

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Claudin-Expression im
Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tatjana Zejc

aus Saratow, Russland

Datum der Promotion: 17.09.2021

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vi
Abbildungsverzeichnis	vii
1. Kurzzusammenfassung	1
Abstract	2
2. Einleitung	3
2.1. Das orale Plattenepithelkarzinom	3
2.1.1. Epidemiologie.....	3
2.1.2. Histologie und Prädilektionsstellen.....	4
2.1.3. Risikofaktoren und Präkanzerosen der Mundschleimhaut.....	5
2.1.4. Tumorgenese und die epithelial-mesenchymale Transition.....	6
2.1.5. Grundlagen der Symptomatik, Diagnostik und Therapie	7
2.2. Das Epithel der Mundhöhle	11
2.3. Zell-Kontakte	13
2.3.1. Die Tight Junction.....	13
2.3.2. Rolle der Claudine in der Tight Junction.....	15
2.3.3. Bedeutung der Claudine bei Erkrankungen.....	16
2.3.4. Dysregulation der Claudin-Expression beim oralen Plattenepithelkarzinom.....	19
2.4. Zielsetzung	21
3. Methoden	22
3.1. Materialien	22
3.1.1. Geräte.....	22
3.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.3. Chemikalien.....	24
3.1.4. Antikörper.....	25
3.1.5. Lösungen und Puffer.....	26
3.1.6. Software.....	28
3.2. Übersicht über das Untersuchungsgut	
3.2.1. Patientenkollektiv.....	28
3.2.2. Proben.....	28

3.3. Proteinanalytik	
3.3.1. Zellyse.....	29
3.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Pierce.....	29
3.3.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli.....	30
3.3.4. Western Blot.....	31
3.3.5. Immundetektion von Proteinen.....	32
3.3.6. Pulldown Assay.....	33
3.4. Immunfluoreszenzfärbung des fixierten Gewebes	
3.4.1. Entparaffinierung und Immunfluoreszenzfärbung.....	34
3.4.2. Prinzip des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops.....	34
3.5. Coomassie-Blau-Färbung.....	35
3.6. Statistik.....	36
4. Ergebnisse.....	37
4.1. Patientencharakteristika.....	37
4.2. Expression der Claudine.....	39
4.3. Lokalisation der Claudine in der Mundschleimhaut im gesunden und Tumorgewebe.....	42
4.4. Claudin-Expression in den unterschiedlichen Mundhöhlenarealen	46
4.5. Zusammenhang zwischen der Claudin-Expression und den klinikopathologischen Faktoren.....	48
4.6. Zusammenhang der Claudin-Expression mit dem rezidivfreien Überleben.....	52
4.7. Claudin-3 im gesunden oralen Epithel und Mundschleimhaut- karzinom.....	55
5. Diskussion.....	58
5.1. Bedeutung von Claudin-1, -2, -4, -5 und -7 im Mundschleimhautkarzinom.....	59
5.2. Einfluss von Claudin-2- und Claudin-4-Expression auf die rezidivfreie Überlebenszeit der kurativ behandelten Patienten.....	65
5.3. Claudin-3-Expression im Mundschleimhautkarzinom.....	66
5.4. Studienlimitationen.....	66
5.5. Zusammenfassung.....	67
6. Literaturverzeichnis.....	68

7. Anhang	77
8. Eidesstattliche Erklärung	83
9. Lebenslauf	84
10. Publikationsliste	85
11. Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchonic acid/ Bicinchoninsäure
BSA	Bovine Serum Albumin Faktor V
c-CPE	Carboxy-terminales Fragment des Clostridium perfringens Enterotoxins
CPE	Clostridium perfringens Enterotoxin
GSH	Glutathion
GST-CPE	Glutathionstransferase-Clostridium perfringens Enterotoxin
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindole
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HPV	Humane Papillomaviren
HER-2	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-2
IF	Immunfluoreszenzfärbung
JAM	Junktionales Adhäsionsmolekül
MMP	Matrix-Metalloprotease
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PECA	Plattenepithelkarzinom
PVDF Membran	Polyvinylidendifluorid Membran
PVP 40	Polyvinylpyrrolidone 40
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyarylamide gel electrophoresis
siRNA	Spezifische kleine Interferenz-RNA
TAMPs	Tight Junction- Associated Marvel Proteine
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TJ	Tight Junction
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

UICC Union for International Cancer Control
ZO Zonula occludens

Tabellenverzeichnis

Seite

Tabelle 1:	7. Auflage TNM- Klassifikation maligner Neoplasien der Mundhöhle nach Union for International Cancer Control (UICC) 2009.....	9
Tabelle 2:	7. Auflage Stadieneinteilung maligner Neoplasien der Mundhöhle nach UICC 2009.....	10
Tabelle 3:	Primärantikörper.....	25
Tabelle 4:	Sekundärantikörper.....	26
Tabelle 5:	Software.....	28
Tabelle 6:	Coomassie-Blau-Färbe- und Entfärbelösungen.....	36
Tabelle 7:	Patientencharakteristika	38
Tabelle 8:	Kruskal-Wallis-Test.....	47
Tabelle 9:	Dependenzanalyse: Claudin-Expressionsunterschied des Tumors und die klinikopathologischen Faktoren.....	49
Tabelle 10:	Gruppeneinteilung für Kaplan-Meier-Überlebensanalyse.....	53
Tabelle 11:	Analyse von Claudin-1, -2, -4, -5, -7-Expression in 60 Kontrollen und jeweiligen Tumoren der Mundschleimhaut anhand von Western Blots.....	77
Tabelle 12:	Analyse von Claudin-3-Expression in 60 Kontrollen und jeweiligen Tumoren der Mundschleimhaut anhand von Western Blots.....	82

Abbildungsverzeichnis

Seite

Abbildung 1:	Gut differenziertes, verruköses Plattenepithelkarzinom der Wange.....	4
Abbildung 2:	Mehrschichtiges Plattenepithel.....	12
Abbildung 3:	Vereinfachtes TJ-Modell.....	14
Abbildung 4:	Analyse der Claudin-Expression anhand von Western Blots.....	40
Abbildung 5:	Paraffinschnitt der Zunge von Patient 31, Hämatoxylin- Eosin Färbung.....	42
Abbildung 6:	Lokalisation der TJ Proteine Claudin-1, -2, -4, -5 und -7 in der Mundschleimhaut.....	44
Abbildung 7:	Tumorlokalisierung.....	47
Abbildung 8:	Claudin-Expression in unterschiedlichen Mundhöhlenarealen.....	48
Abbildung 9:	Zusammenhang zwischen der Veränderung der Claudin-4- und Claudin-7-Expression im Tumor und den klinikopathologischen Faktoren.....	50
Abbildung 10:	Rezidivfreies Überleben der kurativ behandelten und nachbeobachteten Patienten.....	52
Abbildung 11:	Rezidivfreies Überleben der kurativ behandelten und nachbeobachteten Patienten in Abhängigkeit von der Claudin-Expression.....	54
Abbildung 12:	Claudin-3-Expression im Western Blot.....	56
Abbildung 13:	Pulldown Assay.....	56

1. Kurzzusammenfassung

Zielsetzung: Eine Veränderung der Claudin-Expression wurde in verschiedenen Tumoren nachgewiesen. In der vorliegenden Studie wird speziell die Claudin-Expression im Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut mit gesundem oralem Epithel des gleichen Individuums verglichen. Außerdem wird eine mögliche Korrelation zwischen Claudin-Expression und klinisch relevanten Verlaufsparemtern abgeklärt.

Material und Methoden: Die vorliegende Studie umfasst Gewebeproben und klinisch relevante Verlaufsdaten von 60 Patienten mit primärem und unbehandeltem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Tumorgewebe und Gewebe der gesunden Mundschleimhaut der Wange des gleichen Patienten wurden im Western Blot auf die Expression von Claudinen-1, -2, -3, -4, -5 und -7 untersucht. Das Vorhandensein von Claudin-3 im gesunden und Tumorepithel wurde zusätzlich mit einem Pulldown Assay und Massenspektroskopie überprüft. Bei ausgewählten Patienten wurde zusätzlich die Lokalisation dieser Claudine mittels Konfokalmikroskopie validiert.

Ergebnisse: Das gesunde und das Tumorepithel der Mundhöhle exprimiert kein Claudin-3 Protein. Im intraindividuellen Vergleich wird signifikant mehr Claudin-2 und weniger Claudin-4, -5 und -7 im oralen Plattenepithelkarzinom exprimiert. In gesundem, oralem Plattenepithel wurden diese Claudine hauptsächlich in der Zellmembran nachgewiesen, wohingegen eine Dislokation von Claudin-1, -4 und -7 in das Zytoplasma und von Claudin-4 und -5 in den Zellkern bei oralen Plattenepithelkarzinomen beobachtet wurde. Ein relevanter Zusammenhang zwischen verstärkter Claudin-2-Expression oder verminderter Expression von Claudin-4 und einem kürzeren rezidivfreien Überleben wird gezeigt. Außerdem besteht eine Korrelation zwischen reduzierter Expression von Claudin-7 und einem fortgeschrittenen Tumorstadium sowie der Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen.

Schlussfolgerung: Hiermit scheint die Expression der Claudine-2, -4 und -7 für die Diagnose und Prognose des oralen Plattenepithelkarzinoms relevant zu sein.

Abstract

Aims: A change in claudin expression has been demonstrated in various tumors. The present study specifically compares claudin expression in squamous cell carcinoma of the oral mucosa with healthy oral epithelium from the same individual. In addition, the possible correlation between claudin expression and clinically relevant progression parameters is clarified.

Material and Methods: The present study includes tissue samples and clinically relevant follow-up data from 60 patients with primary and untreated squamous cell carcinoma of the oral cavity. Tumor tissue and tissue of the healthy oral mucosa of the cheek of the same patient were examined in Western blot analysis for the expression of claudin-1, -2, -3, -4, -5 and -7. The presence of claudin-3 in the healthy and tumor epithelium is additionally checked using a pulldown assay and mass spectrometry. In selected patients, the localization of these claudins was also validated using confocal microscopy.

Results: Both, healthy and tumor epithelium of the oral cavity do not express claudin-3 protein. In an intraindividual comparison, significantly more claudin-2 and less claudin-4, -5 and -7 are expressed in oral squamous cell carcinoma. In healthy oral squamous epithelium these claudins were mainly found in the cell membrane, whereas dislocalization of claudin-1, -4 and -7 in the cytoplasm and of claudin-4 and -5 in the cell nucleus was observed in oral squamous cell carcinoma. A relevant connection between overexpression of claudin-2 or reduced expression of claudin-4 and a shorter relapse-free survival is shown. There is also a correlation between reduced expression of claudin-7 and an advanced tumor stage and the presence of lymph node metastases.

Conclusion: The expression of claudin-2, -4 and -7 seems to be relevant for the diagnosis and prognosis of oral squamous cell carcinoma.

2. Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression verschiedener Tight Junction (TJ)-Proteine im gesunden und im Plattenepithelkarzinom (PECA) der Mundhöhle im intraindividuellen Vergleich untersucht. Zunächst wird ein Einblick in das Krankheitsbild des PECA der Mundschleimhaut gegeben. Danach werden der grundlegende Aufbau eines Epithels und die Zellkontakte vorgestellt, wobei ein Fokus auf die TJ gelegt wird. Insbesondere werden die TJ Proteine aus der Claudinfamilie und deren Veränderung in der Mundschleimhaut beim PECA hervorgehoben. Darüber hinaus werden Veränderungen der Claudin-Expression bei weiteren Erkrankungen des Organismus dargestellt.

2.1. Das orale Plattenepithelkarzinom

2.1.1. Epidemiologie

Das orale Plattenepithelkarzinom stellt weltweit ca. 2% aller malignen Tumore dar. Annähernd 355.000 Neuerkrankungen des oralen Plattenepithelkarzinoms wurden für das Jahr 2018 weltweit datiert. 177.400 Menschen verstarben im gleichen Jahr an der Erkrankung. Dabei gibt es regionale Unterschiede in der Inzidenz. Die höchste Neuerkrankungsrate findet sich in Papua-Neuguinea mit 27,5 neuerkrankten Männern und 15,0 neuerkrankten Frauen pro 100000 Einwohner pro Jahr. Westeuropa zeigt im Vergleich eine vierfach geringere Inzidenzrate (1). Der Erkrankungsgipfel ist dabei in der 6. bis 7. Lebensdekade. Männer sind 2- bis 3- mal häufiger betroffen (2).

Laut Schätzung des Robert-Koch-Instituts (2019) erkrankten im Jahr 2016 in Deutschland etwa 9720 Männer und 4180 Frauen an bösartigen Tumoren der Mundhöhle und des Rachens. Die Neuerkrankungs- und Sterberaten sind im Zeitraum von 1999-2017 bei den Männern leicht rückläufig, wohingegen bei Frauen ein minimaler Anstieg zu verzeichnen ist (3).

2.1.2. Histologie und Prädilektionsstellen

Die Tumoren in der Mundhöhle sind zu 90% Plattenepithelkarzinome (4). In seltenen Fällen gehen Mundhöhlentumore von Muskel- oder Drüsengewebe aus (5). In Abbildung 1 ist ein Beispiel des gut differenzierten Plattenepithelkarzinoms dargestellt. Die histologische Differenzierung lässt sich in hoch/gut, mittel/mäßig oder niedrig/schlecht differenziert unterteilen und beeinflusst die Prognose der Patienten (2). Aufgrund seiner anatomischen Ausbreitung ist das Mundschleimhautkarzinom nicht immer vom Oropharynxkarzinom zu trennen. Anatomisch gesehen bilden die Ober- und Unterlippe, die Wangenschleimhaut, die Retromolargegend, der obere und untere Sulcus buccoalveolaris, der obere und untere Alveolarfortsatz mit der Gingiva, der harte Gaumen, die vorderen zwei Drittel der Zunge und der Mundboden die Mundhöhle (6). Tumoren der Zunge, insbesondere des Zungenrandes und des Mundbodens, sind mit 59% bzw. 31% häufiger, seltener sind Alveolarkamm-, Gaumen- und Wangenschleimhaut betroffen (5).

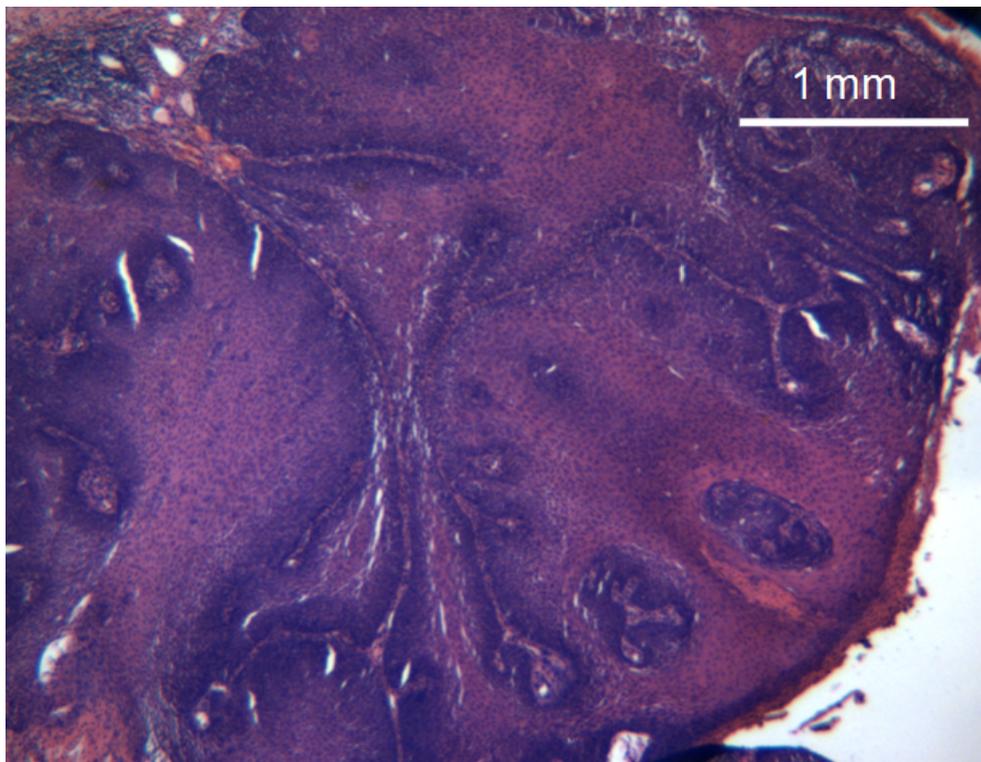


Abbildung 1: Gut differenziertes, verruköses Plattenepithelkarzinom der Wange. Lichtmikroskopische Aufnahme des Plattenepithelkarzinoms der Wange von Patient 30, Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

2.1.3. Risikofaktoren und Präkanzerosen der Mundschleimhaut

Die Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms wird durch eine Reihe von exogenen, aber auch endogenen Faktoren begünstigt. Das die Mundhöhle auskleidende Plattenepithel wird mechanisch durch Nahrungsaufnahme oder schlecht sitzende Prothesen, aber auch physikalisch-chemisch durch Genussmittel wie hochprozentige alkoholische Getränke und Zigarettenrauch stark in Anspruch genommen (4). Allein 92% der Mundhöhlenkarzinome bei Männern und 61% derer bei Frauen werden als direkte Folge des Rauchens diskutiert (5). Die kumulative und synergistische Wirkung von Alkohol und Tabak trägt zum Effekt der Feldkanzerisierung, das heißt zur multifokalen Entwicklung von Präkanzerosen und Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich, bei (7). Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit an einem Zweitkarzinom im Respirationstrakt sowie oberen Verdauungstrakt zu erkranken, auf 4-6% pro Jahr erhöht (2). Nicht nur Pyrolyseprodukte des Tabaks spielen hier eine Rolle, sondern auch der Gebrauch von Kautabak. Hinzu kommt die Besiedelung der Mundflora mit humanen High-Risk-Papillomaviren (HPV) 16 und 18, die als eigenständiger Risikofaktor zur Neoplasieentwicklung durch zelluläre Mechanismen wie Dauerproliferation und DNA-Fehlertoleranz beiträgt (7). Es wird allerdings beschrieben, dass die High-Risk-HPV Infektion der Mundhöhle in der Entwicklung des PECA eine geringere Rolle spielt als in der des Oropharynxkarzinoms (8). Weltweit konsumieren 10-20% der Bevölkerung Betelpfefferblätter, Arekanuss oder deren Kombination mit oder ohne Tabak. Am weitesten ist der Konsum in Indien und den Regionen Südostasiens verbreitert. Diese Substanzen werden ebenfalls als kanzerogen angesehen (9). Einen weiteren Risikofaktor bildet die Sonnenexposition mit UV-B-Strahlen im Lippenbereich. Außerdem gehen endogene Faktoren wie Unterernährung, Vitamin A- und Eisenmangel mit plattenepithelialer Differenzierungsstörung einher. Die genetische Prädisposition zur Differenzierungsstörung des Plattenepithels in Form hereditärer Verhornungsstörungen ist eine Rarität (4, 7). Durch die gesamten zuvor genannten Risikofaktoren können in der Mundhöhle eine Reihe von besonderen Schleimhautveränderungen beobachtet werden, die entweder keine, fakultative oder obligate Präkanzerosen darstellen. Durch die tägliche Reizung der Mundschleimhaut mit scharfkantigen Zähnen oder Zahnprothesen kann es zu Entzündungen und Irritationsfibromen kommen, die in der Regel jedoch kein Entartungspotential besitzen (7). Zu den häufigsten fakultativen Präkanzerosen zählen die Leukoplakie und die Erythroplakie. Die Prävalenz der Leukoplakie weltweit beträgt etwa 2%, dabei sind Männer häufiger betroffen. Eine maligne Transformation findet in etwa

1% der Leukoplakien statt, abhängig von deren Differenzierungsgrad (10). Die Erythroplakie ist seltener als die Leukoplakie und ihr histologisches Bild zeigt oft eine hochgradige Epitheldysplasie, sodass die Gefahr der malignen Entartung mit 25-50% im Vergleich zur Leukoplakie deutlich höher liegt (2). Da es noch keinen molekulargenetischen Marker gibt, der zuverlässig eine maligne Transformation vorhersagt, wird heutzutage generell die Empfehlung zur Entfernung einer Leukoplakie oder Erythroplakie ausgesprochen (10). Das Carcinoma in situ ist eine hochgradige Dysplasieform und obligat präkanzerös, das bedeutet ohne entsprechende Therapie kommt es innerhalb einer gewissen Latenzzeit obligatorisch zur Infiltration der Basalmembran und somit zu einem lokalinvasiven, metastasierungsfähigen Tumor.

2.1.4. Tumorgenese und die epithelial-mesenchymale Transition

Durch die oben genannten Risikofaktoren kommt es in einem Mehrstufenprozess zur Akkumulation von genetischen Veränderungen. Anfangs erfolgt eine Reaktion der Epithelien auf die schädlichen Einflüsse in Form einer Hyperplasie, die durch fortdauernde Einwirkung der Noxen zur Epitheldysplasie führt, die in der Entstehung eines Carcinoma in situ münden kann und ab hier irreversibel fortbesteht bis es durch die Basalmembran einbricht und zum invasiven Karzinom wird (2). Die molekulargenetischen und molekulargenetischen Entstehungsmechanismen von PECA in der Mundhöhle sind sehr vielfältig. In der vorliegenden Arbeit wird nur ein kleiner Bereich der Tumorgenese vertieft und zwar der, der die Zell-Zell-Kontakte betrifft. Die Störung der Zelladhäsion ist eines der Hauptmerkmale der malignen Transformation von Epithelzellen. Damit ist der Aspekt der sogenannten „epithelial-mesenchymalen Transition“ der Tumorzellen gemeint, der für die Einleitung und das Fortschreiten der Tumorgenese von zentraler Bedeutung ist. Bei diesem Vorgang lösen sich die veränderten Zellen aus ihren Zell-Zell-Verbindungen ohne dabei in die Apoptose zu gehen und wandeln sich in Mesenchymzellen um. Schließlich entsteht ein in das Stroma einwachsendes Plattenepithelkarzinom mit Potenzial zur Metastasierung (7). Die TJ-Proteine der Claudinfamilie, die unter anderem für den Aufbau und die Aufrechterhaltung der Polarität der Epithelzellen zuständig sind, sind in diesen Vorgang involviert (11).

2.1.5. Grundlagen der Symptomatik, Diagnostik und Therapie

Die Mehrzahl der Patienten bemerkt die Veränderung im Mundraum nicht gleich. Zum einen sind Schleimhautdefekte anfangs oft schmerzlos und wachsen langsam. Erst später können Symptome wie Blutung, Schmerz, Veränderung der Sprache durch Bewegungseinschränkungen der Zunge, Schwierigkeiten beim Mundöffnen und Kauen, orokutane Fistelbildung, Vergrößerung der Lymphknoten, Gewichtsverlust und Kachexie auftreten. Zum anderen können solche Läsionen als Druckstellen oder Bisswunden fehlinterpretiert werden. Bei den betroffenen Personen werden ebenfalls häufig Verdrängungsmechanismen aktiviert, sodass die erste ärztliche Kontaktaufnahme verzögert erfolgt und die Tumorgenese schon protrahiert sein kann (5).

Die diagnostischen Methoden umfassen das Anamnesegespräch inklusive Familienanamnese und Noxenexposition, die Inspektion der Mundhöhle und die Palpation der lokalen Lymphknoten. Beim Nachweis verdächtiger Strukturen erfolgt eine Bildgebung mit Hilfe von Ultraschall, CT oder MRT, die eine genaue Lokalisierung und Größenbestimmung der Neoplasie sowie eine Aussage zu Lymphknotenbeteiligung und Fernmetastasierung in die Lunge ermöglichen. Im Anschluss erfolgt eine endoskopische Untersuchung des Aerodigestivtrakts gegebenenfalls mit Biopsieentnahme in verdächtigen Arealen, da ein multifokales Tumorwachstum oder ein Zweitkarzinom im Aerodigestivtrakt ausgeschlossen werden sollte. Bei Rezidivverdacht und nicht ausreichender Aussagekraft von CT und MRT kann ein PET-CT durchgeführt werden (12). Zusätzlich zur Basisdiagnostik wird der Zahnstatus mit Orthopantomographie erhoben, denn die Mundhöhle muss vor einer Strahlentherapie saniert werden, sonst besteht die Gefahr der Osteoradionekrosen (13). Die klinische Untersuchung und die Bildgebung werden durch die Biopsieentnahme aus dem vermeintlichen Tumorrandbereich und histologische Aufarbeitung unterstützt (12). Die diagnostischen Maßnahmen dienen der Einteilung des vorliegenden Tumors in die Stadien der TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2, nach der 7. Auflage klassifiziert) und der Einschätzung des Allgemeinzustands des Patienten, um anschließend in einem multidisziplinären Tumorboard eine leitliniengerechte Therapie auszusprechen und einzuleiten.

Bei den Therapiemaßnahmen müssen sowohl die motorischen Funktionen wie Sprechen, Schlucken, Kauen, als auch das ästhetische Ergebnis berücksichtigt werden. Laut umfangreichen Recherchen der S3-Leitlinienkommission erwies sich keine der bislang etablierten Therapieoptionen als eindeutig überlegen. Die Radiotherapie in frühen

Stadien (I/II), sowie die definitive Radiochemotherapie in fortgeschrittenen Stadien (III/IV) liefern vergleichbare Ergebnisse wie die chirurgische Therapie (14). Als wichtigste Therapiemaßnahmen bei kurativ operablen Patienten gelten die komplette Exzision des Tumorgewebes und die Durchführung einer Neckdissection auch bei klinisch unauffälligen Lymphknoten, da die okkulte Metastasierungswahrscheinlichkeit der Halslymphknoten bereits in frühen T-Stadien mit etwa 20% hoch ist (15, 16). Die hämatogene Metastasierung ist selten und betrifft die Lunge bei tendenziell fortgeschrittenen Tumoren. Im Anschluss erfolgt die Rekonstruktion des resezierten Gewebes und gegebenenfalls eine prothetische Versorgung. Außerdem sollte bei fortgeschrittenem T-Stadium (T3/T4), Lymphknotenbefall, Gefäß- oder Perineuralinvasion oder auffälligen Resektionsrändern (<5 mm Resektionsrand) eine frühe postoperative Radio- oder Radiochemotherapie durchgeführt werden. Bei nicht operablen Fällen wird bei Patienten bis 70 Jahren die Radiochemotherapie der ausschließlichen Radiotherapie vorgezogen (12). Optional kann eine Radioimmunotherapie in Kombination mit Cetuximab (monoklonaler Antikörper gegen den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor) statt einer alleinigen Radiatio durchgeführt werden. Diese Therapieoption hat sich bei fortgeschrittenen Kopf- Hals-Tumoren wie Oropharynx-, Hypopharynx- oder Larynxkarzinom als überlegen erwiesen, allerdings sind weitere Studien mit Einbezug des Mundhöhlenkarzinoms noch erforderlich (17). Bei der palliativen Behandlung wird eine supportive Therapie durchgeführt. Es gibt keine Evidenz für eine verlängerte Überlebenszeit durch Chemo- oder Strahlentherapie, jedoch kann in manchen Fällen eine Symptomlinderung erzielt werden. Wie bei anderen Tumorgeschehen sollte eine psychosoziale Betreuung angeboten werden. Außerdem ist eine professionelle Ernährungsberatung von Vorteil, um die notwendige Kalorien- und Nährstoffaufnahme sicherzustellen. Da es bei circa einem Fünftel der Patienten zum Lokalrezidiv kommt, wird eine klinische und radiologische Nachsorge alle 3 Monate in den ersten 2 Jahren und anschließend halbjährlich für weitere 3 Jahren empfohlen (siehe ausführliche Beschreibung in der letzten aktuellen AWMF S3 Leitlinie "Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms" 2012). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt im Stadium I bei 65–79%, im Stadium II bei 53–77%, im Stadium III bei 26–29% und im Stadium IV bei 9–25% (5).

Tabelle 1: 7. Auflage TNM- Klassifikation maligner Neoplasien der Mundhöhle nach Union for International Cancer Control (UICC) 2009 (18).

Kategorie		Ausdehnung
Tx		Primärtumor kann nicht eingeordnet werden
T0		Kein Nachweis eines Primärtumors
Tis		Carcinoma in situ
T1		Tumor ≤2,0 cm in größter Ausdehnung
T2		Tumor >2,0 cm, aber nicht >4,0 cm in größter Ausdehnung
T3		Tumor >4,0 cm in größter Ausdehnung
T4	a	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, in die äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus, M. styloglossus), in die Kieferhöhle oder in die Gesichtshaut
	b	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

Kategorie		Ausdehnung
Nx		Regionale LK* können nicht beurteilt werden
N0		Keine LK*-Metastasen
N1		Metastase in solitärem ipsilateralen LK*, <3,0 cm in größter Ausdehnung
N2	a	Metastase in solitärem ipsilateralen LK*, >3,0 cm, aber <6,0 cm in größter Ausdehnung
	b	Metastasen in multiplen ipsilateralen LK*, <6,0 cm in größter Ausdehnung
	c	Metastasen in bilateralen bzw. kontralateralen LK*, <6,0 cm in größter Ausdehnung
N3		Metastase(n) in LK*, >6,0 cm in größter Ausdehnung

*Lymphknoten

Kategorie		Ausdehnung
Mx		Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0		Keine Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen

Zusatzkategorie - Ausdehnung		
L	0	Keine Invasion in Lymphgefäße
	1	Invasion in Lymphgefäße
V	0	Keine Invasion in Venen
	1	Mikroskopische Invasion in Venen
	2	Makroskopische Invasion in Venen
Pn	0	Keine perineurale Invasion
	1	Perineurale Invasion
R	0	Kein Tumor im Organismus nachweisbar
	1	Mikroskopischer Residualtumor an den Schnittändern
	2	Makroskopischer Tumor an den Schnittändern oder Metastasen belassen
G	1	Gut differenziertes Tumorgewebe
	2	Mäßig differenziertes Tumorgewebe
	3	Schlecht differenziertes Tumorgewebe
	4	Undifferenziertes Tumorgewebe

Lx, Vx, Pnx, Rx, Gx= Keine Bestimmung möglich

Tabelle 2: 7. Auflage Stadieneinteilung maligner Neoplasien der Mundhöhle nach UICC 2009 (18).

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1-3	N1	M0
IVA	T4a	N0-2	M0
	T1-3	N2	M0
IVB	T1-4a	N3	M0

	T4b	N0-3	M0
IVC	T1-4	N0-3	M1

2.2. Das Epithel der Mundhöhle

Das Mundschleimhautkarzinom hat einen epithelialen Ursprung. Das Epithel kleidet sowohl das Innere als auch das Äußere des Körpers aus und bildet durch die unten beschriebenen Zellkontakte einen geschlossenen Verband und dementsprechend eine Barriere zwischen innerem und äußerem Kompartiment. Das Epithel kann man in Deckepithel und Drüsenepithel einteilen. Je nach Organ hat das Epithel unterschiedliche Funktionen. Die wichtigsten Funktionen aller Epithelien sind die Barriere- und Transportfunktion. Trotz der unterschiedlichen Funktionen sind Epithelien ähnlich aufgebaut. Die Epithelien zeigen nach außen oder lumenwärts die apikale und nach innen die basale Seite, die mit darunterliegendem Gewebe verankert ist. Das Plattenepithel der Mundhöhle ist mehrschichtig und zum größten Teil unverhornt. Es wird durch Drüsensekret ständig befeuchtet. Die orthokeratinisierten und parakeratinisierten Stellen bilden sich am harten Gaumen und der Gingiva, weil diese Stellen mechanisch stärker beansprucht werden. Parakeratinisiert bedeutet, dass die Merkmale des unverhornten und verhornten Epitheltyps vereinigt sind. In Abbildung 2a ist der Schichtenaufbau des mehrschichtigen, unverhornten und in Abbildung 2b des mehrschichtigen, verhornten Epithels dargestellt. Bei der parakeratinisierten, mehrschichtigen Schleimhaut fehlt im Gegensatz zur orthokeratinisierten Schleimhaut ein deutliches Stratum granulosum und somit gibt es in den obersten Schichten noch Kernreste. Unter der Basalzellschicht liegendes subepitheliales Bindegewebe wird im gesamten Verdauungstrakt, aber auch im Respirations- und Urogenitaltrakt, als Lamina propria bezeichnet. Das Mundschleimhautepithel samt Lamina propria wird als Mukosa bezeichnet. Die Basalzellschicht dient dem regelmäßigen Nachschub neuer Zellen. Von dort wandern die Zellen nach oben und durchlaufen dabei im physiologischen Fall eine Differenzierung. In der obersten Zellschicht werden die Zellen wiederum abgeschilfert. Die Lebensdauer der Wangenschleimhaut beträgt circa 14 Tage. Wenn die Differenzierung und somit Ausreifung der Zellen nicht mehr richtig abläuft, kommt es zur Dysplasie der Zellen, was als Vorstufe zur malignen Entartung zum Plattenepithelkarzinom eingestuft wird (19).

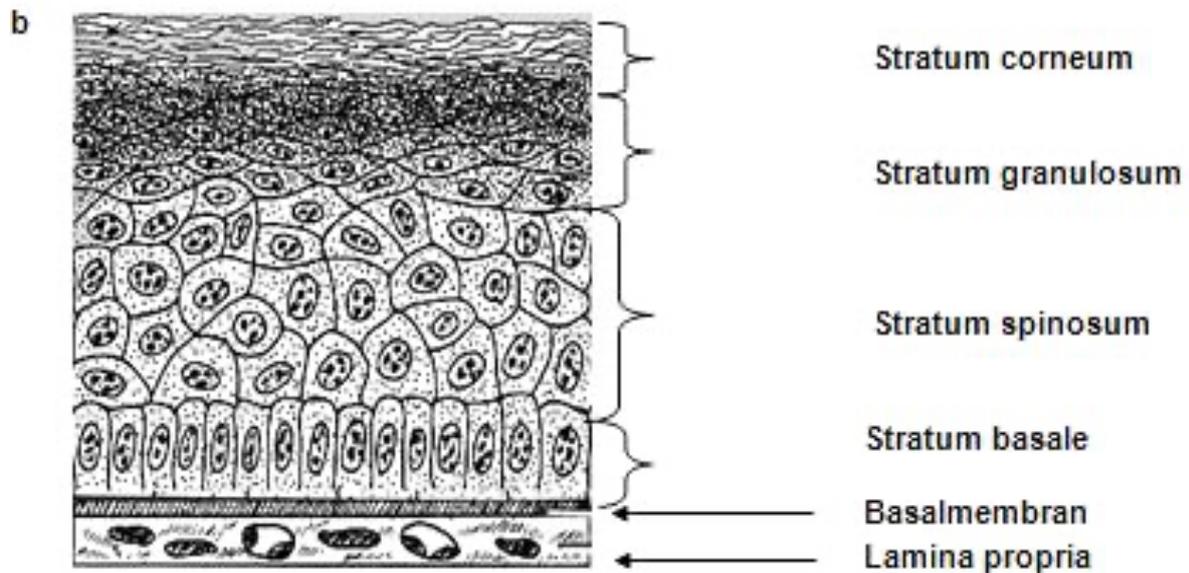
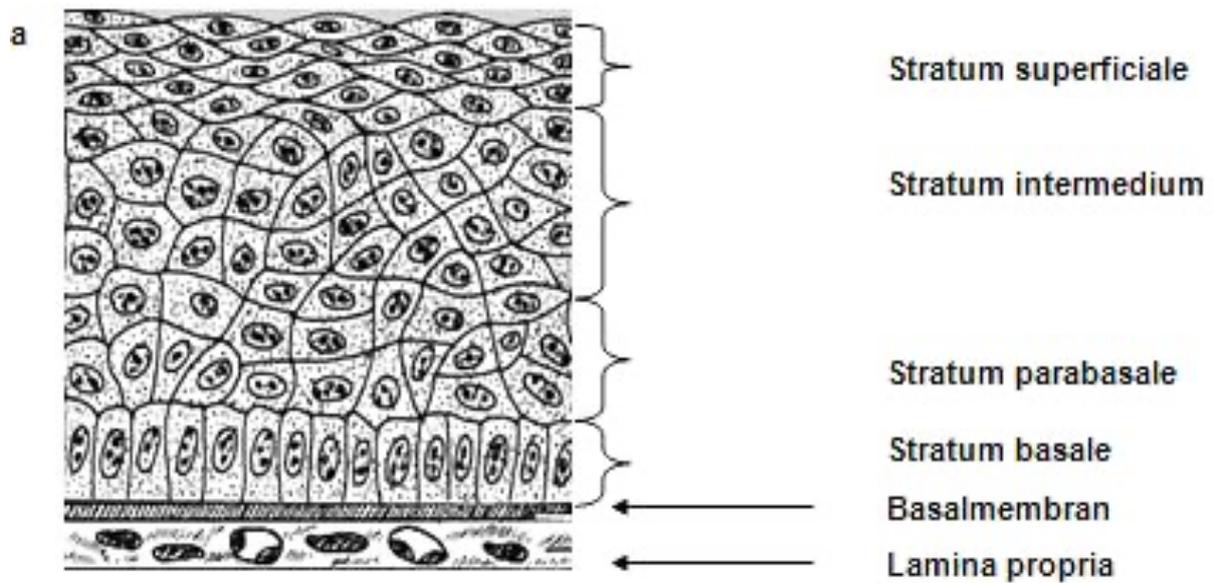


Abbildung 2: Mehrschichtiges Plattenepithel.

a unverhorntes mehrschichtiges Plattenepithel (20).

b verhorntes mehrschichtiges Plattenepithel (21).

2.3. Zell-Kontakte

Die Epithelien sind untereinander und mit darunterliegenden Schichten durch Proteinkomplexe verbunden. Die drei wichtigsten Gruppen der Zellkontakte bilden Verschlusskontakte (Zonula Occludens) oder TJ, Adhäsionskontakte (Adherens Junctions) und Kommunikationskontakte (Gap Junctions). Dabei liegen die TJ als Verschlusschicht gürtelförmig um die Zelle im apikalen Bereich herum. Danach folgt die Adhärenz- und Desmosomschicht mit der Funktion der Verankerung der Zellen entweder untereinander (Desmosome, Adhärens-Kontakte) oder an die darunterliegende Extrazellulärmatrix wie die Basallamina (Hemidesmosome und Fokalkontakte), um geordnete Zellverbände zu bilden und zu erhalten. Diese Kontakte bilden einen Schlussleistenkomplex. Im Anschluss folgt die Kommunikationsschicht, Gap Junctions, die einen Austausch von kleinen Molekülen und Ionen zwischen den benachbarten Zellen und dadurch eine metabolische und elektrische Einheit der Zellen ermöglicht (19, 22).

2.3.1. Die Tight Junction

Die TJ als oberste Verschlusschicht fungieren als Barriere für parazellulären Transport von Ionen, Wasser und Makromolekülen. Je nach Proteinausstattung können selektiv bestimmte Moleküle wie Wasser oder auch Ionen diese interzelluläre Verschlusszone passieren, somit haben manche TJ eine "gate-Funktion" (23). Daraus resultieren Gewebe wie die Sammelrohre der Niere mit sehr dichten TJ und die proximalen Tubuli der Niere mit vergleichsweise leichten TJ (24). Außerdem sind die TJ in die Kontrolle der epithelialen und endothelialen Zellpolarität involviert. Durch diese "Zaunfunktion" (fence-Funktion) wird die Lateraldiffusion der Membranproteine wie der Kanäle, Carrier, Pumpen und Rezeptoren in der Lipiddoppelschicht verhindert, sodass apikale und basolaterale Proteine nicht vermischt werden. Dadurch ist ein gerichteter Transport durch die Epithelschicht möglich (23). Die TJ bestehen aus verschiedenen Membranproteinen und TJ-assoziierten Proteinen. Zu den Membranproteinen gehören Junctional Adhäsionsmoleküle (JAMs), TJ-Associated Marvelproteine (TAMPs) wie Occludin, Tricellulin (Marvel D2), Marvel D3 und die Familie der Claudine. Zu den TJ-assoziierten-Proteinen gehören Zonula occludens Proteine (ZO) (25). Das vereinfachte TJ-Modell ist in der Abbildung 3 dargestellt. Die TJ-assoziierten-Proteine sind in die Signalkaskaden involviert, sodass die

TJs auch eine Rolle beim Zellwachstum, der Proliferation und der Differenzierung einnehmen (26).

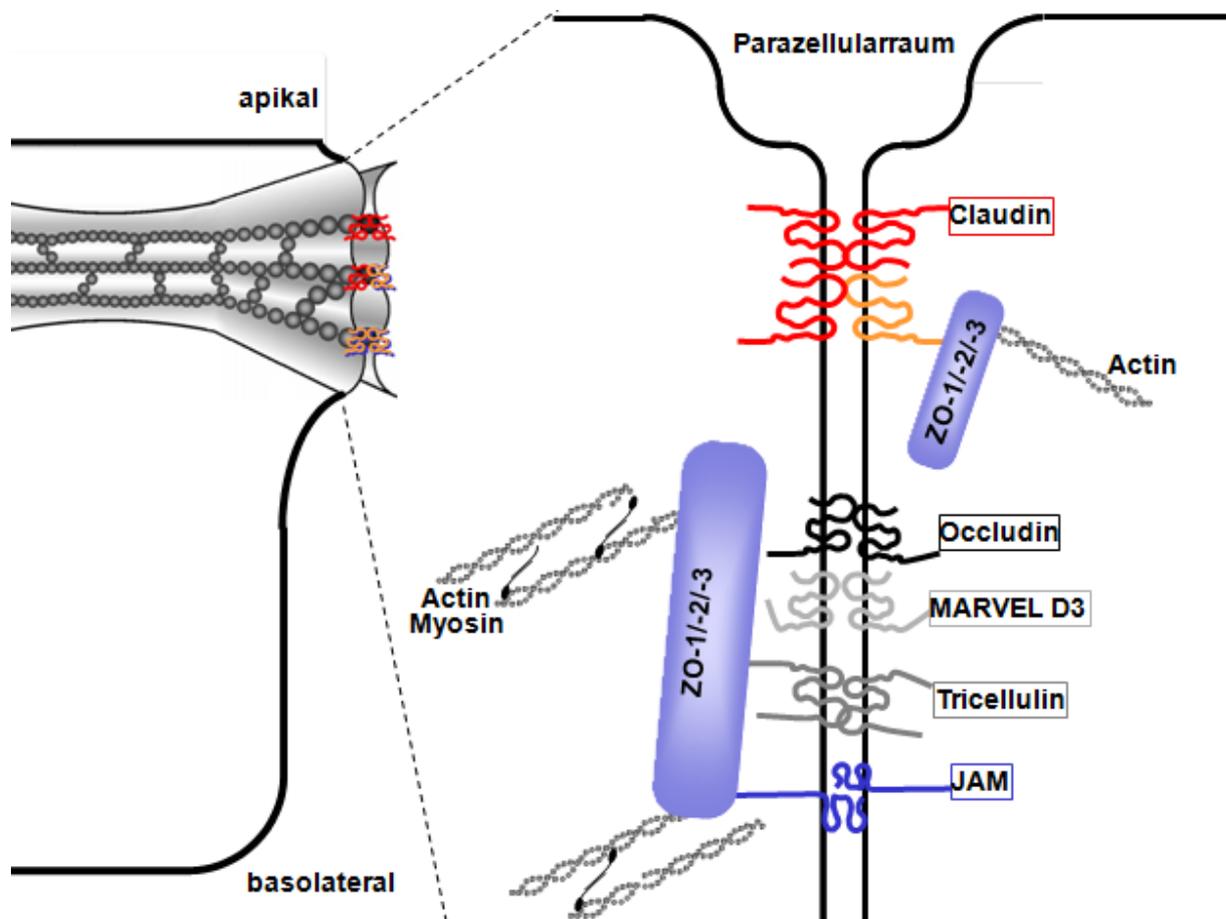


Abbildung 3: Vereinfachtes TJ-Modell.

Die Membranproteine der TJ sind je nach Anzahl der Transmembrandomänen in Tetraspanmembranproteine wie Claudine und TAMPs (Occludin, Tricellulin, Marvel D3) und Monospanmembranproteine wie JAM eingeteilt. Diese binden an die TJ-assoziierten intrazellulären Gerüstproteine wie ZO-1, 2, 3, die unter anderem mit dem Zytoskelettbestandteil Actin interagieren. Modifiziert nach Günzel und Fromm 2012 (25).

2.3.2. Rolle der Claudine in der Tight Junction

Bei den Säugetieren stellt die Familie der Claudine mit ihren 27 Mitgliedern die wichtigste Gruppe der Transmembranproteine der TJ dar, sie bestimmen die Barrierefunktion der TJ. Die Größe der Claudine variiert je nach Anzahl der Aminosäuren zwischen 21 und 34 kDa (27-29). Alle Claudine haben eine ähnliche Struktur, die aus vier Transmembrandomänen besteht. Die intrazellulären Anteile sind COOH- und NH₂-terminale Enden und eine Schleife. Das Carboxy-Ende bindet in den meisten Claudinen über Adapterproteine wie ZO-1, -2, -3 an die Actinfilamente des Zytoskeletts. Außerdem finden hier verschiedene posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung statt, die die Funktion und Lokalisation der Claudine beeinflussen können. Extrazellulär befinden sich zwei Schleifen, die eine parazelluläre Barriere bilden, aber bei bestimmten Claudinen auch einen Kanal für Ionen oder Wasser bilden können. Diese Schleifen interagieren mit denen der benachbarten Zellen (siehe Abbildung 3) (25). Es ist schon lange bekannt, dass die Claudine eine bedeutende Rolle in der Strukturbildung der TJ einnehmen. Im Jahr 1998 konnten Furuse und seine Forschungsgruppe die Ausbildung der Strangnetze innerhalb ansonsten TJ-loser Fibroblasten allein durch das Vorhandensein der einzelnen Claudine nachweisen (30). Diese Strangbildung wird durch unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen den Claudinen initiiert. Die Claudine interagieren mit den Claudinen innerhalb einer Zelle und gehen sogenannte cis-Bindungen miteinander ein. Außerdem bestehen zwischen den Claudinen der benachbarten Zellen trans-Bindungen. Dabei bestehen Wechselwirkungen entweder zwischen gleichen Claudinen (homophil) oder unterschiedlichen Claudinen (heterophil). Die Wechselwirkungen sind unterschiedlich stark und können nur zwischen bestimmten Claudinen aufgebaut werden (31, 32). Auch die parazelluläre Barriere- und Kanalbildungsfunktion der TJ wird vorwiegend durch die Claudinzusammensetzung bestimmt. Als barrierebildende Claudine fungieren beispielsweise Claudine-1, -3- und -5, wohingegen die Claudine-2, -10b und -15 zur Porenausbildung führen und eine Selektivität für Kationen aufweisen oder im Fall von Claudin-2 und Claudin-15 auch für Wasser permeabel sind. Die Claudine-10a und -17 sind permeabel für Anionen (25). Es existieren jedoch auch Claudine, denen keine eindeutige Funktion zugewiesen wird, denn ihre Funktion ist von der Lokalisation und Interaktion mit anderen Claudinen abhängig. So fungieren zum Beispiel Claudin-4 und Claudin-7 in der Nierenzelllinie des Hundes (Madin Darby Canine Kidney cell line, MDCK-II) eher als abdichtende Claudine, wohingegen sie in der Nierenzelllinie der Schweine (pig kidney cell line, LLC-PK1) einen

Chlorid-Kanal zu bilden scheinen (33). Die Zusammensetzung der Claudine eines Epithels ist variabel und unterscheidet sich ebenfalls in den verschiedenen Organen und hier sogar in den einzelnen Segmenten, wodurch die Barriereigenschaften bestimmt werden. So haben die proximalen Bereiche von Niere und Darm eine andere Claudinzusammensetzung als die distalen Bereiche (24).

2.3.3. Bedeutung der Claudine bei Erkrankungen

Claudine können als Rezeptor für Pathogene fungieren und ihnen Eintritt in die Wirtszellen verschaffen. Claudin-1 wurde als Rezeptor/Korezeptor für den Eintritt von Hepatitis-C-Virus und Dengue-Virus in die Wirtszelle identifiziert (34, 35). Außerdem erkannten Zheng und seine Forschungsgruppe, dass Claudin-7 an der HIV-Infektion beteiligt ist und dadurch konnten weitere mögliche Angriffspunkte der Antiviraltherapie geschaffen werden (36). Clostridium perfringens Stämme bilden Enterotoxine (CPE), die eine Lebensmittelvergiftung oder Gasbrand hervorrufen können. Claudin-3 und Claudin-4 wurden zuerst als Rezeptoren (CPE-Rezeptor 2 und 1) dieser Pathogene identifiziert und erst später als Mitglieder der Claudinfamilie. Inzwischen wurden auch andere Claudine identifiziert, die mit CPE interagieren (37). Mutationen der Claudine werden in einer Reihe von Erkrankungen beobachtet. So werden einige hereditäre Erkrankungen mit Mutationen in Claudingenen assoziiert. Bei der neonatalen sklerosierenden Cholangitis und Ichthyose konnte eine Deletion im Claudin-1 Exon nachgewiesen werden, infolgedessen fehlt abdichtendes Claudin-1 in den intra- und extrahepatischen Gallenwegen und der Haut dieser Patienten (38). Eine Mutation im Claudin-14 Gen führt zur Abwesenheit von Claudin-14 in den Haarzellen des Innenohrs und deren Stützzellen, gefolgt von einer veränderten Zusammensetzung der Endolymphe und der Perilymphe des Innenohrs. Dies führte im Mausmodell zur Degradation von Hörzellen und Taubheit (39). Eine Mutation in Claudin-16 oder -19 führt zu einer Nierenerkrankung mit gestörter Reabsorption von Magnesium und Calcium. Das hieraus resultierende Krankheitsbild ist die Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose, die Claudin-19 Mutation ist zusätzlich durch Augenbeteiligung gekennzeichnet (40, 41). Auch erworbene Fehlregulationen der Claudin-Expression oder Claudinlokalisierung durch Infektion, Entzündung oder autoimmunologische Vorgänge gehen mit einer Barrieredysfunktion einher. Am Beispiel der chronischen entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sieht man den Einfluss der proinflammatorischen Faktoren wie Tumornekrosefaktor- α und

Interleukin-13 auf das TJ-Netzwerk. Bei beiden Erkrankungen kommt es zur Hochregulation des porenbildenden Claudin-2 und Herunterregulation von den abdichtenden Claudinen-5 und -8 bei Morbus Crohn und Claudinen-4 und -7 bei Colitis ulcerosa, was in einer Leckflussdiarrhö mündet (42, 43). Bei Asthma bronchiale und entsprechenden chronischen Entzündungen der Atemwege wurde eine Hochregulation von Claudin-4 als möglicher prognostischer Marker festgestellt, dessen Höhe im Plasma der Patienten mit der Wahrscheinlichkeit einer Exazerbation korreliert (44).

Zudem sind Dysregulationen der Claudine auch in Tumorerkrankungen anzutreffen. Es wird davon ausgegangen, dass die Tumorentstehung mit einer Entdifferenzierung der Zellen mit Verlust der Zellpolarität und Zellintegrität mit begleitender TJ-Dysfunktion einhergehen kann. Die Claudine-1, -3, -4 und -7 gehören zu den am häufigsten dysregulierten Claudinen in unterschiedlichen Tumoren (45). So werden beispielsweise beim kolorektalen Karzinom die Claudine-1, -4 und -7 vermindert exprimiert (46). Hingegen werden die gleichen Claudine im Falle eines Zervixkarzinoms im Vergleich zur normalen Zervixschleimhaut verstärkt exprimiert (47). Es kommt in zahlreichen Neoplasien wie Eierstock-, Brust- und Prostatakrebs zu einer Überexpression von Claudin-3 und -4 (48).

Die Daten sind uneinheitlich und es herrscht von Tumorentität zur Tumorentität und sogar innerhalb eines bestimmten Tumors je nach Tumorstadium ein uneinheitliches Bild der Claudin-Expression. Deshalb ist es wichtig, unterschiedliche Tumore bezüglich der Claudin-Expression zu untersuchen, denn es fungieren bereits einige Claudine als Tumormarker, prognostische Parameter oder als potenzielle therapeutische Ansätze.

Claudin-3 und -4 in Ovarialkarzinomen können als Tumormarker fungieren, denn das normale Oberflächenepithel des Ovars exprimiert kaum Claudin-3 und kein Claudin-4 (49). Hinzu kommt, dass das Claudin-4 als Bestandteil eines Exosoms sogar im Blut der Patienten mit Ovarialkarzinom mit 98%-iger Spezifität und 51%-iger Sensitivität nachgewiesen werden kann, was seine Eigenschaft als potenzieller Biomarker zusätzlich stützt (50). Wie bereits beschrieben, sind Claudin-3 und -4 in vielen Tumoren überexprimiert. Ihre hohe Rezeptoraffinität zum fluorescenzmarkierten-CPE, genauer gesagt zu seinem Carboxy-terminalen Fragment (c-CPE), könnte für die intraoperative Identifikation von Mikrometastasen oder des Resttumors bei mikrometastasiertem Ovarialkarzinom genutzt und somit die Prognose dieser Patientinnen verbessert werden (51).

Das Expressionsmuster von Claudinen beeinflusst das Tumorverhalten bei verschiedenen Arten von epithelialen Neoplasien und hat eine prognostische Bedeutung. Die verminderte Expression von Claudin-1 ist mit einem reduzierten Überleben und einer

erhöhten Rezidivrate beim Kolonkarzinom im Stadium II und beim Mammakarzinom assoziiert (52, 53). Außerdem ist die reduzierte Expression von Claudin-2 ein Hinweis auf ein Mammakarzinom in einem fortgeschrittenen Stadium begleitet von einer Lymphknotenmetastasierung (54). Eine geringe Claudin-4-Expression bei Pankreasgangadenokarzinom ist prognostisch ungünstig. In einer japanischen Studie wurden 100 Patienten mit Pankreasgangadenokarzinom untersucht und festgestellt, dass die Patienten mit höherer Claudin-4-Expression im Schnitt 4 Jahre länger überleben als die Patienten mit der verminderten Claudin-4-Expression (55). Einen Prädiktor für Lymphknotenbefall beim Ösophaguskarzinom bildet die reduzierte Expression von Claudin-7 an der Tumordinvasionsfront (56).

Die Claudine werden bereits in den therapeutischen Ansätzen der epithelialen Tumore integriert. Es besteht die Möglichkeit die CPE oder c-CPE basierte Therapie einzusetzen. Hier gibt es bis heute allerdings nur präklinische Modelle. Ein Beispiel hierfür wäre das Prostatakarzinom mit erhöhter Expression von Claudin-3 und -4 in einem Prostata-Zelllinienmodell. Es wird kein zytotoxischer Effekt in normalen Epithelien mit Claudin-4 in der TJ gesehen, wohingegen dies in der Prostata-Tumorzelllinie mit erhöhter Claudin-3 und Claudin-4-Expression außerhalb der TJ der Fall ist. Um den zytotoxischen Effekt in vivo nachzuweisen, wurde eine Tumorzelllinie als Xenotransplantat in athymische Mäuse injiziert und jeweils mit peritumoralen Injektionen mit CPE oder mit Salzlösung für 10 Tage behandelt. Sowohl das Tumorwachstum als auch das Tumolvolumen wurde in der CPE-Gruppe deutlich reduziert, was für die Wirksamkeit dieser Therapie spricht. Nichtsdestotrotz müssen die systemischen Nebenwirkungen weiter evaluiert werden, bevor es den Weg in die klinische Anwendung findet (57). Um die systemischen Nebenwirkungen zu minimieren wurden bereits Modifikationen der CPE-basierten Therapie durchgeführt (58). Auf der anderen Seite steht die Claudin-Antikörper basierte Tumorthherapie. In einem präklinischen Rattenmodell wurde ein monoklonaler Antikörper entwickelt, der an die extrazelluläre Domäne des Claudin-4 bindet. Der Antikörper wurde anschließend im Mausmodell bei Urothelkarzinom mit verstärkter Expression von Claudin-4 alleine und in Kombination mit Cisplatin appliziert. Bei kombinierter Gabe resultierte eine höhere Permeabilität für Cisplatin und somit eine höhere intrazelluläre Akkumulation von Cisplatin im Tumorgewebe. Es scheint, dass durch die zusätzliche Gabe eines Claudin-Antikörpers die Wirksamkeit von Krebsmedikamenten erhöht werden kann (59). Bei Magenadenokarzinom und dessen Metastasen, sowie bei Ösophagus-, Pankreas-, Lungen- und Ovarialkarzinom wurde eine Expression von Claudin-18 Isoform 2 (Claudin-18.2) detektiert (60).

Daraufhin wurde ein chimärer, monoklonaler IgG1 Antikörper (AK) Claudiximab/Zolbetuximab (IMAB362) gegen Claudin-18.2 entwickelt. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom mit fehlender Expression von epidermalem Wachstumsfaktorrezeptor-2 (HER-2), aber einer Expression von Claudin-18.2 in mehr als 40% der Tumorzellen konnte bereits in einer randomisierten Phasen-2 Studie Zolbetuximab erprobt werden. Hier wurde die Erstlinienchemotherapie EOX (Epirubicin, Oxaliplatin, Capecitabine) mit EOX in Kombination mit Zolbetuximab verglichen. Sowohl eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens um im Schnitt 2 Monate, als auch des Gesamtüberlebens um im Schnitt 5 Monate, ohne signifikante Erhöhung von schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen, wurde mit dem neuen AK erzielt (61). Basierend auf Therapieerfolgen wurden bereits mehrere klinische Phase-3 Studien gestartet (NCT03653507), (NCT03504397).

Die oben genannten Erkenntnisse lassen auf eine facettenreiche Bedeutung der Claudine in unterschiedlichen Bereichen der Medizin schließen. Weil das Claudin-Expressionsmuster und deren Einfluss in den unterschiedlichen epithelialen Tumoren variabel ist, widmen wir uns in dieser Studie dem oralen Plattenepithelkarzinom, da in Bezug auf diese Tumorentität bislang noch wenige Studien zu dem Thema vorliegen.

2.3.4. Dysregulation der Claudin-Expression beim oralen Plattenepithelkarzinom

Die publizierten Studien zum primären Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ohne Vorbehandlung zeigen uneinheitliche Ergebnisse bezüglich des Expressionsmusters der Claudine. Innerhalb der Mundhöhle wurden die Claudine-1, -2, -3, -4, -5, -7 und -8 in den meisten Studien immunhistochemisch und nur in einigen Studien auf der Genexpressionsebene untersucht. Die Claudine-1, -2, -3, -4, -5 und -7 wurden von Lourenco in der gesunden oralen Mukosa nachgewiesen (62). Davon ist Claudin-1 das am häufigsten untersuchte TJ-Protein des benignen und malignen Mundschleimhautepithels. Interessanterweise wird das Expressionsmuster innerhalb der gesunden oralen Mukosa uneinheitlich beschrieben. So ist zum Beispiel unklar, ob in der gesunden oralen Mukosa eine Expression von Claudin-1 vorkommt oder nicht (62-67). Eine Veränderung in der Expression und Lokalisation von Claudin-1 findet eventuell schon ab der Transformation des normalen oralen Epithels über Dysplasie zu Carcinoma in situ statt (67-69). In vielen Studien geht die erhöhte Expression von Claudin-1 bei oralem PECA mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einer schlechten Differenzierung, einer

Lymphknotenmetastasierung sowie einer angiolymphatischen und perineuralen Invasion einher (66, 70, 71). Im Widerspruch zu den zuvor genannten Ergebnissen wurde berichtet, dass die Claudin-1-Expression mit der Entdifferenzierung der Tumorzellen abnimmt (62, 64, 65).

Die Claudin-2- und Claudin-3-Expression innerhalb der Mundhöhle wurde bis jetzt nur in einer einzigen Studie untersucht. Ein Einfluss auf die Prognose wurde bislang nicht berichtet (62).

Die erhöhte Expression von Claudin-4 scheint einen protektiven Charakter zu haben, denn Claudin-4-Überexpression in der Zellmembran des Tumors ist mit einer guten Differenzierung, Rezidivfreiheit, geringerer Anzahl an Perineuralinvasion und längerem Überleben assoziiert (62, 72).

Claudin-5 wurde in weniger als 30% der Tumorzellen und dort hauptsächlich in der Zellmembran, aber auch geringfügig im Zytoplasma gefunden und es konnte noch kein Zusammenhang mit der Prognose der Patienten festgestellt werden (62, 73, 74).

Die Expression von Claudin-7 in den vorhergehenden Studien stößt ebenfalls, wie die Expression von Claudin-1, auf widersprüchliche Ergebnisse. In der Genexpressionsanalyse konnte eine Herunterregulation von Claudin-7 bei Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom im Vergleich zu Patienten mit gesundem Epithel festgestellt werden (75). Die Patienten ohne Expression von Claudin-7 in dem oralen PECA sind häufig im fortgeschrittenem UICC-Stadium, haben mehr Rezidive und eine geringere Überlebensrate, sowie Lymphknotenmetastasen, Vaskular- und Perineuralinvasion (73, 76, 77). Speziell im Tumorzentrum ist die Claudin-7-Expression mit einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert (78). Im Gegensatz dazu wurde eine stärkere Claudin-7-Färbung in apikalen oder invasiven Regionen des Zungenkarzinoms im Vergleich zu dem tumorfreien, angrenzenden Epithel festgestellt (74). Eine stärkere Intensität der Claudin-7-Expression in der Tumorfrente ist mit einem reduzierten Überleben und schlechtem Differenzierungsgrad assoziiert (74, 78). Zudem wird bei stärkerer Claudin-7-Expression eine höhere Wahrscheinlichkeit der vaskulären Tumordinfiltration angegeben (62).

Die Überexpression von Claudin-8 wurde in einer Genexpressionsanalyse als Merkmal für reduziertes Gesamtüberleben in oralem PECA identifiziert (79).

Daraus lässt sich schließen, dass die Veränderungen der Claudin-Expression im oralen PECA einen Einfluss auf die Prognose der Patienten nehmen können. Allerdings wurden in allen bisher durchgeführten Studien kein intraindividueller Vergleich zwischen Claudin-Expression im oralen PECA und gesundem Epithel der Mundhöhle desselben

Individuums vorgenommen. Als Kontrollgewebe wurde entweder eine geringe Anzahl "gesunder oraler Mukosa" ohne weitere Angaben (62, 66, 72, 76, 77), das tumorbenachbarte Gewebe (64, 66, 67, 69, 74) oder ein Gewebe nicht oralen Ursprungs (71, 73) genommen.

Claudin-basierte therapeutische Ansätze des oralen PECA, wie in Abschnitt 2.3.2 aufgeführt, finden allerdings bislang noch keine Anwendung in der onkologischen Therapie.

2.4. Zielsetzung

Eine veränderte Claudin-Expression konnte bei verschiedenen Karzinomarten gefunden werden, auch bei oralen Plattenepithelkarzinom. Allerdings sind die Ergebnisse uneinheitlich und allen Studien fehlt bis heute der Vergleich an klinisch gesunder Mundschleimhaut desselben Individuums.

Ziel dieser Arbeit ist es, das orale PECA auf die Expression der TJ-Proteine Claudin-1 bis -5 und Claudin-7 zu untersuchen und mit der Expression in gesundem Mundschleimhautgewebe desselben Patienten zu vergleichen. Dieser intraindividuelle Vergleich soll mögliche Unterschiede zwischen der Claudin-Expression im Tumorgewebe versus im gesunden oralen Epithel feststellen, denn es gibt Hinweise, dass diese Veränderung der Claudin-Expression prognosebestimmend sein können. In unserer Studie werden PECA-Resektate unterschiedlicher Lokalisation innerhalb der Mundschleimhaut und gesundes Wangengewebe untersucht. In diesen Biopsien wird die Expression der Claudine mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Zusätzlich wird die genaue Lokalisation der Claudine in der Konfokalmikroskopie validiert.

Der primäre Endpunkt unserer Studie befasst sich mit dem intraindividuellen Vergleich der Claudin-Expression in oralen Plattenepithelkarzinomen und klinisch gesunder Mundschleimhaut desselben Individuums.

Die sekundären Endpunkte sind zum einen die Evaluation der Claudin-Expression als Biomarker für das Tumorgrading und zum anderen als Prognosefaktor für das rezidivfreie Überleben.

3. Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Brutschrank Heraeus	<i>Hanau</i>
Feinwaage	<i>Sartorius AG</i>
Fusion Fx7-Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-Image	<i>Vilber Lourmat Deutschland GmbH</i>
Gefrierschrank (-20°C)	<i>Bosch</i>
Gefrierschrank (-80°C) Green Line	<i>Skadi Europe Bv</i>
Heizblock, Thermostat 5320	<i>Eppendorf AG</i>
Kühlschrank (+4°C), Maxicoldlab 2021	<i>LKB Bomma</i>
Magnetrührer	<i>IKA-Werke GmbH & CO. KG</i>
Mikroskope:	
-Konfokales Leser-Scanning-Mikroskop 510 META	<i>Carl Zeiss AG</i>
-Lichtmikroskop	<i>Olympus Corporation</i>
Mikrotiterplatten-Lesegerät, TECAN Spectra Classic	<i>Lencore Inc.</i>
Mikrowelle	<i>Samsung</i>
Netzgeräte Power Pac 200/300	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i>
Pipettierhilfe, Pipetboy acu	<i>INTEGRA Biosciences GmbH</i>
Ultraschallprozessor UP50H	<i>Hielscher Ultrasonics GmbH</i>
Vortex-Homogenisator-Geräte, Vibrofix VF 1 electronic	<i>Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA-- Labortechnik</i>
Wiegeschüttler Wippe WT12, Rocking Plattform	<i>Biometra GmbH</i>
Zentrifugen:	
-Centrifuge 5415C	<i>Eppendorf AG</i>
-Laboratory Medical Centrifuge LMC 3000	<i>Biosan Medical Biological Research & Technologies</i>

-Perfect Spin 24R Refrigerated
microcentrifuge

PEQLAB

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Bechergläser (25-150ml)

Firma Kavalier Approx. vol. SIMAX

Deckgläschen

*Gerhard Menzel GmbH (Thermo Fisher
Scientific, Inc.)*

Eppendorf-Gefäße

Eppendorf AG

Einmalhandschuhe

VWR International bvba

Einmal-Spitzen mit Kanülen

Becton, Dickinson and Compan;

(1 ml, 26 GA 3/8 IN 0,45x 10 mm)

B. Braun Melsungen AG

Falcon®-Röhrchen (15,50 ml)

Corning Life Sciences

Falcon® serologische Pipetten (5/10/25 ml)

Corning Life Sciences

Filterpapier, Whatman® 3MM papers

Whatman™ (GE Healthcare)

Hamilton Spritze

Carl Roth GmbH + Co KG

Homogenisator mit PTFE-Pistill

Thermo Fisher scientific Inc.

Magnetrührfisch

Merck KGaA

Micro Amp Optical Adhesive Film

Applied Biosystems

Mikrotiterplatten:

Micro Amp Fast Optical 96-Well Reaction

Plate with Barcode (0,1ml) Base

Micro Amp Splash Free 96-Well

Applied Biosystems

MobiSpin Mini Spin Columns

with 10 µm pore size filter

MobiTec-Molecular Biotechnology

Pipettenspitzen (0,5- 1000 µl)

Sarstedt AG & Co

Polycylnlidendifluorid (PVDF)-Membran

PerkinElmer, Inc.

Skalpelle

FEATHER Safety Razor Co.

3.1.3. Chemikalien

Acrylamid-Bis Fertiglösung 30% (37, 5:1),	
Rotiphorese Gel 30	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Albumin Standard Ampules	<i>Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
BCA Protein Assay A+B	<i>Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)</i>
Bovine Serum Albumin Faktor V (BSA)	<i>Biomol GmbH</i>
Bromphenolblau	<i>Amershamplc (GE Healthcare)</i>
Coomassie Brilliant Blue R Concentrate	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Complete mini EDTA-free, EASYpack	<i>Roche Diagnostics GmbH</i>
DAKO Cytomation protein block X0909	<i>Agilent Technologies</i>
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	<i>Roche Diagnostics GmbH</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)	<i>Gibco® (Thermo Fisher Scientific, Inc.)</i>
Essigsäure (Eisessig) 100%	<i>Merck KGaA</i>
Ethanol, 100 %, absolut	<i>Merck KGaA</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Merck KGaA</i>
Glutathione Sepharose™ 4B	<i>GE Healthcare</i>
Glutathiontransferase-	
Clostridiumperfringensenterotoxin	
Fusionsprotein (GST-CPE)	<i>Charité, Klinische Physiologie CBF</i>
Glycerol	<i>SERVA Electrophoresis GmbH</i>
Glycin	<i>SERVA Electrophoresis GmbH</i>
4-(2-Hydroxyethyl)-1-	
piperazinethansulfonsäure (HEPES)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Lumilight Western Blotting Substrate	<i>Roche Diagnostics GmbH</i>
Methanol	<i>Merck KGaA</i>
Milchpulver	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Mount Fluor	<i>Biocyc GmbH & Co. KG</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Natriumfluorid (NaF)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	<i>Thermo Fisher Scientific</i>

Polyvinylpyrrolidone 40 (PVP 40)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
ProTaq Mount Fluor	<i>Biocyc GmbH & Co. KG</i>
Sodiumdodecylsulfat	
(SDS, Natriumdodecylsulfat)	<i>SERVA Electrophoresis GmbH</i>
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>VWR International GmbH</i>
Trinatriumcitrat	<i>Merck KGaA</i>
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	<i>Merck KGaA</i>
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	<i>Bio-Rad Laboratories, Inc.</i>
1 M Tris Buffer, pH 7,5 / 8,8	<i>SERVA Electrophoresis GmbH</i>
Triton x-100	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Trypsin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
TWEEN®20	<i>AppliChem GmbH</i>
Xylol	<i>Carl Roth GmbH + Co.KG</i>

3.1.4. Antikörper

Tabelle 3: Primärantikörper.

Herkunft	gerichtet gegen	Verdünnung		Hersteller
		IF*	WB**	
Kaninchen	Claudin-1/-2/-3/ -7/-5	1:100	1:1000	<i>Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)</i>
Maus	Claudin-4	1:100	1:5000	
Maus	Claudin-5	1:100	1:1000	
Maus	β-Actin	-	1:10000	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Maus Kaninchen	Zonula occludens-1	1:100	-	<i>Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Inc</i>

*IF – Immunofluoreszenz, **WB – Western Blot

Tabelle 4: Sekundärantikörper.

Herkunft	Gerichtet gegen Target Spezies	Target Antikörperform	Klasse-	Verdünnung IF*	WB**	Hersteller
Ziege	Kaninchen	IgG-F(ab') ₂ Fragment (HRP)			1:10000	Jackson Immuno Research, Inc.
	Maus				1:10000	
	Maus	IgG (H+L) (AlexaFluor®488)		1:500	-	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Inc.
	Kaninchen	IgG (H+L) (AlexaFluor®594)		1:500	-	

*IF – Immunofluoreszenz, **WB – Western Blot

3.1.5. Lösungen und Puffer

Blockierungslösung (Western Blot)	1%	PVP40
	0,5%	Tween20
	ad H ₂ O	
Elektrophorese-Puffer	10%	10XPuffer West
	0,1%	SDS
	ad H ₂ O	
Gesamtlysepuffer	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris-Puffer pH 7,5
	0,5%	Triton-X-100
	0,1%	SDS
	ad H ₂ O	
	1 Tablette Proteaseinhibitor pro 10 ml	
Laemmli-Probenpuffer (5x)	125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	500 mM	DTT
	50%	Glycerol
	10%	SDS
	0,001%	Bromphenolblau

	ad H ₂ O	
RIPA-Lysepuffer	25 mM	NaF
	25 mM	HEPES
	2 mM	EDTA
	1%	SDS
	ad H ₂ O	
	1 Tablette	Proteaseinhibitor pro 10 ml
Sammelgel	5,1%	Acrylamid-Bis
		Fertiglösung 30%
	0,125 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,1%	SDS
	0,1%	APS
	0,1%	TEMED
TBST	500 mM	NaCl
	20 mM	Tris
	0,1%	Tween, pH 7,3
	ad H ₂ O	
20xTEC-Puffer (Immunfluoreszenzfärbung)	5 g	Tris
	10 g	EDTA
	6,4 g	Trinatriumcitrat
	in 1 L dest. H ₂ O, pH 7,8	
Transferpuffer	10%	10xWest-Puffer
	10%	Methanol
	ad H ₂ O	
Trenngel 12,5 %	12,5%	Acrylamid
	0,35 M	Tris-Puffer, pH 8,8
	0,1%	SDS
	0,1%	APS
	0,1%	TEMED
	ad H ₂ O	
10xWest-Puffer	1,9 M	Glycin
	0,25 M	Tris, pH 8,1-8,4
	ad H ₂ O	

3.1.6. Software

Tabelle 5: Software.

Programm	Anwendungsbereich	Hersteller
AIDA Image Analyzer Version 3.21	Densitometrische Auswertung der Western Blots	Raytest Isotopenmessgeraete GmbH
Excel - Microsoft Office	Datenauswertung	Microsoft Corporation
Image Processing and Analysis in Java	Bildbearbeitung	Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health
ZEN	Bildbearbeitung für konfokales Mikroskop	Carl Zeiss Microimaging, LLC.
IBM SPSS Statistics 25.0	Datenanalyse	International Business Machines Corporation

3.2. Übersicht über das Untersuchungsgut

3.2.1. Patientenkollektiv

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Patientenkollektiv besteht aus 60 Patienten mit neu diagnostiziertem und histologisch gesichertem primärem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, die im Zeitraum von April 2014 bis Dezember 2016 in der Kiefer- und Gesichtschirurgie der Charité am Campus Benjamin Franklin behandelt wurden. Vor dem Studieneinschluss wurden die Patienten aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Studienteilnahme. Der Ethikantrag (EA4/152/15) für diese Studie wurde bewilligt.

3.2.2. Proben

Das zu untersuchende Gewebe wurde im Rahmen der operativen Entfernung des primären Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle entnommen. Neoadjuvante Therapie fand nicht statt. Kleine Gewebestücke des jeweiligen Tumors und des gesunden Gewebes von der gegenüberliegenden Wangenschleimhaut wurden während der Operation in Falcon Rörchen mit physiologischer NaCl-Lösung auf Eis gelegt und unmittelbar nach der

Operation in das Labor transportiert. Danach wurde das Gewebe weiter zerteilt und in Eppendorf-Gefäße verteilt. Anschließend wurden die Proben im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Das restliche entnommene Gewebe wurde routinemäßig zur Paraffineinbettung und pathologischen Begutachtung in die Pathologie geschickt.

3.3. Proteinanalytik

3.3.1. Zellyse

Die Gesamtproteinextraktion erfolgte mit einem hoch denaturierenden RIPA (engl. Radioimmunoprecipitation assay)-Lysepuffer (siehe 3.1.5. Lösungen und Puffer). Die entsprechenden kleinen Gewebeprobe wurden in einen Potter gegeben und es wurde jeweils 1 ml RIPA-Lysepuffer zugesetzt. Das Gewebe wurde mit Hilfe von Pistill homogenisiert. Die entstandene Suspension wurde in Eppendorf-Gefäße überführt und für 30 Minuten zum Inkubieren auf Eis gestellt. Danach erfolgte zum einen eine jeweils 13 Mal 1 Sekunde dauernde Sonifizierung mit einem Ultraschallstab (Ultraschallprozessor UP50H) und zum anderen wurde es 3 Mal durch die Kanüle $0,45 \times 10 \text{ mm } 26 \text{ G } 3/8$ gezogen. Die entstandene Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Hinzu kommt die Zellyse von einigen Mundschleimhautproben und einer Kolonprobe im Gesamtlysepuffer (siehe 3.1.5. Lösungen und Puffer), die als Positivkontrolle für nachzuweisende Claudine fungiert. Hier wurde das Gewebe genauso wie oben beschrieben homogenisiert, inkubiert, sonifiziert und anschließend bei Zentrifugalbeschleunigung von $15000 \times g$ und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert (Perfect Spin 24R Refrigerated microcentrifuge). Der Überstand wurde jeweils in ein Eppendorf-Gefäß überführt und kurzfristig bei -20°C oder langfristig bei -80°C eingefroren.

3.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Pierce

Die quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Gesamtproteinextraktion beruht auf der BCA (engl. Bicinchoninic acid)-Methode nach Angaben des Herstellers (Pierce®, Thermo Scientific). Die Proteine bilden mit zweiwertigen Kupferionen in alkalischer Lösung einen Komplex, sogenannte Biuret-Reaktion. Dabei werden die zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Kupferionen reduziert. BCA reagiert mit einwertigem Kupferion zu einer Komplexverbindung mit violetter Farbe. Dabei kann die

Proteinkonzentration im Rahmen einer photometrischen Messung unter einer Wellenlänge von 562 nm durch die Absorption ermittelt werden.

Die Proteinbestimmung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurde eine BSA-Eichreihe bekannter Konzentration (0; 0,2; 0,8; 1,2 mg BSA/ ml), RIPA-Puffer und die zu vermessenden Proben pipettiert, jeweils 10 µl per Well. Anschließend wurde die Eichreihe und die zu bestimmenden Proben mit jeweils 190 µl BCA Gebrauchslösung versehen und über 30 Minuten in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der Abkühlung bis zur Raumtemperatur wurde die Proteinkonzentration in einem Photometer (Tecan Spectra Classik) bestimmt.

Nach der Proteinbestimmung wurden die Proben für den Western Blot vorbereitet. Die Proben wurden auf die gleiche Proteinkonzentration gebracht und Laemmli-Lysepuffer (siehe 3.1.5. Lösungen und Puffer) im Verhältnis 1:5 zugesetzt, sodass eine fertige Probe 20 µg Protein pro 20 µl beinhaltet. Die Proben wurden bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei -20°C gelagert.

3.3.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli

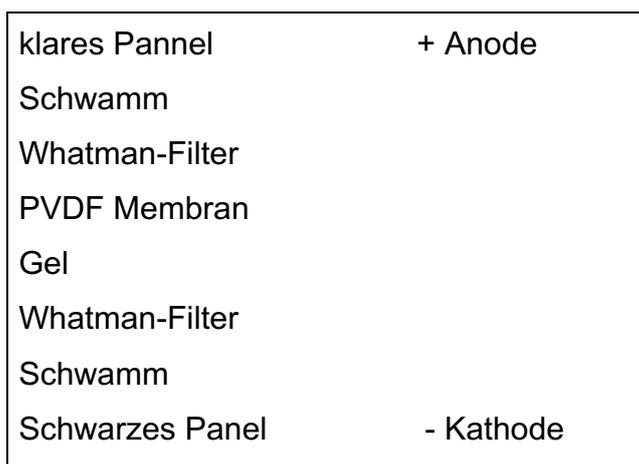
Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen wurde eine denaturierende SDS-PAGE (engl. sodium dodecyl sulfate polyarylamide gel electrophoresis) nach Laemmli durchgeführt. Darunter werden die Proteine durch SDS (engl. Sodiumdodecylsulfat) denaturiert, wodurch die Protein-Protein-Wechselwirkung aufgehoben wird. Außerdem trägt das DTT (Dithiothreitol) des Laemmli-Puffers ebenfalls zur Unterbindung der Protein-Protein-Wechselwirkung bei. Es entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. Bei einer Spannung von 100V wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode, wobei die kleinen Proteine schneller als die großen wandern.

Hier wurden Claudine untersucht, deren Molekulargewicht zwischen 21 und 34 kDa liegt. Für solche kleinen Proteine eignet sich ein 12,5% Acrylamid-Trenngel (siehe 3.1.5. Lösungen und Puffer). Dabei gilt, je größer die Acrylamidkonzentration des Gels, desto kleiner ist die Porengröße und desto langsamer laufen die Proteine. Die Vernetzung des Acrylamids wird durch den Polymerisationsinitiator APS (Ammoniumpersulfat) und Katalysator TEMED (Tetramethylethylendiamin) gewährleistet. Dabei werden im Sammelgel bei einem nahezu neutralen pH-Wert die Proteine in einer Ebene fokussiert, bevor sie im

Trenngel (siehe 3.1.5. Lösungen und Puffer) bei einem basischen pH-Wert nach Größe separiert werden. Nach einer halbstündigen Polymerisation des Trenngels wurde ein Sammelgel überschichtet und mit einem Kamm versehen, damit sich gleich Geltaschen ausbilden können. Nach der vollständigen Polymerisation wurden die fertigen Gele in die Gelelektrophorese-Kammer (Mini-PROTEAN Tetra cell) überführt und dazu der Elektrophorese-Puffer eingefüllt (siehe 3.1.5. Lösungen und Puffer). Die oben beschriebenen zusammengesetzten Proben wurden 5 Minuten bei 95°C denaturiert, um die Proteine in der primären Struktur zu erhalten und danach zentrifugiert. Nach dem Entfernen der Kämmen und gründlichem Ausspülen der Geltaschen mit Elektrophorese-Puffer wurde mit einer Hamilton Spritze ein Marker (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder) zum Vergleich des bekannten Molekulargewichts und jeweils 20 µl Probe pro Geltasche aufgetragen. Die Dauer der Gelelektrophorese betrug 1,5 bis 2 Stunden und wurde durch die Färbung der Proben mit Bromphenolblau überwacht. Anschließend wurde das Gel aus der Gelkammer ausgebaut und beim folgenden Western Blot weiterverarbeitet.

3.3.4. Western Blot

Nachdem die Proteine ihrer Größe nach in der SDS-PAEG sortiert wurden, wurden im Western Blot die Proteine mit Hilfe eines senkrechten elektrischen Feldes auf eine Poly Screen PVDF Membran übertragen. Der Transfer erfolgte im Nassblotverfahren. Vorab wurde die Poly Screen PVDF Membran in absolutem Alkohol über 5 Minuten aktiviert, um dann gemeinsam mit dem Gel, den Schwämmen und dem Whatman 3 mm Filter weitere 5 Minuten in Transfer-Puffer (siehe 3.1.5. Lösungen und Puffer) equilibriert zu werden. Anschließend wurde ein Gel-Membran-Sandwich hergestellt:



Das Sandwich wurde in die Elektrodenkammer (Mini-Transplot-Modul) eingesetzt und im kaltem Transfer-Puffer bei 100 V und konstantem Strom 0,2-0,4 A für 1 Stunde an ein Netzgerät (Power Pac 200/300) angeschlossen. Die Proteine binden nicht kovalent an die Blotmembran. Danach wurde die Membran entweder bei -20°C eingefroren oder weiterverarbeitet.

3.3.5. Immundetektion von Proteinen

Nun wurden die Proteine über die Bindung eines Primärantikörpers gegen das Protein und eines Sekundärantikörpers gegen den Primärantikörper nachgewiesen (siehe 3.1.4. Primär- und Sekundärantikörper). Um die gleiche Proteinbeladung der einzelnen Proben zu überprüfen, wurde beim Nachweis der verschiedenen Claudine eine β -Actin Kontrolle durchgeführt.

Die Membran wurde kurz in einer TBST-Waschlösung (siehe 3.1.5. Lösungen und Puffer) gespült, um die Bestandteile der vorherigen Behandlungen wie z.B. SDS zu entfernen. Danach erfolgte eine Blockierung mit Blockierungslösung PVP40 (3.1.5. Lösungen und Puffer) über eine Stunde, damit in den nächsten Schritten keine unspezifischen Bindungen der Antikörper entstehen. Der Primärantikörper wurde in TBST mit 5% BSA im Verhältnis 1:1000 verdünnt, 10 ml des Primärantikörpers wurde auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Membran 3 Mal je 10 Minuten gewaschen und mit dem Sekundärantikörper, der in der TBST-Waschlösung mit 1% Blocking Reagent (Milchpulver) in einem Verhältnis von 1:10000 verdünnt wurde, über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem erneuten 3-maligen Waschen wurde die Membran in der Lumilightlösung (1:1 Mischung von Lösung 1 und 2) über 5 Minuten in der Dunkelheit inkubiert. Dabei ist der Sekundärantikörper an eine Peroxidase gekoppelt, die mit Luminol der Lumilightlösung eine detektierbare Chemilumineszenz auslöst. Das Signal wurde im Fusion x 7 Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-Imaging detektiert. Die Intensität der Chemilumineszenz ermöglichte die quantitative Analyse der vorhandenen Menge des zu untersuchenden Proteins, die im Anschluss mit AIDA (Advanced Image Data Analyzer) densitometrisch ausgewertet wurde. Bei der quantitativen Analyse wurde die Expressionsstärke des Kontrollproteins β -Actin einbezogen.

3.3.6 Pulldown Assay

Das Pulldown-Verfahren bietet die Möglichkeit Protein-Protein Interaktionen darzustellen. Dabei basiert diese Methode auf einer Affinität des so genannten "Köderproteins" mit dem "Beuteprotein". In unserer Studie fungiert Glutathiontransferase-Clostridium perfringens Enterotoxin (GST-CPE) als Ködermolekül, das Claudin-3 sowie einige andere Claudine spezifisch am C-terminalen Ende binden kann.

In die Mini-Columns wurden die Filter eingesetzt und mit jeweils 81 µl Glutathion (GSH) Sepharose beads versehen. Die Haftung der beads wurde durch Zentrifugation bei 500 x g bei 4°C für 5 Minuten gefördert. Anschließend mussten die GSH Sepharose beads mit Ethanol bei erneuter Zentrifugation mit PBS ausgewaschen werden. Das in jeweils 200 µl Gesamtlysepuffer zugegebene GST-CPE (je 1,5 µg) gelangte in die Mini-Columns und rotierte für eine Stunde bei 4°C, um GSH Sepharose beads GST-CPE Komplexe zu bilden. Während dieser Zeit wurden die Proben im Gesamtlysepuffer lysiert (siehe Abschnitt 3.3.1.). Danach wurden die Mini-Columns 5 Minuten bei 500 x g und 4°C zentrifugiert und so die Fraktion 1 "flow-through 1" (**FT1**) gewonnen. Somit bildet diese Fraktion den ungebundenen Anteil an GST-CPE Fusionsprotein. Es folgten 3 Waschschrte mit Gesamtlysepuffer bei 500 x g, 4°C für je 2 Minuten, die beim nächsten Waschschrte identisch ausgeführt wurden.

Weitere 2 Stunden Inkubation erfolgten, nachdem den Mini-Columns die Probelysate (jeweils 270 µg Mundschleimhautlysate und 61 µg Colonlysate) zugesetzt wurden. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation der Mini-Columns, die die Gewinnung der Fraktion 2 (**FT2**) mit ungebundenen Proteinen förderte. Nach dem erneuten Waschen konnten die Proteine mit Hilfe von 1xLaemmli von dem Filter mit GSH Sepharose beads getrennt werden (Eluat/**E**), sodass am Ende die gewünschten Proteine im Western Blot detektiert und quantitativ ausgewertet werden konnten.

3.4. Immunfluoreszenzfärbung des fixierten Gewebes

3.4.1. Entparaffinierung und Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenzfärbung fungiert in dieser Arbeit als qualitative Methode zur Darstellung der TJ-Proteine Claudine in verschiedenen Zellkompartimenten. Die Mundschleimhautschnitte, sowohl von der Tumorregion als auch von der Kontrollregion, mussten zuerst entparaffiniert und dehydriert werden, um die Formalin-bedingte Proteinvernetzungen zu demaskieren und die Proteine wieder zugänglich zu machen. Dabei wurden die Schnitte nacheinander 2 Mal jeweils 20 Minuten in Xylol inkubiert und anschließend kurz in der absteigenden Ethanolreihe (absolut, 90%, 80%, 70%) und Aqua dest. hydratisiert. Anschließend erfolgte eine Mikrowellenbehandlung in einem Citrat-haltigen TEC Puffer (siehe 3.1.5. Lösungen und Puffer) 2 Mal je 10 Minuten bei 360 W. Danach wurde eine Abkühlung der Schnitte im restlichen TEC Puffer für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierdurch erfolgte eine weitere "Wiederherstellung" oder "Renaturierung" durch Fixierung einer veränderteren Proteinstruktur. Nachdem die Schnitte 2 Mal je 3 Minuten mit TBST gewaschen wurden, erfolgte eine 10-minütige Inkubation in 0,001% Trypsin, um die Zellen für die Antikörper zugänglich zu machen. Nachdem die Schnitte erneut mit Aqua dest. und 2 Mal je 3 Minuten mit TBST gespült wurden, blockierte man diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit DAKO (DAKO Cytomation protein block X0909), damit die unspezifische Antikörperbindung unterdrückt wird. Währenddessen wurden die Primärantikörper in PBS angesetzt (siehe 3.1.4. Primärantikörper), dabei wurden die einzelnen Schnitte mit dem jeweiligen Claudin-Antikörper und ZO-1-Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte 3 Mal je 3 Minuten in TBST gewaschen und für zwei Stunden mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (jeweils gegen Maus oder Kaninchen, siehe 3.1.4. Sekundärantikörper) und dem Zellkernfarbstoff DAPI (1:2000) im Dunkeln inkubiert, wobei es immer eine Negativkontrolle ohne die primären Antikörper gab. Danach erfolgte ein Abwaschen der ungebundenen Antikörper mit PBS und Aqua dest. jeweils 2 Mal je 5 Minuten. Die Schnitte wurden mit dem Mount Fluor eingedeckt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.4.2. Prinzip des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops

Die fertigen fluoreszenzmarkierten Mundschleimhautschnitte wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop 510 META und der ZEN Software analysiert. Die

Fluoreszenzfarbstoffe auf dem sekundären Antikörper wurden mit dem monochromen Laserstrahl der Wellenlänge 408 nm (DAPI), 488 nm (Goat-Anti-Mouse) und 594 nm (Goat-Anti-Rabbit) angeregt und die daraufhin emittierten Lichtsignale der Wellenlänge 420-480 nm blau, 505-550 nm grün und 582-647nm rot aufgenommen. Um die Claudine speziell in der TJ darzustellen, wurde das TJ-Protein ZO-1 ebenfalls angefärbt, damit man die Kolokalisation mit dem entsprechenden Claudin in der TJ darstellen kann. Die Kolokalisation ergibt ein gelbes Signal (grün+rot). Dabei ist das Besondere bei der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie, dass dabei nicht das ganze Objekt auf einmal beleuchtet und abgebildet wird, sondern ein fokussiertes Punkt-für-Punkt-abtasten oder abscannen und abbilden einzelner Punkte des Objekts erfolgt. Dabei wird die reflektierte oder emittierte Intensität des Lichts von jedem abgetasteten Punkt gemessen. Zudem gibt es eine zweite Linse, die das reflektierte Licht bündelt, bevor es auf den Detektor trifft. In der Brennebene solcher Linsen befindet sich die Airy-Blende, die nur Licht durchlässt, was davor im Fokus des Objektivs stand. Mit Hilfe dieser kleinen Blendenöffnung, dem sogenannten Pinhole, wird gewährleistet, dass nicht genau in der Objektfokusebene liegende Strukturen, die zu einem unscharfen Bild führen würden, ausgeblendet werden und nur die Lichtintensität der vorher fokussierten Punkte gemessen wird. Diese Lichtintensität wird durch Photomultiplier verstärkt und gemessen und es kann im Nachhinein durch die vorherigen Einstellungen diesen Intensitäten Farbe zugeordnet werden. So entsteht ein scharfes Fluoreszenzbild.

3.5. Coomassie-Blau-Färbung

Als Vorbereitung für die Massenspektroskopie von Claudin-3 im Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie wurde zuerst eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt. Ein Blot enthält die Proben (Kontrollen von Patient 15 und 16 jeweils 40 µg, Positivkontrolle Kolonadenokarzinomzelllinie HT29/B6 jeweils 5 µg) in doppelter Ausführung. Danach wird das Gel in identische Hälften getrennt, sodass eine Gelhälfte für die Coomassie-Blau-Färbung eingesetzt wurde und mit der anderen Gelhälfte ein Western Blot (siehe Abschnitte 3.3.3. bis 3.3.4.) mit anschließender Immundetektion von Claudin-3 (siehe Abschnitt 3.3.5.) durchgeführt wurde, um die Höhe der aus dem Gel auszuschneidenden Banden zu detektieren.

Bei der Coomassie-Blau-Färbung wurde das Gel in 20 ml Färbelösung (siehe Tabelle 6.) 15 Minuten langsam bei Raumtemperatur auf dem Wiegeschüttler inkubiert. Danach

wurde die Färbelösung entfernt und das Gel zwei Mal mit Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Gels in der Entfärbelösung (siehe Tabelle 6.) auf dem Wiegeschüttler bei Raumtemperatur über Nacht.

Tabelle 6: Coomassie-Blau-Färbe- und Entfärbelösungen.

Färbelösung (1l)	Entfärbelösung (1l)
1 g Coomassie Blau R-L50 450 ml Methanol 450 ml H ₂ O 100 ml Eisessig	100 ml Methanol 100 ml Eisessig 800 ml H ₂ O

Die entsprechenden Banden (Kontrollen von Patient 15 und 16 bei ~ 55 kDa; Positivkontrolle Kolonadenokarzinomzelllinie HT29/B6 bei ~23 kDa wie im Kontroll Western Blot) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und im Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie mittels Massenspektroskopie analysiert.

3.6. Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 25.0 analysiert. Der Unterschied zwischen der Claudin-Expression im Tumor und in der Kontrolle wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests auf Signifikanz geprüft und mit der Bonferroni-Methode korrigiert. Der Einfluss der Lokalisation innerhalb der Mundhöhle auf die Claudin-Expression wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test überprüft. Die Korrelationen der Claudin-1, -2, -4, -5, -7- Expression mit den klinikopathologischen Eigenschaften des Tumors wurden entweder mit dem Spearman-Rho-Test oder mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Die rezidivfreie Überlebenszeit bezogen auf die Claudin-Expression wurde mittels der Kaplan-Meier-Methode abgeschätzt und mit Hilfe vom Log-Rank-Test auf Signifikanz überprüft. Die rezidivfreie Überlebenszeit definiert sich durch das Intervall zwischen der Resektion des Primarius und der letzten Nachkontrolle, in der der Patient in Remission war (zensiert) bzw. dem Datum des erstmaligen Auftretens des Rezidivs (unzensiert). Außerdem wurde im Anschluss eine Cox-Multiregressionsanalyse durchgeführt, um den gleichzeitigen Einfluss von mehreren Variablen auf das rezidivfreie Überleben zu überprüfen. Ein p-Wert von unter 0,05 (2-seitig) bei den Tests wurde als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Patientencharakteristika

Insgesamt nahmen 60 Patienten mit primärem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle an dieser Studie teil. Jedem Patienten wurde eine Nummer von 1 bis 60 zugeordnet. Dabei wurden Tumore aus unterschiedlichen Mundhöhlenarealen untersucht (siehe Abbildung 9 Abschnitt 4.4.). Die Patientengruppe beinhaltet sowohl Männer als auch Frauen und jedes Tumorstadium nach UICC 2009 war mindestens einmal vertreten (Stadium: 0 (n=1), I (n=8), II (n=12), III (n=11), IVa/b/c (n=26), keine Zuordnung (n=2)). In der Erfassung der Patientendaten wurde soweit bekannt der Nikotin- und Alkoholkonsum mitberücksichtigt. Das Tumorstadium wurde den Berichten der Pathologie sowie den bildgebenden Staging-Untersuchungen entnommen. Die meisten Tumore (n=38) sind mäßig differenziert (G2-Stadium) und es wurden in wenigen Fällen Lymph- (n=6) oder Gefäßinfiltration (n=2) angegeben. Nur in vier Fällen wurde eine Aussage über eine Perineuralinvasion gemacht, bei allen anderen Patienten gab es keine Angaben dazu. Ein Patient wies in der primären Diagnostik histopathologisch eine Metastasierung auf. In drei anderen Fällen wurde eine unklare Raumforderung der Lunge in der Bildgebung auf Wunsch der Patienten nicht weiter abgeklärt. Bei einem Patienten wurden die potenziellen Metastasen aufgrund des palliativen Settings nicht ausgeschlossen. Bei einem weiteren Patienten war der Metastasierungsstatus ebenfalls unklar. Nach der Tumoresektion wurde dieser Patient nicht verlaufsbeobachtet. Die mittlere Beobachtungszeit, die dem Patientendatenerfassungssystem des Krankenhauses entnommen werden konnte, betrug 21,0 Monate mit einem Minimum von 0,1 Monaten und einem Maximum von 59,8 Monaten. Die genaue Zusammensetzung der Patientencharakteristika kann der Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Patientencharakteristika.

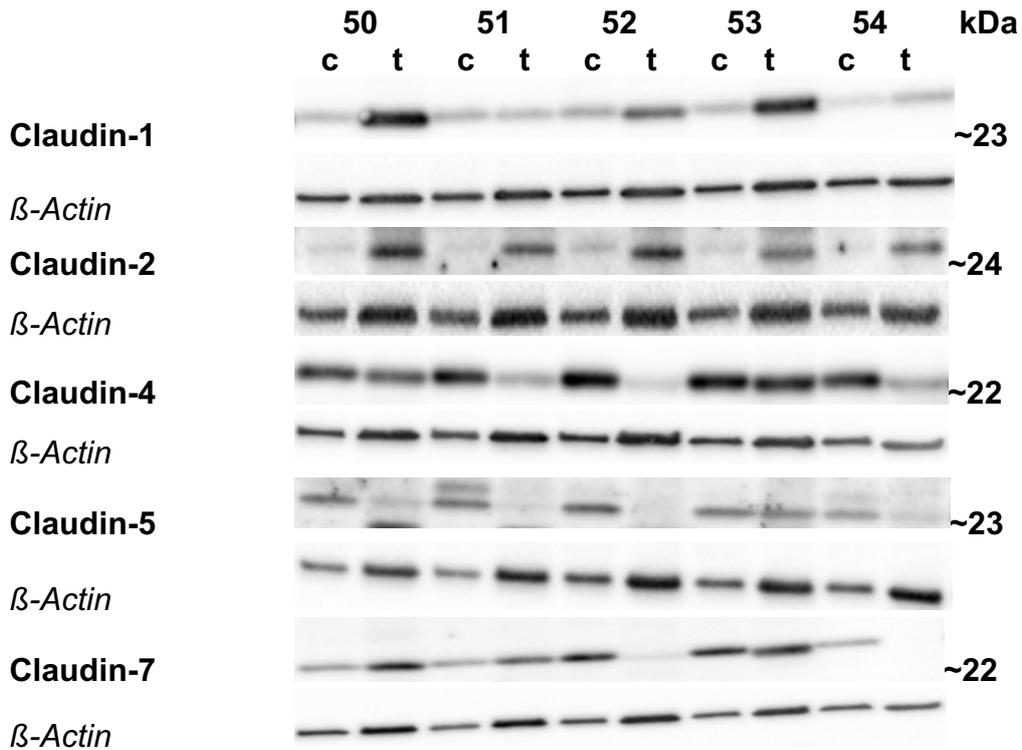
Manifestationsalter	35-90 (Ø 65,7)
Geschlecht	
männlich	38 (63,3%)
weiblich	22 (36,7%)
Nikotinkonsum	
ja	34 (56,7%)
nein	7 (11,7%)
keine Angaben	19 (31,7%)
Alkoholkonsum	
ja	26 (43,3%)
nein	2 (3,3%)
keine Angaben	32 (53,3%)
T-Stadium	
Tis	1 (1,7%)
T1	16 (26,7%)
T2	21 (35%)
T3	6 (10%)
T4	15 (25%)
Tx	1 (1,7%)
Lymphknotenmetastasen	
N0	27 (45%)
N1	10 (16,7%)
N2 (a-c)	17 (28,3%)
Nx	6 (10%)
Tumorgrading	
G1	4 (7%)
G2	38 (63%)
G3	10 (17%)
Gx	8 (13%)
Lymphgefäßinvasion	
Ja	6 (10%)
Nein	41 (68,3%)
Lx	13 (21,7%)
Gefäßinfiltration	
Ja	2 (3,3%)
Nein	45 (75%)
Vx	13 (21,7%)
Rezidiv	
Ja	14 (23,3%)
Nein	35 (58,3%)
Lost of follow-up	7 (11,7%)
Verstorben	1 (1,7%)
Progredienz bei Palliativsetting	3 (5%)

Tx, Nx, Mx, Gx, Lx und Vx keine Angaben; "Lost of follow-up": seit der definitiven Therapie keine Verlaufskontrollen im ambulanten oder stationären Bereich der Charité

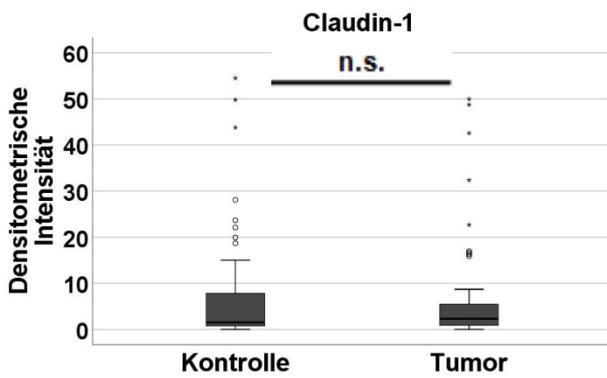
4.2. Expression der Claudine

Der primäre Endpunkt der vorliegenden Arbeit zielt auf den Vergleich der Claudin-Expression im Tumor versus gesundem Mundschleimhautepithel des gleichen Individuums ab. Hierfür wurden aus dem entnommenen Gewebe (Tumor- und Kontrollgewebe) Proteinlysate hergestellt und der Western Blot Analyse als Methode zur Proteinbestimmung und -quantifizierung gewählt. Dabei ist zu beachten, dass pro Western Blot Proben von Tumor und gesundem Kontrollgewebe für maximal sieben Patienten aufgetragen und verglichen werden konnten. Dadurch wurden bei allen Analysen jedes Mal gleiche Bedingungen für einen intraindividuellen Vergleich geschaffen. Damit können wir mit Hilfe des Wilcoxon-Tests nachweisen, dass die Expression von Claudin-4, Claudin-5 und Claudin-7 im oralen Plattenepithelkarzinom vermindert ist ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu ist Claudin-2 verstärkt exprimiert ($p < 0,001$). Die Expressionshöhe von Claudin-1 weist keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Tumor und der Kontrolle auf ($p = 0,596$). Die Unterschiede sind in Abbildung 4 veranschaulicht. Außerdem ist die komplette Western Blot Analyse für 60 Kontrollen und jeweiligen Tumoren im Anhang dargestellt.

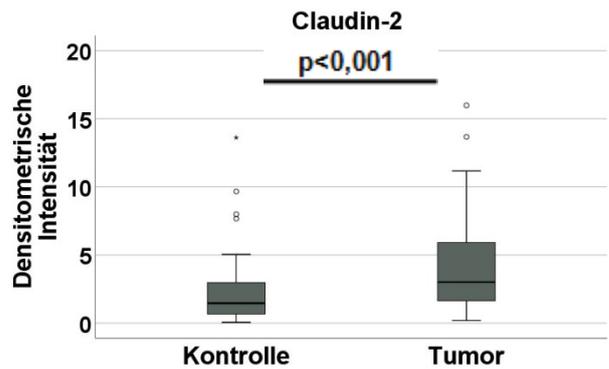
a



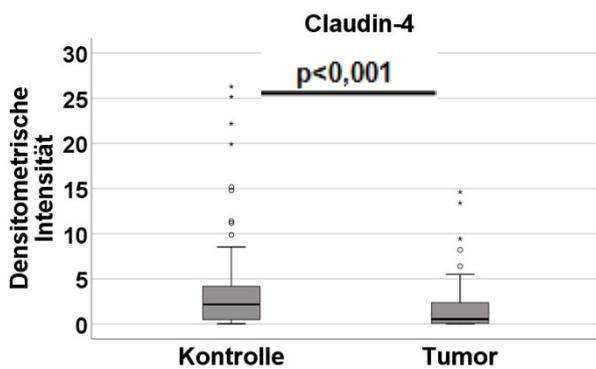
b



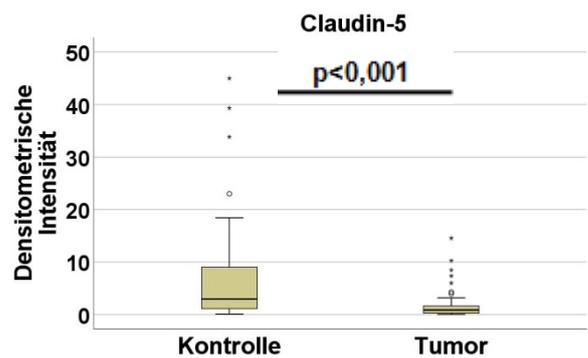
c



d



e



f

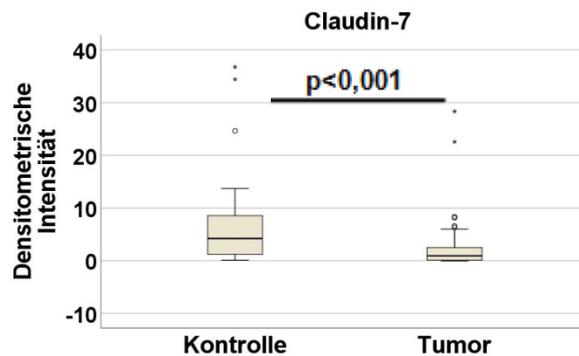


Abbildung 4: Analyse der Claudin-Expression anhand von Western Blots.

a Western Blot Analyse der Claudine hier beispielhaft gezeigt in den Kontrollen (**c**) 50-54 und den jeweiligen Tumoren (**t**) anhand der unterhalb liegender Ladungskontrolle β -Actin (42 kDa) normiert. Anhand der Stärke der Banden wird der intraindividuelle Vergleich zwischen dem Tumor und der Kontrolle durchgeführt.

b-f In Boxplots sind paarweise densitometrische Analysen der Expression von Claudin-1, Claudin-2, Claudin-4, Claudin-5 und Claudin-7 in dem gesunden Kontrollgewebe der 60 Patienten (n=60) gegenüber dem Tumorgewebe (n=60) mit der Ladungskontrolle β -Actin normiert und dargestellt. Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle $p < 0,001^{***}$, n.s. nicht signifikant. \circ milde Ausreißer; * extreme Ausreißer.

4.3. Lokalisation der Claudine in der Mundschleimhaut im gesunden und Tumorgewebe

Um die Verteilung der Claudine innerhalb der Epithelschichten zu begutachten wurden an einzelnen ausgewählten Paraffinschnitten Immunfluoreszenzfärbungen (IF) durchgeführt. Hier wurde nach dem gleichen Prinzip jeweils der Tumor und die dazugehörige Kontrolle (Wangenepithel) qualitativ evaluiert. Für die Claudine-1, -2, -4, -5 und -7 wurden jeweils zwei Tumorfärbungen und zwei zugehörige Kontrollfärbungen ausgewertet. Vor der IF wurden die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Paraffinschnitte des Kontroll- und Tumorgewebes lichtmikroskopisch angeschaut. Als Beispiel zeigt die Abbildung 5 ein lichtmikroskopisches Bild eines unveränderten Zungenepithels und eines Plattenepithelkarzinoms der Zunge.

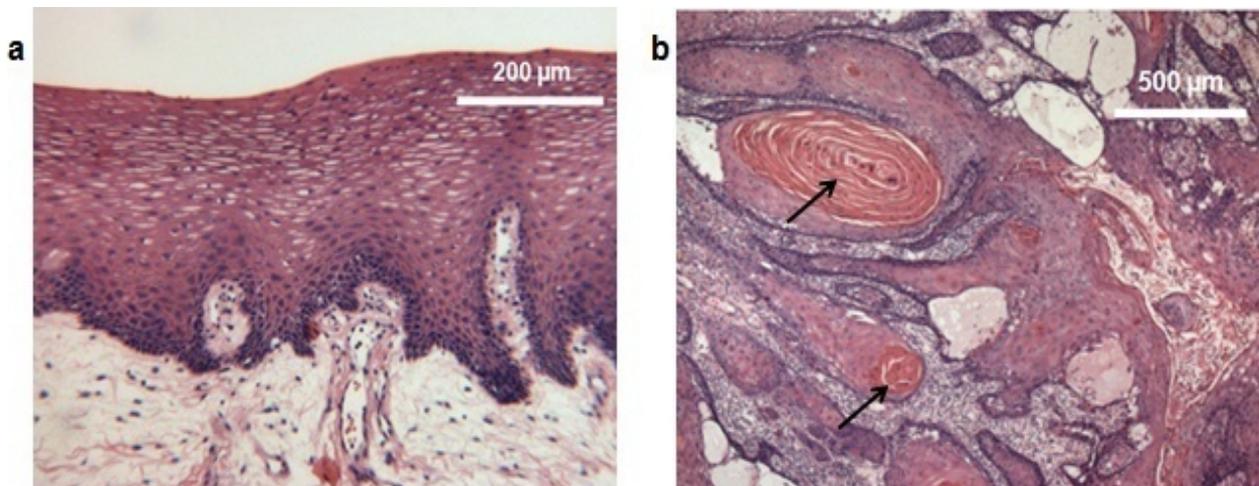


Abbildung 5: Paraffinschnitt der Zunge von Patient 31, Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

a Ein normales unverhorntes mehrschichtiges Plattenepithel der Zungenunterseite

b Ein gut differenziertes, verhornendes Plattenepithelkarzinom der Zunge mit Hornperlen (Pfeile).

Die IF wurde mit Antikörpern gegen einzelne Claudine und das Adapterprotein ZO-1 als TJ-Marker durchgeführt.

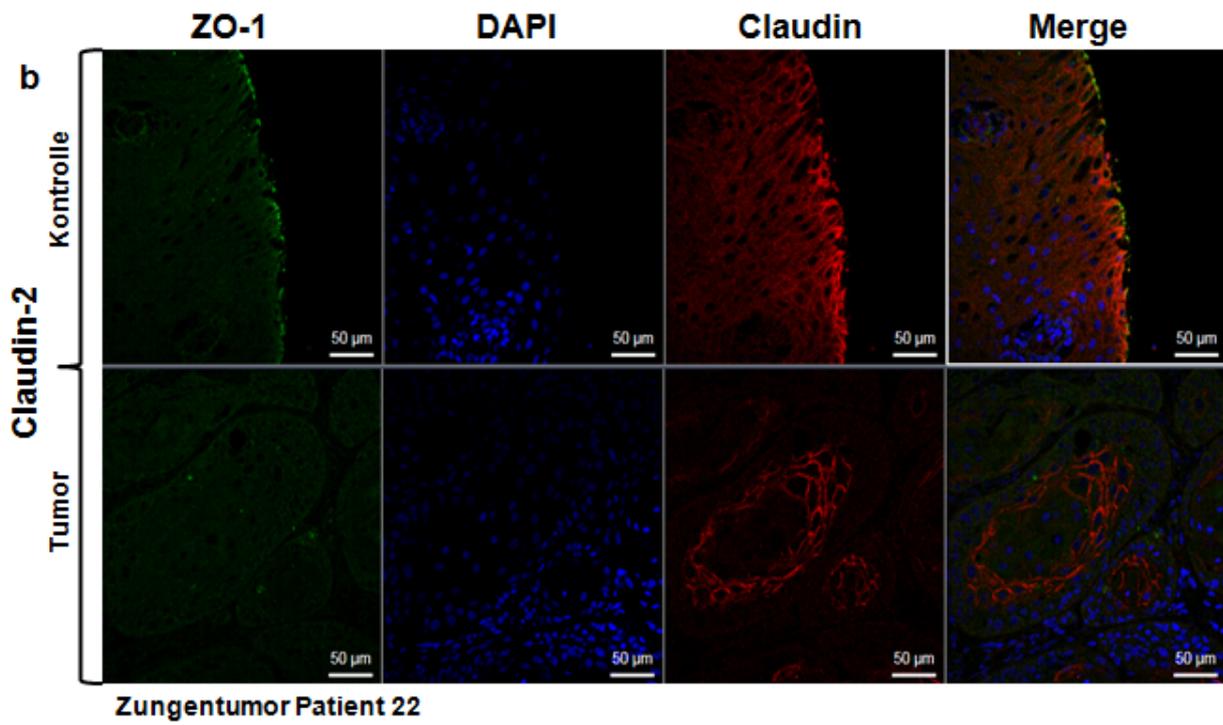
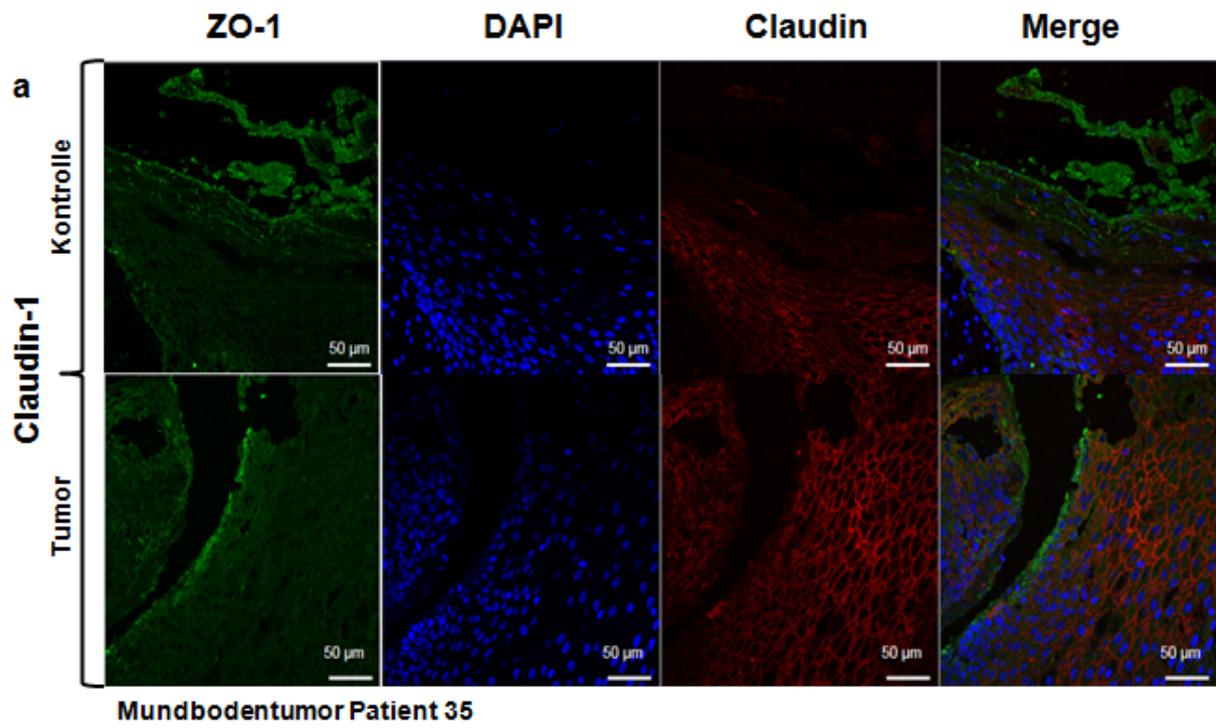
Das TJ-Protein Claudin-1 wurde über alle Epithelschichten in der Zellmembran des unveränderten Wangenepithels gesehen. Die Kolo-kalisation mit dem Adapterprotein ZO-1

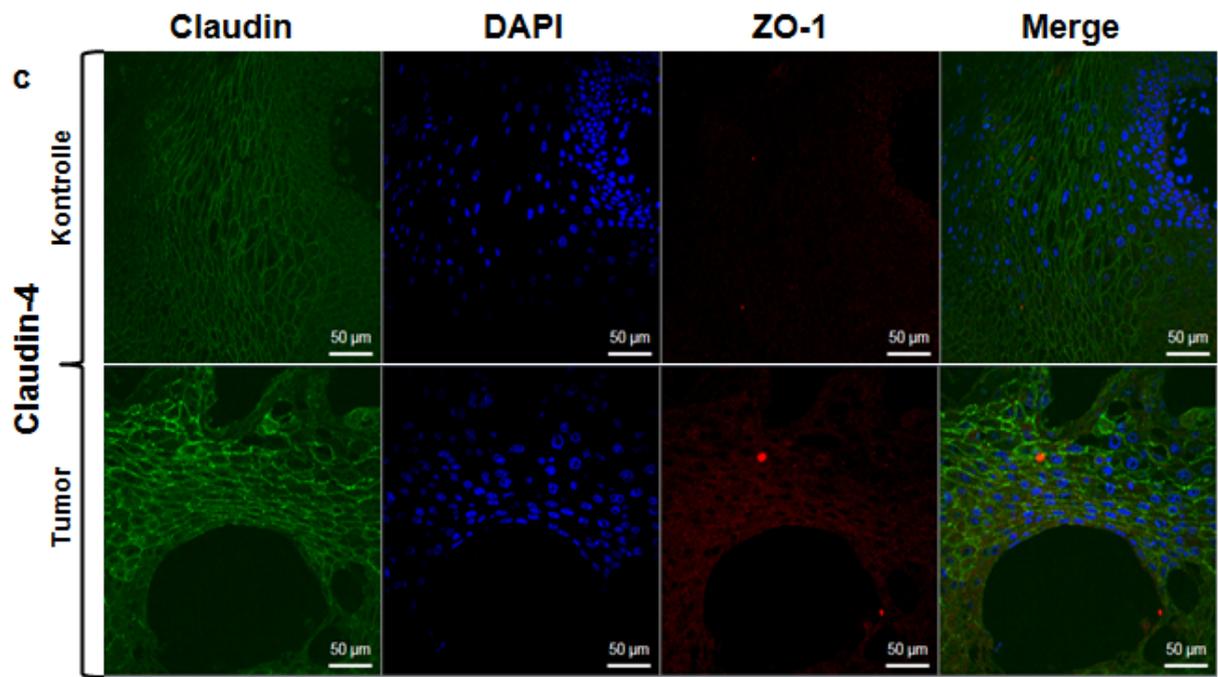
ist vorwiegend in der apikalen Region anzutreffen. Die untersuchten Tumorareale hatten Claudin-1 in der Zellmembran und zusätzlich eine Anreicherung von Claudin-1 im Zytoplasma. Im Tumor konnte keine Kollokalisierung von Claudin-1 und ZO-1 festgestellt werden. Das ZO-1 scheint hier im Zytoplasma zu sein. Die Abbildung 6a veranschaulicht die Claudin-Expression in dem Kontrollepithel versus Mundbodenkarzinom und ist konkordant mit dem Ergebnis des Western Blots.

Das normale Wangenepithel zeigt Claudin-2 in der Zellmembran der Verhornungen und in der Zellmembran der apikalen Bereiche (obere 1/3-2/3) der Epithelschichten, wo auch stellenweise Kollokalisierung mit ZO-1 vorhanden ist. Der Tumor zeigt ein stärkeres Claudin-2 Signal in der Zellmembran der Verhornungen, ein ZO-1 Signal wurde nicht detektiert (siehe Abbildung 6b).

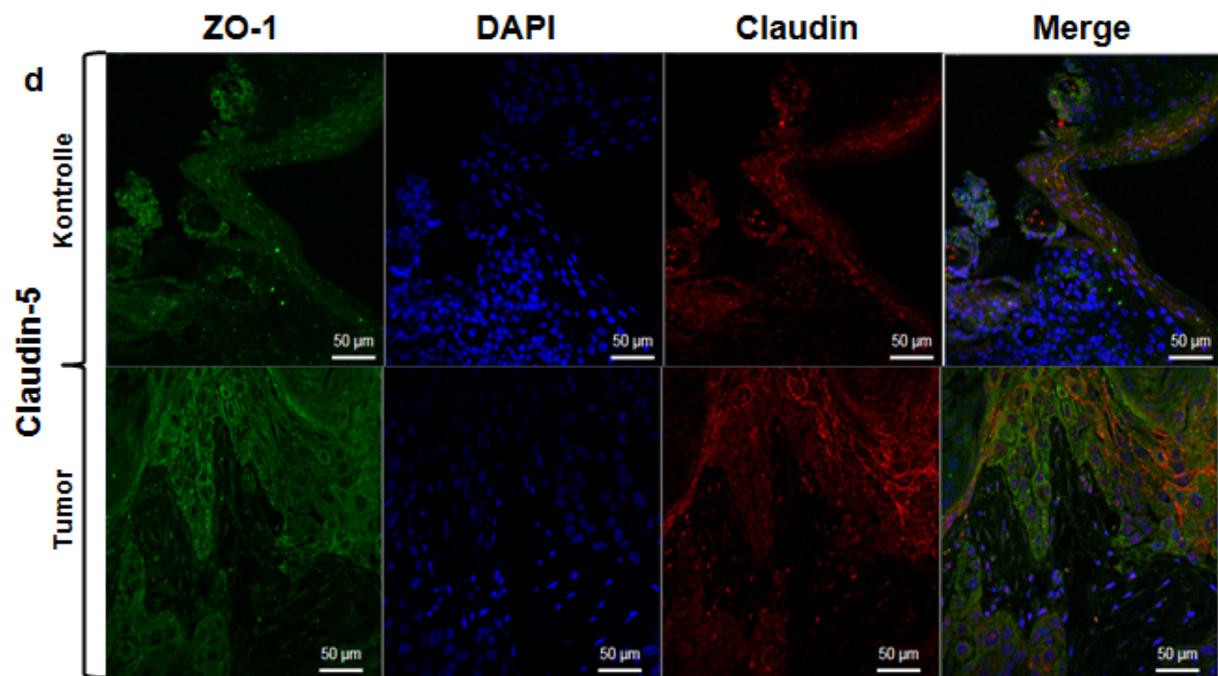
Das Wangenepithel besitzt in der Zellmembran von Stratum basale bis zum Stratum superficiale Claudin-4. Die Immunfluoreszenzfärbung ähnelt der Claudin-1 Färbung des gesunden Epithels. Das ZO-1 Protein ist mit Claudin-4 in der Zellmembran des Stratum intermedium bis Stratum superficiale an einigen Stellen kollokalisiert. Im Tumorepithel kann man die Claudin-4 Färbung in der Zellmembran, im Zytoplasma und vereinzelt im Zellkern beobachten. Das ZO-1 Signal ist im Zytoplasma detektierbar. Die Beispielfärbung in der Abbildung 6c präsentiert eine verstärkte Expression des Claudin-4 in einem gut differenzierten Zungentumor, die mit dem zugehörigen Western Blot-Ergebnis übereinstimmt.

Die Immunfluoreszenzfärbung für Claudin-5 und Claudin-7 zeigt im Kontrollgewebe ein ähnliches Signalmuster. Beide Proteine sind zum Teil gemeinsam mit ZO-1 in der Zellmembran von Stratum intermedium bis Stratum superficiale zu finden. Zusätzlich kann Claudin-5 im Zellkern über alle Epithelschichten und im Zytoplasma der Basalzellen gefunden werden. Claudin-7 hingegen ist möglicherweise auch vereinzelt in der Zellmembran der Basalzell- und Parabasalschicht vorhanden. Im Mundschleimhauttumor ist Claudin-5 in der Zellmembran, dem Zellkern und vereinzelt im Zytoplasma lokalisiert. Hier ist keine Kollokalisierung von Claudin-5 und ZO-1 zu erkennen (siehe Abbildung 6d). Claudin-7 ist in der Zellmembran der Tumorzellen exprimiert und in den Hornperlen des Tumorepithels mit ZO-1 in der Zellmembran kollokalisiert. Die Anwesenheit von Claudin-7 im Zytoplasma der Tumorzellen ist vereinzelt vorhanden (siehe Abbildung 6e).





Zungentumor Patient 31



Mundbodentumor Patient 35

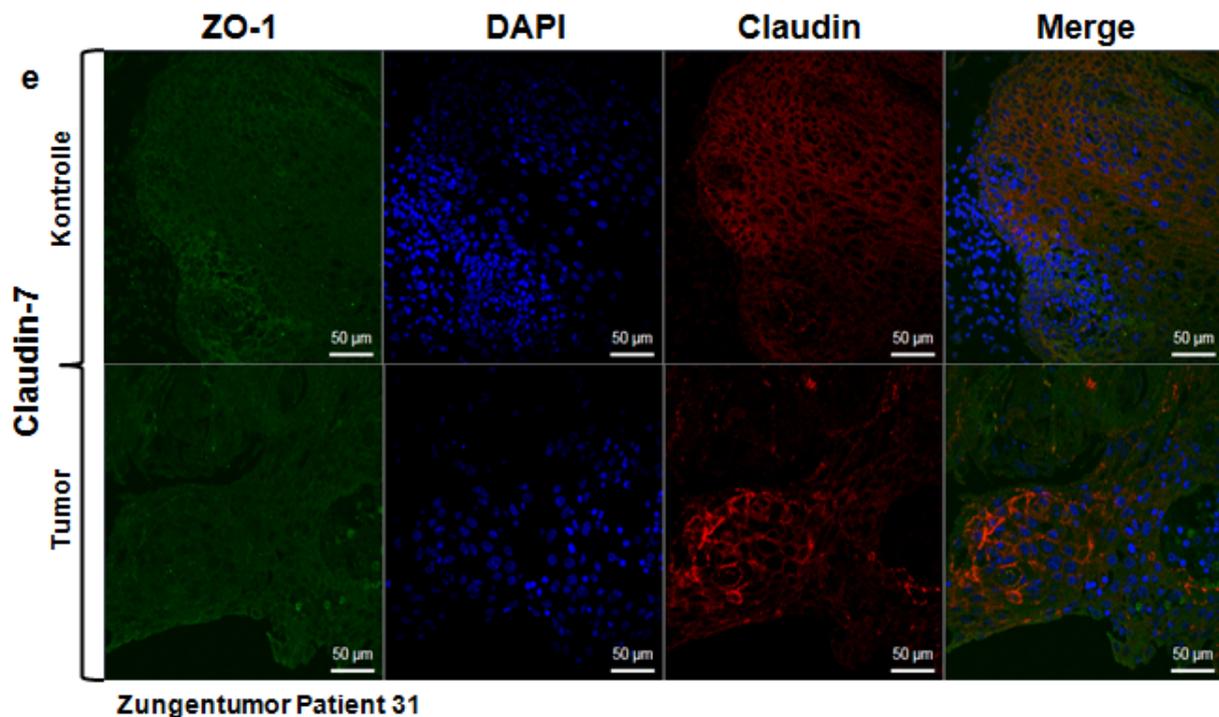


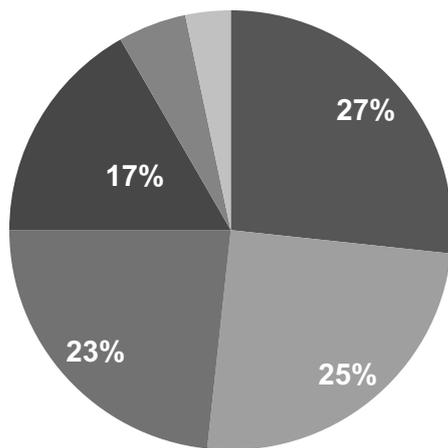
Abbildung 6: Lokalisation der TJ Proteine Claudin-1, -2, -4, -5 und -7 in der Mundschleimhaut.

Jeweils einschichtige Immunfluoreszenzaufnahme von einem Tumor und der entsprechenden Kontrolle. Darstellung in a, b, d, e von Claudin-1, -2, -5, -7 (rot) und ZO-1 (grün) und in c Claudin-4 (grün) und ZO-1 (rot), der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt (blau), Merge-Bild als zusammenfassende Darstellung zur Kolo-kalisation von Claudin und ZO-1 (gelb).

4.4. Claudin-Expression in den untersuchten Mundhöhlenarealen

Die meisten der hier untersuchten Tumore waren in der Zunge lokalisiert (n=16), gefolgt von annähernd gleicher Anzahl an Mundboden- (n=15) und Alveolarkammtumoren (n=14). Nur wenige Tumore stammten aus der Wangenschleimhaut (n=3) und dem Gaumen (n=2). Die bösartigen Neoplasien, die nicht nur an einer Stelle des oralen Epithels vorhanden waren, wurden als multifokal (n=10) bezeichnet. Abbildung 7 bildet die Verteilung berücksichtigter oraler Plattenepithelkarzinome ab.

Tumorlokalisation



- Zunge 27%
- Mundboden 25%
- Alveolarkamm Ober- oder Unterkiefer 23%
- Multifokal 17%
- Wangenschleimhaut 5%
- Gaumen 3%

Abbildung 7: Tumorlokalisation.

Der prozentuale Anteil der in dieser Studie untersuchten Plattenepithelkarzinome innerhalb der Mundhöhle.

Insgesamt lässt sich kein signifikanter Unterschied im Kruskal-Wallis-Test (siehe Tabelle 8) bezüglich der Claudin-Expression beim oralen PECA in unterschiedlichen Bereichen der Mundhöhle feststellen. Deshalb wurden die Ergebnisse der Claudin-Expression in allen 60 unterschiedlichen Proben unabhängig von der Lokalisation innerhalb der Mundhöhle betrachtet. Die Differenz der Expression von Claudin-1, -2, -4, -5 und -7 zwischen Kontroll- und Tumorgewebe ist in Abbildung 8 veranschaulicht.

Tabelle 8: Kruskal-Wallis-Test.

Gruppenvariable: Tumorlokalisation, Testvariable: Differenz der Claudin-Expression im Tumor und der Kontrolle.

	Claudin-1	Claudin-2	Claudin-4	Claudin-5	Claudin-7
Kruskal- Wallis H	5,231	7,662	3,409	6,917	3,244
Asymptotische Signifikanz	0,388	0,176	0,637	0,227	0,662

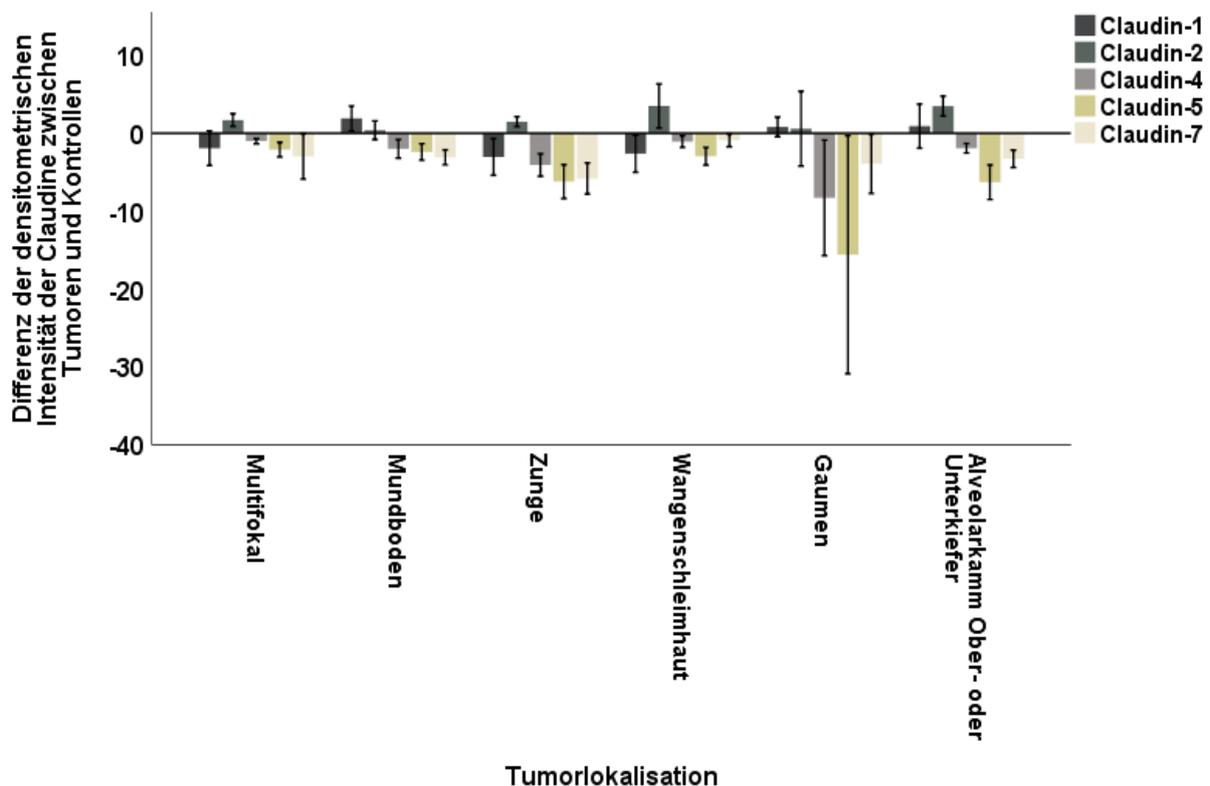


Abbildung 8: Claudin-Expressionshöhe unterschiedlicher Mundhöhlenareale.

Claudin-Expression im Western Blot unterteilt nach verschiedenen Tumorlokalisationen innerhalb der Mundhöhle. Dabei ist die Claudin-Expression des Tumors entweder höher (positiver Bereich) oder niedriger (negativer Bereich) in Bezug auf die Kontrolle (=0). Die Mittelwerte der Differenz der densitometrischen Intensität zwischen Tumoren und Kontrollen mit β -Actin Normierung sind mit Standardfehler angegeben.

4.5. Zusammenhang zwischen der Claudin-Expression und den klinikopathologischen Faktoren

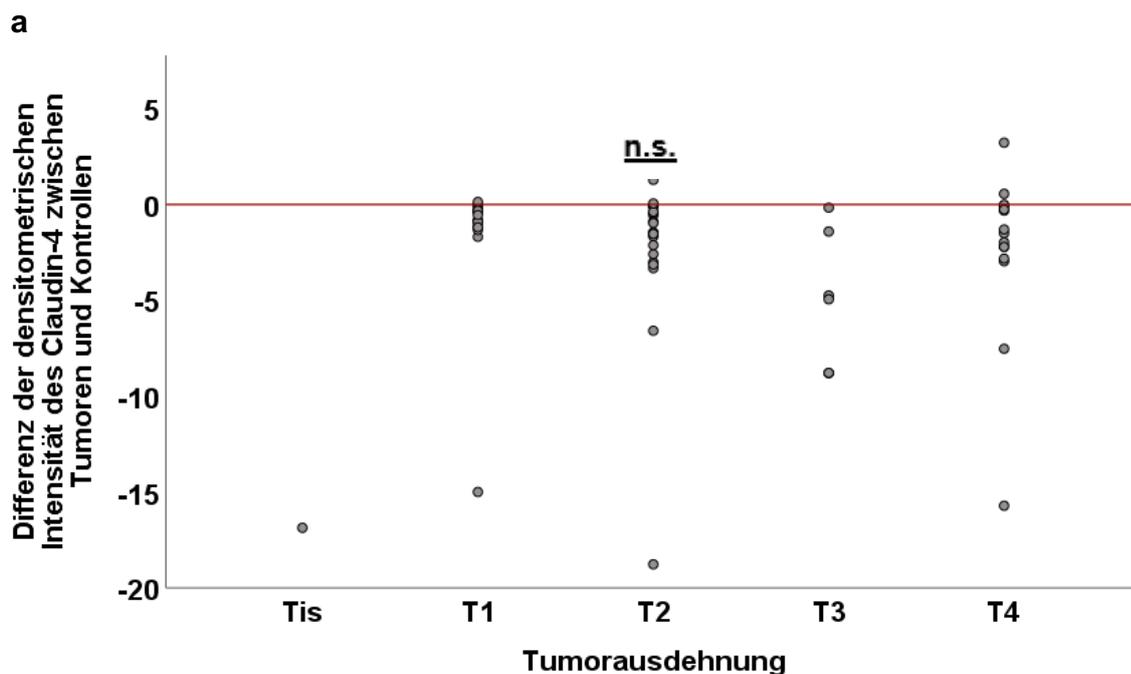
Als sekundäres Ziel der vorliegenden Studie wurde eine Assoziation zwischen der Differenz der Claudin-Expressionshöhe zwischen normaler Mundschleimhaut und der Mundschleimhautkarzinome im Zusammenhang mit den klinikopathologischen Faktoren evaluiert. Die Abweichungen der Claudin-Expression zwischen Tumor- und Kontrollgewebe wurden mit dem Tumorstadium und weiteren bekannten Faktoren wie Geschlecht oder mit den nachweislich Neoplasie-beeinflussenden Faktoren wie Nikotinkonsum verglichen. Die Korrelation zwischen Claudin-Expression und klinikopathologischen Parametern ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Dependenzanalyse: Claudin-Expressionsunterschied des Tumors und die klinikopathologischen Faktoren. Die Daten ohne Angaben von Nikotin- und Alkoholkonsum, UICC-Stadium, Tx, Nx, Gx, Lx wurden nicht miterfasst, p-Wert Berechnung mit dem Sperm-Rho- oder Mann-Whitney-U-Test mit signifikantem Ergebnis bei **p<0,01; r=Rangkorrelationskoeffizient; R=mittlerer Rang.

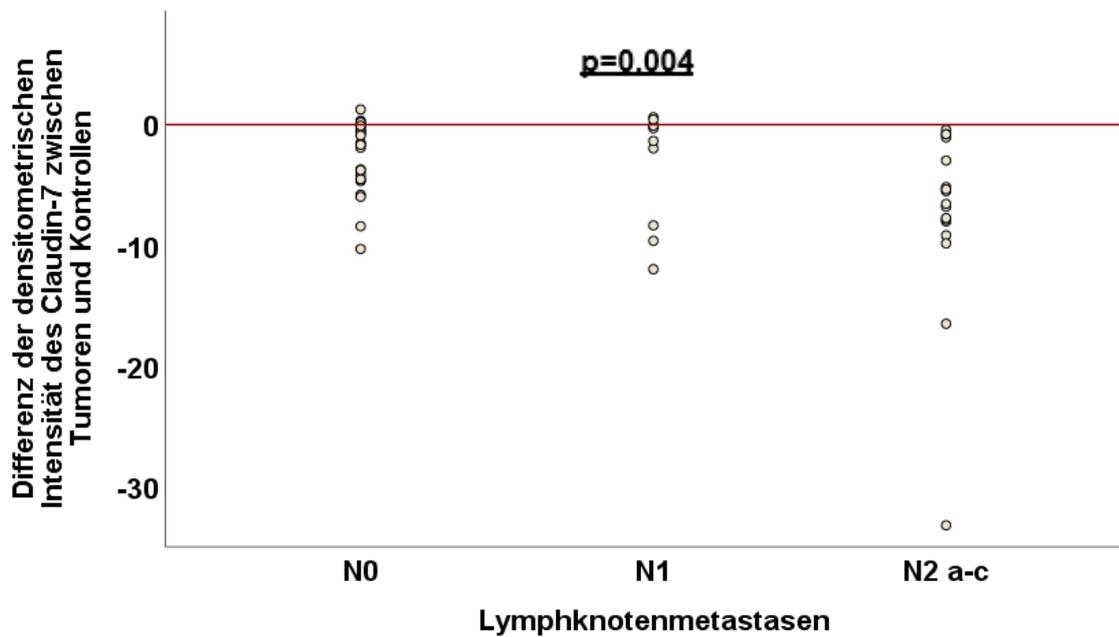
Klinikopathologische Faktoren	N	Claudin-1	Claudin-2	Claudin-4	Claudin-5	Claudin-7
Alter p-Wert	60	r(-0,092) 0,484	r(0,072) 0,583	r(0,159) 0,225	r(-0,061) 0,641	r(-0,028) 0,831
Geschlecht <i>männlich</i> <i>weiblich</i> p-Wert	38 22	R(33,08) R(26,05) 0,133	R(29,12) R(32,86) 0,425	R(28,61) R(33,77) 0,269	R(31,45) R(28,86) 0,581	R(28,63) R(33,73) 0,276
Nikotinkonsum <i>Ja</i> <i>Nein</i> p-Wert	34 7	R(22,15) R(15,43) 0,177	R(21,56) R(18,29) 0,510	R(21,15) R(20,29) 0,862	R(20,74) R(22,29) 0,755	R(21,38) R(19,14) 0,652
Alkoholkonsum <i>Ja</i> <i>Nein</i> p-Wert	26 2	R(14,85) R(10) 0,422	R(14,15) R(19) 0,422	R(13,88) R(22,50) 0,153	R(14,31) R(17) 0,656	R(14,04) R(20,50) 0,284
UICC-Stadium p-Wert	52	r(0,160) 0,428	r(0,090) 0,965	r(0,005) 0,560	r(0,085) 0,208	r(-0,367) 0,008**
Tumorausdehnung p-Wert	59	r(-0,089) 0,503	r(0,042) 0,752	r(-0,227) 0,083	r(-0,209) 0,112	r(-0,213) 0,106
Lymphknotenmetastasen p-Wert	54	r(0,150) 0,279	r(-0,018) 0,898	r(-0,014) 0,920	r(0,010) 0,940	r(-0,387) 0,004**
Grading p-Wert	52	r(0,040) 0,780	r(-0,073) 0,609	r(0,006) 0,965	r(0,047) 0,740	r(-0,046) 0,747
Lymphgefäßinvasion <i>Ja</i> <i>Nein</i> p-Wert	6 41	R(34,17) R(22,51) 0,052	R(21,50) R(24,37) 0,633	R(29,17) R(23,24) 0,323	R(30,67) R(23,02) 0,202	R(25) R(23,85) 0,848

Diese Studie konnte keinen Zusammenhang zwischen der Claudin-1-, Claudin-2-, Claudin-4- und Claudin-5-Expression des oralen PECA und den untersuchten klinikopathologischen Parametern nachweisen. Lediglich tendieren die Mundschleimhautepithelkarzinome mit Lymphgefäßinfiltration dazu eine höhere Claudin-1-Expression zu haben (p -Wert=0,052), allerdings ist die Anzahl der Patienten in dieser Gruppe gering, sodass weitere Untersuchungen zur Abklärung des Zusammenhangs erfolgen müssen. Außerdem besteht rein deskriptiv ein Zusammenhang zwischen der Claudin-4-Expression und der Tumorausdehnung (siehe Abbildung 9a). Je größer der Tumor ist, desto weniger Claudin-4 lässt sich nachweisen (p -Wert=0,083).

Wir stellten fest, dass eine verringerte Expression von Claudin-7 im oralen PECA signifikant mit einer Lymphknotenmetastasierung korreliert ($p=0,004$). Diese Erkenntnis setzt sich bei der UICC-Stadieneinteilung fort, sodass Claudin-7 in den fortgeschrittenen Stadien signifikant weniger gebildet wird ($p=0,008$). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 9b und 9c zur Verdeutlichung dargestellt.



b



c

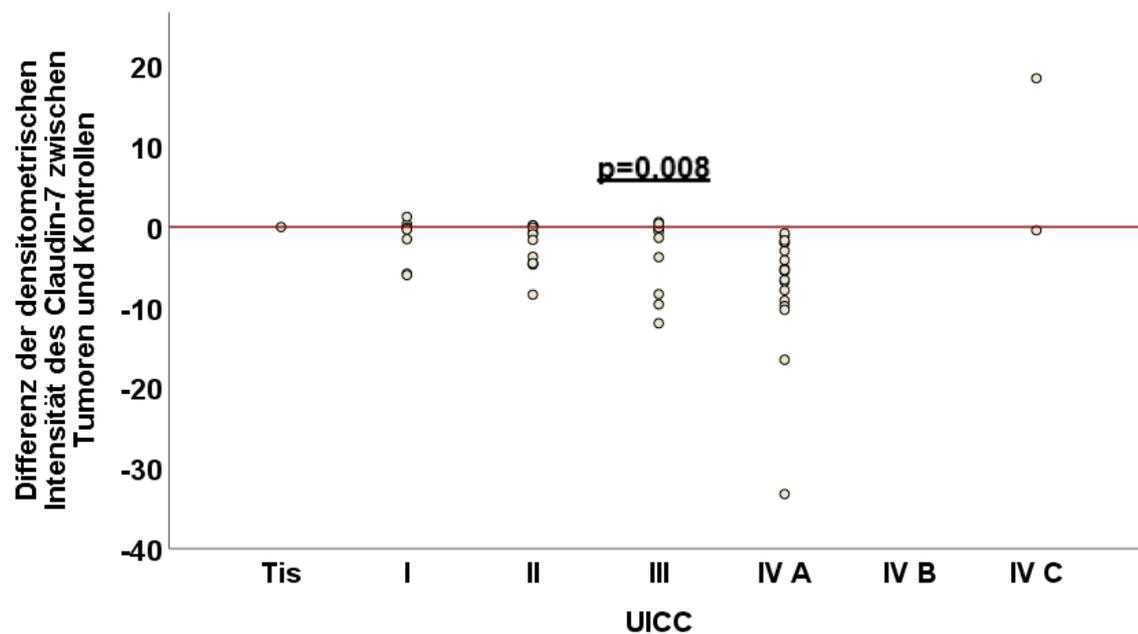


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen der Veränderung der Claudin-4- und Claudin-7-Expression im Tumor und den klinikopathologischen Faktoren.

a Assoziation zwischen Claudin-4 und Tumorausdehnung

b Assoziation zwischen Claudin-7 und Lymphknotenmetastasen

c Assoziation zwischen Claudin-7-Expression und UICC-Stadium

Dabei bildet die rote Linie, die die y-Achse bei 0 schneidet, die Kontrolle. Alle Werte sind β -Actin normiert.

4.6 Zusammenhang der Claudin-Expression mit dem rezidivfreien Überleben

Insgesamt wurden 49 Patienten kurativ behandelt und nachbeobachtet (siehe Tabelle 7, Abschnitt 4.1.). 28,6% (n=14) der Patienten bekamen ein Rezidiv (unzensiert) und 71,4% (n=35) der Patienten bekamen keine erneute Erkrankung im beobachteten Zeitraum (zensiert). Die Nachbeobachtungszeit der kurativ behandelten Patienten lag im Mittel bei 25,0 Monaten, mit einem Minimum von 1,9 und einem Maximum von 59,8 Monaten (siehe Abbildung 10).

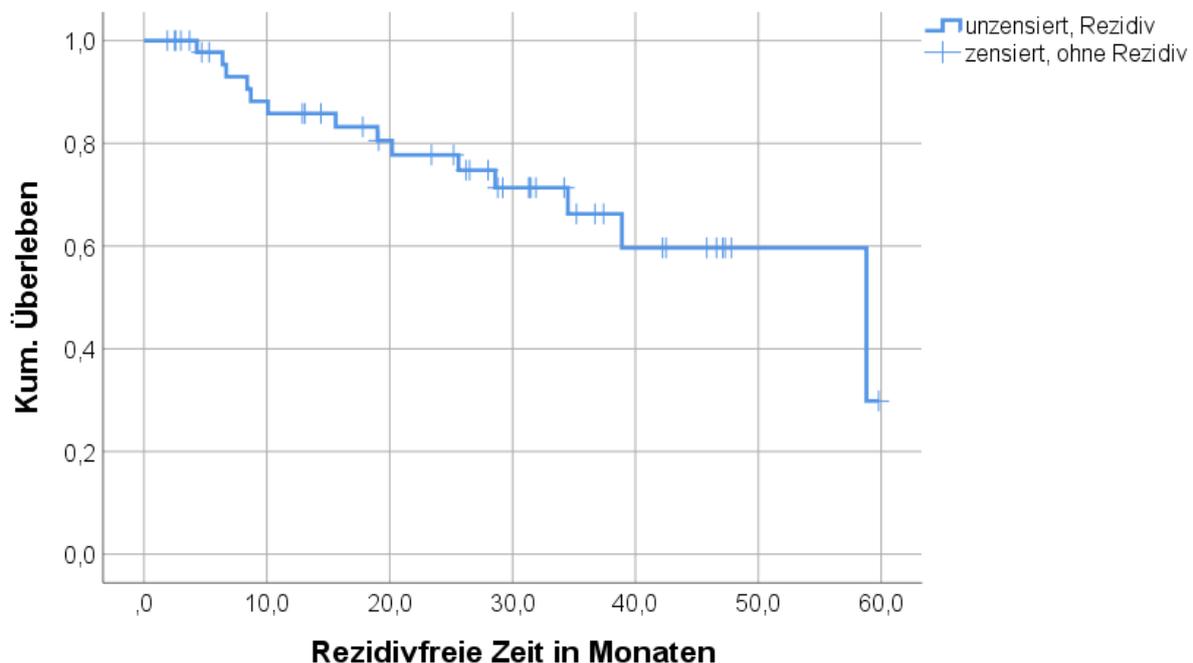


Abbildung 10: Rezidivfreies Überleben der kurativ behandelten und nachbeobachteten Patienten.

Um den Einfluss der Claudin-Expression auf die rezidivfreie Überlebenszeit zu überprüfen, wurde der Unterschied zwischen der Claudin-Expression im Tumor versus Kontrolle entweder in 2 Gruppen (Gruppe 1 mit Werten kleiner oder gleich dem Median und Gruppe 2 größer als Median der Claudin-Expressionsdifferenz zwischen Tumor und Kontrolle) oder in 3 Gruppen (Terzile) eingeteilt (zur Übersicht der Cutoff-Werte für die Einteilung in die jeweilige Gruppe siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Gruppeneinteilung für Kaplan-Meier-Überlebensanalyse.

	Diff_CLDN*-1	Diff_CLDN*-2	Diff_CLDN*-4	Diff_CLDN*-5	Diff_CLDN*-7
Median	-0,0036	0,5166	-1,2990	-1,8187	-2,9739
Terzile:					
33,3	-0,5033	0,0791	-1,7837	-3,8407	-5,4102
66,7	0,3062	1,5743	-0,4159	-0,8055	-0,7588

*Diff_CLDN ist die Claudindifferenz zwischen dem Tumor und der Kontrolle.

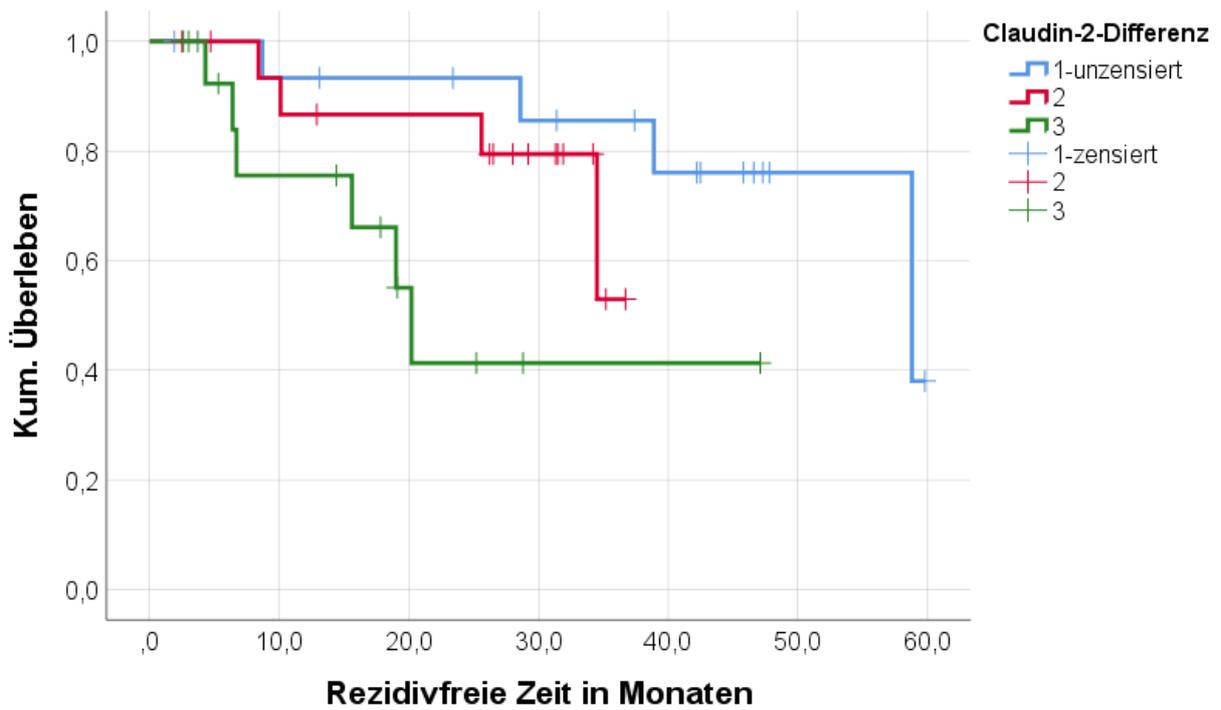
Bei der Einteilung der untersuchten Claudine nach Expressionshöhe in drei gleich große Gruppen, kristallisierte sich eine Tendenz bezüglich der rezidivfrei Überlebenszeit heraus.

Es stellte sich heraus, dass die Patienten, bei denen die Claudin-2-Expression im Tumor und der intraindividuellen Kontrolle ähnlich war (Gruppe 1), eine längere rezidivfreie Zeit hatten bzw. dass diejenigen, die Claudin-2 verstärkt exprimierten (Gruppe 3), zu häufigeren Rezidiven und einer kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit neigten ($p=0,019$). So bekamen die Patienten der Gruppe 1 mit annähernd normaler Claudin-2-Expression im Durchschnitt ein Rezidiv erst nach 33,8 Monaten verglichen mit der Gruppe 2, die ein Rezidiv nach 19,7 Monaten ($p=0,244$) bekamen und der Gruppe 3 mit dem Rezidiv nach 12 Monaten ($p=0,019$) (siehe Abbildung 11a).

Außerdem hatten die Patienten mit einer annähernd gleichen Claudin-4-Expression im Tumor und in der intraindividuellen Kontrolle (Gruppe 3, Rezidiv im Durchschnitt nach 29,0 Monaten) eine längere rezidivfreie Überlebenszeit als die Gruppe 2 (Rezidiv im Durchschnitt nach 24,5 Monaten, $p=0,154$) und die Gruppe 1 mit der stärksten Claudin-4-Expressionsminderung (Rezidiv im Durchschnitt nach 15,0 Monaten, $p=0,036$) (siehe Abbildung 11b).

Darüber hinaus beobachtete man die gleiche Tendenz für Claudin-5- wie bei Claudin-4-Expression in oralen PECA-Zellen versus intraindividuelle gesunde Kontrolle, dies erwies sich allerdings als nicht signifikant ($p=0,142$). Die Expression von Claudin-1 und -7 im Vergleich zwischen PECA der Mundhöhle und der gesunden Schleimhaut ergab keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben der Patienten.

a



b

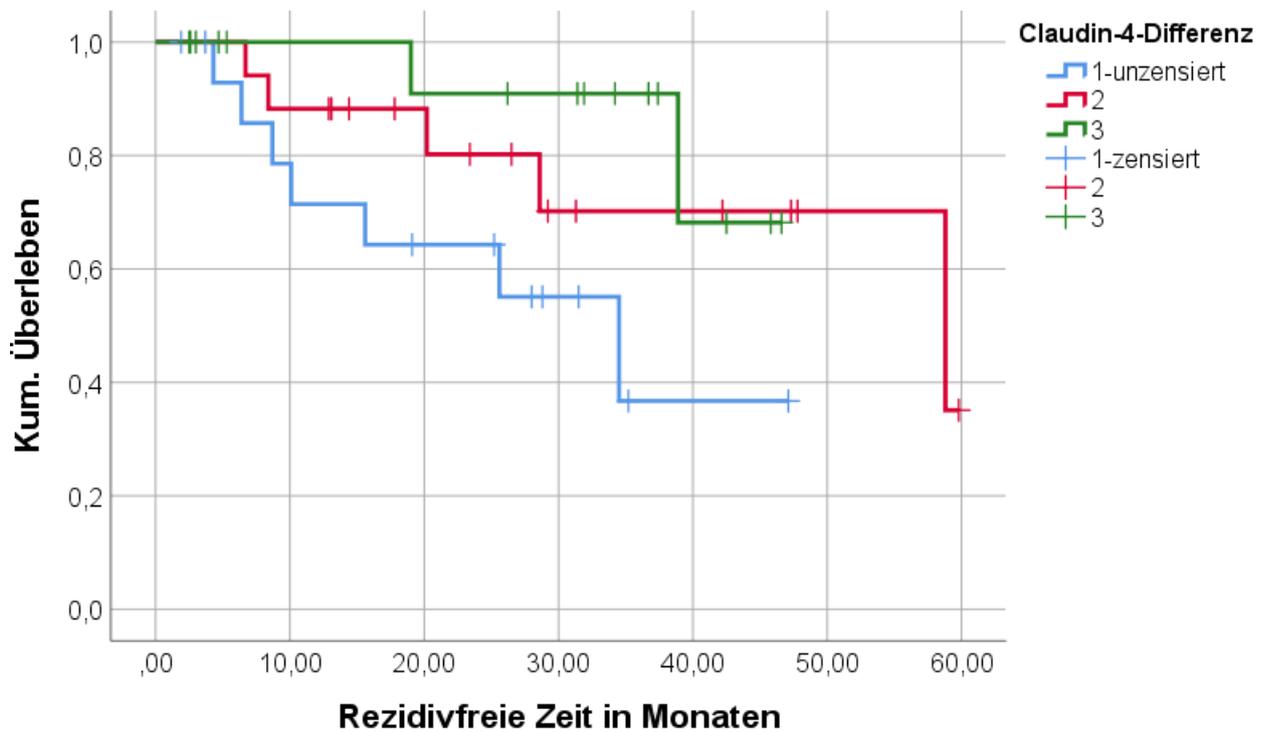


Abbildung 11: Rezidivfreies Überleben der kurativ behandelten und nachbeobachteten Patienten in Abhängigkeit von der Claudin-Expression.

a Claudin-2-Expression in drei gleich große Gruppen eingeteilt, dabei besitzt das Tumorgewebe der Gruppe 1 ähnlich viel Claudin-2 wie das Kontrollgewebe, die Gruppen 2 und

3 exprimieren im Tumorgewebe verstärkt Claudin-2 im Vergleich zur Kontrolle, paarweise Vergleich zwischen Gruppe 1 und 3 ($p=0,019$)

b Hier sind die Patienten anhand der Unterschiede in der Claudin-4-Expression zwischen Tumorgewebe und gesundem Kontrollgewebe in drei gleich große Gruppen eingeteilt worden mit dem geringsten Unterschied in Gruppe 3 und dem größten Unterschied in Gruppe 1, paarweise Vergleich zwischen Gruppe 1 und 3 ($p=0,036$).

Im Weiteren wurde zuerst der univariate Einfluss der Kovariablen (Claudin-1, -2, -4, -5 und -7, Alter, Tumorausdehnung, Lymphknotenmetastasen und Tumorgrading) analysiert, wo sich nur Claudin-2-Expression (Hazard Ratio 1,157; 95%-Konfidenzintervall 1,032-1,296; $p=0,012$) als bedeutsame Claudin-Kovariable nachgewiesen wurde.

Danach wurde der gleichzeitige Einfluss von mehreren Kovariablen (Claudin-2, Alter, Tumorausdehnung, Lymphknotenmetastasen und Tumorgrading) auf das rezidivfreie Überleben mit Hilfe von Cox-Multiregressionsanalysen überprüft. Claudin-2-Expression (Hazard Ratio 1,213; 95%-Konfidenzintervall 1,027-1,434; $p=0,023$), die Tumorausdehnung (Hazard Ratio 0,398; 95%-Konfidenzintervall 0,179-0,887; $p=0,024$) und die Lymphknotenmetastasen (Hazard Ratio 3,154; 95%-Konfidenzintervall 1,212-8,212; $p=0,019$) im PECA der Mundhöhle fungieren als unabhängige signifikante Prognosefaktoren für das rezidivfreie Überleben.

4.7. Claudin-3 im gesunden oralen Epithel und Mundschleimhautkarzinom

Sowohl im gesunden Wangenepithel als auch im Tumor konnte im Western Blot kein Claudin-3-Signal bei 23 kDa detektiert werden. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse von Claudin-3 mit der Positivkontrolle der Kolonadenokarzinomzelllinie HT29/B6 dargestellt. Allerdings wurde in den Lysaten aller Patienten eine 55 kDa schwere Bande nachgewiesen. Dementsprechend stand offen, ob diese stets anwesende Bande Claudin-3 als Dimer oder ein Komplex mit einem weiteren Protein darstellt oder kein Claudin-3 vorhanden ist und die 55 kDa schwere Bande eine unspezifische Bande ist. Um dies abzuklären wurde ein GST-CPE-Pulldown Assay durchgeführt. Hier konnte ebenfalls kein Claudin-3 in der gesunden Mundschleimhaut nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13a). Das c-CPE bindet unter anderem auch Claudin-4, deshalb führten wir parallel als Kontrolle für einen reibungslosen Ablauf einen Claudin-4 Nachweis durch. Wie erwartet exprimierten

das gesunde Kontrollgewebe der Mundhöhle, genauso wie das Kolonepithel, Claudin-4 (siehe Abbildung 13b).

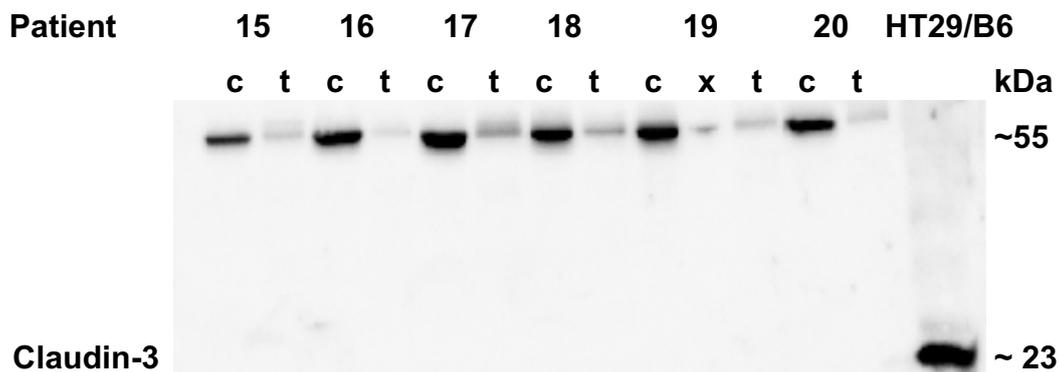
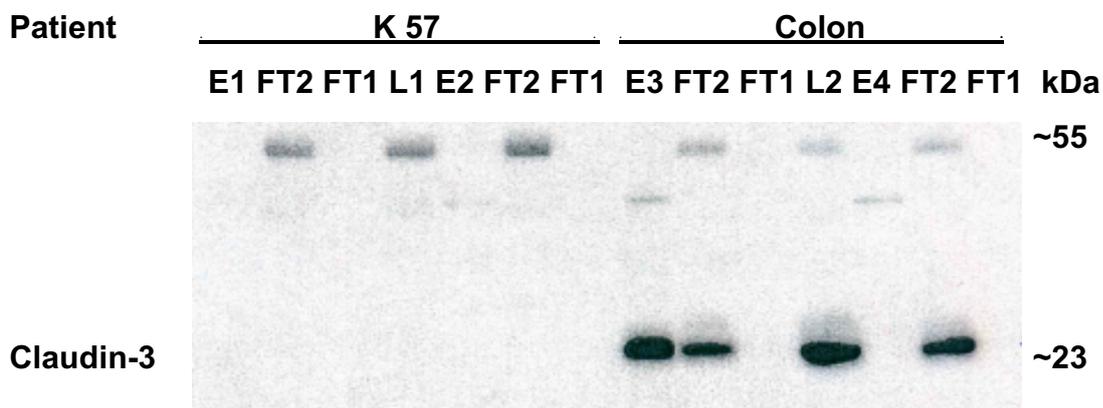


Abbildung 12: Claudin-3-Expression im Western Blot.

Western Blot Analyse von Claudin-3, hier beispielhaft gezeigt in den Kontrollen (c) 15-20 und den jeweiligen Tumoren (t), Kolonadenokarzinomzelllinie HT29/B6 mit Claudin-3 bei ca. 23 kDa gilt als Positivkontrolle. Im oralen gesunden und Tumorepithel fehlt die Claudin-3 Bande bei 23 kDa, eine Bande bei ca. 55 kDa wird stets detektiert, diese Bande ist im Tumorgewebe bei allen Patienten schwächer als im Kontrollgewebe (x ist eine deformierte Geltasche).

a



b

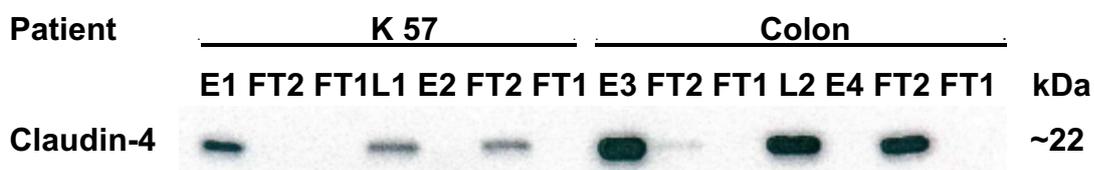


Abbildung 13: Pull-down Assay.

Analyse von Claudin-3 **(a)** und Claudin-4 **(b)** hier beispielhaft gezeigt in der Kontrolle von Patient 57 und Colongewebe als Positivkontrolle mit Claudin-3 **(a)** bei ca. 23 kDa **(E3, L2)** und Claudin-4 **(b)** bei ca. 22 kDa **(E3, L2)**. Im gesunden oralen Epithel fehlt die Claudin-3 Bande bei 23 kDa **(E1, L1)**, eine Bande bei ca. 55 kDa wurde in einigen Fraktionen, aber nicht im Eluat **(E1)** im gesunden oralen Epithel und nicht im Colonepithel **(E3)** detektiert. Claudin-4 ist im oralen Epithel **(E1, L1)** vorhanden. **E2** und **E4** bilden jeweils die Negativkontrollen (GST-cCPE_{Y306A/Y315A}) mit mutierten Bindungsstellen zwischen Glutathiontransferase-Clostridium perfringens Enterotoxin und Claudin-3 oder Claudin-4. **E** Eluat, **FT2** Fraktion mit ungebundenen Proteinen, **FT1** Fraktion mit ungebundenem Anteil an GST-CPE Fusionsproteinen, **L** Lysat für Western Blot (siehe Kapitel 3.3.6.).

Das bedeutet weiterhin, dass entweder die Bindungsstelle für c-CPE in der vermuteten Claudin-3 Region durch ein Dimer oder ein weiteres Protein verdeckt ist oder dass kein Claudin-3 vorhanden ist und diese Bande als unspezifisch definiert werden darf, weil der Claudin-3 Antikörper nicht ausreichend spezifisch ist (80).

Daraufhin wurde massenspektroskopisch die Anwesenheit von Claudin-3 in der gesunden Mundschleimhaut auf Höhe von 55 kDa von Dr. Haseloff und seiner Forschungsgruppe im Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie überprüft. Hier wurde kein Claudin-3 gefunden. Das steht im Einklang mit unseren bisherigen Ergebnissen. Daraus folgt, dass kein Claudin-3 im gesunden und Tumorgewebe der Mundhöhle auf der Proteinebene exprimiert wird und eine 55 kDa schwere Bande als unspezifisch bezeichnet werden kann.

5. Diskussion

Die Sterberaten für Krebserkrankungen von Mundhöhle und Rachen haben sich seit dem Jahr 2000 nicht wesentlich verändert (3). Um Grundlagen für neue diagnostische, prognostische und therapeutische Möglichkeiten des oralen PECA zu schaffen, haben wir die TJ-Proteine Claudine untersucht, denn in zahlreichen anderen Tumorentitäten wurde bereits eine Veränderung in der Expression verschiedener Claudine nachgewiesen. Diese Veränderungen sind allerdings nicht einheitlich für alle epithelialen Tumore. Die gleichen Claudine werden in einigen Tumoren überexprimiert, in anderen Tumorarten herunterreguliert (25). In der vorliegenden Arbeit wurde die Claudin-Expression im oralen PECA untersucht, zu dem bislang nur wenige aussagekräftige Studien vorliegen. In unserer Studie haben wir zum ersten Mal einen intraindividuellen Vergleich anhand einer Stichprobe von 60 Patienten durchgeführt und gezeigt, dass die Claudin-Expression im oralen PECA gegenüber dem normalen oralen Epithel des gleichen Individuums verändert ist. Wir konnten zum ersten Mal nachweisen, dass die Expression von Claudin-2 in oralem Tumorepithel im Vergleich höher ist als die des Kontrollepithels. Außerdem gelang es uns, die verminderte Expression von Claudin-4, Claudin-5 und Claudin-7 im Tumorgeewebe im intraindividuellen Vergleich nachzuweisen. Die Expressionshöhe des Claudin-1 unterscheidet sich im oralen PECA nicht von der in gesundem Epithel. In der Immunfluoreszenzfärbung konnte aber ein Hinweis auf Dislokation von Claudin-1 aus der TJ in das Zytoplasma detektiert werden. 60 Kontrollen entstammen jeweils der Wangenschleimhaut und die Tumoren waren entweder auf der Zunge, auf der Wange, am Mundboden, am Alveolarkamm, am Gaumen oder multifokal lokalisiert. Die Tumorlokalisierung innerhalb der Mundhöhle hatte in vorliegender Arbeit statistisch keinen Einfluss auf die Höhe der Claudin-Expression. Zum gleichen Ergebnis kamen bereits die Forschungsgruppen von Lourenco für alle von uns untersuchten Claudine und von Babkair für Claudin-1 (62, 67). Im Gegensatz dazu wurde in der Studie von Ouban und Ahmed von einer höheren Claudin-1-Expression im Zungenkarzinom gegenüber anderen oralen PECA berichtet, die allerdings statistisch nicht signifikant war (64). Claudin-3 konnte weder in der Kontrolle noch im PECA der Mundhöhle im Western Blot, Pulldown Assay oder in der Massenspektroskopie nachgewiesen werden.

5.1. Bedeutung von Claudin-1, -2, -4, -5 und -7 im Mundschleimhautkarzinom

Claudin-1

Claudin-1 im oralen PECA wurde in vielen Studien untersucht. Wir konnten die Expression von Claudin-1 im gesunden oralen Epithel und im PECA der Mundhöhle sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenzfärbung nachweisen. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Großteil der bisher durchgeführten Studien (62, 65, 66, 68, 69). Wir stellten fest, dass sich die Claudin-1-Expression im oralem PECA nicht von der intraindividuellen Kontrolle unterscheidet. In vorliegender Studie konnte in der Tendenz ein Zusammenhang zwischen Lymphgefäßinvasion und einer verstärkten Claudin-1-Expression festgestellt werden. Um das genauer zu untersuchen, müsste man allerdings eine größere Patientengruppe mit einer positiven Lymphgefäßinvasion untersuchen, denn in vorliegender Studie ist dies lediglich bei 6 von 47 Patienten der Fall. Darüber hinaus konnte kein weiterer Zusammenhang zwischen Claudin-1-Expression und klinikopathologischen Faktoren festgestellt werden. Im Gegensatz zu unserem Ergebnis berichten andere Studien, die Claudin-1 immunhistochemisch semiquantitativ beurteilten, über eine verstärkte Claudin-1-Expression im PECA der Mundhöhle im Zusammenhang mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (71), einer schlechten (69, 71) oder einer guten Differenzierung des oralen Tumorgewebes (62, 63, 65), einer Lymphknotenmetastasierung (71) sowie einer angiolymphatischen und perineuralen Invasion (71). Allen Studien ist gemeinsam, dass sie im Gegensatz zu unserer Studie keine gesunden oralen Kontrollen des gleichen Individuums untersucht haben. Denkbar ist, dass die Menschen per se nicht die gleiche Menge der Claudine im normalen als auch neoplastisch veränderten Epithel der Mundhöhle besitzen. Das wurde bisher in keiner weiteren Studie mit oralem Plattenepithel und deren benignen oder malignen Veränderungen untersucht.

In der vorliegenden Studie wurde ein Claudin-1-Signal in der Immunfluoreszenzfärbung in allen Schichten des gesunden oralen Epithels in der Zellmembran detektiert. Zum gleichen Ergebnis kamen die Studien von Lourenco et al. und Ivina et al. (62, 65). In der Studie von Upadhaya et al. hingegen, in der als Kontrolle gesundes Gewebe angrenzend an Tumor- oder an Dysplasiegewebe untersucht wurde, konnte immunhistochemisch kein Claudin-1 in der Basalzellschicht nachgewiesen werden (69). In der Studie von Babkair et al. wurde gar kein Claudin-1 im gesunden Tumor-angrenzenden Epithel nachgewiesen (67). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre, dass diese Forschungsgruppen ausschließlich Areale um den Tumor untersucht haben und dort könnten bereits

Veränderung durch die Tumormikroumgebung stattgefunden haben (81). Vereinzelt Studien erwähnen die Claudin-1-freie Basalzellschicht im normalen oralen Kontrollepithel. Allerdings war die Anzahl der Proben mit solchem Befund unklar (68, 72) oder gering (66). Die Fluoreszenzuntersuchung des Claudin-1 von oralem PECA zeigte eine Lokalisation von Claudin-1 nicht nur in der Zellmembran des Tumors, sondern auch im Zellplasma. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte in einigen Studien eine Expression von Claudin-1 zusätzlich im Zellkern detektiert werden (63, 69).

Es liegen Studien vor, die eine schrittweise Veränderung der Claudin-1-Expression und -Lokalisation von Dysplasien hin zum invasiven PECA zeigen (65, 67-69). So wurde eine Dislokation von Claudin-1 von der Zellmembran in das Zellplasma bei Dysplasie und zusätzlich bei Carcinoma in situ, gefolgt von oralem PECA gezeigt (67-69).

Denkbar wäre, dass mit zunehmendem Dysplasiegrad eine zunehmende Dislokation von Claudin-1 aus der Zellmembran in andere Zellkompartimente stattfindet. Claudin-1, was sich nicht mehr in der TJ befindet, könnte zum einen seine ursprüngliche Funktion nicht mehr ausführen und zum anderen eine andere funktionelle Bedeutung im Tumor gewinnen. Im normalen Epithel fungiert Claudin-1 als abdichtendes TJ-Protein (82) und durch den Verlust der TJ-Integrität kann es zur parazellulären Barriervedysfunktion und zum unregulierten Eintritt der Nährstoffe und Wachstumsfaktoren in das Gewebe kommen, wodurch ein Wachstumsreiz gesetzt werden kann (83).

Die genaue Funktion von Claudin-1 im oralen PECA ist nicht bekannt, aber anzunehmen ist, dass es direkt oder indirekt an der Tumorpheriferation beteiligt ist. Andere Studien zeigten, dass das Ausschalten der Claudin-1-Expression in der oralen PECA-Zelllinie mit Claudin-1 in der Zellmembran und im Zellplasma mit Hilfe von spezifischen kleinen Interferenz-RNA (siRNA) zur Inhibierung der Zellproliferation und Zellinvasivität des Tumors führte (66, 67). Zusätzlich konnte mit Hilfe von Claudin-1-CDS (Claudin-1 expression cassette plasmid) eine Überexpression von Claudin-1 in der oralen PECA-Zelllinie induziert werden und das wiederum erhöhte die Invasivität der Tumorzellen (66). Ein Erklärungsansatz dafür ist die Rekrutierung der Membrantyp Matrix-Metalloproteinase-1 (MT1-MMP) und pro-MMP-2 auf der Zelloberfläche, die zur Spaltung der extrazellulären Matrix führt und durch Claudin-1 direkt oder indirekt beeinflusst wird. Das kann einen Einfluss auf die Zellintegrität gefolgt von einem metastatischen Potenzial der losgelösten Zellen haben (84).

Claudin-2

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal auf Proteinebene eine verstärkte Claudin-2-Expression des oralen PECA im Vergleich zur intraindividuellen Kontrolle festgestellt. Die Immunfluoreszenzfärbung des TJ Proteins Claudin-2 im gesunden oralen Epithel geht von den Parabasalzellen bis zu oberen Zellschichten und im Tumor befindet sich Claudin-2 auch in der Zellmembran. In einer einzigen anderen Studie wurde das Expressionsmuster von Claudin-2 im oralen Epithel und im oralen PECA immunhistochemisch untersucht (62). Dort wurde zusätzlich in einigen Fällen Claudin-2 im Zytoplasma der oralen PECA-Zellen nachgewiesen (62). In der vorliegenden Studie genau wie in der Studie von Lourenco et al. (62) wurden keine Korrelationen zwischen Claudin-2-Expression und den Tumorgrading-Parametern festgestellt. Allerdings konnten wir Claudin-2 als unabhängige Variable für das rezidivfreie Überleben identifizieren. Obwohl in der vorliegenden Studie eine verstärkte Claudin-2-Expression im intraindividuellen Vergleich festgestellt werden konnte, ist die Claudin-2-Expression ubiquitär im normalen und neoplastischen Gewebe vorhanden, sodass der Nutzen der potenziellen gegen Claudin-2 gerichteten Therapie, wie dies im Falle des Claudin-18.2 im fortgeschrittenem Magenkarzinom ist (61), eingeschränkt erscheint.

Claudin-4

Wir konnten nachweisen, dass die Claudin-4-Expression im gesunden oralen Epithel höher ist als im oralen PECA. Dies unterstützt die immunhistochemischen Ergebnisse von Sappayatosok et al., die zeigen, dass Claudin-4 in 60% der untersuchten Tumore in weniger als 25% der Zellen detektiert wurde (71). Zusätzlich zu unseren Beobachtungen wurde hier die Expression von Claudin-4 in der Tumorperipherie/ Invasionsfront und im Tumorzentrum untersucht. Diese Studie sowie die Studie von Bello et al. zeigten diesbezüglich keine wesentlichen Unterschiede (71, 74). Das Vorhandensein eines Claudin-4-Signals in den immunhistochemischen Färbungen wurde mit einem differenzierteren Tumor, der Abwesenheit von Perineuralinvasion (62), einem längeren Überleben und einer geringeren Anzahl an Rezidiven (72) assoziiert. Wir haben im Gegensatz zu den benannten Studien die Claudin-4-Expression zwischen gesundem Epithel und oralem PECA intraindividuell verglichen und konnten Claudin-4 nicht als Biomarker für das Tumorgrading, aber als Prognosefaktor für das längere rezidivfreie Überleben bei Patienten, deren Claudin-4-Expression im oralen PECA ähnlich hoch wie die des gesunden Kontrollepitheles war, identifizieren.

Claudin-4 konnte in der vorliegenden Studie ähnlich wie in der Studie von Lourenco et al. (62) über alle Epithelschichten der gesunden oralen Mukosa in der Zellmembran nachgewiesen werden. In anderen Studien wurde entweder keine gesunde Kontrolle untersucht (71) oder keine Ergebnisse zur Claudin-4-Expression im gesunden oralen Epithel (72) oder tumorbenachbartem Epithel (74) berichtet. Der Tumor besitzt Claudin-4 in der Zellmembran (62, 71, 72), im Zellplasma (72) und wir konnten es zusätzlich vereinzelt auch im Zellkern der oralen PECA-Zellen detektieren. Die Bedeutung der Dislokation von Claudin-4 aus der TJ im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist unklar, aber es ist sicher, dass Claudin-4 außerhalb der TJ wie Claudin-1 eine andere Funktion besitzt. Es wurde beschrieben, dass das Vorhandensein von Claudin-4 im Zellplasma mit einer Entdifferenzierung der oralen PECA-Zellen korreliert (72). Dem kann in weiteren Studien nachgegangen werden, um die Korrelation der Claudin-4-Expression in unterschiedlichen Zellkompartimenten im Tumor und seiner intraindividuellen Kontrolle mit den klinisch relevanten Parametern abzuklären. Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass die Aufrechterhaltung der Claudin-4-Expression im oralen PECA protektiv zu sein scheint, denn beim Ausschalten der Claudin-4-Expression (Claudin-4 siRNA) kommt es zum höheren Invasionspotenzial der oralen Tumorzellen einer PECA-Zelllinie (84).

Claudin-5

Eine vergleichbare schwache Expression von Claudin-5 in den immunhistochemischen Färbungen (74) oder sogar in über 50% (62) bis 75% (73) der Fälle Abwesenheit von Claudin-5 in oralen PECA, stimmt mit der verminderten Expression von Claudin-5 im intraindividuellen Vergleich der gesunden und neoplastisch-veränderten oralen Epithelien im Western Blot der vorliegenden Studie überein. Bello et al. stellten keinen Unterschied zwischen der Verteilung von Claudin-5 innerhalb der oberen Schichten des PECA der Zunge und deren Invasionsfront fest (74). Dies wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht. In der vorliegenden Studie und in anderen Studien konnte keine Korrelation zwischen der Claudin-5-Expression und den Parametern des Tumorstagings festgestellt werden (62, 73, 74).

Im gesunden Wangenepithel wurde Claudin-5 in allen Epithelschichten detektiert. Wir detektierten Claudin-5 in der Zellmembran von Stratum intermedium bis Stratum superfiziale. Außerdem konnten wir Claudin-5 in den Zellkernen über alle Epithelschichten und Zellplasma der Basalzellschicht des gesunden oralen Epithels feststellen. Lourenco et al. trafen lediglich die allgemeine Aussage, dass das gesunde orale Epithel Claudin-5 bis

zum Stratum intermedium exprimiert und sich um die Zellmembran befindet (62). In einigen weiteren Studie wurde entweder kein gesundes orales Epithel untersucht (73) oder es wurden keine weiteren Angaben, außer der Lokalisation von Claudin-5 in der Zellmembran, im normal erscheinenden Tumor-benachbarten Epithel gemacht (74). Im oralen PECA wurde die Lokalisation von Claudin-5 in der Zellmembran (62, 73, 74) und in einigen Fällen im Zellplasma (62) beschrieben. In der vorliegenden Studie detektierten wir das Claudin-5 Signal in der Zellmembran, im Zellkern und vereinzelt im Zytoplasma der Tumorzellen. Die Funktion von Claudin-5 außerhalb der TJ im Zellplasma oder im Zellkern der oralen PECA ist noch ungeklärt und erfordert weitere Untersuchungen.

Claudin-7

Mittels cDNA-Mikroarray Genexpressionsanalyse konnten viele heraufregulierte und herunterregulierte Gene in vier Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Zelllinien im Vergleich zu intraindividuellen gesunden Kontrollen festgestellt werden (75). Außerdem wurde eine Herunterregulation von Claudin-7 im PECA auf der Proteinebene festgestellt (75, 77). In der vorliegenden Studie stellten wir ebenfalls eine verminderte Expression von Claudin-7 in vivo auf der Proteinebene im intraindividuellen Vergleich zwischen gesundem Epithel und PECA der Mundhöhle fest. Die Mechanismen, die zur Herunterregulation von Claudin-7 im oralen PECA führen, sind noch nicht komplett erforscht. Als Erklärung der Herunterregulation von Claudin-7 im oralen PECA wurde die Hypermethylierung seines Promotors festgestellt (77). Außerdem wurde in einer weiteren Studie eine hochinvasive Mundhöhlenkarzinomzelllinie auf die Expression von E-Cadherin, als wichtiges Transmembranprotein der Adhäsionskontakte, und auf Claudin-7 untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Herunterregulation der beiden Zell-Zell-Kontakte auf mRNA- und Proteinebene und dafür eine Überexpression des SNAIL-Transkriptionsfaktors auf mRNA-Ebene, was die Expression der beiden Zell-Zell-Kontakte supprimieren kann und damit einen wichtigen Schritt in der epithelial-mesenchymalen Transition in der Tumorgenese und Tumorprogression darstellt (11, 76).

Wir konnten einen Zusammenhang zwischen der verminderten Expression von Claudin-7 und einem fortgeschrittenen UICC-Stadium feststellen. Außerdem korreliert die verminderte Expression von Claudin-7 im PECA der Mundhöhle mit der Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen und kann damit als prädiktiver Marker für positiven Lymphknotenbefall fungieren. Das kann in Zukunft als Entscheidungsgrundlage für oder gegen eine elektive Neckdissektion dienen.

Auch in den anderen Studien wurden Zusammenhänge zwischen der reduzierten Claudin-7-Expression im PECA des Mundraums und einem fortgeschrittenem UICC-Stadium (62, 73, 77) sowie einem Lymphknotenbefall (73, 76) immunhistochemisch nachgewiesen. Zudem berichteten Studien über einen möglichen Zusammenhang zwischen der reduzierten Claudin-7-Expression und einem Rezidiv (62, 77), fortgeschrittener Tumorausdehnung (73, 76, 77) und Entdifferenzierung (73), Perineural- (73) und Gefäßinfiltration (62, 73) und einem geringeren 5-Jahres-Überleben (76). Außerdem könnte die Claudin-7-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation im Tumorzentrum oder der Tumorausdehnungsfront variieren und mit klinikopathologischen Parametern assoziiert sein (74, 78). Letzteres wurde in der vorliegenden Studie nicht überprüft. In keiner der benannten Studie wurde ein intraindividueller Vergleich zwischen Tumor- und gesundem Gewebe durchgeführt. Als Bezugspunkt für eine verringerte Claudin-7-Expression wurde entweder ein Gewebe nicht oralen Ursprungs (73), eine unbekannte Anzahl an gesunder oraler Mukosa ohne weiteren Angaben (62, 76-78) oder das Tumor-benachbarte Gewebe (74) genommen. Das kann die Differenzen im Zusammenhang mit klinikopathologischen Parametern erklären. Außerdem gibt es in dem vorliegenden Patientengut nur eine geringe Anzahl an positiven lymphatischen-, perineuralen- oder vaskulären Infiltrationen. Diese Faktoren und der Einfluss auf das Gesamtüberleben wurden nicht überprüft.

Im gesunden oralen Epithel ist stellenweise eine Claudin-7-Expression über alle Epithelschichten der Zellmembran in der Immunfluoreszenzfärbung zu detektieren. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit mehreren immunhistochemischen Studien (62, 74, 76, 77). Andere Studien erwähnen normale Kontrollen in der Durchführung der Experimente, jedoch beschreiben sie weder Lokalisation von Claudin-7 innerhalb der Zellkompartimente noch der Epithelschichten (78) oder führen die Kontrollfärbung des normalen Epithels nicht durch (73). Ähnlich wie die anderen Studien detektierten wir Claudin-7 in der Zellmembran (62, 73, 74, 78) der oralen PECA-Zellen sowie geringfügig im Zellplasma (73, 76). In einigen Studien wird nur die Zellmembranfärbung ausgewertet und keine Angaben zur anderweitigen Lokalisation von Claudin-7 gemacht, sodass Claudin-7 innerhalb des Zellplasmas nicht ausgeschlossen werden kann (74, 78). Zusätzlich detektierten Yoshizawa et al. Claudin-7 im Zellkern, was wir in zwei Fluoreszenzfärbungen nicht nachweisen konnten (76).

5.2. Einfluss von Claudin-2- und Claudin-4-Expression auf die rezidivfreie Überlebenszeit der kurativ behandelten Patienten

Diese Studie konnte Claudin-2 als unabhängige Variable für das rezidivfreie Überleben nachweisen. Patienten mit verstärkter Claudin-2-Expression haben ein kürzeres rezidivfreies Überleben im Vergleich zu Patienten mit annähernd normaler Claudin-2-Expression gezeigt. So lebten Patienten mit verstärkter Claudin-2-Expression durchschnittlich 12 Monate ohne ein Rezidiv zu bekommen im Gegensatz zu den Patienten mit annähernd gleicher Expression von Claudin-2 im gesunden und im Tumorgewebe der Mundhöhle, die durchschnittlich 34 Monate rezidivfrei waren. Das gleiche Verhalten bezüglich einer verstärkten Expression von Claudin-2 im primären Mamakarzinom und einer verkürzten rezidivfreien Überlebenszeit wurde beobachtet (85). Claudin-2 wird in gesundem Gewebe des Körpers in unterschiedlichen Organen exprimiert, deshalb ist die therapeutische Bedeutung einer verstärkten Claudin-2-Expression eingeschränkt. Nichtsdestotrotz wurde präklinisch ein monoklonaler Claudin-2-Antikörper generiert (86).

Die Patienten der vorliegenden Studie mit annähernd gleicher Expression von Claudin-4 im gesunden und im Tumorgewebe der Mundhöhle haben ein Rezidiv nach durchschnittlich 29 Monaten bekommen. Im Gegensatz dazu bekamen die Patienten mit am stärksten verminderter Expression von Claudin-4 im Tumor im Vergleich zum gesunden Gewebe bereits nach durchschnittlich 15 Monaten ein Rezidiv. Das Ergebnis der vorliegenden Studie korreliert mit dem von Vicente et al., dort trat bei Patienten mit starker Claudin-4-Expression in der immunhistochemischen Färbung der oralen PECA kein Rezidiv auf (72). Auch in Tumoren anderer Lokalisation wie zum Beispiel Ösophaguskarzinom und hepatozellulärem Karzinom wurde eine verminderte Claudin-4-Expression mit verkürzter rezidivfreier Überlebenszeit assoziiert (87, 88).

Deshalb könnte Claudin-2 gemeinsam mit Claudin-4 im Mundhöhlenkarzinom als prädiktive Marker für das rezidivfreie Überleben fungieren. Empfehlenswert wäre es daher, die Patienten mit einer verstärkten Expression von Claudin-2 und einer verminderten Expression von Claudin-4 in kürzeren Abständen in der Tumornachsorge zu reevaluiieren.

5.3. Claudin-3-Expression im Mundschleimhautkarzinom

Bei der Western Blot Analyse konnten wir mit dem Antikörper in den Mundschleimhautbiopsien eine Bande bei etwa 55 kDa detektieren, die ein Dimer oder einen Komplex von Claudin-3 mit einem weiteren Protein darstellen könnte. Da die weitere Analyse mit einem GST-CPE-Pulldown Assay kein eindeutiges Ergebnis dazu erbrachte, wurden die Proben im Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie massenspektroskopisch untersucht und es konnte auf Proteinebene kein Claudin-3 in dem oralen gesunden Epithel nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist gegensätzlich zur bislang einzigen publizierten Studie, die Claudin-3 in knapp 70% der oralen PECA und im gesunden oralen Epithel immunhistochemisch nachweisen konnte (62). In jeder Western Blot-Untersuchung gab es in der vorliegenden Studie eine unspezifische Bande bei ungefähr 55 kDa. Das kann ein Hinweis sein, dass der primäre Claudin-3-Antikörper zur unspezifischen Bindung neigt. Tatsächlich wurde in der Studie von Castro Dias et al. von der Unspezifität dieses Antikörpers berichtet. Sie stellten fest, dass mehrere unterschiedliche primäre Claudin-3-Antikörper im Western Blot und in der Immunfluoreszenzfärbung Claudin-3 in Claudin-3-defizienten Mäusen detektierten (80). Das könnte die Anwesenheit von Claudin-3 im gesunden oralen Epithel und dem PECA der Mundhöhle in der Studie Lourenco et al. erklären.

5.4. Studienlimitationen

Alle 60 Kontrollen der vorliegenden Studie entstammen dem gesunden, gegenüberliegenden Wangengewebe. Die PECA der Mundhöhle waren dagegen hauptsächlich in der Zunge, aber auch in anderen Lokalisationen vertreten. Das könnte einen Einfluss auf die Ergebnisse nehmen. Allerdings konnten wir nachweisen, dass die Claudin-Expression in den Tumoren innerhalb des Mundraums sich untereinander nicht voneinander unterscheidet. Die klinikopathologische Verlaufsparemeter wurden dem Patientenerfassungssystem der Klinik entnommen. Aus diesem Grund gibt es in einigen Fällen keine Angaben zum Nikotin- oder Alkoholkonsum oder zum Tumorstadium der jeweiligen Patienten. Aus diesem Grund waren die Fallzahlen bei einzelnen Merkmalen trotz einer ausreichend großen Gesamtanzahl an Patienten klein. Das hatte möglicherweise eine Auswirkung auf die Ergebnisse, sodass sich möglicherweise unterschiedliche Gruppen als nicht signifikant im statistischen Test herausstellen können.

5.5. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Claudin-Expression im gesunden und Tumorgewebe eine intraindividuelle Variabilität aufweist. In 60 oralen PECA und 60 dazugehörigen Kontrollen konnte eine verminderte Expression von Claudin-4, -5 und -7 und eine vermehrte Expression von Claudin-2 nachgewiesen werden. Außerdem konnten wir die Abwesenheit von Claudin-3 sowohl im gesunden Gewebe als auch im oralen PECA feststellen. Anhand von wenigen Immunfluoreszenzfärbungen konnte die Lokalisation von Claudin-1, -2, -4, -5 und -7 innerhalb der Zellkompartimente und der Epithelzellschichten der Mundhöhle gezeigt werden. Hier stellten wir mögliche Dislokation der Claudine-1, -4, -5 und -7 aus der TJ im PECA im Vergleich zum gesunden Kontrollgewebe der Mundhöhle fest. Diese Ergebnisse können in zukünftigen Studien aufgegriffen und anhand einer ausreichend großen Anzahl an intraindividuellen Tumor- und gesunden Proben überprüft werden, um daraus gegebenenfalls einen Einfluss auf die klinikopathologischen Faktoren abzuleiten. Es wurde eine Korrelation zwischen der Expression von Claudin-1, -2, -4, -5 und -7 in Tumor- und Kontrollgewebe und klinikopathologischen Parametern (UICC-Stadium, Tumorausdehnung, Lymphknotenmetastasen, Tumordifferenzierung, Lymphgefäßinvasion, Manifestationsalter, Nikotin- und Alkoholkonsum), sowie das Claudin-abhängige rezidivfreie Überleben überprüft. Eine verstärkte Claudin-2- und verminderte Claudin-4-Expression stellen Prognosefaktoren für ein kürzeres rezidivfreies Überleben dar. Eine Reduktion von Claudin-7 kann als Biomarker für ein fortgeschrittenes Tumorstadium und Lymphknotenmetastasierung fungieren. Diese Erkenntnisse können im klinischen Alltag eine Bedeutung gewinnen und die Diagnose- und Prognosequalität verbessern.

6. Literaturverzeichnis

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Böcker W, Aguzzi A. *Pathologie.* 4., vollst. überarb. Aufl. München u.a. : Elsevier, Urban & Fischer 2008. 1362 : 202; 665-68.
3. Dr. Kaatsch P, Dr. Spix C, Prof. Dr. Katalinic A, Dr. Hentschel S, Dr. Luttmann S, Dr. Waldeyer-Sauerland M, Dr. Waldmann A, Christ M, Dr. Folkerts J, Dr. Hansmann J, Dr. Klein S, Dr. Kranzhöfer K, Dr. Kunz B, Dr. Manegold K, Dr. Penzkofer A, Dr. Treml K, Dr. Vollmer G, Dr. Weg-Remers S, Dr. Barnes B, Buttman-Schweiger N, Dr. Dahm S, Fiebig J, Franke M, Gurung-Schönfeld I, Dr. Haberland J, Dr. Kraywinkel K, Dr. Wienecke A. *Krebs in Deutschland für 2015/2016.* 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin 2019. 160:24-27
4. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000. 2011;57(1):19-37.
5. Hiddemann W, Bartram CR. *Die Onkologie.* 2., aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer 2010. 1822: 273-80; 1301-34.
6. Kösling S, Bootz F. *Bildgebung HNO-Heilkunde.* 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer 2015. 542: 278 p.
7. Riede U-N, Werner M. *Allgemeine und Spezielle Pathologie.* 2., überarbeitete Auflage. Berlin: Springer 2017. 893: 71-74; 243-246; 267-268; 443-449
8. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez M J, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch F X, Reidel U, Snijders P J, Meijer C J, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S, IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1772-83.
9. Humans. IWGoTEoCRt. Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut derived nitrosamines. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2004;85:1-334.

10. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):317-23.
11. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 10):1959-67.
12. Wolff K-D, Bootz F, Beck J, Bikowski K, Böhme P, Budach W, Burkhardt A, Danker H, Eberhardt W, Engers K, Fietkau R, Frerich B, Gauler T, Germann G, Gittler Hebestreit N, Grötz K, Horch R, Ihrler S, Keilholz U, Lell M, Lübke A, Mantey W, Nusser-Müller-Busch R, Pistner H, Paradies K, Reichert T, Reinert S, Schliephake H, Schmitter M, Singer S, Westhofen M, Wirz S, Wittlinger M. S3 Leitlinie: Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. 2012. Accessed 08.10.2019 <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/007-100OL.html>.
13. Tong AC, Leung AC, Cheng JC, Sham J. Incidence of complicated healing and osteoradionecrosis following tooth extraction in patients receiving radiotherapy for treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Australian dental journal.* 1999;44(3):187-94.
14. Frerich B. Standard therapy for oral squamous epithelial carcinoma according to the guidelines. *Organ der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie* In Zusammenarbeit mit der Schweizerischen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. 2018;11(Supplement 1):5-14.
15. Woolgar JA. Pathology of the N0 neck. *British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery.* 1999;37(3):205-9.
16. D'Cruz AK, Vaish R, Kapre N, Dandekar M, Gupta S, Hawaldar R, Agarwal J P, Pantvaidya G, Chaukar D, Deshmukh A, Kane S, Arya S, Ghosh-Laskar S, Chaturvedi P, Pai P, Nair S, Nair D, Badwe R, Head, Neck Disease Management Group. Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(6):521-9.
17. Bonner JA, Harari Paul M, Giralt J, Cohen R B, Jones C U, Sur R K, Raben D, Baselga J, Spencer S A, Zhu J, Youssoufian H, Rowinsky E K, Ang K K. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncology.* 2010;11(1):21-8.
18. Sobin LH, Gospodarowicz M K, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumours . International Union Against Cancer. Lip and Oral Cavity. Seventh Edizion 2009.

332: 22-29. Accessed 12.11.2019 http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/educacion/13072015_TNM%20Classification.pdf.

19. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 5. Auflage. Stuttgart: Thieme 2015. 676: 34-44; 104-22; 388-90

20. Zeichnung. Mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel. Accessed 24.01.2020 http://www.histonet2000.de/praeparat.php?pzid=012_060#.

21. Zeichnung. Mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel. Accessed 24.01.2020 http://www.histonet2000.de/praeparat.php?pzid=012_076#.

22. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of cell biology*. 1963;17:375.

23. Brandes R, Lang F, Schmidt RF. Transport in Membranen und Epithelien. In: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 32nd Edition. Berlin, Heidelberg: Springer 2019. 1058: 22-37.

24. Amasheh S, Fromm M, Gunzel D. Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;201(1):133-40.

25. Gunzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol*. 2012;2(3):1819-52.

26. Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(5):453-8.

27. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *The Journal of Cell Biology*. 1998;141(7):1539-50.

28. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*. 2011;585(4):606-12.

29. Gunzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological reviews*. 2013;93(2):525-69.

30. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*. 1998;143(2):391-401.

31. Daugherty BL, Ward C, Smith T, Ritzenthaler JD, Koval M. Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J Biol Chem*. 2007;282(41):30005-13.

32. Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Muller S L, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig I E. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(1):146-58.
33. Hou J, Gomes AS, Paul DL, Goodenough DA. Study of claudin function by RNA interference. *J Biol Chem*. 2006;281(47):36117-23.
34. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne D M, Syder A J, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating J A, Bieniasz P D, Rice C M. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. 2007;446(7137):801-5.
35. Gao F, Duan X, Lu X, Liu Y, Zheng L, Ding Z, Li J. Novel binding between pre-membrane protein and claudin-1 is required for efficient dengue virus entry. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;391(1):952-7.
36. Zheng J, Xie Y, Campbell R, Song J, Massachi S, Razi M, Chiu R, Berenson J, Yang O O, Chen I S, Pang S. Involvement of claudin-7 in HIV infection of CD4(-) cells. *Retrovirology*. 2005;2:79.
37. Mitchell LA, Koval M. Specificity of interaction between clostridium perfringens enterotoxin and claudin-family tight junction proteins. *Toxins*. 2010;2(7):1595-611.
38. Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, De Prost Y, Munnich A, Hadchouel M, Smahi A. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology*. 2004;127(5):1386-90.
39. Ben-Yosef T, Belyantseva I A, Saunders T L, Hughes E D, Kawamoto K, Van Itallie C M, Beyer L A, Halsey K, Gardner D J, Wilcox E R, Rasmussen J, Anderson J M, Dolan D F, Forge A, Raphael Y, Camper S A, Friedman T B. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet*. 2003;12(16):2049-61.
40. Simon DB, Lu Y, Choate K A, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton R P. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science*. 1999;285(5424):103-6.
41. Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey A V, Waldegger S, Lesslauer A, Vitzthum H, Suzuki Y, Luk J M, Becker C, Schlingmann K P, Schmid M, Rodriguez-Soriano J, Ariceta G, Cano F, Enriquez R, Juppner H, Bakkaloglu S A, Hediger M A, Gallati S, Neuhauss S C, Nurnberg P, Weber S. Mutations in the tight-junction gene claudin 19

(CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *American journal of human genetics*. 2006;79(5):949-57.

42. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen A J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke J D. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56(1):61-72.

43. Oshima T, Miwa H, Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008;23 Suppl 2:S146-50.

44. Lee PH, Kim B G, Lee S H, Lee J H, Park S W, Kim D J, Park C S, Leikauf G D, Jang A S. Alteration in Claudin-4 Contributes to Airway Inflammation and Responsiveness in Asthma. *Allergy, asthma & immunology research*. 2018;10(1):25-33.

45. Singh AB, Sharma A, Dhawan P. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *Journal of oncology*. 2010;2010:541957.

46. Suren D, Yildirim M, Kaya V, Alikanoglu A S, Bulbuller N, Yildiz M, Sezer C. Loss of tight junction proteins (Claudin 1, 4, and 7) correlates with aggressive behavior in colorectal carcinoma. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2014;20:1255-62.

47. Sobel G, Paska C, Szabo I, Kiss A, Kadar A, Schaff Z. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Human pathology*. 2005;36(2):162-9.

48. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res*. 2005;65(21):9603-6.

49. Zhu Y, Brannstrom M, Janson PO, Sundfeldt K. Differences in expression patterns of the tight junction proteins, claudin 1, 3, 4 and 5, in human ovarian surface epithelium as compared to epithelia in inclusion cysts and epithelial ovarian tumours. *International journal of cancer*. 2006;118(8):1884-91.

50. Li J, Sherman-Baust CA, Tsai-Turton M, Bristow RE, Roden RB, Morin PJ. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. *BMC cancer*. 2009;9:244.

51. Cocco E, Shapiro E M, Gasparrini S, Lopez S, Schwab C L, Bellone S, Bortolomai I, Sumi N J, Bonazzoli E, Nicoletti R, Deng Y, Saltzman W M, Zeiss C J, Centritto F, Black J D, Silasi D A, Ratner E, Azodi M, Rutherford T J, Schwartz P E, Pecorelli S, Santin A D. Clostridium perfringens enterotoxin C-terminal domain labeled to fluorescent dyes for

in vivo visualization of micrometastatic chemotherapy-resistant ovarian cancer. *International journal of cancer*. 2015;137(11):2618-29.

52. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18(4):511-8.

53. Morohashi S, Kusumi T, Sato F, Odagiri H, Chiba H, Yoshihara S, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H. Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *International journal of molecular medicine*. 2007;20(2):139-43.

54. Kim TH, Huh JH, Lee S, Kang H, Kim GI, An HJ. Down-regulation of claudin-2 in breast carcinomas is associated with advanced disease. *Histopathology*. 2008;53(1):48-55.

55. Tsutsumi K, Sato N, Tanabe R, Mizumoto K, Morimatsu K, Kayashima T, Fujita H, Ohuchida K, Ohtsuka T, Takahata S, Nakamura M, Tanaka M. Claudin-4 expression predicts survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Annals of surgical oncology*. 2012;19 Suppl 3:S491-9.

56. Usami Y, Chiba H, Nakayama F, Ueda J, Matsuda Y, Sawada N, Komori T, Ito A, Yokozaki H. Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Human pathology*. 2006;37(5):569-77.

57. Maeda T, Murata M, Chiba H, Takasawa A, Tanaka S, Kojima T, Masumori N, Tsukamoto T, Sawada N. Claudin-4-targeted therapy using *Clostridium perfringens* enterotoxin for prostate cancer. *The Prostate*. 2012;72(4):351-60.

58. Romanov V, Whyard TC, Waltzer WC, Gabig TG. A claudin 3 and claudin 4-targeted *Clostridium perfringens* protoxin is selectively cytotoxic to PSA-producing prostate cancer cells. *Cancer letters*. 2014;351(2):260-4.

59. Kuwada M, Chihara Y, Luo Y, Li X, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Fujimoto K, Kondoh M, Kuniyasu H. Pro-chemotherapeutic effects of antibody against extracellular domain of claudin-4 in bladder cancer. *Cancer letters*. 2015;369(1):212-21.

60. Sahin U, Koslowski M, Dhaene K, Usener D, Brandenburg G, Seitz G, Huber C, Tureci O. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(23):7624-34.

61. Singh P, Toom S, Huang Y. Anti-claudin 18.2 antibody as new targeted therapy for advanced gastric cancer. *Journal of hematology & oncology*. 2017;10(1):105.
62. Lourenco SV, Coutinho-Camillo C M, Buim M E C, Pereira C M, Carvalho A L, Kowalski L P, Soares F A. Oral squamous cell carcinoma: status of tight junction claudins in the different histopathological patterns and relationship with clinical parameters. A tissue-microarray-based study of 136 cases. *Journal of clinical pathology*. 2010;63(7):609-14.
63. Ouban A, Hamdan H, Hakam A, Ahmed AA. Claudin-1 expression in squamous cell carcinomas of different organs: comparative study of cancerous tissues and normal controls. *International journal of surgical pathology*. 2012;20(2):132-8.
64. Ouban A, Ahmed A. Analysis of the distribution and expression of claudin-1 tight junction protein in the oral cavity. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2015;23(6):444-8.
65. Ivina AA, Babichenko, II, Rabinovich OF, Togonidze AA. [Ki-67 and claudin-1 expression in hyperplasia, oral squamous intraepithelial neoplasia and oral squamous cell carcinoma]. *Stomatologiya*. 2014;93(1):31-3.
66. Dos Reis PP, Bharadwaj R R, Machado J, Macmillan C, Pintilie M, Sukhai M A, Perez-Ordóñez B, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S. Claudin 1 overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2008;113(11):3169-80.
67. Babkair H, Yamazaki M, Uddin M S, Maruyama S, Abe T, Essa A, Sumita Y, Ahsan M S, Swelam W, Cheng J, Saku T. Aberrant expression of the tight junction molecules claudin-1 and zonula occludens-1 mediates cell growth and invasion in oral squamous cell carcinoma. *Human pathology*. 2016;57:51-60.
68. Carvalho Mde V, Pereira Jdos S, Costa Ade L, de Souza LB, Freitas Rde A, Miguel MC. Alterations in the immunoexpression of claudin-1 between different grades of oral epithelial dysplasias. *Archives of oral biology*. 2010;55(4):261-7.
69. Upadhaya P, Barhoi D, Giri A, Bhattacharjee A, Giri S. Joint detection of claudin-1 and junctional adhesion molecule-A as a therapeutic target in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Journal of cellular biochemistry*. 2019;120(10):18117-27.
70. Warner GC, Reis P P, Jurisica I, Sultan M, Arora S, Macmillan C, Makitie A A, Grenman R, Reid N, Sukhai M, Freeman J, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S. Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlated with nodal metastasis. *International journal of cancer*. 2004;110(6):857-68.

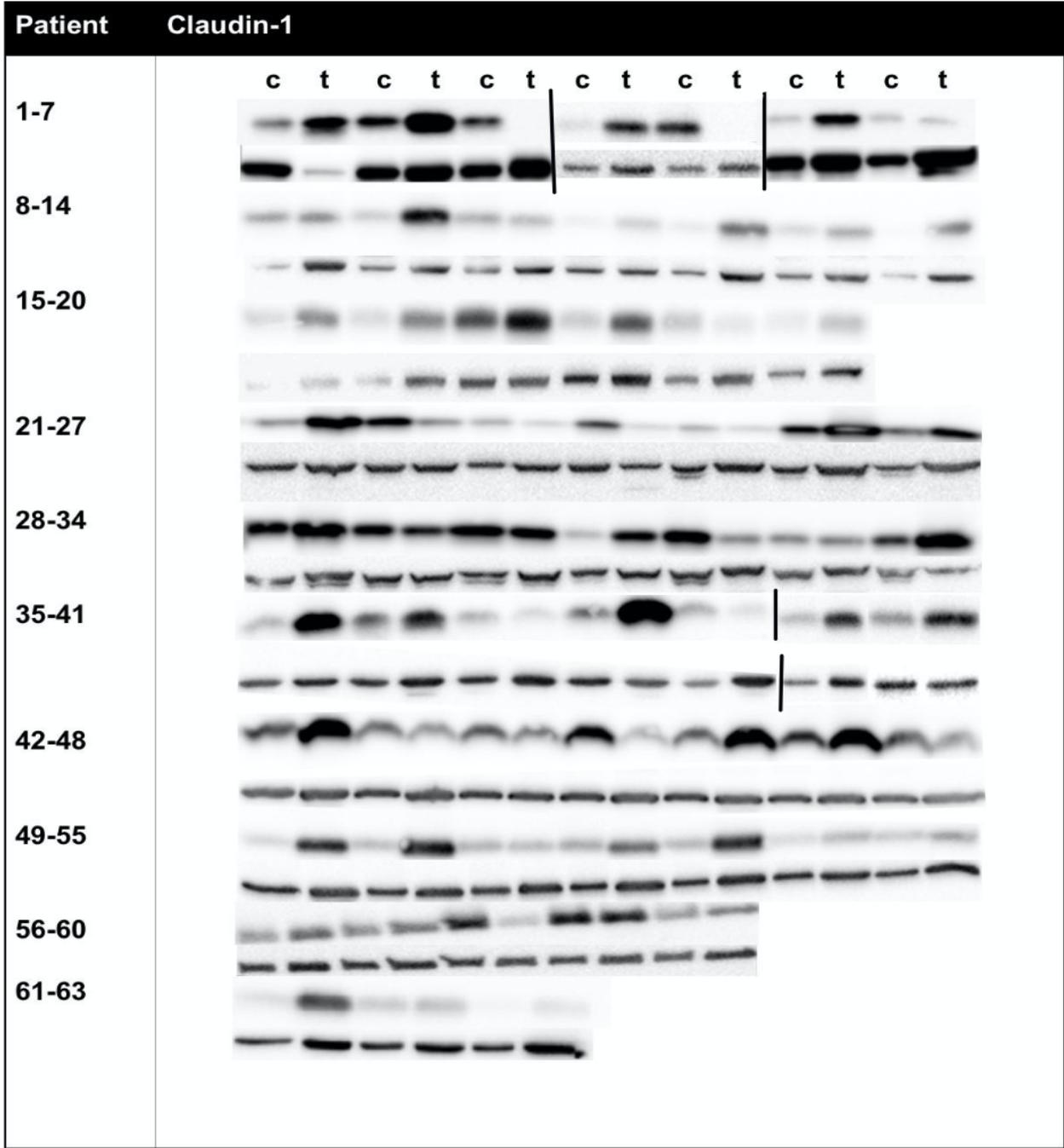
71. Sappayatosok K, Phattarataratip E. Overexpression of Claudin-1 is Associated with Advanced Clinical Stage and Invasive Pathologic Characteristics of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Head and neck pathology*. 2015;9(2):173-80.
72. De Vicente JC, Fernandez-Valle A, Vivanco-Allende B, Santamarta T R, Lequerica-Fernandez P, Hernandez-Vallejo G, Allonca-Campa E. The prognostic role of claudins -1 and -4 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer research*. 2015;35(5):2949-59.
73. Phattarataratip E, Sappayatosok K. Expression of claudin-5, claudin-7 and occludin in oral squamous cell carcinoma and their clinico-pathological significance. *Journal of clinical and experimental dentistry*. 2016;8(3):e299-306.
74. Bello IO, Vilen ST, Niinimaa A, Kantola S, Soini Y, Salo T. Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 and occludin, and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Human pathology*. 2008;39(8):1212-20.
75. Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali M A, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, Black M J, Sladek R, Foulkes W D. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene*. 2002;21(17):2634-40.
76. Yoshizawa K, Nozaki S, Kato A, Hirai M, Yanase M, Yoshimoto T, Kimura I, Sugiura S, Okamune A, Kitahara H, Noguchi N, Kato K, Ueki K, Kawashiri S. Loss of claudin-7 is a negative prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports*. 2013;29(2):445-50.
77. Lourenco SV, Coutinho-Camillo C M, Buim M E, de Carvalho A C, Lessa R C, Pereira C M, Vettore A L, Carvalho A L, Fregnani J H, Kowalski L P, Soares F A. Claudin-7 down-regulation is an important feature in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2010;57(5):689-98.
78. Melchers LJ, Bruine de Bruin L, Schnell U, Slagter-Menkema L, Mastik M F, de Bock G H, van Dijk B A, Giepmans B N, van der Laan B F, van der Wal J E, Roodenburg J L, Schuurin E. Lack of claudin-7 is a strong predictor of regional recurrence in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2013;49(10):998-1005.
79. Zhao X, Sun S, Zeng X, Cui L. Expression profiles analysis identifies a novel three-mRNA signature to predict overall survival in oral squamous cell carcinoma. *American journal of cancer research*. 2018;8(3):450-61.
80. Castro Dias M, Coisne C, Lazarevic I, Baden P, Hata M, Iwamoto N, Francisco D M F, Vanlandewijck M, He L, Baier F A, Stroka D, Bruggmann R, Lyck R, Enzmann G,

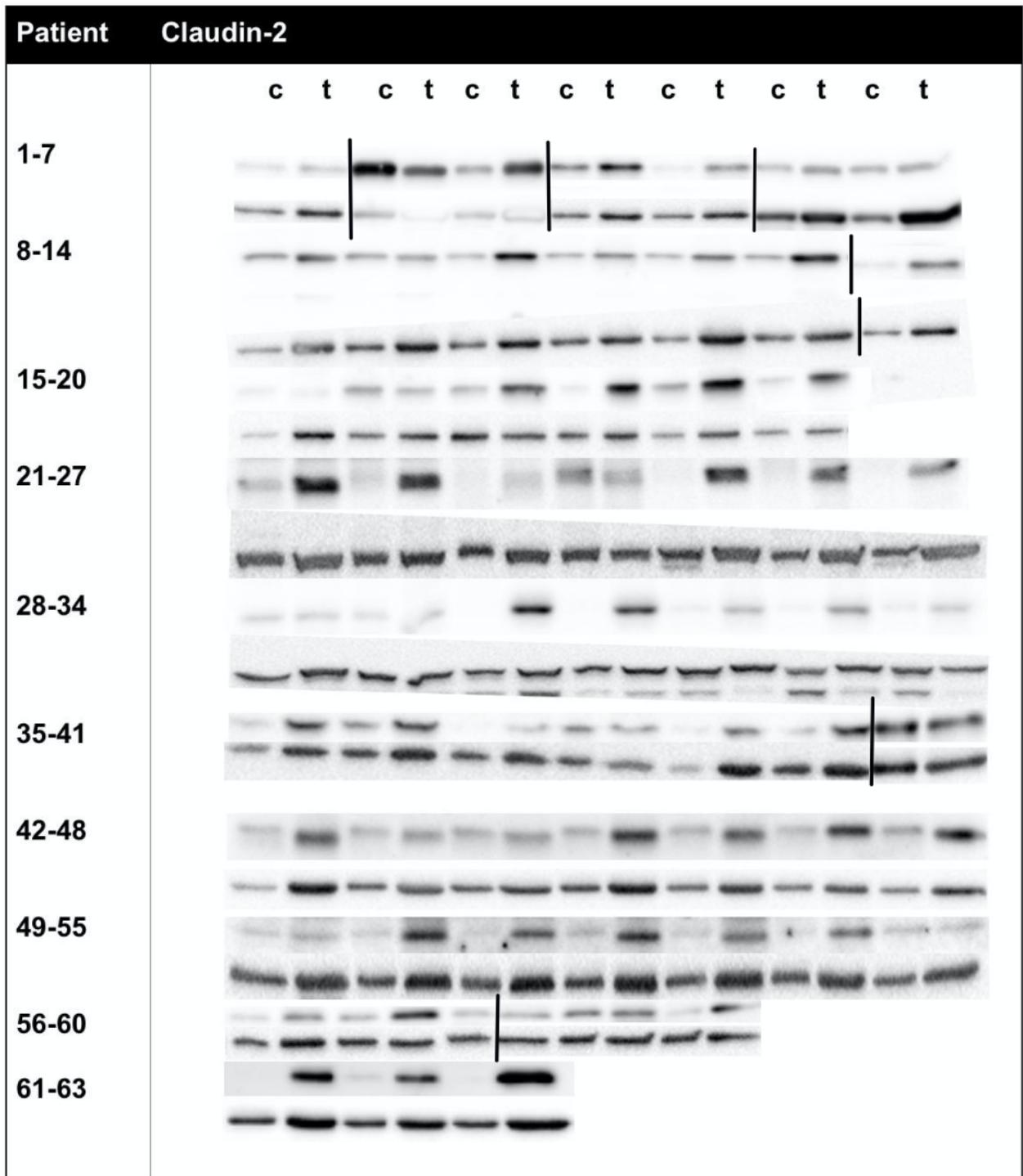
- Deutsch U, Betsholtz C, Furuse M, Tsukita S, Engelhardt B. Claudin-3-deficient C57BL/6J mice display intact brain barriers. *Sci Rep.* 2019;9(1):203.
81. Salvador E, Burek M, Forster CY. Tight Junctions and the Tumor Microenvironment. *Curr Pathobiol Rep.* 2016;4:135-45.
82. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 2002;156(6):1099-111.
83. Mullin JM. Epithelial barriers, compartmentation, and cancer. *Sci STKE.* 2004;2004(216):pe2.
84. Oku N, Sasabe E, Ueta E, Yamamoto T, Osaki T. Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma2 chain via matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane-type MMP-1. *Cancer Res.* 2006;66(10):5251-7.
85. Kimbung S, Kovacs A, Bendahl P O, Malmstrom P, Ferno M, Hatschek T, Hedenfalk I. Claudin-2 is an independent negative prognostic factor in breast cancer and specifically predicts early liver recurrences. *Molecular oncology.* 2014;8(1):119-28.
86. Hashimoto Y, Hata T, Tada M, Iida M, Watari A, Okada Y, Doi T, Kuniyasu H, Yagi K, Kondoh M. Safety evaluation of a human chimeric monoclonal antibody that recognizes the extracellular loop domain of claudin-2. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences.* 2018;117:161-7.
87. Sung CO, Han SY, Kim SH. Low expression of claudin-4 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Annals of surgical oncology.* 2011;18(1):273-81.
88. Bouchagier KA, Assimakopoulos S F, Karavias D D, Maroulis I, Tzelepi V, Kalofonos H, Karavias D D, Kardamakis D, Scopa C D, Tsamandas A C. Expression of claudins-1, -4, -5, -7 and occludin in hepatocellular carcinoma and their relation with classic clinicopathological features and patients' survival. *In vivo (Athens, Greece).* 2014;28(3):315-26.

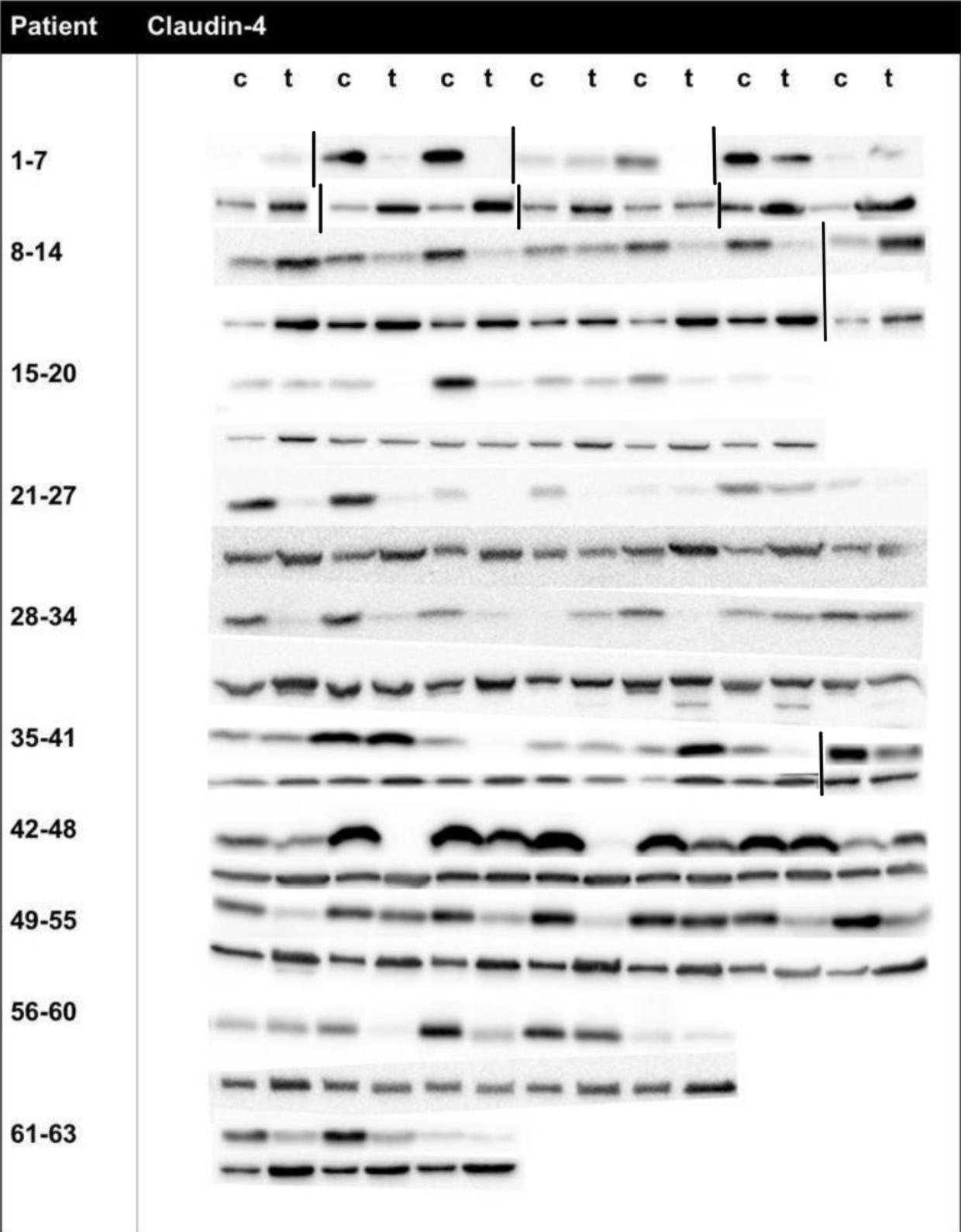
7. Anhang

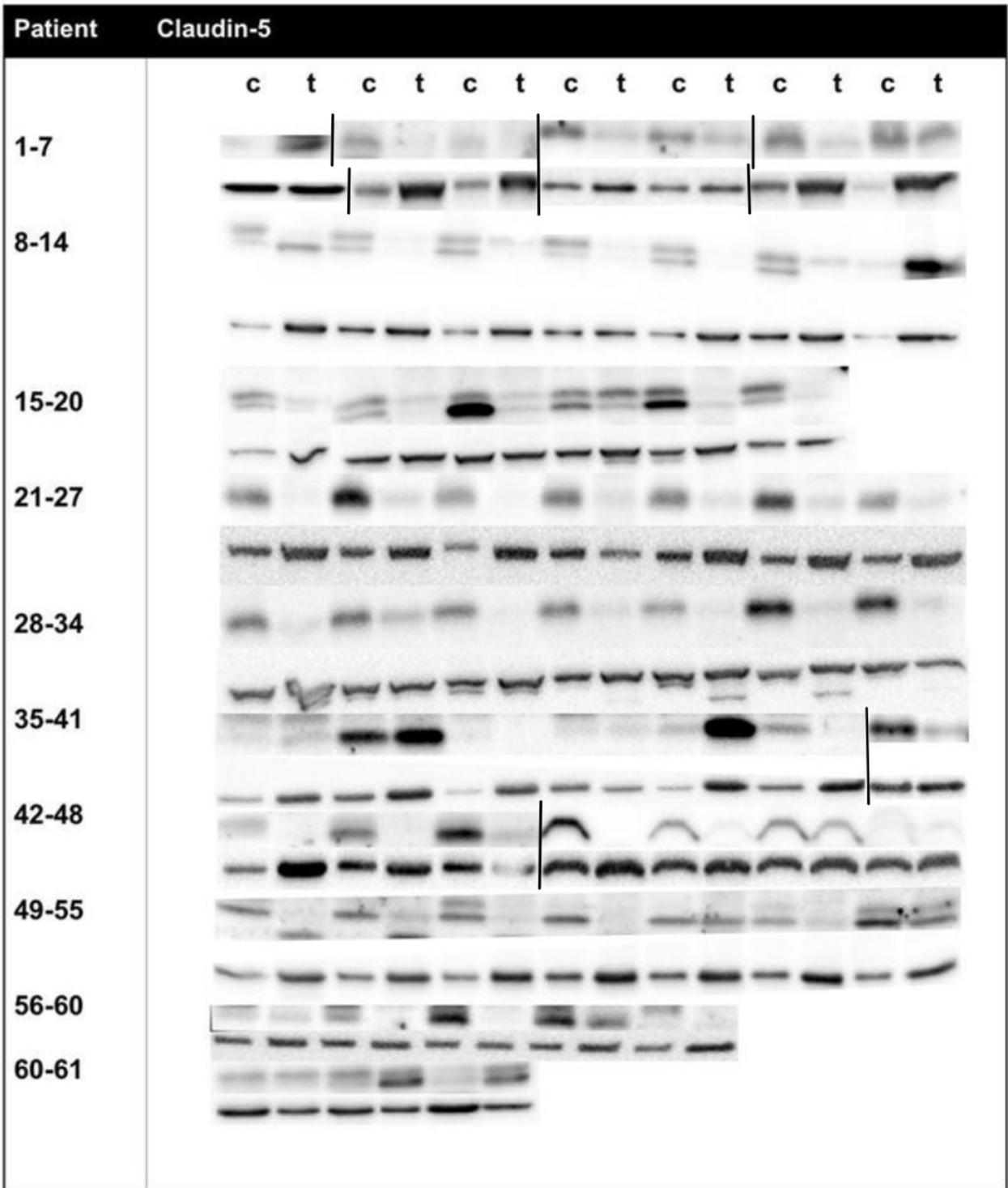
Tabelle 11: Analyse von Claudin-1, -2, -4, -5, -7-Expression in 60 Kontrollen und jeweiligen Tumoren der Mundschleimhaut anhand von Western Blots.

Western Blot Analyse von Claudin-1 (23kDa), Claudin-2 (24 kDa), Claudin-4 (22 kDa), Claudin-5 (23 kDa, bei Doppelbanden die untere Bande) und Claudin-7 (22 kDa) mit unterhalb liegender Ladungskontrolle β -Actin (42 kDa) normiert. Die Patienten 19, 49, 55 sind vollständigshalber mit abgebildet, jedoch sind das Oropharynxkarzinome, die in dieser Studie ausgeschlossen wurden.









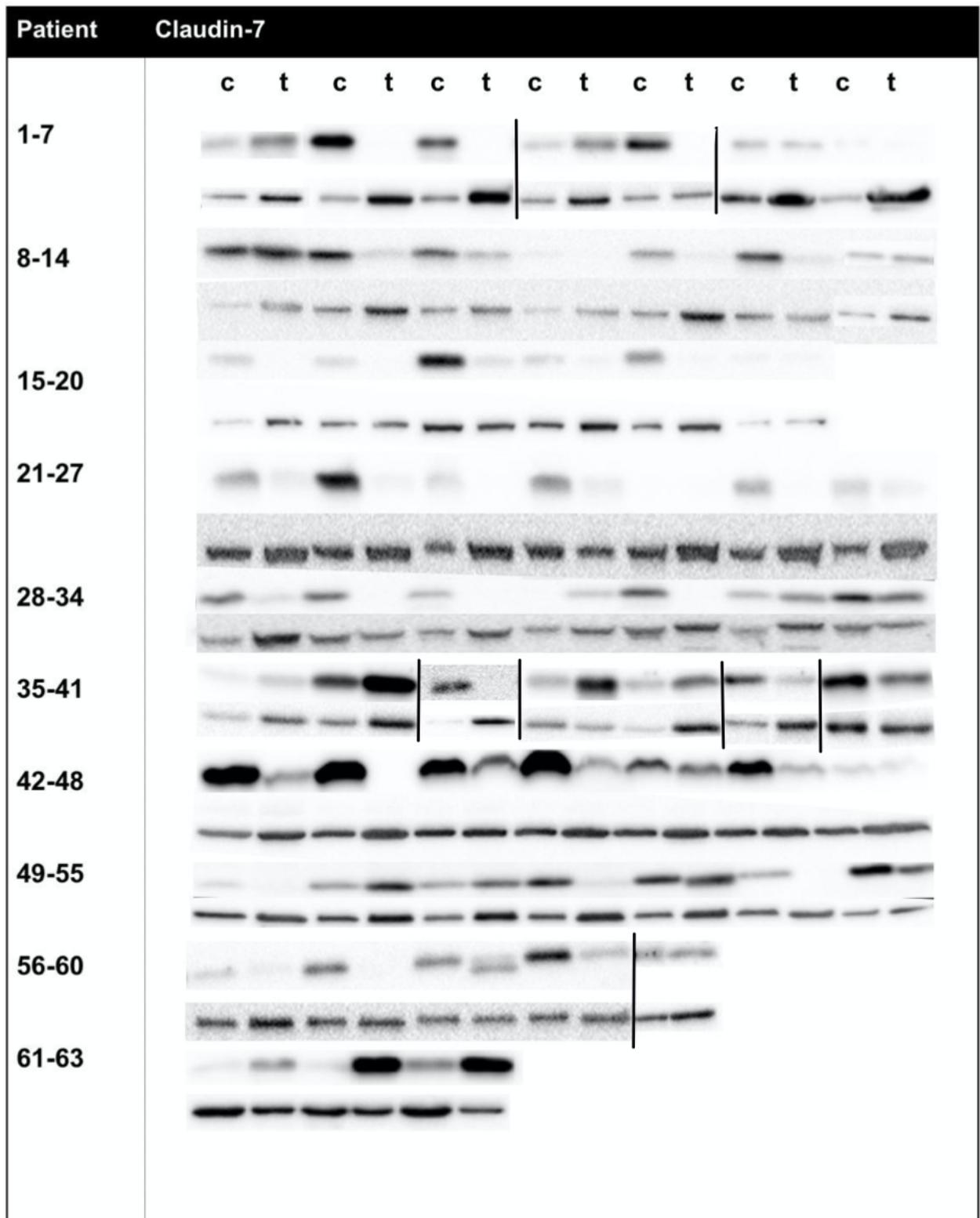
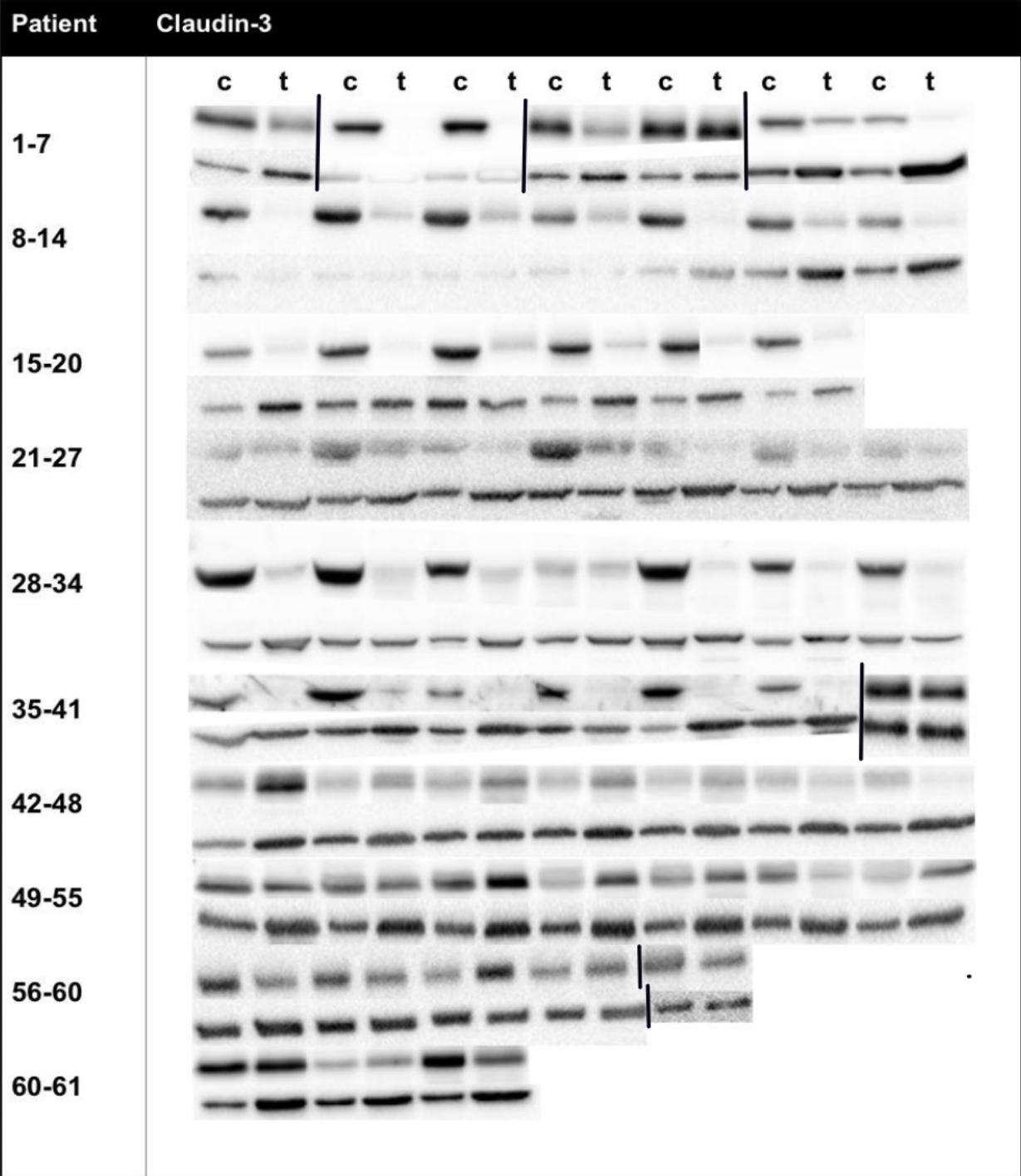


Tabelle 12: Analyse von Claudin-3-Expression in 60 Kontrollen und jeweiligen Tumoren der Mundschleimhaut anhand von Western Blots.

Western Blot Analyse von Claudin-3 in 60 Kontrollen und zugehörigen Tumoren, dabei wurde immer eine Bande bei ca. 55 kDa detektiert und mit unterhalb liegender Ladungskontrolle β -Actin (42 kDa) hier dargestellt. Weitere Analysen unter Verwendung eines Pulldown-Assays und einer Massenspektroskopie zeigten, dass diese Bande nicht Claudin-3 ist. Patienten 19, 49, 55 sind vollständigshalber mit abgebildet, jedoch sind das Oropharynxkarzinome, die in dieser Studie ausgeschlossen wurden.



8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Tatjana Zejc, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Untersuchung der Claudin-Expression im Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut" / "Examination of claudin expression in squamous cell carcinoma of the oral mucosa" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum 01.08.2020

Unterschrift:

9. Lebenslauf

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

10. Publikationsliste

Noch nicht publizierter Artikel:

Eingereicht bei Oral Oncology im August 2020

“Clinical significance of claudin expression in oral squamous cell carcinoma”

Tatjana Zejc^a, Jörg Piontek^a, Jörg-Dieter Schulzke^a, Michael Fromm, Jürgen Ervens^{b‡},
Rita Rosenthal^{a‡}

^aDepartment of Gastroenterology, Rheumatology and Infectious Diseases, Institute of Clinical Physiology/Nutritional Medicine, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, 12203 Berlin, Germany

^bDepartment of Oral and Maxillofacial Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, 12203 Berlin, Germany

[‡]These authors contributed equally to this work.

11. Danksagung

Hiermit möchte ich mich für die Möglichkeit der Durchführung der vorliegenden Studie im Institut für Klinische Physiologie der Medizinischen Fakultät Charité unter Leitung von Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter PD Dr. rer. medic. Rita Rosenthal. Sie hat mich stets bei allem über die gesamte Zeit unterstützt, förderte mich im experimentellen Bereich der Forschung und war die ganze Zeit für meine Fragen offen. Eine bessere Betreuung wäre kaum vorstellbar.

Ich bedanke mich rechtherzlich bei allen Patienten, die an der Studie teilnahmen. Ohne sie wäre die Studie nicht möglich gewesen.

Für die Patientenrekrutierung und Entnahme des Kontrollgewebes sowie PECA der Mundhöhle bedanke ich mich beim Dr. med. Dr. dent. Jürgen Ervens, aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Charité. Er hat stets für reibungslose Durchführung der Eingriffe und sofortigen postoperativen Probentransport persönlich gesorgt. Für die Einarbeitung und Unterstützung im experimentellen Bereich möchte ich mich besonders bei der technischen Assistentin Britta Jebautzke bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Dorothee Günzel und PD Dr. rer. nat. Jörg Piontek Klinische Physiologie der Medizinischen Fakultät Charité für Rat und Tat bei der Durchführung der konfokalmikroskopischen Analyse, des Pulldown Assays und für den fachlichen Austausch zu Claudin-3.

Für die Kooperation mit Dr. Haseloff aus dem Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie und externen Durchführung der Massenspektroskopie bedanke ich mich sehr. Für die Vorbereitung und Zustellung der Paraffinschnitte möchte ich mich bei Frau PD Dr. Korinna Jörens aus dem Institut für Pathologie der Charité Mitte bedanken.

Bei der Dipl.-Math. Fr. Andrea Stroux aus dem Institut für Biometrie und Klinischen Epidemiologie an der Charité bedanke ich mich für die statistische Beratung.

Für das Korrekturlesen meiner Dissertation bedanke ich mich bei meiner Freundin und Kollegin Dr. med. Anna Lisa Hitzegrad.

Anschließend möchte ich mich rechtherzlich bei meiner Familie bedanken. Sie haben mich motiviert, bei allem unterstützt und mir die Durchführung sowie Abschluss der Dissertation ermöglicht.