung nach, dagegen auf 10 Primärtumoren, vergleichbar mit unseren Ergebnissen, nur einzelne angefärbte Tumorzellen.

Zwei Karzinomgewebe (10%, Tabelle 23, Code-Nr.n 013 und 209) exprimierten in unseren Untersuchungen kein CD44v10. Die Scorewerte der Karzinomgewebe variierten zwischen 0 und 6 mit einem Medianwerte von 2. Die CD44v10-Expression war auf dem Plattenepithel im Tumorzentrum deutlich geringer mit einem Median von 0,5 (N = 2): Tabelle 23, vgl. Tabelle 28, mikroskopische Abbildung 22, grafische Darstellung Abbildung 23. Die immunreaktive Scores und PP-Werte der CD44v10-Expression auf den Karzinomzellen und auf dem Plattenepithel des Tumorzentrums unterschieden sich statistisch nicht (Wilcoxon: p (IRS und PP) = 1,00, vgl. Tabellen 31 und 32).

Herold-Mende et al [80] wiesen auf etwa 30% der Tumorzentrumschnitte mit mehr als 90% deutlich mehr CD44v10-positive Karzinomzellen nach als wir in unseren Untersuchungen. Auf etwa 50% dieser Gewebeschnitte konnten die Autoren zwischen 50 und 90% und auf etwa 15% der Gewebeschnitte weniger als 50% CD44v10-positive Karzinomzellen nachweisen. Wenn sich auch das Beurteilungskriterium der CD44v10-positiven Zellen bei Herold-Mende et al von unserer Bewertung unterscheidet, lässt sich dennoch ein deutlicher Unterschied der Ergebnisse mit einer höheren Expression von CD44v10 bei Herold-Mende et al erkennen.

Herold-Mende et al [80] stellten auf den Metastasen, die meist schlechter als der Primärtumor differenziert sind, eine signifikante Abnahme der CD44v10-positiven Tumorzellen im Vergleich zu den Primärtumoren fest. Wir konnten dagegen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der CD44v10-Expression auf G2- und G3-Tumoren nachweisen: U-Test: p (IRS) = 0,286; p (PP) = 0,317, vgl. Tabellen 41 und 42).

Im Gewebe des Tumorzentrums (Tabelle 23, Abbildung 23) war 6-mal Drüsengewebe vorhanden und nur 2-mal schwach angefärbt (SI = 1). In unserer Studie war CD44v10 nur in einem der 9 Schnitte mit Gefäßendothelien, nicht aber im Bindegewebe und der Muskulatur exprimiert. Nervengewebe zeigte in 2 von 3 Schnitten eine geringe CD44v10-Expression.

Der Kurvenvergleich der Kaplan-Meier-Kurven (vgl. Punkt 2.2.4.) lag bei geringerer und höherer CD44v10-Expression auf dem Karzinom im Tumorzentrum mit Log Rank $p = 0.074$ nahe einer Signifikanz (Abbildung 30, vgl. Tabelle 44). Da die nachgewiesene Expression von CD44v10 auf dem Karzinom in unserer Studie insgesamt aber nur sehr niedrig ist (Tabelle 23), eignet sich der Nachweis der CD44v10-Expression eher nicht für eine prognostische Aussage. Die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs war bei Patienten mit einer höheren CD44v10-Expression mit 25 ± 9 Monate deutlich geringer als bei Patienten, in deren Karzinom wir eine geringere Expression nachwiesen: 92 ± 22 Monate.

4.7.2. Immunhistochemischer Nachweis von CD44v10 im Tumorrand und im tumorfernen Gewebe von Kopf-Hals-Tumoren

Im Tumorrand liess sich CD44v10 neben dem Karzinom und Plattenepithel zusätzlich nur auf Drüsengewebe und Nervengewebe nachweisen (Tabelle 24, Abbildung 24). Eine CD44v10-Expression wiesen wir auf 3 von 5 Drüsengeweben nach. Der Nachweis von CD44v10 auf Nervengewebe gelang auf allen 4 Schnitten mit Nervengewebe. Auf den 8 Schnitten mit Gefäßendothelien fehlte eine CD44v10-Expression. Im tumorfernen Bereich (Tabelle 25, Abbildung 25) war CD44v10 ebenfalls neben dem Plattenepithel nur auf 4 der 8 Schnitte mit Nerven- und Drüsengewebe nachweisbar.

Vergleicht man die Anzahl CD44v10-positiven Zellen (PP-Werte) im Plattenepithel des Tumorrangewebes mit den PP-Werten im Karzinom des Tumorzentrums, ist die Zahl der CD44v10-positiven Zellen im Tumorrang auf dem Epithel höher als auf dem Karzinom (p (PP) = 0,096). Eine statistische Berechnung zwischen den PP-Werten des Karzinoms im Tumorrang und dem normalen Epithel des Tumorrandes konnte nicht durchgeführt werden (Tabelle 32). Zu einem

dazu widersprüchlichen Ergebnis kamen wir bei der Untersuchung des tumorfernen Plattenepithels von Patienten mit G3-Tumoren und G2-Tumoren. Die Zahl CD44v10-positiver Epithelzellen im tumorfernen Bereich ist bei unseren Patienten mit G3-Tumoren signifikant größer als bei den Patienten mit G2-Tumoren (Tabellen 41 und 42, U-Test: p (IRS) = 0,002 bzw. p (PP) = 0,003). Nach Herold-Mende et al [80] müsste man bei einer schlechteren Differenzierung mit einer Abnahme der CD44v10-positiven Zellen rechnen.

Der Kurvenvergleich der Kaplan-Meier-Kurven (vgl. Punkt 2.2.4.) war bei geringerer und höherer CD44v10-Expression auf dem Karzinomrest im Tumorrangewebe (7 Patienten) nicht signifikant (Log Rank p = 0.313): Abbildung 34, vgl. Tabelle 45. Die rezidivfreie Zeit betrug bei Patienten mit einer höheren CD44v10-Expression im Karzinomrestgewebe nur 9 ± 4 Monate versus 81 ± 31 Monaten bei Patienten, in deren Karzinom wir eine geringere Expression nachwiesen.

4.7.3. Einschätzung der nachgewiesenen Expression von CD44v3 auf den Kontrollgeweben im Vergleich zu den Ergebnissen der Tumorgewebe

Wie bei Herold Mende et al [80], ließ sich CD44v10 auf den Plattenepithelien unserer Kontrollgewebe der Patienten ohne Tumoren (Tabelle 4) im Stratum basale, Stratum suprabasale und Stratum spinosum nachweisen. Dieses CD44v10-Verteilungsmuster entspricht dem auf den Plattenepithelien der Gewebe unserer Tumorpatienten.

Signifikante Unterschiede für eine Downregulierung der CD44v10-Expression auf den Plattenepithelien der Kontrollgewebe (Tabelle 26, Abbildung 26) im Vergleich zur Expression auf den Plattenepithelien der Gewebe der Karzinompatienten konnten wir weder im Tumorzentrum noch im Tumorrang oder tumorfernen Bereich nachweisen. Allerdings waren die immunreaktiven Scorewerte bzw. war die Zahl der CD44v10-positiven Zellen (PP) auf dem Plattenepithel im Tumorzentrum merklich kleiner als auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe (Tabellen 51 und 52, U-Test: p (IRS) = 0,069, p (PP) = 0,065). Mit Vorbehalt können die geringen p -Werte als eine Tendenz zur Downregulierung von CD44v10 bei einer beginnenden Karzinogenese des Plattenepithels gedeutet werden. Das Ergebnis kann auch durch die geringe Anzahl untersuchter tumornaher Plattenepithelien bedingt sein.

Herold-Mende et al [80] stellten zwischen der CD44v10-Expression auf dem Kontrollepithel gesunder Probanden und CD44v10-positiver Tumorzellen eine signifikante Downregulation fest. In unserer Studie war der Unterschied zwischen der CD44v10-Expression (PP und IRS) auf den

Plattenepithelien der Kontrollgewebe und auf den Karzinomzellen im Tumorzentrum nicht signifikant: U-Test: p (IRS) = 0,331, p (PP) = 0,368, Tabellen 51 und 52.

4.8. Kann der Nachweis der Spleißvarianten CD44v3, CD44v5, CD44v7 oder CD44v10 die Diagnostik oder Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich unterstützen?

Nach einer Standardtherapie von Kopf-Hals-Tumoren wird die Prognose vorwiegend durch häufig auftretende Rezidive oder Zweittumoren und durch relativ selten auftretende Fernmetastasen bestimmt. Eine wesentliche Ursache der Rezidive und Zweittumoren ist die Feldkanzerisierung in der Umgebung des Tumors [170; vgl. 23], die man nur durch molekulare Marker nachweisen kann [24, 168, 179, 190]. Mitbestimmend für den weiteren Krankheitsverlauf der Patienten sind weiterhin auch disseminierte einzelne Krebszellen in der Tumorumgebung (Mikrometastasen) oder okkulte Mikrometastasen in tumornahen Lymphknoten, die den Methoden der Routinehistopathologie entgehen können. Zur Erkennung dieser minimalen residualen Erkrankung (minimal residual disease, MRD) ist die Sensitivität einer RT-PCR geeigneter als die Immunhistochemie [128; vgl. 133 und 134, 167]: In den vergleichenden Untersuchungen von Nagatani et al [128] betrug z.B. die Sensitivität der Immunhistochemie 33%, die Sensitivität der RT-PCR (reverse transcriptions-PCR) 83%. Um geeignete Sequenzen für den molekularbiologischen Nachweis der minimalen residualen Erkrankung eines bestimmten Tumors zu suchen, sind immunhistochemische Untersuchungen sehr hilfreich. Bisher waren neben Zytokeratinen auf diese Weise CD44v6 und die ähnlichen Adhäsionsmoleküle U36 und E48 nach immunhistochemischen Untersuchungen von Einzelzellen aus Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich [45, 133, 134] zum Nachweis von Mikrometastasen oder der minimalen residualen Erkrankungen in der RT-PCR eingesetzt worden [59, 60, 133, 134, 190].

Ergänzt werden diese Untersuchungen bei HNSCC-Patienten durch den Nachweis von disseminierten einzelnen Krebszellen in Blut oder im Knochenmark zur Einschätzung der Prognose [36, 60, 61, 139, 188, 190].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Adhäsionsmoleküle CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10 wurden bisher nicht zum Nachweis von Mikrometastasen oder zur Erkennung der minimal residual diseases (MRD) eingesetzt. Vergleicht man die immunreaktiven Scorewerte der vier Spleißvarianten auf den Karzinomzellen im Tumorzentrum der untersuchten 20 Patienten, so war der Medianwert von CD44v5 (Tabelle 15) mit 10.5 mit Abstand am höchsten: im Vergleich dazu CD44v3 (Tabelle 11) Medianwert 6, CD44v7 (Tabelle 19) Medianwert 1 und Medianwert von CD44v10 (Tabelle 23) = 2. Das Ergebnis der vorliegenden Studie von 20 Patienten zeigt, dass von den untersuchten vier CD44-Spleißvarianten für den Nachweis einer minimalen

residualen Erkrankung nur CD44v5 ausreichend hoch auf den Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches exprimiert ist. CD44v5 ist signifikant höher auf dem Karzinom im Tumorzentrum und Tumorrand als die anderen Spleißvarianten exprimiert und die Expression von CD44v3 ist signifikant höher als die von CD44v7 und CD44v10 (Tumorzentrum: Tabellen 33 und 34, Tumorrand: Tabellen 35 und 36). Dagegen ist die Expression aller 4 Spleißvarianten auf dem Plattenepithel im Tumorzentrumgewebe nicht signifikant unterschiedlich. Im Tumorrand und tumfernen Gewebe ist die CD44v5-Expression auf dem Plattenepithel signifikant am höchsten: Tumorrand Tabellen 35 und 36, tumfernen Tabellen 37 und 38. Dies stimmt mit den Untersuchungen von Bankfalvi et al [8] überein, die nach der Untersuchung von 93 Karzinomen von Kopf-Hals-Tumoren auch zu der Einschätzung kommen, dass CD44v5 (u.a.) ein Target für eine Antikörper-basierte adjuvante Therapie sein könnte. Kritischer sehen dies Braun und Pantel [26] in ihren Untersuchungen zum Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark. Der diagnostische Nachweis der CD44v5-Expression wird von ihnen nur als bedingt geeignet eingestuft und weniger für eine adjuvante Therapie geeignet. Auch Piffko et al [142] kamen, im Gegensatz zu Bankfalvi et al [8], nach einer Untersuchung von 100 Karzinomgeweben zu der Einschätzung, dass CD44v5 kein geeigneter Tumormarker für die Diagnostik von HNSCC ist.

Die Expression von CD44v3 auf den untersuchten 20 Karzinomgeweben in der vorliegenden Arbeit ist signifikant geringer als die Expression von CD44v5 ausgeprägt und danach nur mit Vorbehalt für den diagnostischen oder therapeutischen Einsatz geeignet. Dagegen kamen Bankfalvi et al [8] nach der Untersuchung von 93 Karzinomen zu dem Ergebnis, dass auch CD44v3 ein wichtiger Tumormarker und ein wichtiges therapeutisches Target sein könnte. Dies wird durch die Ergebnisse von Franzmann et al [52] sowie Reatagui et al [145] unterstützt. Um unsere Ergebnisse zu überprüfen, sind Untersuchungen an einer größeren Patientenzahl notwendig.

Die sehr geringe Expression von CD44v7 in unserer Studie steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kuo et al [108], die CD44v7 auch als einen geeigneten diagnostischen Marker einschätzten. Für die Untersuchung von Mikrometastasen in regionalen Lymphknoten von Patienten mit kolorektalen Karzinomen eignete sich in der Studie von Chun et al [35] neben CD44v6 auch der Nachweis von CD44v7.

Die CD44v10-Expression war in der vorliegenden Arbeit bei den 20 untersuchten Karzinomgeweben nur sehr niedrig. Herold-Mende et al [80] fanden gleichfalls in 55 Karzinomgeweben nur eine mäßige CD44v10-Expression. Wir möchten daraus ableiten, dass die CD44v10-Expression weder für einen Einsatz als Tumormarker noch als ein Therapie-Target ausreicht.

Insgesamt kommen wir aber zu der Einschätzung, dass alle immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen eine wichtige diagnostische Bedeutung haben, die ggf. zur Korrektur des ermittelten Tumorstaging und zu einer veränderten Therapie führen kann [24, 45]. Andererseits sind diese Untersuchungen wichtig für die Suche geeigneter Targets einer adjuvanten Antikörper-Therapie oder einer aktiven Vakzinetherapie [79].

Mit dem gleichen Ziel sind Untersuchungen nach löslichen CD44-Molekülen als Tumormarker einzuschätzen. Kawano et al [96, 97] untersuchten vor und nach der Therapie neben CD44s und CD44v6 auch CD44v5 und konnten bei 81 Patienten mit einem HNSCC als Therapieeffekt eine Reduktion von löslichem CD44s, CD44v5 und CD44v6 nachweisen.

Bisher vorliegende Studien und unsere eigenen Ergebnisse zeigen, dass CD44v5 sowohl als ein diagnostischer Tumormarker als auch ein therapeutisches Target für eine adjuvante Therapie für Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt werden könnte.

5. Zusammenfassung

Molekulare Mechanismen der Infiltration und Destruktion benachbarter Gewebe bzw. der Metastasierung von Kopf-Hals-Tumoren sind komplex und noch nicht ausreichend bekannt. Eigenschaften der Tumorzellen wie das Loslösen vom Primärtumor, das Eindringen in Blut- und Lymphgefäße, das Festsetzen im Zielorgan und die Freisetzung von Tochtergeschwülsten könnten sehr wohl durch eine Änderung der Oberflächenmoleküle bedingt sein. Tumorzellen unterscheiden sich oft erheblich in der Art und Ausprägung ihrer Oberflächenmoleküle von ihren Vorläuferzellen. Die Adhäsionsmoleküle vermitteln z.B. Bindungen an die extrazelluläre Matrix und haben so unter anderem Einfluß auf die Beweglichkeit der Zellen.

CD44-Antigene bilden eine Gruppe heterogener Glykoproteine, die in der Standardform oder in unterschiedlichsten Spleißvarianten von verschiedensten Zellen und Geweben wie z.B. von hämatopoetischen Zellen, von Epithelzellen, von Fibroblasten, von Gliazellen, aber auch von Tumorzellen exprimiert werden.

Die Prognose der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich wird vor allem durch häufige Rezidive und / oder lokoregionale Zweittumoren bestimmt. Die Fernmetastasierung der Tumoren steht im weiteren Verlauf der Erkrankung nur an zweiter Stelle. Die Feldkanzerisierung in der Umgebung des Primärtumors, aber auch die Disseminierung der Tumorzellen spielt für den Krankheitsverlauf eine wichtige Rolle. Deshalb bemüht man sich, neben der chirurgischen Standardtherapie des Primärtumors, ggf. in Kombination mit einer Radio-Chemotherapie, nach Invasionsmarkern zu suchen, um frühzeitig molekulare Prozesse in der Tumorumgebung zu erkennen, um so das Risiko für den weiteren Krankheitsverlauf abzuschätzen und rechtzeitig weitere therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können.

Für die Ausbreitung der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich sind multiple Faktoren bestimmend, dabei auch das Adhäsionsmolekül CD44 und in unterschiedlicher Bedeutung die Spleißvarianten CD44v2 bis CD44v10. In früheren Untersuchungen unserer Klinik war auf die Bedeutung von CD44v6 hingewiesen worden. Deshalb befassen sich die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit mit der Frage, welche Bedeutung der Nachweis der Spleißvarianten CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10 für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich hat.

Der immunhistochemische Nachweis der Expression der vier Spleißvarianten in den Geweben der Tumor- und Kontrollpatienten erfolgte mit der APAAP-Methode. Hauptsächlich konnten wir dafür Gefrierschnitte herstellen und einsetzen. Bei einem geringeren Teil der Gewebe der Tu-

morpatienten (10%) stand uns nur formalinfixiertes Material für Paraffinschnitte zur Verfügung. Die Expression der vier Spleißvarianten wurde semiquantitativ durch Scorewerte ermittelt, dabei wurde aus dem Färbeindex (SI) und dem prozentualen Anteil positiver Zellen (PP) ein immunreaktiver Scorewert ($IRS = SI \times PP$) berechnet. Dies ermöglichte uns einen Vergleich zwischen der Expression der vier Spleißvarianten. Da es uns darauf ankam, auch die Tumorumgebung in diese Studie einzubeziehen, untersuchten wir Tumorzentrumgewebe, Tumorrandgewebe und tumorferne Gewebe von 20 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich und verglichen die Expression in den einzelnen Gewebebereichen untereinander sowie mit 20 Kontrollgeweben aus vergleichbaren Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereiches. Neben 20 Karzinomen im Zentrumgewebe konnten wir in 7 Tumorrandgeweben, die noch Karzinomreste enthielten, ebenfalls die Expression der vier CD44-Spleißvarianten nachweisen. Weiterhin untersuchten wir in allen Geweben die Expression der vier CD44-Spleißvarianten auf Plattenepithelien und zusätzlich die Expression im Bindegewebe, im lymphatischen Gewebe bzw. in lymphozytären Infiltraten, auf Drüsengeweben, in der Muskulatur, auf Endothelien sowie auf Nervengewebe.

Auf allen Karzinomen des Tumorzentrums oder Tumorrandbereichs wiesen wir eine Antigenexpression von CD44v3 und CD44v5 nach. Mehr als 70% dieser Karzinome zeigten auch eine Expression von CD44v7 und mehr als 86% eine CD44v10-Expression.

Auf dem nicht entarteten Plattenepithel (neben dem Karzinom im Tumorzentrum und / oder Tumorrand sowie im tumorfernen Gewebe) waren mit wenigen Ausnahmen immer alle untersuchten CD44-Spleißvarianten nachzuweisen. CD44v7 war auf einem Gefrierschnitt im Tumorrand nicht exprimiert, CD44v10 auf einem Paraffinschnitt des Tumorzentrums. Auf den Geweben der Kontrollpatienten wiesen wir auf allen Epithelien CD44v3 und CD44v5 nach, auf 89% der Epithelien CD44v7 und auf 94% der Epithelien CD44v10.

Bindegewebe zeigte mit unseren CD44-Antikörpern keine Anfärbung. Tonsilläres lymphatisches Gewebe bzw. lymphozytäre Infiltrate zeigten in wenigen Präparaten eine Expression von CD44v3, CD44v5 oder CD44v10. Muskelgewebe war auf den Paraffinschnitten mit Anti-CD44v3 und Anti-CD44v5 unspezifisch angefärbt. Nervengewebe zeigte auf Kryostatschnitten eine Anfärbung mit Anti-CD44v10. Auf Gefäßendothelien, vor allem auf Paraffinschnitten, wiesen wir eine Expression von CD44v3 und CD44v5 nach, vereinzelt auch von CD44v10. Die Gefäßendothelien auf den Gefrierschnitten der Kontrollgewebe zeigten in keinem Fall eine Expression der untersuchten 4 CD44-Spleißvarianten. Alle Drüsengewebe (Paraffin- und Kryostatschnitte) in den Geweben der Karzinompatienten reagierten mit den 4 untersuchten Anti-

CD44-Antikörpern. Dagegen zeigte das Drüsengewebe in den Kontrollgeweben nur eine Expression von CD44v3 und CD44v5.

Die Expression der einzelnen CD44-Spleißvarianten unterschied sich nicht signifikant in den drei untersuchten Gewebelokalisationen (Tumorzentrum, Tumorrand, tumorfernes Gewebe). Die Expression von CD44v10 auf dem tumorfernen Plattenepithel war signifikant abhängig vom Tumorgrading. Ansonsten war die Expression der CD44-Spleißvarianten auf den Geweben mit einem unterschiedlichen Tumorgrading oder Tumorstaging nicht signifikant verschieden.

Für die Ermittlung eines geeigneten diagnostischen und / oder therapeutischen Markers interessierte vor allem, welche der vier CD44-Spleißvarianten auf den in dieser Arbeit untersuchten Geweben, vor allem auf den Karzinomen und den Plattenepithelien, am stärksten exprimiert war. An unseren Ergebnisstabellen erkennt man, dass die Expression von CD44v5 deutlich höher als die Expression der anderen drei Spleißvarianten war. Weiterhin unterschied sich die nur gering nachweisbare Expression von CD44v10 signifikant von der Expression der drei anderen Spleißvarianten: An unseren Patientengeweben konnten wir nur eine intrazelluläre Expression von CD44v10 nachweisen, während die anderen Spleißvarianten auf der Zellmembran lokalisiert waren.

Da wir seit der Gewebeentnahme mehrere Jahre den weiteren Krankheitsverlauf der Patienten durch die Tumornachsorge in unserer Klinik verfolgen konnten, überprüften wir in Kaplan-Meier-Kurven eine mögliche prognostische Bedeutung der nachgewiesenen CD44-Expression auf dem Karzinom im Tumorzentrum und im Tumorrand. Eine prognostische Aussage der Kaplan-Meier-Kurven ist durch die geringe Patientenzahl nur mit gebotener Vorsicht möglich: Im Tumorzentrum ist die Kaplan-Meier-Kurve mit einer höheren CD44v10-Expression annähernd signifikant verschieden von der Kurve mit fehlender oder geringerer CD44v10-Expression und die rezidivfreie Zeit war bei den Patienten mit einer höheren CD44v10-Expression deutlich geringer.

Für die Kaplan-Meier-Kurven der CD44-Expression auf dem Karzinomrest im Tumorrand war die Patientenzahl noch geringer. Tendenziös ist bei Patienten mit einer höheren CD44v3-, CD44v5- und CD44v10-Expression im Tumorrand die rezidivfreie Zeit deutlich kürzer als bei Patienten mit einer geringeren Expression dieser Spleißvarianten. Dagegen war bei Patienten mit einer höheren CD44v7-Expression im Tumorrandgewebe die mittlere Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs deutlich verlängert.

In weiteren Untersuchungen an einer größeren Patientenzahl müssen diese Befunde noch erhärtet werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Kosma V-N. Expression and prognostic value of CD44 Standard and variant v3 and v6 Isoforms in Prostate Cancer. *Eur Urol* 2001; 39: 138-143.
2. Adolf GR, Ostermann E, Patzelt E. Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen variante Formen von CD44. 1994; In: CD44-Symposium, AKH Wien, 9. Juni 1994, Abstract 804.
3. Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4: 2868-2880.
4. Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B: 301-309.
5. Arndt O, Brock J, Kundt G, Müllender A. Der Nachweis humaner Papillomvirus (HPV) DNA in formalinfixierten invasiven Plattenepithelkarzinomen des Larynx mit der Polymerase Chain Reaction (PCR). *Laryngo-Rhino-Otol* 1994; 73: 527-532.
6. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1303-1313.
7. Bahar R, Kunishi M, Kayada Y, Yoshiga K. CD44 variant 6 (CD44v6) expression as a progressive marker in benign, premalignant and malignant oral epithelial tissues. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997; 26: 443-446.
8. Bankfalvi A, Kraßort M, Buchwalow IB, Vegh A, Felszeghy E, Piffko J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin and -catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol* 2002; 198: 343-351.
9. Bankfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 291-298.
10. Bartel C. Verteilung des α 2-Makroglobulin-Rezeptors auf Plattenepithelkarzinomen und dem Tumor benachbarten Geweben im Kopf-Hals-Bereich. Dissertation der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin 2000: 1-137.
11. Beham-Schmid C, Heider KH, Hoefler G, Zatloukal K. Expression of CD44 splice variant v10 in Hodgkin's disease is associated with aggressive behaviour and high risk of relapse. *J Pathol* 1998; 186: 383-389.
12. Bergerheim US, Kunimi K, Collins VP. Deletion mapping of chromosomes 8, 10 and 16 in human prostatic carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1991; 3: 215 -220.
13. Berner HS, Davidson B, Berner A, Risberg B, Nesland JM. Differential expression of CD44s and CD44-v3-v10 in adenocarcinoma cells and reactive mesothelial cells in effusions. *Virchows Arch* 2000; 436: 330-335.
14. Bevilacqua MP. Endothelial leucocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 767-804.
15. Bierer BE, Burakoff SJ. T cell receptors: adhesion and signaling. *Adv Cancer Res* 1991; 51: 49-76.
16. Birchmeier W, Behrens J, Weidner KM, Hülsken J, Birchmeier C. Epithelial differentiation and the control of metastasis in carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 118-135.
17. Bloor BK, Rajarajan A, Jaafary-Haghighat K, Odell EW. Transcription and expression of CD44 variant exons by oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 2002; 21: 907-913.
18. Böttger T, Maschek H, Gottwald W, Lobo M, Brenner W, Junginger T. Expression von CD44 und seiner Isoformen v4, v5, v6, v7, v10 – neue prognostische Parameter beim duktalem Pankreaskarzinom? *Chirurg* 1998; 69: 1089-1092.
19. Böttger TC, Youssef V, Dutkowski P, Maschek H, Brenner W, Junginger T. Expression of CD44 variant proteins in Adenocarcinoma of Barrett's esophagus and its relation to prognosis. *Cancer* 1998; 83: 1074-1080.
20. Bourguignon LY, Lida N, Welsh CF, et al. Involvement of CD44 and its variant isoforms in membrane-cytoskeleton interaction, cell adhesion and tumor metastasis. *J Neurooncol* 1995; 26: 201-208.

21. Bourguignon LY, Zhu D, Zhu H. CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signalling and tumor progression. *Front Biosci* 1998; 3: 637-649.
22. Boyle P, Macfarlane GJ, Maisonneuve P, et al. Epidemiology of mouth cancer in 1989: A review. *J Roy Soc Med* 1990; 83: 724-730.
23. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 2003; 63: 1727-1730.
24. Brennan J A, 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: 429-435.
25. Braun OM, Hassmann M, Horn KH, Lainz KH. Histopathologic CD44 var (v6) Reactivity of Human Breast Cancer in Correlation with Staging, Grading, histological Tumor Type and Receptor Status. CD44-Symposium, AKH Wien, 9. Juni 1994, Abstract Nr. 812.
26. Braun S, Pantel K. Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow. *Cancer and Metastasis Review* 1999; 18: 75-90.
27. Brown TA, Bouchard T, St.John T, Wayner E, Carter WG. Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44 E) as a heparinsulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol* 1991; 113: 207-221.
28. Bühl A, Zöfel P. SPSS 12 (2005). Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. 9. überarbeitete und erweiterte Auflage. Pearson Education Deutschland GmbH, München, 1-744
29. Camp RL, Kraus TA, Pure E. Variations in the cytoskeletal interaction and posttranslational modification of the CD44 homing receptor in macrophages. *J Cell Biol* 1991; 115: 1283-1292.
30. Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, et al. Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol* 2007; 30: 813-823.
31. Carinci F, Stabellini G, Calvitti M, et al. CD44 as prognostic factor in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Craniofacial Surg* 2002; 13: 85-89.
32. Chan BMC, Matsuura N, Takada Y, Zetter BR, Hemmler ME. In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on Rhabdomyosarcoma cells. *Science* 1991; 251: 1600-1602.
33. Chan GG, Tai BC, Liang S, Lim DT, Soo KC. Squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC)-multimodality treatment and impact on survival. *Asian J Surg* 2002; 25: 35-40.
34. Chu DZ, Gibson G, David D, Yen Y. The surgeons role in cancer prevention. The model in colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 3054-3069.
35. Chun SY, Bae OS, Kim JB . The significance of CD44 variants expression in colorectal cancer and its regional lymph nodes. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 696-700.
36. Colnot DR, Nieuwenhuis EJ, Kuik DJ, et al. Clinical significance of micrometastatic cells detected by E48 (Ly-6D) reverse transcription-polymerase chain reaction in bone marrow of head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7827-7833.
37. Coombe DR, Rider CC. Lymphocyte homing receptors cloned - a role for anionic polysaccharides in lymphocyte adhesion. *Immunol Today* 1989; 10: 289-291.
38. Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 219-229.
39. DakoCytomation, Boenisch T (ed.). Handbuch immunchemische Färbemethoden, 3. Aufl 2003; 1-86
40. Dämmrich JR, Vollmers HP. Unterschiedliche Expression von CD44v6 im intestinalen und diffusen Typ des Magenkarzinoms: Symposium Adhäsionsmoleküle, Faktoren der Zellorientierung und Interaktion. Universität Giessen, 21. Januar 1995, Abstract 1195.
41. Davies L, Welch G. Epidemiology of head and neck cancer in the United States. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 135: 451-457.

42. Drlicek M, Casati B, Liszka U, Lintner F. CD44 bei Lungenkarzinomen, CD44-Symposium, AKH Wien, 9. Juni 1994, Abstract 808.
43. Endo K, Terada T. Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *J Hepatol* 2000; 32: 78-84.
44. Evan G. Cancer - a matter of live and cell death. *Int J Cancer* 1997; 71: 709-711.
45. Fabricius EM, Guschmann M, Langford A, et al. Immunohistochemical assessment of the tumour-associated epitopes CD44v6 and E48 in tumour-free lymph nodes from patients with squamous cell carcinoma in the head-neck region. *Analytical Cellular Pathology* 2000; 20: 115-129.
46. Fabricius EM, Guschmann M, Wildner GP, et al. Divergent immunohistochemical E48 and CD44-v6 antigen expression patterns between lymph node metastases and primary squamous cell carcinomas in the head and neck region. *Cancer J* 1998; 11: 153-159.
47. Fabricius EM, Langford A, Bier J, et al. Immunohistochemical characterization of E 48 and CD44-v6 expression in head and neck carcinomas. *Cancer J* 1997; 10: 325-329.
48. Faye-Lund H, Abdelnoor M. Prognostic factors of survival in a cohort of head and neck cancer patients in Oslo. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1996; 32B: 83-90.
49. Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res* 1978; 28: 149-250.
50. Finke LH, Zörb C, Haensch W, Schlag PM, Terpe HJ. Expression von CD44 Isoformen - ein neuer histopathologischer Parameter beim kolorektalen Karzinom? *Zentralbl Chir* 1996; 121: 450-454.
51. Fonseca I, Pereira T, Rosa-Santos, Soares J. Expression of CD44 Isoforms in Squamous Cell Carcinoma of the Border of the Tounge: A Correlation with Histological Grade, Pattern of Stromal Invasion and Cell Differentiation. *J Surg Oncol* 2001; 76: 115-120.
52. Franzmann EJ, Weed DT, Civantos FJ, Goodwin WJ, Bourguignon LY. A novel CD44v3 isoform is involved in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 124: 426-432.
53. Friedrichs K, Franke F, Lisboa BW, et al. CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5424-5433.
54. Friedrichs K, Kügler G, Franke F, et al. CD44 isoforms in prognosis of breast cancer. *Lancet* 1995; 345: 1237.
55. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; 113: 173-185.
56. Gallatin WM, Wayner EA, Hoffman PA, et al. Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4654-4658.
57. Galluzzo E, Albi N, Fiorucci S, et al. Involvement of CD44 variant isoforms in hyaluronate adhesion by human activated T cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2932-2939.
58. Garcia-Montesinos-Perea B, Val-Bernal JF, Saiz-Bustillo R. Epidermoid carcinoma of the lip: An immunohistochemical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10: 454-461.
59. Garrel R, Dromard M, Costes V, et al. The diagnostic accuracy of reverse transcription-PCR quantification of cytokeratin mRNA in the detection of sentinel lymph node invasion in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a comparison with immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2498-2505.
60. Gath HJ, Brakenhoff RH. Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18: 109-126.
61. Ghossein R, Battacharya S, Rosai J. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1950-1960.
62. Goldstein LA, Butcher EC. Identification of mRNA that encodes an alternative form of H-CAM (CD44) in lymphoid and non-lymphoid tissues. *Immunogenetics* 1990; 32: 389-397.
63. Goldstein LA, Zhou DFH, Picker LJ, et al. A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 1989; 56: 1063-1072.

64. Gonzalez-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, et al. Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in tongue cancer. *Anticancer Res* 2003; 23 (6D): 5187-5202.
65. Gotley DC, Fawcett J, Walsh MD, Reeder JA, Simmons DL, Antalis TM. Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumour progression in colorectal cancer. *Brit J Canc* 1996; 74: 342-351.
66. Gotoda T, Matsumura Y, Kondo H, et al. Expression of CD44 variants and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut* 2000; 46: 14-19.
67. Gotoda T, Matsumura Y, Kondo H, et al. Expression of CD44 variants and its association with survival in pancreatic cancer. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 1033-1040.
68. Griffioen AW, Horst E, Heider KH, et al. Expression of CD44 splice variants during lymphocyte activation and tumor progression. *Cell Adhes Commun* 1994; 2: 195-200.
69. Grimme H, Termeer C, Bennett K, et al. Colocalization of basic fibroblast growth factor and CD44 isoforms containing the variably spliced exon v3 (CD44v3) in normal skin and in epidermal skin cancers. *Br J Dermatol* 1999; 141: 824-832.
70. Grundmann E. Cancer morbidity and mortality in USA Mormons and Seventh-day Adventists. *Arch Anat Cytol Pathol* 1992; 40: 73-78.
71. Güler G, Saraç S, Üner A, Karabulut E, Ayhan A, Hiroshi O. Prognostic value of CD44 variant 6 in laryngeal epidermoid carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128: 393-397, 2002.
72. Günthert U. CD44: a multitude of isoforms with diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 1993; 184: 47-63.
73. Günthert U. CD44 in malignant disorders. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 271-285.
74. Günthert U, Hofmann M, Rudy M, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24.
75. Günthert U, Stauder R, Mayer B, Terpe HJ, Finke L, Friedrichs K. Are CD44 variant isoforms involved in human tumor progression? *Cancer Surveys* 1995; 24: 19-43.
76. Hanak H. First Experience with CD44v5, -v6 in Immunohistochemistry on Carcinomas of Breast and Large Bowel. CD44-Symposium, AKH Wien, 9. Juni 1994, Abstract 810.
77. Hart IR, Goode NT, Wilson RE. Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochem Biophys Acta* 1989; 989: 65-84.
78. Haruyama K, Matsumura Y, Moriya Y, et al. Clinicopathological significance of the expression of CD44v2 in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1999; 19: 4421-4428.
79. Heider K-H, Sproll M, Susani S, et al. Characterization of a high-affinity monoclonal antibody specific for CD44v6 as candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 43: 245-253.
80. Herold-Mende C, Seiter S, Born AI, et al. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Pathol* 1996; 179: 66-73.
81. Hesse J. Histologischer Differenzierungsgrad, proliferative Aktivität und CD44-Varianten in oralen epidermoiden Karzinomen. Dissertation der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena: 1996: 1-52.
82. Hirano H, Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Bell JI, Hodes RJ. CD44 isoform expression mediated by alternative splicing: tissue-specific regulation in mice. *Int Immunol* 1994; 6: 49-59.
83. Hudson DL, Speight PM, Watt FM. Altered expression of CD44 isoforms in squamous-cell carcinoma and cell lines derived from them. *Int J Cancer* 1996; 66: 457-463.
84. Hyckel P, Kosmehl H, Berndt A, et al. Immunohistochemische Demonstration von CD44H, CD44v3 und CD44v6 im oralen Plattenepithelkarzinom. Quantifizierung und Korrelation zum morphologischen Malignitätsgrad sowie zum TNM-Status. *Dtsch Z Kiefer Gesichtschir* 1995; 19: 284-289.
85. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
86. Hynes RO, Lander AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations and targeting of cells and axons. *Cell* 1992; 68: 303-322.

87. Idzerda RL, Carter WG, Nottenburg C, Wayner EA, Gallatin WM, St John T. Isolation and DNA sequence of a cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4659-4663.
88. Ito H, Hatori M, Kinugasa Y, Irie T, Tachikawa T, Nagumo M. Comparison of the expression profile of metastasis-associated genes between primary and circulating cancer cells in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2003 (2B); 23: 1425-1430.
89. Jackson DG, Buckley J, Bell JI. Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. *J Biol Chem* 1992; 267: 4732-4739.
90. Jalkanen S, Jalkanen M, Bargatze RF, Tammi M, Butcher EC. Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J Immunol* 1988; 141: 1615-1623.
91. Janeway CA, Travers P. *Immunologie*. Spectrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin - Oxford 1995; 282
92. Kainz C, Tempfer C, Kohlberger P, et al. Immunohistochemical detection of adhesion molecule CD44 splice variants in lymph node metastases of cervical cancer. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1996; 69: 170-173.
93. Kanke M, Fujii M, Kameyama K, et al. Role of CD44 variant exon 6 in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126: 1217-1223.
94. Kanke M, Fujii M, Kameyama K, et al. Clinicopathological significance of expression of CD44 variants in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 410-415.
95. Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, et al. CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 1999; 59: 219-226.
96. Kawano T, Yanoma S, Nakamura Y, et al. Soluble CD44 standard, CD44 variant 5 and CD44 variant 6 and their relation to staging in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 2005; 125: 392-397.
97. Kawano T, Yanoma S, Nakamura Y, et al. Evaluation of soluble adhesion molecules CD44 (CD44st, CD44v5, CD44v6), ICAM-1 and VCAM-1 as tumor markers in head and neck cancer. *Am J Otolaryngol* 2005; 26: 308-313.
98. Khaldoyanidi S, Achtnich M, Hehlmann R, Zöller M. Expression of CD44 variant isoforms in peripheral blood leukocytes in malignant lymphoma and leukemia: inverse correlation between expression and tumor progression. *Leuk Res* 1996; 20: 839-851.
99. Korabiowska M, Brinck U, Hönig J, Mora O, Bartkowski S, Schauer A. CD44: a marker of metastases of head and neck melanomas. *In Vivo* 1995; 9: 253-256.
100. Koretz K, Hinz U, Lehnert T, Möller P. Expression und prognostische Bedeutung von CD44s und CD44v im kolorektalen Karzinom. Symposium Adhäsionsmoleküle, Faktoren der Zellorientierung und Interaktion. Universität Giessen, 21. Januar 1995, Abstract 1194.
101. Koretz K, Möller P, Lehnert T, et al. Effect of CD44v6 on survival in colorectal carcinoma. *Lancet* 1995; 345: 327-328.
102. Kosunen A, Ropponen K, Kellokoski J, et al. Reduced expression of hyaluronan is a strong indicator of poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 40: 2004: 257-263.
103. Kosunen A, Pirinen R, Ropponen K, et al. CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007; 43: 51-59.
104. Kowalski SR. Nachweis von Papillomvirus-DNA in Kopf-Hals-Tumoren und Tumorrandgebieten mit der PCR. Dissertation der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin 2001: 1-94.
105. Koyama S, Maruyama T, Adachi S. Expression of epidermal growth factor receptor and CD44 splicing variants sharing exons 6 and 9 on gastric and esophageal carcinomas: a two-color flow-cytometric analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 47-54.

106. Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. 5. überarbeitete aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.(Hrsg) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut. Saarbrücken 2006: 13-24.
107. Kunishi M, Kayada Y, Yoshiga K. Down-regulated expression of CD44 variant 6 in oral squamous cell carcinomas and its relationship to regional lymph node metastasis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997; 26: 280-283.
108. Kuo MY, Cheng SJ, Chen HM, Kok SH, Hahn LJ, Chiang CP. Expression of CD44s, CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in betel quid chewing-associated oral premalignant lesions and squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 428-433.
109. Lacy BE, Underhill CB. The hyaluronate receptor is associated with actin filaments. *J Cell Biol* 1987; 105: 1395-1404.
110. Legras S, Günthert U, Stauder R, et al. A strong expression of CD44-v6 correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1998; 91: 3401-3413.
111. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JP, van der Waal I, Snow GB. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer* 1993; 71: 452-456.
112. Lehmann K. Immunhistochemischer Nachweis von p53, mdm-2 und bcl-2 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und der Vergleich ihrer Expression in Abhängigkeit von der Entfernung zum Tumorzentrum. Dissertation der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin 2000: 1-85.
113. Lesley J, English N, Perschl A, Grogoroff J, Hyman R. Variant cell lines selected for alterations in function of the hyluronian receptor CD44 show differences in glycosylation. *J Exp Med* 1995; 182: 431-437.
114. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and ist interacion with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993; 54: 271-335.
115. Levesque MC, Haynes BF. In vitro culture of human peripheral blood monocytes induces hyaluronan binding and up-regulates monocyte variant CD44 isoform expression. *J Immunol* 1996; 156: 1557-1565.
116. Lyons AJ, Jones J. Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36: 671-679.
117. Macfarlane GJ, McCredie M, Pompe-Kirn V, et al. Second cancers occurring after cancers of the mouth and pharynx: data from three population-based regis-tries in Australia, Scotland and Slovenia. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B: 315-318.
118. Marhaba R, Zöller M. CD44 in cancer progression: Adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* 2004; 35: 211-231.
119. Martegani MP, Del Prete F, Gasbarri A, Natali PG, Bartolazzi A. Structural variability of CD44v molecules and reliability of immunodetection of CD44-isoforms using mAbs specific for CD44 variant exon products. *Am J Pathol* 1999; 154:291-300.
120. Masuda M, Kuratomi Y, Shiratsuchi H, Nakashima T, Naonobu K, Komiyama S. Decreased CD44H expression in early-stage tongue carcinoma associates with late nodal metastases following interstitial brachytherapy. *Head Neck* 2000; 22: 662-665.
121. Matsumura Y, Hanbury D, Smith J, Tarin D. Non-invasive detection of malignancy by identification of unusual CD44 gene activity in exfoliated cancer cells. *BMJ* 1994; 5: 619-624.
122. Matsumura Y, Sugiyama M, Matsumura S, et al. Unusual retention of introns in CD44 gene transcripts in bladder cancer provides new diagnostic and clinical oncological opportunities. *J Pathol* 1995; 177: 11-20.
123. Matzku S, Komitowski D, Mildemberger M, Zöller M. Characterization of BSp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Inv Metast* 1983, 3: 109-123.
124. Mayer B, Funke I, Lorenz C, et al. Prognoserelevanz der Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin, ICAM-1, CD44/CD44v9 beim humanen Magenkarzinom. In: Symposium Adhäsionsmoleküle, Faktoren der Zellorientierung und Interaktion. Universität Giessen, 21. Januar 1995, Abstract 1188.

125. Miyasaka M, Tanaka T. How do Lymphocytes find their way in vivo? *Ensho Saisei* 2004; 24: 611-618.
126. Mizera-Nyczak E, Dyszkiewicz W, Heider K, Zeromski J. Isoform expression of CD44 adhesion molecules, Bcl-2, p53 and Ki-67 proteins in lung cancer. *Tumor Biol* 2001; 22: 45-53.
127. Müller W, Schneider A, Heider K-H, Meier S, Hommel G, Gabbert HE. Expression and prognostic value of the CD44 splicing variants v5 and v6 in Gastric cancer. *J Pathol* 1997; 183: 222-227.
128. Nagatani S, Shimada Y, Li Z, et al. Validation of intra-operative detection of paratracheal lymph node metastasis using real-time RT-PCR targeting esophageal squamous cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 549-555.
129. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002; 39: 527-579.
130. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 241-319.
131. Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 260-267.
132. Navarro P, Gomez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M, Cano A. A role for E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol* 1991; 115: 517-533.
133. Nieuwenhuis E, Jaspars L, Castelijn J, et al. Quantitative molecular detection of minimal residual head and neck cancer in lymph node aspirates. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 755-761.
134. Nieuwenhuis EJC, Leemans CR, Kummer JA, Denkers F, Snow GB, Brakenhoff RH. Assessment and clinical significance of micrometastases in lymph nodes of head and neck cancer patients detected by E48 (Ly-6D) quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Lab Invest* 2003; 83: 1233-1240.
135. Oliveira DT, Odell EW. Expression of CD44 variant exons by normal oral epithelia. *Oral Oncol* 1997; 33: 260-262.
136. Oliveira DT, Sherriff M, Odell EW. Expression of CD44 variant exons by primary and metastatic oral squamous carcinomas. *J Oral Pathol Med*, 1998; 27: 303-307.
137. Omara-Opyene AL, Qiu J, Shah GV, Iczkowski KA. Prostate cancer invasion is influenced more by expression of a CD44 isoform including variant 9 than by Muc18. *Lab Invest* 2004; 84: 894-907.
138. Ostwald JPO, Rhode E, Kramp B. Sind die Produkte der Exons v5 und v6 von CD44 Marker für die Metastasierung von Larynxkarzinomen? *Laryngo-Rhino-Otol* 1997; 76: 295-299.
139. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 329-340.
140. Penno MB, August JT, Baylin SB, et al. Expression of CD44 in human lung tumors. *Cancer Res* 1994; 54: 1381-1387.
141. Piffko J, Bankfalvi A, Joos U, Öfner D, Krassort M, Schmid KW. Immunophenotypic analysis of normal mucosa and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Cancer Detect Prev* 1999; 23: 45-56.
142. Piffko J, Bankfalvi A, Klauke K, et al. Unaltered strong immunohistochemical expression of CD44-v6 and v5 isoforms during development and progression of oral squamous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 502-506.
143. Rassekh CH, Johnson JT, Eibling DE. Circulating markers in squamous cell carcinoma of the head and neck: A review. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994; 30B : 23-28.
144. Raz A, Hanna N, Fidler IJ. In vivo isolation of a metastatic tumor cell variant involving selective and nonadaptive process. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 183-189.
145. Reategui EP, de Mayolo AA, Das PM, et al. Characterization of CD44v3-containing isoforms in head and neck cancer. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 1163-1168.

146. Reber S, Matzku S, Günthert U, Ponta H, Herrlich P, Zöller M. Retardation of metastatic tumor growth after immunization with metastasis-specific monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 1990; 46: 919-927.
147. Remmele W, Hildebrand U, Hienz HA, et al. Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1986; 409: 127-147.
148. Remmele SW, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immnhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologie* 1987; 8: 138-140.
149. Répássy G, Forster-Horváth C, Juhász A, Ádány R, Tamássy A, Tímar J. Expression of invasion markers CD44v6/v3, NM23 and MMP2 in laryngeal and hypopharyngeal carcinoma. *Pathol Oncol Res* 1998; 4: 14-21.
150. Ristamäki R, Joensuu H, Jalkanen S. Does soluble CD44 reflect the clinical behavior of human cancer? *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213:155-166.
151. Roca X, Mate JL, Ariza A, et al. CD44 isoform expression follows two alternative splicing pathways in breast tissue. *Am J Pathol* 1998; 153:183-190.
152. Rudy W, Hofman M, Schwarz-Albiez R, et al. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res* 1993; 53: 1262-1268.
153. Ruiz P, Schwärzler P, Günthert U. CD44 isoforms during differentiation and development. *BioEssays* 1995; 17: 17-24.
154. Sachs L. *Angewandte Statistik - Anwendung statistischer Methoden*. 11. Auflage Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York - Tokio, 2004: 1-889.
155. Saegusa M, Hashimura M, Okayasu Isao. CD44 expression in normal, hyperplastic and malignant endometrium. *J Pathol* 1998; 184: 297-306.
156. Sato S, Miyauchi M, Kato M, et al. Upregulated CD44v9 expression inhibits the invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Pathobiology* 2004; 71: 171-175.
157. Sato S, Miyauchi M, Ogawa I, et al. Inhibition of CD44v9 upregulates the invasion ability of oral squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol* 2003; 39: 27-30.
158. Sato S, Miyauchi M, Takekoshi T, et al. Reduced expression of CD44 variant 9 is related to lymph node metastasis and poor survival in squamous cell carcinoma of tongue. *Oral Oncol* 2000; 36: 545-549.
159. Sawada T, Kimura K, Nishihara T, et al. TGF-beta1 down-regulates ICAM-1 expression and enhances liver metastasis of pancreatic cancer. *Adv Med Sci* 2006; 51: 60-65.
160. Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: Inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 1991; 51: 6328-6337.
161. Schröder W, Rudlowski C, Biesterfeld S, Knobloch CV, Hauptmann S, Rath W. Expression of CD44(v5-10) splicing variants in primary ovarian cancer and lymph node metastases. *Anticancer Res* 1999; 19(5B): 3901-3906.
162. Screatton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelius FB, Gerth U, Bell JL. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12160-12164.
163. Seelentag WKF, Günthert U, Saremaslani P, et al. CD44 standard and variant isoform expression in human epidermal skin tumors is not correlated with tumor aggressiveness but down-regulated during proliferation and tumor dedifferentiation. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1996; 69: 218-224.
164. Seiter S, Schadendorf D, Tilgen W, Zöller M. CD44 variant isoform expression in a variety of skin-associated autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 89: 79-93.
165. Seiter S, Tilgen W, Herrmann K, et al. Expression of CD44 splice variants in human skin and epidermal tumors. *Virchows Arch* 1996; 428: 141-149.
166. Shi S-R, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-748.

167. Shores CG, Yin X, Funkhouser W, Yarbrough W. Clinical evaluation of a new molecular method for detection of micrometastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 937-942.
168. Simon C, Koitschev A, Plinkert PK. Gibt es tumorbiologische Besonderheiten, die ein bevorzugtes Auftreten von Rezidiven bei Kopf-Hals-Tumoren begünstigen: Tumorinvasion "revisited". *Laryngorhinootologie* 2007; 86: 172-175.
169. Simon JC, Heider K-H, Dietrich A, et al. Expression of CD44 isoforms in human skin cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 1394-1400.
170. Slaughter D, Southwick H, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer* 1953; 6: 963-968.
171. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122: 627-632.
172. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
173. Stamenkovic I, Amiot M, Pesandro JM, Seed B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 1989; 56: 1057-1062.
174. Stauder R, Günthert U. CD44 isoforms impact on lymphocyte activation and differentiation. *The Immunologist* 1995; 3: 77-83.
175. Stewart BW, Kleihus P (Eds). WHO - World Cancer Report. IARC Nonserial Publication, 2003: 1-351
176. Stoll C, Baretton G, Soost F, Löhrs U. The influence of CD44 splice variants to the outcome of patients with oral squamous cell carcinoma. *Adv Exp Med Biol* 1998; 451: 51-55.
177. Stoll C, Baretton F, Soost F, Terpe H-J, Domide P, Löhrs U. Prognostic importance of the expression of CD44 splice variants in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology* 1999; 35: 484-489.
178. Stoll C, Phänotypische Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung Proliferations- und Apoptose-assoziiierter Faktoren sowie der Expression von Adhäsionsmolekülen in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx. Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin 2001: 1-123.
179. Tabor M, Brakenhoff R, van Houten VMM, et al: Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1523-1532.
180. Tempfer C, Gitsch G, Haeusler G, Reinhaller A, Koebl H, Kainz C. Prognostic value of histochemically detected CD44 expression in patients with carcinoma of the vulva. *Cancer* 1996; 78: 273-277.
181. Terpe A, Franke F, Stark H, et al. Das Vorkommen von CD44 und seinen Isoformen unter orthologischen und pathologischen Bedingungen. *Verh Dtsch Ges Path* 1993; 77: 276-281.
182. Terpe HJ. Unterschiedliche Bedeutung von CD44 bei malignen Tumoren am Beispiel des Neuroblastoms und Nierenzellkarzinoms. Symposium Adhäsionsmoleküle, Faktoren der Zellorientierung und Interaktion. Universität Giessen, 21. Januar 1995, Abstract 1206.
183. Terpe HJ, Böcker W. Bedeutung von Adhäsionsmolekülen in der Onkologie. *Pathologie* 1997; 18: 117-123.
184. Thomas GJ, Speight PM. Cell Adhesion Molecules and Oral Cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12: 479-498.
185. Tokue Y, Matsumura Y, Katsumata N, Watanabe T, Tarin D, Kakizoe T. CD44 variant isoform expression and breast cancer prognosis. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 283-290.
186. Tölg C, Hofmann M, Herrlich P, Ponta H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acid Research* 1993; 21: 1225-1229.

187. Ue T, Yokozaki H, Kagai K, et al. Reduced expression of the CD44 variant exons in oral squamous cell carcinoma and its relationship to metastasis. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 197-201.
188. Van Hal NLW, van Dongen GAMS, Ten Brink C, et al. Evaluation of soluble CD44v6 as a potential serum marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999 5: 3534-3541.
189. Van Hal NLW, van Dongen GAMS, Stigter-Van Walsum M, Snow GB, Brakenhoff RH. Characterization of CD44v6 isoforms in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1999; 82: 837-845.
190. Van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3803-3816.
191. Van Kooyk Y, Figdor CG. Activation and inactivation of adhesion molecules. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1993; 184: 235-248.
192. Vestweber D. Selectins: cell surface lectins which mediate the binding of leucocytes to endothelial cells. *Seminars in Cell Biol* 1992; 3: 211-220.
193. Vestweber D. The selectins and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 1993; 184: 65-75.
194. Wang SJ, Wreesmann VB, Bourguignon LYW. Association of CD44v3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Head Neck* 2007; 29: 550-558.
195. Weber GF, Ashkar S, Cantor H. Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation. *Proc Assoc Am Physicians* 1997; 109: 1-9.
196. Weg-Remers S, Anders M, von Lampe B. Decreased expression of CD44 splicing variants in advanced colorectal carcinomas. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1607-1611.
197. Weimann TK, Wagner C, Goos M, Wagner SN. CD44 variant isoform v10 is expressed on tumor-infiltrating lymphocytes and mediates hyaluronan-independent heterotypic cell-cell adhesion to melanoma cells. *Exp Dermatol* 2003; 12: 204-212.
198. Welsh CF, Zhu D, Bourguignon LY. Interaction of CD44 variant isoforms with hyaluronic acid and the cytoskeleton in human prostate cancer cells. *J Cell Physiol* 1995; 164: 605-612.
199. Wimmenauer S, Keller H, Ruckauer KD, et al. Expression of CD44, ICAM-1 and N-CAM in colorectal cancer. Correlation with the tumor stage and the phenotypical characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes. *Anticancer Res* 1997; 17(4A): 2395-2400.
200. Wittekind Ch, Meyer HJ, Bootz F (Eds). *TNM Klassifikation maligner Tumoren. UICC International Union Against Cancer. 6. Aufl. Korr. Nachdruck. Kopf- und Halstumoren, 2005; 19-52*
201. Wittig B, Seiter S, Schmidt DS, Zuber M, Neurath M, Zöller M. CD44 variant isoforms on blood leukocytes in chronic inflammatory bowel disease and other systemic autoimmune diseases. *Lab Invest* 1999; 79: 747-759.
202. Wolffe EJ, Gause WC, Pelfrey CM, et al. The cDNA sequence of mouse Pgp-1 and homology to human CD44 cell surface antigen and proteoglycan core/ link protein. *J Biol Chem* 1990; 265: 341-347.
203. Xu YP, Zhao XQ, Sommer K, Moubayed P. Correlation of matrix metalloproteinase-2, -9, tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase and CD44 variant 6 in head and neck cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci* 2003; 4: 491-501.
204. Yamada KM, Kennedy DW, Yamada SS, et al. Monoclonal antibody and synthetic peptide inhibitors of human tumor cell migration. *Cancer Res* 1990; 50: 4485-4496.
205. Zahalka MA, Okon E, Goslar U, Holzmann B, Naor D. Lymph node (but not spleen) invasion by murine lymphoma is both CD44- and hyaluronate-dependent. *J Immunol* 1995; 154: 5345-5355.
206. Zetter BR. Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 219-229.
207. Zhou DFH, Ding JF, Picker LJ, Bargatze RF, Butcher EC, Goeddel DV. Molecular cloning and expression of Pgp-1. The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. *J Immunol* 1989; 143: 3390-3395.

208. Zöller M. CD44: physiological expression of distinct isoforms as evidence for organ-specific metastasis formation. *J Mol Med* 1995; 73: 425-438.
209. Zöller M. Joint features of metastasis formation and lymphocyte maturation and activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 215-247.
210. Zöller M, Kaufmann M. CD44 and metastasis. *Onkologe* 1994; 17: 114 -122.
211. Zörb C, Finke L, Terpe J. Nachweis von Adhäsionsmolekülen im normalen und neoplastischen Epithel der Kolonschleimhaut: die Expression von α 3-Integrin, α 6-Integrin, β 1-Integrin, β 4-Integrin, E-cadherin und CD44 korreliert mit dem histologischen Grading bzw. der Tumorprogression. *Verh Dtsch Ges Path* 1994; 78: 630.

7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

7.1. Abbildungsverzeichnis

Nr.	Abbildungslegenden	Seite
1	Die Gewebeverteilung und Liganden wichtiger Adhäsionsmoleküle [91] (vgl. 8. Abkürzungsverzeichnis)	13
2	Beispiele unterschiedlicher CD44-Varianten (Schema) [entnommen aus 178]	19
3	Schematische Darstellung der CD44-Standard- und Variantenregion (A). Struktur des CD44-Standard- und Variantenmoleküls (B und C) [modifiziert nach 72] [aus 181]	19
4	Schema der APAAP-Reaktion [nach 38]	39
5	Die Alters- und Geschlechtsverteilung der Tumorpatienten	46
6	Die Alters- und Geschlechtsverteilung der Kontrollpatienten	47
7	Mikroskopisches Bild der Expression von CD44v3 auf dem Plattenepithelkarzinom im Tumorzentrum (Patient 198, APAAP-Methode (40x)) (vgl. Tabelle 11)	50
8	Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v3 auf dem Plattenepithelkarzinom und auf dem normalen Plattenepithel im Tumorzentrum	50
9	Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v3 auf dem Plattenepithelkarzinom und auf dem normalen Plattenepithel im Tumorrandbereich	52
10	Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v3 auf dem Plattenepithel im tumorfernen Bereich	54
11	Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v3 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe	56
12	Mikroskopisches Bild der Expression von CD44v5 auf dem Plattenepithelkarzinom im Tumorzentrum (Patient 198, APAAP-Methode (40x)) (vgl. Tabelle 15)	58
13	Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v5 auf dem Plattenepithelkarzinom und dem normalen Plattenepithel im Tumorzentrum	58
14	Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v5 auf dem Plattenepithelkarzinom und auf dem normalen Epithel im Tumorrandbereich	60
15	Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v5 auf dem Plattenepithel im tumorfernen Bereich	62
16	Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v5 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe	64
17	Mikroskopisches Bild der Expression von CD44v7 auf dem Plattenepithelkarzinom im Tumorzentrum (Patient 198, APAAP-Methode (40x)) (vgl. Tabelle 19)	66
18	Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v7 auf dem Plattenepithelkarzinom und dem normalen Epithel im Tumorzentrum	66
19	Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v7 auf dem Plattenepithelkarzinom und auf dem normalen Epithel im Tumorrandbereich	69
20	Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v7 auf dem Plattenepithel im tumorfernen Bereich	71
21	Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v7 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe	72
22	Mikroskopisches Bild der Expression von CD44v10 auf dem Plattenepithelkarzinom im Tumorzentrum (Patient 198, APAAP-Methode (40x)) (vgl. Tabelle 23)	74
23	Die prozentuale Verteilung der IRS-Werte von CD44v10 auf dem Plattenepithelkarzinom und auf dem normalen Epithel im Tumorzentrum	75
24	Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v10 auf dem Plattenepithelkarzinom und Plattenepithel im Tumorrandbereich	77
25	Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v10 auf normalem Plattenepithel im tumorfernen Bereich	79
26	Die prozentuale Verteilung der immunreaktiven Scorewerte von CD44v10 auf dem Plattenepithel der Kontrollgewebe	81
27	Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v3 auf dem Karzinomgewebe (Ca) im Tumorzentrum	96

Fortsetzung des Abbildungsverzeichnisses

Nr.	Abbildungslegenden	Seite
28	Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v5 auf dem Karzinomgewebe (Ca) des Tumorzentrums	96
29	Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v7 auf dem Karzinomgewebe (Ca) des Tumorzentrums	97
30	Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v10 auf dem Karzinomgewebe (Ca) des Tumorzentrums	97
31	Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v3 auf dem Karzinomrestgewebe (Ca) im chirurgischen Tumorrand (TR)	99
32	Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v5 auf dem Karzinomrestgewebe (Ca) im chirurgischen Tumorrand (TR)	100
33	Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v7 auf dem Karzinomrestgewebe (Ca) im chirurgischen Tumorrand (TR)	100
34	Kaplan-Meier-Kurven für die Expression von CD44v10 auf dem Karzinomrestgewebe (Ca) im chirurgischen Tumorrand (TR)	101

7.2. Tabellenverzeichnis

Nr.	Tabellenlegenden	Seite
1	Lokalisation und prozentualer Anteil der häufigsten Krebsformen zur Gesamtzahl der Krebsneuerkrankungen 2002 in Deutschland: 208.215 Krebs-Neuerkrankungen bei Männern und 206.000 Krebs-Neuerkrankungen bei Frauen [106]	10
2	Lokalisation und prozentualer Anteil der Sterbefälle der häufigsten Krebsformen zur Gesamtzahl der Sterbefälle 2002 in Deutschland: 109.631 Krebssterbefälle bei Männern und 99.945 Krebssterbefälle bei Frauen [106]	10
3	Untersuchte Gewebe der Tumorpatienten einschließlich der Lokalisation des Tumorzentrums	35
4	Untersuchte Gewebe der Kontrollpatienten einschließlich der Lokalisation des Gewebes	36
5	Primärantikörper	36
6	Brückenantikörper	41
7	APAAP-Komplex	41
8	Immunreaktiver Scorewert (IRS): SI (= Färbeintensität) x PP (= prozentualer Anteil Antikörper-positiver = angefärbter Zellen)	42
9	Patientendaten und Risikofaktoren aus den Krankenakten der Tumorpatienten (vgl. Material und Methoden, Tabelle 3)	45
10	Patientendaten und Risikofaktoren aus den Krankenakten der Kontrollpatienten (vgl. auch Material und Methoden, Tabelle 4)	47
11	Expression von CD44v3 im Tumorzentrum	48
12	Expression von CD44v3 im Tumorrandbereich	51
13	Expression von CD44v3 im tumorfernen Bereich	53
14	Expression von CD44v3 auf den Kontrollgeweben	55
15	Expression von CD44v5 im Tumorzentrum	56
16	Expression von CD44v5 im Tumorrandbereich	59
17	Expression von CD44v5 im tumorfernen Bereich	61
18	Expression von CD44v5 auf den Kontrollgeweben	63
19	Expression von CD44v7 im Tumorzentrum	64
20	Expression von CD44v7 im Tumorrandbereich	67
21	Expression von CD44v7 im tumorfernen Bereich	69
22	Expression von CD44v7 auf den Kontrollgeweben	71
23	Expression von CD44v10 im Tumorzentrum	73
24	Expression von CD44v10 im Tumorrandbereich	76
25	Expression von CD44v10 im tumorfernen Bereich	78
26	Expression von CD44v10 auf den Kontrollgeweben	80

Fortsetzung des Tabellenverzeichnisses

Nr.	Tabellenlegenden	Seite
27	Übersicht über die Dokumentation der Ergebnisse von den Geweben der Tumorpatienten	81
28	Gegenüberstellung der Mittel- und Medianwerte der immunreaktiven Scores (IRS) der Expression von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 im Tumorzentrums-Gewebe	82
29	Gegenüberstellung der Mittel- und Medianwerte der immunreaktiven Scores (IRS) der Expression von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Tumorrands-Geweben	83
30	Gegenüberstellung der Mittel- und Medianwerte der immunreaktiven Scores (IRS) der Expression von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den tumorfernen Geweben	83
31	Vergleich der immunreaktiven Scorewerte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und Epithelien unterschiedlicher Gewebereiche	85
32	Vergleich der PP-Werte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Epithelien unterschiedlicher Gewebereiche	86
33	Vergleich der immunreaktiven Scorewerte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und den Epithelien des Tumorzentrums (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test	86
34	Vergleich der PP-Werte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und den Epithelien des Tumorzentrums (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test	87
35	Vergleich der immunreaktiven Scorewerte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und den Epithelien des Tumorrandes (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test	88
36	Vergleich der PP-Werte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und den Epithelien des Tumorrandes (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test	89
37	Vergleich der immunreaktiven Scorewerte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Epithelien des tumorfernen Bereiches (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test	89
38	Vergleich der PP-Werte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Epithelien des tumorfernen Bereiches (nur auf Kryostatschnitten): Wilcoxon-Test	90
39	Vergleich der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 bei unterschiedlichen Tumorstadien (nur auf Kryostatschnitten) (auffälligster Wert unterstrichen): U-Test	91
40	Vergleich der PP-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 bei unterschiedlichen Tumorstadien (nur auf Kryostatschnitten): U-Test	92
41	Vergleich der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 bei unterschiedlichem Tumorgrading (nur auf den Kryostatschnitten)	92
42	Vergleich der PP-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 bei unterschiedlichem Tumorgrading (auf den Kryostat- und Paraffinschnitten)	93
43	Vergleich der Häufigkeit einer höheren CD44-Expression (IRS-Werte ab Medianwert) mit unterschiedlichem Staging und dem Tumorgrading [200] ¹ (Tabelle 9)	94
44	Rezidivfreie Zeit bis zum Eintreten des ersten Krankheitsrückfalls nach Entnahme des untersuchten Gewebes zum Nachweis der CD44-Expression	95
45	Rezidivfreie Zeit bis zum Eintreten des ersten Krankheitsrückfalls nach Entnahme des untersuchten Gewebes zum Nachweis der CD44-Expression	98
46	Übersicht über die Dokumentation der Ergebnisse von den Geweben der Kontrollpatienten	102
47	Vergleich der Expression der immunreaktiven Scorewerte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Kontrollgeweben	102
48	Vergleich der Expression der PP-Werte von CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Kontrollgeweben (markante Werte fett gedruckt)	102
49	Vergleich der IRS-Werte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelien der Kontrollgewebe (nur Kryostatschnitte): Wilcoxon-Test	103

Fortsetzung des Tabellenverzeichnisses

Nr.	Tabellenlegenden	Seite
50	Vergleich der PP-Werte der einzelnen Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf dem normalen Plattenepithel der Kontrollgewebe: Wilcoxon-Test	104
51	Vergleich der immunreaktiven Scorewerte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Plattenepithelien im Tumorzentrum, Tumorrand und tumorfernen Bereich mit den Plattenepithelien der Kontrollgewebe (markanter Wert unterstrichen)	104
52	Vergleich der PP-Werte der Antikörper CD44v3, -v5, -v7 und -v10 auf den Plattenepithelkarzinomen und normalen Plattenepithelien im Tumorzentrum, Tumorrand und tumorfernen Bereich mit den Plattenepithelien der Kontrollgewebe (markanter Wert unterstrichen)	104
53	Expression von CD44s (CD44-Standard) und der CD44-Spleißvarianten auf Geweben von HNSCC-Tumoren, insbesondere ihre Bedeutung für die Tumorprogression oder Metastasierung ¹	109

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AB-Serum	humanes antikörperfreies AB-Serum
Ak	Antikörper
AS	Aminosäuren
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
BGW	Bindegewebe
BMS	Bender MedSystems (Wien, Österreich)
BSp73-Zelllinie	spontane Ratten-Tumorzelllinie eines Pankreas-Adenokarzinoms mit einer hochmetastatisierenden Variante BSp73-ASML und einer weniger metastatisierenden Variante BSp73-AS
Ca	Karzinom
CD	Cluster of differentiation, Nomenklatur zur Differenzierung von Oberflächmolekülen auf Leukozyten
CD44s	Standardform von CD44
cDNA	complementary DANN
CR3	complement receptor 3, Komplementrezeptor 3, bindet an das iC3b Fragment des Komplements.
CR4	Complement receptor 4, Komplementrezeptor 4
DANN	desoxyribonucleid acid, Desoxiribonukleinsäure (DNS)
Dr	Drüsengewebe
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
ECMRIII	Extrazellulärer Matrix-Rezeptor (römisch-)3
ELAM-1	endothelial leucocyte adhesion molecule-1, endotheliales Leukozytenadhäsionsmolekül-1
E-Selektin	Selektin, das auf vaskulärem Endothel exprimiert wird.
FAB-Fragment	Antigen-bindendes Fragment
FaDu	humane Tumorzelllinie eines hypopharyngealen Plattenepithelkarzinoms
FI	Färbeindex; Farbeintensität SI
G	histopathologisches Tumorgrading
Ge	Gefäße
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-(1), glycosylierungsabhängiges (mucinähnliches) Zelladhäsions-Molekül
Gp90 Hermes	90-kDa "schweres" Glykoprotein der Hermes-Klasse
HNSCC	head neck squamous cell carcinoma, Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich
H-CAM	hyaluronic-cellular adhesion molecule, Hyaluronsäure-bindendes zelluläres Adhäsionsmolekül oder auch homing-associated cell adhesion molecule, mit dem Lymphozyten-homing assoziiertes Zelladhäsionsmolekül
ICAM	intercellular adhesion molecule, interzelluläres Adhäsionsmolekül
iC3b	inactivated complement-3b, Fragment des aktivierten Komplements C3, bindet mit Komplementrezeptor 3 (CR3)
IgG	Immunglobulin G
IRS	immunreaktiver Score(wert)
j	ja
kD	Kilodalton
Kryo	Kryostatschnitte, Gefrierschnitte
LFA	lymphocyte function-associated antigen, Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen
LFA-1-Integrin	Leukozytenfunktion-assoziiertes-1-Integrin
LI-Cadherin	Cadherin der Leber- und Darmzellen
LPAM-(1)	Lymphocyte Peyer`s Patch adhesion molecule-(1)
L-Selektin	Selektin, das auf Leukozyten exprimiert wird.
Lymphge	Lymphgewebe
M	Fernmetastasen (TNM-Klassifikation)
m	männlich
Mac-1	(adhesion molecules) membrane-activated complex 1, membran-aktivierter Komplex (von Adhäsionsmolekülen) 1

Fortsetzung des Abkürzungsverzeichnisses

MadCAM-(1)	mucosal addressin cell adhesion molecule-(1) = mucosal adressin, mukosales Zelladhäsions-Molekül
M	Median, Medianwert
M-Cadherin	muskuläres Cadherin
Mel-14	Mouse leukocyte homing receptor for high endothelial venules
MoAk	monoklonale Antikörper
MRD	minimal residual disease
mRNA	messenger RNA
Mu, Muskel	Muskelgewebe
MW	Mittelwert
n	nein
N	Anzahl (untersuchter Tumoren u.a.)
N	regionärer Lymphknotenstatus, N-Status (TNM-Klassifikation)
n.b.	nicht bekannt
N-Cadherin	neurales Cadherin
Ne	Nerven
N-S	Negativserum
OB	Osteoblasten
OB-Cadherin	Cadherin in Osteoblasten
P	pathologisch
p	p = probability, ausreichend abgesichert; Irrtumswahrscheinlichkeit
p150,95	Homo sapien leukocyte adhesion protein 150,95
p ₂₅	25. Perzentile
p ₇₅	75. Perzentile
PADGEM	platelet activation-dependent granule-external membran
Paraffin	Paraffinschnitte
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Plattenepithel bzw. nicht maligne entartetes Plattenepithel
PE 2 / PE 3	Scorewerte auf dem Epithel von Patienten mit einem Karzinom des Gradings 2 bzw. 3
pH, pH-Wert	pondus hydrogenii oder potentia hydrogenii, ein Maß für die Stärke der sauren bzw. basischen Wirkung einer wässrigen Lösung
P-Cadherin	plazentales Cadherin
PP	prozentualer Anteil der Antikörper-positiven (= angefärbten) Zellen
pgp-1	plasma membrane glycoproteine-1, Plasmamembran-Glycoprotein-1
P-Selektin	Selektin, das auf vaskulärem Endothel und Platelets exprimiert wird
pTNM	histopathologische Tumorklassifikation
RNA	ribonucleid acid, Ribonukleinsäure (RNS)
RPMI-Medium 1640	vom Rosewell Park Memorial Institut entwickeltes Zellkulturmedium
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
SD	Standardabweichung
SI (auch FI)	staining intensity, Färbeintensität
T	Ausdehnung des Primärtumors, T-Status (TNM-Klassifikation)
Tab	Tabelle
TBS	tris buffered saline, Trispuffer
Tf	tumorfern
TGF	transforming growth factor, transformierender Wachstumsfaktor
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TR	Tumorrand
TZ	Tumorzentrum
T-Lymphozyten	thymusabhängige Lymphozyten
T-Zellen	T = thymusabhängige Zellen
UICC	International Union Against Cancer
VCAM-(1)	vascular cell-adhesion molecule-(1), vaskuläres Zelladhäsions-Molekül-(1)
VLA	very late antigen
w	weiblich

9. Lebenslauf

**“ Mein Lebenslauf wird aus
datenschutzrechtlichen Gründen
in der elektronischen Version
meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“**

10. Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. mult.h.c. J. Bier, ehemaliger Direktor der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Charité Campus Virchow-Klinikum, möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas meiner Arbeit und seine Unterstützung sowohl bei meiner studentischen Ausbildung als auch bei der Anfertigung dieser Arbeit danken. Den Ärzten der Klinik danke ich für die Bereitstellung der nativen Gewebe für die Tumorbank.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. B. Hoffmeister danke ich für seine unkomplizierte Art und Hilfe, diese Arbeit nach dem Tod von Herrn Professor Bier zu Ende bringen zu können.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dr. E.-M. Fabricius. Ohne ihr Engagement bei der Bewältigung der in dieser Arbeit auftauchenden Probleme und ohne ihre Geduld und aufmunternde Art hätte ich die Thematik nicht bewältigen können.

Für die histopathologische Befundung der in dieser Arbeit untersuchten Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches aus den Jahren 1994 bis 1996 bedanke ich mich bei Herrn em. Prof. Dr. S. Blümcke (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Charité, Campus Virchow Klinikum). Herr em. Prof. Dr. G.P. Wildner (Robert-Rössle-Klinik, Universitätsklinikum Charité, Campus Berlin-Buch) hat dankenswerter Weise alle Gefrierschnitte dieser Karzinome einschließlich der Tumorrand- und tumorfernen Gewebe sowie die Kontrollgewebe nachbefundet.

Vielen Dank an Herrn Dr. Dr. J.-D. Raguse für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und für seine hilfreichen Anmerkungen.

Für ihre Beratung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse möchte ich mich bei Frau Dr. I. Küchler (Medizinische Biometrie, Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität zu Berlin) bedanken.

Ein großes Dankeschön gebührt Frau U. Kruse-Boitschenko, die mir beim Erlernen und bei der Durchführung der Methoden stets hilfreich und freundlich zur Seite stand.

Ebenfalls möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglichten und bei meiner Frau für ihre Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit herzlichst bedanken.

11. Erklärung

„Ich, Ralf-Roger Grunert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Immunhistochemischer Nachweis der CD44-Spleißvarianten CD44v3, CD44v5, CD44v7 und CD44v10 auf Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich unter Berücksichtigung ihrer quantitativen Verteilung in Abhängigkeit von der Entfernung zum Tumorzentrum selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“