

Aus dem Institut für Pathologie
des HELIOS Klinikums Bad Saarow
Akademisches Lehrkrankenhaus
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunhistochemische Untersuchungen von
Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx
in Hinblick auf Anwendungsmöglichkeiten einer innovativen
zielgerichteten Therapie („targeted therapy“)

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ursula Höfle

aus Groß-Gerau

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. habil. St. Koch
 2. Prof. Dr. A. Erbersdobler
 3. Prof. Dr. med. V. Krenn

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7
2 Wissenschaftliche Grundlagen	8
2.1 Epidemiologie von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx.....	8
2.2 Pathologie	9
2.2.1 Regulation des Zellzyklus.....	10
2.2.1.1 Das Tumorsuppressorgen p53	11
2.2.1.2 Der Ki-67Antikörper	11
2.2.1.3 Das Cyclin D1 Protoonkogen.....	12
2.2.1.4 Das EGFR Protoonkogen	12
2.2.1.5 Das c-erb-B2 Protoonkogen	13
2.2.1.6 Das c-kit Protoonkogen	13
2.2.1.7 Der PDGFR α Antikörper	14
2.2.2 Regulation der Apoptose.....	15
2.2.2.1 Das bcl-2 Onkogen	15
2.2.3 Adhäsion	16
2.2.3.1 Das E-Cadherin Protein.....	16
2.3 Diagnostik.....	17
2.4 Therapie	18
2.4.1 Bisherige Therapieformen	18
2.4.2 Zielgerichtete Tumorthherapie.....	19
2.5 Aufgabenstellung.....	21
3 Material und Methode.....	23
3.1 Struktur und Versorgungsauftrag des Klinikums Bad Saarow.....	23
3.2 Patientengut.....	24
3.3 Methodische Durchführung der immunhistochemischen Untersuchung.....	26
3.4 Auswertung der immunhistologischen Untersuchung.....	28
3.5 Statistische Auswertung	29
4 Ergebnisse	29
4.1 Geschlechterverteilung.....	29

4.2	Altersverteilung.....	31
4.3	Grading	32
4.4	Lokalisation	33
4.5	p53	35
4.6	Ki-67	39
4.7	Cyclin D1	41
4.8	EGFR	45
4.9	EGFR innere Domäne.....	49
4.10	PDGFR α	53
4.11	bcl-2	57
4.12	E-Cadherin	60
4.13	c-erb-B2 und c-kit.....	64
4.14	Statistische Auswertung der Ergebnisse	64
5	Diskussion	68
5.1	Diskussion zu Material und Methode.....	68
5.1.1	Diskussion zum Patientengut	68
5.1.2	Diskussion zur Datenerfassung.....	68
5.2	Diskussion zu Geschlechterverteilung und Altersverteilung	69
5.3	Diskussion zu Grading	70
5.4	Diskussion zur Lokalisation	72
5.5	Diskussion zu den immunhistochemischen Markern.....	72
5.5.1	p53 72	
5.5.2	Ki-67	75
5.5.3	Cyclin D1	75
5.5.4	EGFR	77
5.5.5	EGFR innere Domäne.....	78
5.5.6	c-erb-B2	78
5.5.7	c-kit 80	
5.5.8	PDGFR α	81
5.5.9	bcl-2	82
5.5.10	E-Cadherin	83
6	Zusammenfassung.....	84
7	Literaturverzeichnis	86
	Danksagung	103

Lebenslauf.....	104
Erklärung.....	105

Abkürzungsverzeichnis

bcl-2	B-cell lymphoma 2
DDR	Deutsche Demokratische Republik
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DÖSAK	Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich
EGF	epidermal growth factor
EGF-R	epidermal factor receptor
EU	Europäische Union
FI	Färbungsintensität
GIST	gastrointestinal stromal tumors
ICD-O	international classification of diseases for oncology
IRS	immunreaktiver Score
kD	kilo Dalton
LSAB	labeled StreptAvidin-Biotin
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PP	Prozentsatz positiver Zellen
TBS	tris buffered saline
TGF	tumor growth factor
TNM	tumor nodes metastasis
UICC	International Union against Cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World health organization

1 Einleitung

Eine Krebserkrankung im Kopf-Hals-Bereich beeinträchtigt häufig wichtige Funktionen wie Atmung, Nahrungsaufnahme und Sprache. Dies geschieht durch den Tumor selbst, aber auch - und zwar oft in weit stärkerem Maße - durch die erforderliche Therapie. Zur Belastung durch die Erkrankung an einem malignen Tumor kommt für den Patienten meist noch das Problem der Lokalisation in sehr exponierter Lage hinzu.

Der Zahnarzt sollte sich bewusst sein, welche große Rolle die Früherkennung eines Tumors der Mundhöhle oder des Rachens im Rahmen der zahnärztlichen Vorsorgeuntersuchung spielt. Oft ist er der Erste, der eine auffällige Veränderung der Schleimhaut diagnostiziert, ohne dass der Patient bereits Beschwerden bemerkt.

In der modernen Tumordiagnostik spielt die Immunhistochemie eine immer größere Rolle. Es lassen sich mit Hilfe der immunhistochemischen Ergebnisse Rückschlüsse auf die Prognose einer Krebserkrankung ziehen. In den letzten Jahren wurden Medikamente entwickelt, die genau auf die Marker abgestimmt sind und eine zielgerichtete Therapie („targeted therapy“) zulassen. Da es durch die Hemmung von übergeordneten Regulatoren zur Inaktivierung nachgeschalteter Signalwege kommt, wird auch der Begriff der „Signalwegstherapie“ gebraucht. Solche Therapien werden derzeit schon bei malignen Erkrankungen anderer Körperregionen angewendet. Von besonderem Interesse für gezielte Therapieansätze sind molekulardiagnostische Methoden, die den Nachweis der entsprechenden Zielstrukturen ermöglichen. Ein derartiger Nachweis liefert nicht nur die Grundlage für die Nutzung dieser neuen Tumorthapeutika, sondern verhindert auch deren Anwendung an Patienten, die von einer solchen Therapie nicht profitieren können, da in ihren Tumoren die Zielstruktur nicht vorhanden ist.

Ziel dieser Studie ist es, den Zusammenhang zwischen dem pathohistologischen Grading und den Ergebnissen aus immunhistochemischen Untersuchungen mit acht immunhistochemischen Markern bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk gilt der Bedeutung dieser Ergebnisse für die Therapie.

2 Wissenschaftliche Grundlagen

2.1 *Epidemiologie von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx*

Bösartige Tumoren der Mundhöhle und des Rachens treten weltweit bei Männern mit 7,9 % an vierter und bei Frauen mit 3,9 % an achter Stelle der zehn häufigsten Tumormanifestationen auf [113].

Die vom Robert-Koch-Institut geschätzte Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland ist bei Männern mit etwa 7650 mehr als doppelt so hoch wie bei Frauen (etwa 2950). Bei Männern stehen damit Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit an achter Stelle. Ihr Anteil an krebsbedingten Sterbefällen beträgt 3,5 %. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei vergleichsweise niedrigen 58, bei Frauen bei 63 Jahren [7]. Aus dem Tumorregister des DÖSAK ergibt sich, dass 77,2 % der Patienten männlich sind, wobei der Altersgipfel bei den Männern zwischen 50 und 60 Jahren liegt, bei den Frauen zwischen 50 und 75 Jahren [60]. Im Sachbericht des Tumorzentrums Land Brandenburg, dem ersten landesweiten, flächendeckenden klinischen Krebsregister in der Bundesrepublik Deutschland, lag die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2005 bei Männern bei 271, bei den Frauen bei 57 (allerdings unter Einbeziehung der Tonsillen, des Nasopharynx und des Oropharynx). Das mittlere Erkrankungsalter der Männer liegt hier bei 58 Jahren, der Frauen bei 65,3 Jahren [124].

Im Vergleich mit den Erkrankungsraten anderer EU-Länder liegt die Inzidenz in Deutschland für Männer wie für Frauen im oberen Drittel. Auch in den anderen Ländern der EU erkranken Männer deutlich häufiger an Mundhöhlen- und Rachenkrebs als Frauen [7].

Krebserkrankungen des Mund- und Rachenraumes gehören zu den Erkrankungen, deren Inzidenz sich in Deutschland bei den Männern nach erheblicher Zunahme in früheren Jahren seit Mitte der 80er Jahre kaum verändert, bei den Frauen auf Grund ihres geänderten Rauchverhaltens jedoch zunimmt. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der tumorbedingten Sterblichkeit. Die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Männern 43 %, bei Frauen 56 %. Erkrankte Männer verlieren durchschnittlich elf, Frauen neun Jahre ihrer Lebenserwartung durch Krebs der Mundhöhle und des

Rachens [7]. Im Land Brandenburg beträgt die alterskorrigierte Fünf-Jahres-Überlebensrate aller Patienten mit einem Karzinom im Mund- bzw. Rachenbereich 45 % [124]. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate hat sich in den letzten vier bis fünf Jahrzehnten nicht verändert [101].

Am häufigsten sind die Tumoren im Mundboden lokalisiert, gefolgt von Unterkieferalveolarfortsatz, Zungenkörper, Wangenschleimhaut, Tonsillarregion, Zungengrund, Oberkieferalveolarfortsatz, weichem und hartem Gaumen [120]. Der prozentuale Anteil der im DÖSAK-Tumorregister dokumentierten Primärerkrankungen der Mundhöhle liegt bei 88 % und im Oropharynx bei vier Prozent. Dabei liegen 50 % der Mundhöhlenkarzinome in der postkaninen Region [60].

Die hauptsächlich mit der Tumorgenese assoziierten Risikofaktoren sind Alkoholabusus, Rauchen, schlechte Mundhygiene und eine bisher noch nicht geklärte Disposition, der wahrscheinlich eine genetische Risikokonstellation zu Grunde liegt.

Die Karzinome der Mundhöhle haben die Eigenschaft, überwiegend in die regionären Lymphknoten zu metastasieren. Fernmetastasen treten relativ selten auf, meist erst im weiteren Fortschritt der Tumorerkrankung, und betreffen hauptsächlich die Lunge. Auch bei vollständiger Entfernung des Tumors im Rahmen der Primärbehandlung bestehen bei den meisten Patienten die kanzerogenen Noxen fort, so dass ein Risiko für die Entstehung von Zweiterkrankungen gegeben ist. Hierzu schwanken die Angaben zwischen 4,3 % und 30 % [60].

2.2 Pathologie

Bei der Entstehung von Malignomen können Störungen des Zellzyklus, der Apoptose oder Veränderungen bei der Zelladhäsion eine Rolle spielen.

Neoplastische Erkrankungen sind durch eine Störung des Gleichgewichts zwischen der Zellvermehrung durch Zellteilung und dem natürlichen Absterben von Zellen oder dem programmierten Zelltod charakterisiert [71]. Das Tumorwachstum kann die Folge aus abnorm gesteigerter autonomer Proliferation und/oder Inhibition des normalen Zellverlustes durch Apoptose sein.

Dabei werden Zellzyklus und Apoptose durch viele Faktoren reguliert. Einige Schlüsselfaktoren können durch speziell entworfene biologische Wirkstoffe angegriffen werden, damit sie die Krebszellen zerstören [61].

2.2.1 Regulation des Zellzyklus

Die zelluläre Proliferation folgt dem schrittweisen Ablauf des Zellzyklus, der bei somatischen Zellen zunächst in die Mitose und die Interphase eingeteilt werden kann [38]. Die Mitose stellt dabei mit den einzelnen Schritten der Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase und einer Dauer von etwa 30 Minuten den kürzesten Abschnitt im Zellzyklus dar [28]. Im ersten Schritt der Interphase, der G1-Phase, vollzieht sich nach der Zellteilung zunächst die Rekonstruktion der Zellproteine zum Wiedererreichen der ursprünglichen Zellgröße und Zellfunktion sowie die Vermehrung der Zellorganellen [38]. Die Dauer der G1-Phase variiert bei verschiedenen Zellarten beträchtlich und beträgt im Stratum basale des Mundschleimhautepithels etwa zehn bis dreizehn Tage [140]. In der ungefähr sechs Stunden langen S-Phase findet anschließend die Synthese der Desoxyribonukleinsäure (DNA) statt. Es folgt die prämitotische Ruhephase G2, die etwa sechs Stunden dauert. In der S-Phase nimmt der zuvor diploide DNA-Gehalt bis zur Tetraploidie zu, die in der G2-Phase erreicht ist und während der Mitose bis zur Zytokinese erhalten bleibt [10, 50, 96]. Alternativ können Zellen nach der Mitose in die G0-Phase eintreten, in der keine Zellteilungsvorgänge stattfinden, aus der aber eine Rückkehr in den Zellzyklus möglich ist. Nach Eintritt in die terminale Differenzierungsphase GT ist eine weitere Zellteilung nicht mehr möglich [38].

Die Proliferation von Zellen ist ein fundamentaler biologischer Mechanismus, der sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielt. Bei der Begutachtung pathologischer Gewebeveränderungen ist die Erfassung der Proliferationsaktivität ein oft gefordertes Kriterium, um das biologische Verhalten dieser Veränderungen charakterisieren zu können [139].

Die Zählung der Mitoserate ist der klassische Ansatz zur Bestimmung der Proliferationsaktivität in Tumoren und spielt neben strukturellen und zytologischen Parametern auch beim Tumor-Grading eine Rolle [119].

Eine andere Möglichkeit zur Beurteilung der Proliferationsaktivität ist neben der Zählung der Mitosen die Bestimmung von Antigenen, die nur in bestimmten Phasen innerhalb des Zellzyklus exprimiert werden [139]. Sie erlangt zunehmend an Bedeutung in der Diagnostik maligner Erkrankungen.

2.2.1.1 *Das Tumorsuppressorgen p53*

Das p53-Gen hat eine Molekülmasse von 53kD und besteht aus 393 Aminosäuren. Es ist ein unter physiologischen Bedingungen auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit von maximal 20 Minuten in nur geringer Konzentration im Zellkern lokalisiertes Phosphorprotein [89].

Am Ende der G1-Phase, vor Eintritt in die S-Phase wird der Zellzyklus von im Genom geschädigten Zellen so lange gestoppt, bis der Schaden repariert ist oder die Apoptose eingeleitet wird. An dieser Stelle des Zellzyklus greift das Tumorsuppressorgen p53 ein und übt seine Funktion als „Wächter des Genoms“ aus. Es verhindert, dass ein genetischer Schaden durch Zellteilung auf die Tochterzelle weitergegeben wird [85, 153].

Das p53 scheint im Zellzyklus von ungeschädigten Zellen keine lebenswichtige Funktion zu besitzen, da Mäuse, die auf Grund eines genetischen Defektes kein funktionsfähiges p53 in ihren Zellen ausbilden, zunächst keine Entwicklungsstörungen zeigen. Im Laufe ihres Lebens entwickeln sie jedoch gehäuft verschiedene Tumoren [34]. Den Zellen fehlt die Kontrollfunktion des p53, wodurch es zu einer Akkumulation von Mutationen und schließlich zur Ausbildung von Tumoren kommt. Es sind mehrere Mechanismen bekannt, die zu einer Inaktivierung und somit zu einem Funktionsverlust von p53 führen.

Treten Mutationen auf, wird die Halbwertszeit des veränderten p53 auf mehrere Stunden verlängert, sodass es dann immunhistologisch im Zellkern in der 10- bis 100-fachen Menge gegenüber nicht transformierten Zellen nachweisbar wird [89].

2.2.1.2 *Der Ki-67Antikörper*

Ki-67 ist ein von Gerdes et al. 1983 entwickelter monoklonaler Antikörper der Maus, der selektiv mit proliferierenden Zellen menschlicher Gewebe reagiert [41]. Das Ki-67-Antigen wird in allen aktiven Zellen des Zellzyklus exprimiert (G1, S, G2 und Mitose), in ruhenden Zellen (G0) ist es jedoch nicht vorhanden [42]. Das Ki-67-Antigen ist ein

Nicht-Histon-Protein, das sich aus Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 345 und 395 kD zusammensetzt [43], wobei das kleinere Protein eine Variante mit der Deletion von Exon 7 ist. Das entsprechende Gen ist auf dem Chromosom 10 lokalisiert [36]. Während der Interphase kann das Antigen ausschließlich im Zellkern gefunden werden, wohingegen während der Mitose der Großteil des Proteins auf die Oberfläche des Chromosoms verlegt wird [129].

2.2.1.3 *Das Cyclin D1 Protoonkogen*

Cyclin D1 ist ein monoklonaler Antikörper und ein Mitglied der großen Gruppe der Cycline. Diese Proteine regulieren Übergänge während verschiedener Phasen des Zellzyklus, indem sie sich mit cyclinabhängigen Kinasen verbinden und diese aktivieren [28, 38]. Die cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6 werden durch die Cycline D1, D2 und D3 aktiviert. Mit Ausnahme dieser Cycline sind Cycline nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus vorhanden. Die Cyclin D1-Expression ist während des Zellzyklus leicht schwankend und erreicht einen Höhepunkt in der G1-Phase, worauf sich auch die regulatorische Bedeutung beschränkt [93, 62].

Das Gen, das für Cyclin D1 kodiert, ist ein Protoonkogen, das auf Chromosom 11 lokalisiert ist [11].

Eine Überexpression des Cyclin D1 bewirkt eine gesteigerte Inaktivierung des Retinoblastoms, das als Tumorsuppressorgen die ordnungsgemäße Fortführung des Zellzyklus reguliert. Diese Inaktivierung führt zu ungehemmtem Wachstum und in der Folge zu einer Tumorerkrankung [58].

2.2.1.4 *Das EGFR Protoonkogen*

Der EGF-Rezeptor ist ein transmembraner Tyrosinkinase-Rezeptor mit 170 kDa. Verschiedene Liganden, wie z. B. TGF- α und Amphiregulin können an den Zelloberflächenrezeptor binden und eine Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität bewirken [157].

Im nicht aktivierten Zustand liegt der EGF-Rezeptor als Monomer vor. Nach Bindung des Liganden EGF oder TGF α kommt es infolge einer Konformationsänderung zur Homodimerisierung des Rezeptors mit einem zweiten EGF-R oder zur Heterodimerisierung, z.B. mit c-erb-B2. Die hierdurch induzierte Nähe der beiden Kinasedomänen führt zur Autophosphorylierung der EGF-R-Tyrosinkinase und zur

Rekrutierung von Adapterproteinen, die Signalkaskaden auslösen, wodurch Tumorproliferation und Apoptosehemmung bewirkt werden [31].

Die Überexpression von EGFR erwies sich bei verschiedenen malignen Tumoren als Kennzeichen für eine schlechte Prognose, z. B. Brust-, Eierstock-, Blasen- und Speiseröhrenkrebs. Auch eine hohe Resistenz bei der Bestrahlung korrelierte mit der EGFR-Überexpression [102].

2.2.1.5 *Das c-erb-B2 Protoonkogen*

Der c-erbB2-Rezeptor (Her2/neu) ist ein vom c-erb-B2 Protoonkogen kodiertes transmembranes Glykoprotein mit 185 kDa, dessen intrazelluläre Domäne Thyrokinaseaktivität aufweist [164] und Homologien zum epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor zeigt [9]. Das c-erb-B2 Protoonkogen ist auf Chromosom 17q lokalisiert.

Die Aktivierung des Rezeptors wird durch Phosphorylierung von spezifischen Tyrosinkinaseresten im Zytoplasma hervorgerufen. Dies führt zur simultanen Stimulation vieler Signalwege [108]. Insbesondere als Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und TGF- α wird dem c-erb-B2 eine wichtige Rolle bei der Übermittlung von Signalen zur Proliferation und Differenzierung zugeordnet [97].

Unter physiologischen Umständen wird das Protein in Epithelien von Mamma, Ovar, Endometrium, Lunge, Gastrointestinaltrakt und Niere sowie im Gehirn exprimiert [103].

Eine Überexpression des p185 Proteins führt zu einer erhöhten Tyrosinkinaseaktivität; die Zellen werden durch chronische Stimulation der Signaltransduktionswege transformiert [12].

2.2.1.6 *Das c-kit Protoonkogen*

Das Produkt des beim Menschen auf Chromosom 4 gelegenen c-kit Protoonkogens [163] gehört zur Klasse der Protein-Tyrosin-Kinase-Rezeptoren [13]. Allen gemeinsam ist eine lange glykosylierte Domäne, die den Liganden extrazellulär bindet, ferner eine hydrophobe transmembranäre und eine zytoplasmatische Region mit Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität. Auf Grund dieser Konfiguration kann man sich die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen als membranassoziierte allosterische Enzyme vorstellen, wobei die ligandenbindende Region von der Region mit Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität durch die Plasmamembran getrennt ist [148].

Bindet der zum c-kit-Rezeptor gehörende Ligand SCF (stem cell factor) an die extrazelluläre Domäne, so resultiert daraus eine Dimerisierung des c-kit-Rezeptors, wonach eine Aktivierung der Tyrosin-Kinase-Funktion der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors erfolgt [168].

Auf Grund des Vorkommens von c-kit-Rezeptoren bzw. c-kit mRNA auf verschiedenen Malignomen lässt sich vermuten, dass das c-kit-Protoonkogen auch in der Tumorentstehung eine Rolle spielt. So wurde c-kit sowohl bei Malignomen des hämatopoetischen Systems [17, 64] als auch bei soliden Tumoren, wie bei bestimmten Formen des Mammakarzinoms [104], kleinzelligen Lungenkarzinomen [104], nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen [116], Melanomen [104], Glioblastomen [88], GISTs (gastrointestinal stroma tumors) [56], einigen Arten von Speicheldrüsenkarzinomen [66] und Keimzelltumoren des Hodens [104], nachgewiesen.

2.2.1.7 *Der PDGFR α Antikörper*

PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor) ist ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor. Die PDGFs bilden eine Familie von Wachstumsfaktoren, deren Mitglieder eine von vier Polypeptidketten enthalten: PDGFR-A, PDGFR-B, PDGFR-C und PDGFR-D [37]. Jede Kette wird von einem individuellen Gen kodiert, das jeweils auf den Chromosomen 7, 22, 4 und 11 lokalisiert ist [149]. Die Polypeptidketten sind durch Aminosäure-Disulfid-Brücken verbunden und bilden Homo- oder Heterodimere, von denen bisher fünf beschrieben wurden: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD. Diese Faktoren üben ihren extrazellulären Einfluss über die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren PDGFR α und PDGFR β aus. PDGFR α kann durch PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB und PDGF-CC aktiviert werden. Die Bindung eines Liganden induziert die Rezeptor-Dimerisierung und die Aktivierung und Autophosphorylierung der Tyrosin-Kinase-Domäne. Hierbei werden Signal-Enzyme aktiviert, wodurch letztlich die Migration, Proliferation und das Überleben der Zelle gefördert werden [15].

Es ist bekannt, dass PDGF in den Blutplättchen produziert und von mononukleären Phagozyten, Endothelzellen, vaskulären Muskelzellen und Megakaryozyten exprimiert wird [105].

PDGF-Expression ist in Glioblastomen [54], Tumoren des Ovars [30] und der Prostata [40] nachgewiesen worden.

In Tumoren trägt PDGF zum autokrinen Wachstum bei oder moduliert das tumorumgebende Stroma, indem es die Angiogenese und das Tumorstadium stimuliert [105].

2.2.2 Regulation der Apoptose

Der physiologische Zelluntergang wird als Apoptose bezeichnet und unterscheidet sich grundlegend von der unregulierten Nekrose [47]. Um die Integrität des Gesamtorganismus nicht zu gefährden, ist die Eliminierung der Zellen einer genauen Regulation unterworfen, deren Programm und biochemischer Apparat Bestandteil jeder Körperzelle sind [46].

Die Apoptose geht mit einer blasigen Veränderung der Plasma- und Zellmembran, der Schrumpfung der Zelle sowie der Fragmentierung und Kondensierung des Chromatins einher. Die Zellorganellen werden nicht geschädigt und der Zellinhalt tritt nicht in die Umgebung aus. Der physiologische Zelltod mündet in sogenannten Apoptose-Körpern, die von Makrophagen und benachbarten Zellen ohne Entzündungszeichen phagozytiert werden. Biochemisch lässt sich bei der Apoptose eine Aktivierung von Proteinasen und endogenen Nukleasen nachweisen [72, 137].

In den Zellen, die einen genetischen Schaden tragen, ist die Initiation der Apoptose in erster Linie von der Funktion des Wildtyp-p-53-Phosphoproteins abhängig, das für eine Unterbrechung in der späten G1-Phase des Zellzyklus verantwortlich ist, bis eine Reparatur des genetischen Schadens stattgefunden hat oder die Apoptose der Zelle eingeleitet wird [85, 28].

Ein weiteres Molekül, das bcl-2 (B-cell lymphoma-2), ist in die Regulation des programmierten Zelltods involviert, indem es die Apoptose sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch im Tumorgewebe inhibiert und zu einem Wachstumsvorteil der Zellen führt [57].

2.2.2.1 *Das bcl-2 Onkogen*

Bcl-2 (B-cell-lymphoma-2-gene) bezeichnet ein Onkogen, das zuerst bei folliculären B-Zell-Lymphomen entdeckt wurde [146]. Das bcl-2-Gen, das sich normalerweise auf dem Chromosom 18q21 befindet, ist bei dieser Erkrankung auf den Locus der schweren Immunglobulinkette des Chromosoms 14 verschoben, was eine vermehrte Expression zur Folge hat [95]. Eine Überexpression fand sich später auch in verschiedenen

epithelialen Malignomen beispielsweise der Lunge, der Schilddrüse, der Brust, der Niere, dem Ovar und dem Magen [114, 118, 33, 22, 82, 86].

Das bcl-2 Onkoprotein befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran, des endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns [1, 161, 57] und hat ein Molekulargewicht von 26 kDa [81].

bcl-2 hemmt die Wildtyp-p53-vermittelte Apoptose und führt die Zellen in ein wachstumsgehemmtes Stadium. Bei vermehrter bcl-2-Expression kommt es zu einer verminderten Apoptoserate, in deren Folge das Risiko einer malignen Transformation ansteigt [23].

Bei zahlreichen hämatologischen und soliden Tumoren wird eine Überexpression von bcl-2 festgestellt, aber auch Translokationen werden als Ursache der vermehrten Präsenz von bcl-2 beobachtet. Dadurch kommt es neben der Hemmung der Apoptose auch zu einer Resistenz der Tumorzellen gegen Radio- und Chemotherapie [80].

2.2.3 Adhäsion

Zelladhäsionsmoleküle sind an allen Schritten der malignen Progression beteiligt [165]. Durch Verlust und Dysregulation von Zelladhäsionsmolekülen geht die geordnete Struktur verloren und Tumorzellen können sich aus dem Gewebeverband lösen [48]. Voraussetzung für die Infiltration bindegewebiger Strukturen ist die Expression von Adhäsionsmolekülen, die an Bestandteile der extrazellulären Matrix binden.

Die Adhäsion von Zellmembranrezeptoren lymphogen metastasierender Tumorzellen an Liganden der Lymphgefäße in den Lymphknoten ist eine Voraussetzung für die Ausbildung von Lymphknotenmetastasen. Hämatogen metastasierende Tumorzellen können über Zelladhäsionsmoleküle an Endothelzellen und die endotheliale Basalmembran binden und damit die Ausbildung von Fernmetastasen induzieren [48, 59].

2.2.3.1 Das E-Cadherin Protein

Der Name E-Cadherin leitet sich aus dem Begriff Calcium-abhängiges Adherin ab. E-Cadherin ist ein Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 120 kD; das kodierende Gen ist auf Chromosom 16q22.1 lokalisiert [39]. Funktionell handelt es sich um ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das Epithelzellen über Calcium-abhängige, homotypische

Interaktionen verbindet [144, 143]. Außerdem ist E-Cadherin entscheidend für die Induktion und Aufrechterhaltung der Zellpolarität und Differenzierung in vitro und in reifen epithelialen Geweben [48].

Da eine reduzierte interzelluläre Adhäsion von Karzinomen häufig mit einer Reduktion bzw. einem Verlust der E-Cadherin-Expression einhergeht, wird postuliert, dass dem funktionellen Verlust von E-Cadherin eine Bedeutung bei der Tumorausbreitung zukommt [14, 67].

2.3 Diagnostik

Neben bildgebenden Verfahren wie Röntgen, Computertomografie, Kernspintomografie, Sonografie, Skelettszintigrafie spielt die histologische Untersuchung bei der Diagnostik eine entscheidende Rolle. Die Histologie liefert nicht nur Aussagen über Art und Dignität des Tumors, sondern auch über tatsächliche Ausdehnung, vollständige Entfernung und Differenzierung. Je nach Ausdehnung der Veränderung wird der Tumor in toto histologisch untersucht oder es wird eine Biopsie durchgeführt, deren Ergebnis die Grundlage für die Therapie bildet.

Die standardisierte morphologische Diagnostik für menschliche Tumoren basiert zumeist auf einer Kombination von Histopathologie und Immunhistologie, die eng mit klinischen Daten verknüpft wird. Den Richtlinien der WHO und UICC folgend, liefert dieses Vorgehen in den meisten Fällen präzise Informationen über Dignität, Gewebeherkunft, Tumortyp, Staging und Grading sowie Informationen über die vollständige chirurgische Entfernung der Läsion. Heute sind diese Daten die wichtigsten Informationen für die Prognose der Erkrankung und die Grundlage für die geplante Therapie.

Da allerdings die Tumormorphologie die Unterschiedlichkeit der Veränderungen in Tumorzellen nur unvollständig widerspiegelt, beobachten Pathologen und Kliniker nicht selten, dass zwei Patienten mit dem anscheinend gleichen Tumortyp einen sehr unterschiedlichen klinischen Verlauf bezüglich Überleben, Metastasierungstyp und Ansprechen auf die Standardtherapie zeigen. Um diese unbefriedigende Situation zu verbessern, wäre eine auf den Gewebeproben aufbauende präzise Vorhersage des tumorbiologischen Verhaltens von eminenter Bedeutung für den einzelnen Patienten [32].

2.4 Therapie

Grundlage für die Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx ist die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Vertretern mehrerer Fachgebiete. Der Zahnarzt steht oft am Anfang und spielt eine wichtige Rolle bei der Früherkennung und der Kontrolle präkanzeröser Veränderungen. Auch wenn die eigentliche Behandlung dem Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen zukommt, werden für diagnostische Maßnahmen auch HNO-Ärzte, Radiologen, Nuklearmediziner, Internisten und Pathologen hinzugezogen. An der Therapie sind oft noch Strahlentherapeuten und Onkologen beteiligt. Am Ende der Therapie trägt der Zahnarzt mit prothetischen und implantatprothetischen Maßnahmen maßgeblich zur Eingliederung des Patienten in ein normales gesellschaftliches Leben bei.

Bei der Therapie von Mundhöhlenkarzinomen besteht der entscheidende Unterschied zu Neoplasien anderer Körperregionen im psychologischen Aspekt. Die Mundhöhlenkarzinome betreffen das Gesicht und die Patienten erleben in dieser exponierten Region das Geschwulstleiden sehr bewusst. Alle therapeutischen Maßnahmen, die mit einer ästhetischen Beeinträchtigung einhergehen, werden als Entstellung empfunden. Deshalb dürfen alle Behandlungsmodalitäten nicht nur unter dem Gesichtspunkt der Verbesserung der Überlebensrate betrachtet werden. Wegen der Bedeutung eines intakten Gesichts für das Selbstwertgefühl des Patienten und zur Sicherstellung der Gesellschaftsfähigkeit müssen die Erhaltung und Wiederherstellung der Funktion und Ästhetik der Gesichtsregion ein wesentlicher Bestandteil der Therapie sein [51].

In der Behandlung bösartiger Erkrankungen findet im Moment ein Paradigmenwechsel statt. Zu den bisherigen Therapieformen Operation, Chemotherapie und Bestrahlung tritt die zielgerichtete Therapie (targeted therapy) hinzu, die sich mit Hilfe von Medikamenten direkt gegen molekulare Mechanismen des Tumorzellwachstums richtet. Sie findet meist in Kombination mit einer Chemotherapie statt [127].

2.4.1 Bisherige Therapieformen

Für das Mundhöhlenkarzinom gilt eine komplette Operation nach wie vor als Therapie der Wahl, wenngleich allgemein akzeptiert wird, dass kleine Tumoren (T1) auch nur bestrahlt werden können [60, 112, 117]. Nach Tucker et al. [147] zeigt die Bestrahlung als alleinige Therapie bei kleinen Tumoren gleiche Ergebnisse wie die Operation.

Ab einem bestimmten Tumorstadium werden die Lymphabflussgebiete in die Operation mit einbezogen. Über die Art der Tumorsektion und den Umfang der Lymphknotenoperation existieren unterschiedliche Lehrmeinungen und Therapiekonzepte. Einigkeit herrscht hingegen darüber, dass bei fortgeschrittenen Tumorstadien die Notwendigkeit einer adjuvanten Therapie besteht. Hier steht die Radiotherapie im Vordergrund, wobei wiederum unterschiedliche Konzepte bezüglich der Dosis und der prä- bzw. postoperativen Applikation sowie einer möglichen Kombination mit Chemotherapie existieren [60].

Die neoadjuvante Chemotherapie wird häufig vor den anderen Möglichkeiten angewandt und kann die folgende Operation oder Bestrahlung erleichtern [150].

Präoperative Radio-Chemo-Therapie als eine neoadjuvante Herangehensweise an die Therapie oraler Plattenepithelkarzinome ist eine mögliche Alternative zu der primären Operation mit postoperativer Bestrahlung [73]. Die neoadjuvante Behandlung ist jedoch häufig mit Wundheilungsstörungen und einer verspäteten funktionellen und ästhetischen Wiederherstellung verbunden [3, 100].

Ferner sollen unnötige adjuvante Therapien vermieden werden, die gerade Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen schwer belasten und durch die sie dem Arbeitsprozess lange fernbleiben [60].

Zu bedenken ist auch, dass selbst die Behandlung kleiner Tumoren durch Strahlentherapie und Operation beträchtliche Folgen wie Xerostomie, Entstellungen und die Beeinträchtigung wichtiger Vitalfunktionen haben kann [27].

Aufgrund der Größe eines Mundhöhlentumors oder seiner Nähe zu vital essentiellen anatomischen Strukturen bzw. aufgrund eines stark reduzierten Allgemeinzustandes können etwa 15 % der Patienten bei der Erstbehandlung nicht operiert werden. Die hier möglichen Therapiebausteine beinhalten zumeist Kombinationen aus Radio- und Chemotherapie. Neben der erstrebten Lebensverlängerung gilt hier der Lebensqualität besonderes Augenmerk [60].

2.4.2 Zielgerichtete Tumorthherapie

Die orale Karzinogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der durch genetische, epigenetische und phänotypische Veränderungen charakterisiert ist. Viele dieser Veränderungen beinhalten die Aktivierung von Signalwegen, die der Zelle vorteilhafte

Eigenschaften beim Wachstum und Überleben geben [142]. Die gestörte Wachstumskontrolle der Tumorzellen kann durch autokrine Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, Überexpression oder Verlust regulatorischer Gene, Genmutation, Genamplifikation, Gendeletion oder Chromosomentranslokation entstehen [31]. Medikamenten, die diese Veränderungen durch gezielte, molekular genau bestimmte Signalwege verhindern oder rückgängig machen können, gilt deshalb erhöhte Aufmerksamkeit [142].

Da in verschiedenen Tumorentitäten der gleiche Signalweg dereguliert sein kann, ist es wahrscheinlich, dass in Zukunft der Signaltransduktionsdefekt und nicht mehr die Tumorentität als Entscheidungskriterium für den Einsatz einer Therapie im Vordergrund steht. Da die Zielstruktur häufig nur in der Tumorzelle vorliegt, zeichnet sich diese Therapieform durch ein geringes Nebenwirkungsprofil aus [31].

Biologische Wirkstoffe, die in der Krebstherapie genutzt werden, damit sie in den Zellzyklus oder die Apoptose eingreifen, sind entweder Gene (Gentherapie) oder monoklonale Antikörper (Immuntherapie) [61].

In den letzten Jahren haben die Bemühungen zur Entschlüsselung der Verbindungen zwischen zellmembranständigen Rezeptoren, aktivierten Rezeptorkinasen und intrazellulären Signalkaskaden erhebliche Fortschritte gezeigt. Dabei wurden eine große Anzahl von potentiellen Inhibitoren und deren therapeutische Zielstrukturen beschrieben (Tab. 1) [32].

Die beschriebenen Substanzen wirken durch Hemmung der Tyrosinkinase, z.B. BMS 354825, oder durch Blockade eines Rezeptors, z.B. Trastuzumab. Ein gutes Beispiel hierfür ist der EGF-Rezeptor, der Homologien zu Her2/neu aufweist (siehe Kapitel 2.2.1.4). Es wird nicht nur die Proliferation des Tumors durch die Hemmung von Wachstumsfaktoren gestört, sondern auch die Angiogenese gehemmt. Die Angiogenese ist für die Progression einer malignen Grunderkrankung ein unabdingbarer Prozess, ohne den wachsende Tumoren von der Nährstoffversorgung abgeschnitten sind.

Der VEGF-Rezeptor spielt in der Gefäßneubildung eine zentrale Rolle. Die Inhibition der VEGF-induzierten Signalkette entweder durch Neutralisierung des Wachstumsfaktors, durch Rezeptorblockade oder durch direkte Hemmung der intrazellulären

Signaltransduktion wird daher seit einigen Jahren als vielversprechendes Ziel zur Entwicklung neuer Therapiestrategien angesehen [74].

Tabelle 1: Auswahl von Substanzen für die zielgerichtete Therapie

Substanz	Tumortyp	Ziel
Trastuzumab Herceptin®	metastasierende Mammakarzinome	Her2/neu
Imatinib Glivec®	CML, GIST	BCR/ABL, PDGFR, KIT
BMS 354825	GIST	c-Kit
Lapatinib	metastasierende Mamma- und Kolonkarzinome	Her2/neu, EGFR
Sunitinib	Nierenzellkarzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	VEGFR, PDGFR, KIT, FLT3, RET
Sorafenib Nexavar®	Nierenzellkarzinom, Melanome	VEGFR, PDGFR, KIT, FLT3, p38, Raf
SU 11248	Mammakarzinom, Lungenkarzinom	PDGFR, VEGFR, KIT, FLT3
Lefunamide	Prostatakarzinom	PDGFR
Vatalanib	metastasierendes Kolorektalkarzinom	VEGFR, PDGFR, c-KIT
Bevacizumab Avastin®	metastasierendes Kolorektalkarzinom	VEGFR
Cetuximab	metastasierendes Kolorektalkarzinom	EGFR
Gefitinib	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	EGFR
Erlotinib	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	EGFR

2.5 Aufgabenstellung

Tumoren gleicher Entität weisen nicht immer identische molekulargenetische Strukturen auf. Die sich dadurch ergebenden Misserfolge bei der konventionellen Therapie fordern die Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze (targeted therapy).

Die molekularen Strukturen, die als Ansatzpunkte für diese targeted therapy dienen, müssen im Vorfeld der Therapie im Tumor nachgewiesen werden, damit effektiv und

zielgerichtet behandelt werden kann. Patienten, in deren Tumoren diese Zielstrukturen nicht nachweisbar sind, können so unnötige Nebenwirkungen erspart bleiben.

Mit Hilfe molekularpathologischer Methoden ist der Nachweis der targets möglich, dies ist im Rahmen der Routinepathologie jedoch ein großer und kostenintensiver Aufwand. Aus diesem Grund werden einfache immunhistochemische Methoden gesucht, mit deren Hilfe die Zielstruktur zuverlässig markiert werden kann.

Ziel dieser Studie war es, mit Hilfe von immunhistochemischen Markern bestimmte Strukturen in zuvor konventionell histologisch untersuchten Schnitten von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx nachzuweisen. Dabei wurden bewusst keine molekulargenetischen Methoden angewandt, weil die routinemäßige und in den meisten Instituten für Pathologie etablierte Immunhistochemie im Vordergrund stehen sollte. Auch prognostische Aussagen, wie z. B. Überlebensraten, waren in der vorliegenden Studie nicht von Interesse.

Insbesondere sollte untersucht werden:

- Korrelieren konventionelle etablierte Zellzyklusmarker (Ki-67, p53) mit morphologischen Befunden?
- Zeigen Marker aus der Gruppe der Tyrosinkinaserzeptoren (EGFR, C-erb-B2, c-kit, PDGFR α) eine Korrelation zum Differenzierungsgrad?
- Gibt es bei dem EGF-Rezeptor, der ein komplexes Bindungsareal darstellt, eine Korrelation zwischen den Ergebnissen von EGFR und EGFR innere Domäne? Lassen sich diagnostisch relevante Unterschiede erkennen?
- Lässt sich mit dem in der Diagnose von Mammakarzinomen schon routinemäßig verwendeten Hercep-Test auch bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx eine Überexpression erkennen?
- Kann man die Anwendung von c-kit bei GISTs auch auf die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Oropharynx übertragen?
- Spielt eine verringerte Apoptoserate (Überexpression von bcl-2) bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx eine Rolle und gibt es eine Korrelation zum Differenzierungsgrad?

- Lässt sich in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx eine reduzierte Aktivität von E-Cadherin erkennen und gibt es einen Zusammenhang mit der Entdifferenzierung?
- Lassen sich bereits in der klinischen Anwendung befindliche zielgerichtete Therapien anderer Körperregionen auf Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Oropharynx übertragen?

3 Material und Methode

3.1 *Struktur und Versorgungsauftrag des Klinikums Bad Saarow*

Das Klinikum Bad Saarow ist 1954 als Zentralkrankenhaus der kasernierten Volkspolizei gegründet worden und fungierte in den folgenden Jahrzehnten als Zentrales Lazarett der Nationalen Volksarmee. Am 1. Dezember 1981 wurde in Bad Saarow die Militärmedizinische Akademie gegründet, die die Ausbildung der Militärmediziner übernahm. Es existierten alle für die klinische Ausbildung notwendigen Kliniken und Institute.

Schon damals wurden nicht nur Armeeingehörige, sondern auch deren Familien und die Zivilbevölkerung der Region in den modern ausgestatteten Abteilungen behandelt. Zum Zeitpunkt der Gründung der Militärmedizinischen Akademie verfügte das Klinikum Bad Saarow über 25 Kliniken und Institute mit 800 Betten.

Nach der Wiedervereinigung der beiden deutschen Staaten 1990 wurde die Militärmedizinische Akademie durch die Bundeswehr übernommen und gehörte ab 1991 zu der HUMAINE Gesellschaft für Klinikmanagement mbH München.

1992 wurde in Bad Saarow das Ost-Brandenburgische-Tumorzentrum (OBTZ) gegründet, das nach dem Strukturkonzept der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Tumorzentren ein regionales Tumorzentrum darstellt. Das Klinikum Bad Saarow ist seitdem Mitglied und klinische Leiteinrichtung des Ost-Brandenburgischen Tumorzentrums, dem zurzeit etwa 70 natürliche und juristische Personen angehören.

Das OBTZ arbeitet fachübergreifend mit Kliniken und niedergelassenen Ärzten der Region zusammen. Durch die Förderung der fachgebietsbezogenen und

interdisziplinären Zusammenarbeit aller an der Tumorbekämpfung beteiligten Ärzte, Einrichtungen und Organisationen, sollen Diagnostik, Therapie, Rehabilitation und Nachsorge sowie die soziale und psychologische Betreuung von Krebspatienten verbessert werden.

Im Juli 1998 fusionierte das Klinikum Bad Saarow mit dem Kreiskrankenhaus Fürstenwalde/Spree, einem kommunalen Krankenhaus der Grundversorgung. Schon vor der Zusammenlegung der beiden Häuser wurden sämtliche Obduktionen sowie die intravitalen bioptischen Untersuchungen des Krankenhauses Fürstenwalde im Institut für Pathologie des Klinikums Bad Saarow durchgeführt.

Seit 1998 ist das Klinikum Bad Saarow Lehrkrankenhaus der Charité Berlin.

Im September 2006 wurde das Klinikum Bad Saarow vom HELIOS Krankenhauskonzern übernommen und verfügt derzeit über etwa 600 Betten. Im Landeskrankenhausbettenplan wird die Einrichtung als Klinikum der erweiterten Regelversorgung geführt.

3.2 Patientengut

Im Rahmen der Studie wurden die durch Fachärzte für Pathologie erstellten Biopsiebefunde des Instituts für Pathologie des Humaine-Klinikums Bad-Saarow aus den Jahren 1988 bis 2001 durchgesehen. Es konnten 603 Fälle mit Tumoren der Kopf-Hals-Region aufgenommen werden. Die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Oropharynx wurden genau erfasst, dabei wurden mit Hilfe eines Erfassungsbogens folgende Daten erhoben:

Jahr, Name, Vorname, Alter, Geschlecht, einsendende Abteilung, Lokalisation, Grading, TNM-Klassifikation.

Die Lokalisation wurde mit dem Tumorlokalisierungsschlüssel der ICD-O (International classification of diseases for oncology) in der deutschen Fassung von 1993 auf der Grundlage der klinischen Angaben festgelegt [154].

Die von Broders 1941 angegebene Einteilung in drei Differenzierungsgrade [16] ist im Rahmen der TNM-Klassifikation [156] erweitert worden:

GX: Differenzierungsgrad nicht bestimmbar

G1: gut differenziert

G2: mittelgradig differenziert

G3: gering differenziert

G4: undifferenziert

Beurteilungsgrundlagen für das Grading sind Zellreichtum, Mitoserate, Zellpleomorphie, Vorliegen von Nekrosen und Verhältnis von Zellen zu Interzellulärsubstanz innerhalb des Tumorgewebes.

Die von der UICC (Union International Contre le Cancer) vorgeschlagene TNM-Klassifikation der Oralkarzinome [156, 53] berücksichtigt die Ausdehnung des Primärtumors (T), die Metastasen in den regionären Lymphknoten (N) und die hämatogenen Fernmetastasen (M):

TX: Primärtumor nicht beurteilbar

T1: Tumor bis 2 cm in größter Ausdehnung

T2: Tumor 2 cm bis 4 cm in größter Ausdehnung

T4: Tumor über 4 cm in größter Ausdehnung

NX: Lymphknoten nicht beurteilbar

N0: keine Lymphknotenmetastasen

N1: Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, bis 3 cm in größter Ausdehnung

N2: Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm bis 6 cm in größter Ausdehnung, oder in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner über 6 cm in größter Ausdehnung, oder in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner über 6 cm in größter Ausdehnung.

N3: Metastase(n) in Lymphknoten, über 6 cm in größter Ausdehnung

MX: Fernmetastasen nicht beurteilbar

M0: Keine Fernmetastasen

M1: Fernmetastasen

3.3 Methodische Durchführung der immunhistochemischen Untersuchung

Die immunhistochemische Behandlung der Schnitte wurde mit der LSAB (Labeled-StreptAvidin-Biotin)-Methode durchgeführt.

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte viermal je zwei Minuten mit Xylol behandelt und unterliefen dann die absteigende Alkoholreihe mit Ethanol, wobei jeder Schritt eine Minute dauerte.

Anschließend wurden die Schnitte zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität fünf Minuten in 270 ml Methanol und 30 ml Wasserstoffperoxid (30 %) getaucht. Danach wurde gründlich mit Leitungswasser gespült und die Schnitte wurden in Tris-Spülpuffer eingestellt.

Es folgte für vier Minuten die Hitzedemaskierung im Dampfdrucktopf mit Citratpuffer. Anschließend wurde wieder in Leitungswasser gespült und in Tris-Spülpuffer eingestellt. Nur der HercepTest für c-erbB-2 durchlief eine Hitzedemaskierung im Wasserbad, wobei die Schnitte in eine Edelstahlküvette, die mit 300 ml Target Retrieval Solution High pH (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) gefüllt war, eingestellt und 40 Minuten im 98 °C heißen Wasserbad inkubiert wurden.

Der jeweilige Primärantikörper wurde mit dem Antikörperverdünnungsmedium (DAKO S2022) in entsprechender Verdünnung (Tab. 2) angewendet. Die Inkubation der Schnitte erfolgte für 60 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Schnitte mit TBS gespült.

Danach wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Antikörper, entsprechend dem verwendeten Kit, für zehn Minuten inkubiert und mit TBS gespült.

Es folgte zehn Minuten lang die Inkubation der Schnitte in Peroxidase markiertem Streptavidin, dann wieder Spülung mit TBS.

Die Schnitte wurden schließlich mit frisch angesetzter Substrat-Chromogen-Lösung inkubiert und danach mit DAB-Substrat aus dem DAKO-Kit (K5001) entwickelt (zehn Minuten).

Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser gespült und für eine Minute mit Hämalaun gegengefärbt.

Es folgte das Bläuen in Leitungswasser und die Entwässerung in der aufsteigenden Ethanolreihe und in Xylol.

Zur Qualitätssicherung der immunhistochemischen Untersuchungen, insbesondere zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper, wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen mitgeführt.

Als Positivkontrollen wurde die Reaktivität der eingesetzten Antikörper mit nicht neoplastisch veränderten Normalgeweben, die in den Präparaten enthalten waren, betrachtet. Für die Neagativkontrolle wurden die polyklonalen Primärantikörper durch eine affinitätsabsorbierte Immunglobulinfraktion vom Kaninchen (DAKO, Code-Nr. X0936), die monoklonalen Primärantikörper durch Mausserum der gleichen Immunglobulinklasse (DAKO, Code-Nr. X0943) ersetzt. Dabei handelt es sich um mit den Primärantikörpern identische Proteinkonzentrationen.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper mit jeweiliger Verdünnung

Antikörper	Hersteller/ Clone	Verdünnung
bcl-2	DAKO/ Clone 124	1:100
HER-2/neu (c-erbB-2-Onkoprotein)	DAKO/ polyklonaler Kaninchen-Anti-Human-Antikörper	vorverdünnt
c-kit	DAKO/ polyklonaler Kaninchenantikörper	1:50
Cyclin D1	DAKO/ Clone DCS-6	1:20
E-Cadherin	DAKO/ Klon 36B5	1:100
EGFR	NOVOCASTRA/ 2-1E1	1:50
EGFR, innere Domäne	NOVOCASTRA/ EGFR 25	1:50
Ki-67	DAKO/ Clone MIB-1	1:200
p53	DAKO/ DO-7	1:150
PDGFR α	Santa Cruz/ polyklonaler Kaninchenantikörper	1:50

3.4 Auswertung der immunhistologischen Untersuchung

Es wurden 94 gut dokumentierte Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Oropharynx ausgewählt, um eine immunhistologische Untersuchung durchzuführen. Dazu wurden die archivierten Paraffinblöcke verwendet und zur Färbung mit verschiedenen Antikörpern Schnitte hergestellt. In den Schnitten wurden jeweils drei zentrale Tumorausschnitte bei 20-facher Vergrößerung im Mikroskop (Olympus BX 50) betrachtet und außer bei Ki-67 und c-erb-B2 sowohl die Intensität der Färbung als auch der Prozentsatz der positiven Zellen erfasst. Aus den Werten der drei Tumorausschnitte wurde der Mittelwert gebildet und die Intensität und der Prozentsatz positiver Zellen in einem Score zusammengefasst. Grundlage war hierbei der Immunreaktive Score (IRS) von Remmele und Stegner [122], der die Färbungsintensität mit dem Prozentsatz positiver Zellen multipliziert. Dabei wurden in dieser Studie folgende Einteilungen vorgenommen:

Färbungsintensität (FI):

- (0) : keine Färbereaktion
- (1) : schwache Färbereaktion
- (2) : mäßige Färbereaktion
- (3) : starke Färbereaktion

Prozentsatz positiver Zellen (PP):

- (0) : keine positiven Zellen
- (1) : bis zu einem Drittel der Zellen sind positiv
- (2) : ein Drittel bis zwei Drittel der Zellen sind positiv
- (3) : zwei Drittel bis alle Zellen sind positiv

$$\text{IRS} = \text{FI} \times \text{PP}$$

Bei Ki-67 wurde in den drei Tumorausschnitten die Anzahl der positiven Zellen in Prozent angegeben und aus den drei Werten der Mittelwert gebildet.

Bei c-erb-B2 kam der HercepTest von DAKO zur Anwendung. Der HercepTest verwendet einen affinitätsgereinigten polyklonalen c-erb-B2-Antikörper. Die Auswertungsrichtlinien basieren auf einem semiquantitativen c-erb-B2-Score, in den der Prozentsatz der positiven Tumorzellen sowie die Art und Intensität der Membranfärbung einfließen (Tab.3):

Tabelle 3: Immunhistochemischer Score (c-erb-B2)

Färbemuster	Score
Keine Färbung oder Membranfärbung in weniger als 10 % der Tumorzellen	0 negativ
Schwache oder kaum sichtbare Membranfärbung in mehr als 10 % der Tumorzellen	1+ negativ
Schwache bis moderate komplette Membranfärbung in mehr als 10 % der Tumorzellen	2+ schwach positiv
Starke, die komplette Membran umfassende Färbung in mehr als 10 % aller Tumorzellen	3+ stark positiv

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms SPSS Student Version 11.0 statt. Dabei wurden klinische und pathologische Daten durch die deskriptive Statistik dargestellt. Die immunhistochemischen Marker wurden miteinander und mit dem pathohistologischen Grading mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Geschlechterverteilung

Von den 94 Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden, waren 81 männlich und 13 weiblich, das entspricht 86 bzw. 14 Prozent (Abb. 1). Über die Jahre betrachtet fällt auf, dass erst ab dem Jahr 1994 Frauen behandelt wurden und dann gleichbleibend

wenige. Bei den Männern ist ab dem Jahr 1997 ein deutlicher Anstieg der Häufigkeit diagnostizierter Plattenepithelkarzinome zu erkennen (Tab. 4, Abb. 2).

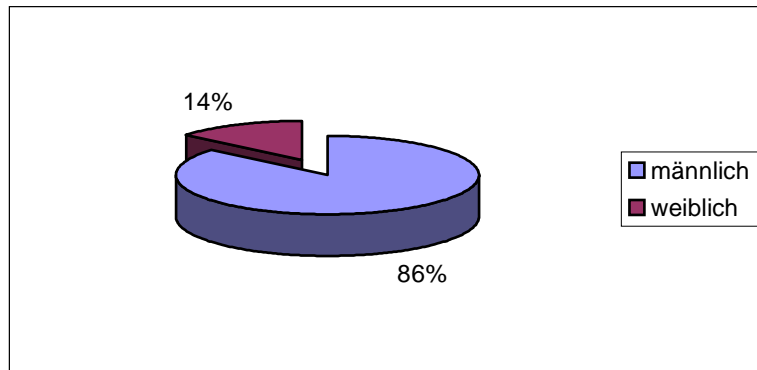


Abbildung 1: prozentuale Verteilung männlich/ weiblich

Tabelle 4: Anzahl diagnostizierter Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Oropharynx aus den Jahren 1990-2002

Jahr	männlich	weiblich	gesamt
1990	4		4
1991	2		2
1992	1		1
1993	3		3
1994	3	1	4
1995	5	1	6
1996	6	2	8
1997	9	1	10
1998	10	1	11
1999	10	1	11
2000	8	2	10
2001	11	2	13
2002	9	2	11

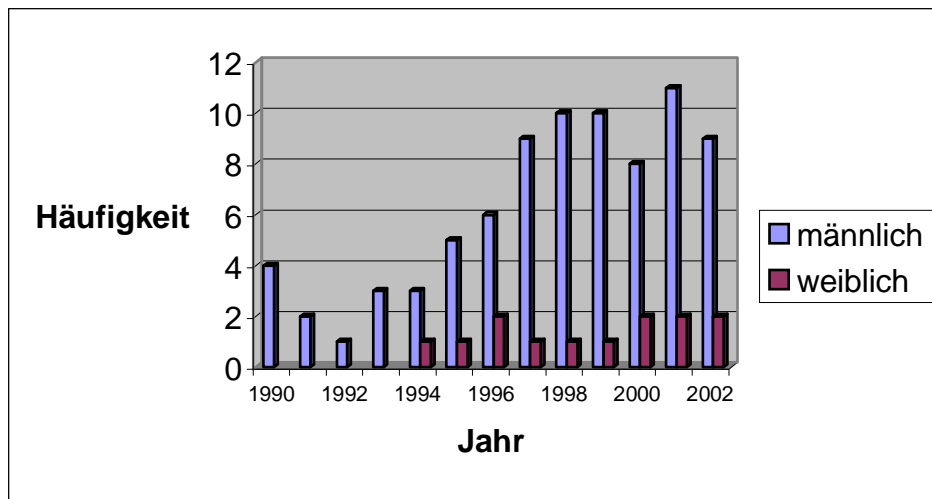


Abbildung 2: Anzahl diagnostizierter Plattenepithelkarzinome pro Jahr

4.2 Altersverteilung

Während sich bei den Männern die Altersspanne über sechs Jahrzehnte erstreckt, treten in dieser Studie Frauen erst ab der sechsten Lebensdekade auf (Tab. 5, Abb. 3).

Die Männer sind im Durchschnitt 55,5 Jahre alt, die Frauen 65,9. Der Median liegt bei den Männern bei 55 Jahren, bei den Frauen bei 69 Jahren.

Bei den Männern lässt sich erkennen, dass die Häufigkeit der Erkrankungen in der fünften und sechsten Lebensdekade am höchsten ist und dann wieder abnimmt. Bei den Frauen ist sie von der sechsten bis zur achten Lebensdekade konstant.

Tabelle 5: Anzahl diagnostizierter Plattenepithelkarzinome in Lebensdekaden

Alter	männlich Anzahl	männlich %	weiblich Anzahl	weiblich %
30 bis 39 Jahre	6	7,4		
40 bis 49 Jahre	23	29,4		
50 bis 59 Jahre	23	28,4	4	30,8
60 bis 69 Jahre	19	23,5	4	30,8
70 bis 79 Jahre	9	11,1	4	30,8
80 bis 89 Jahre	1	1,2	1	7,7

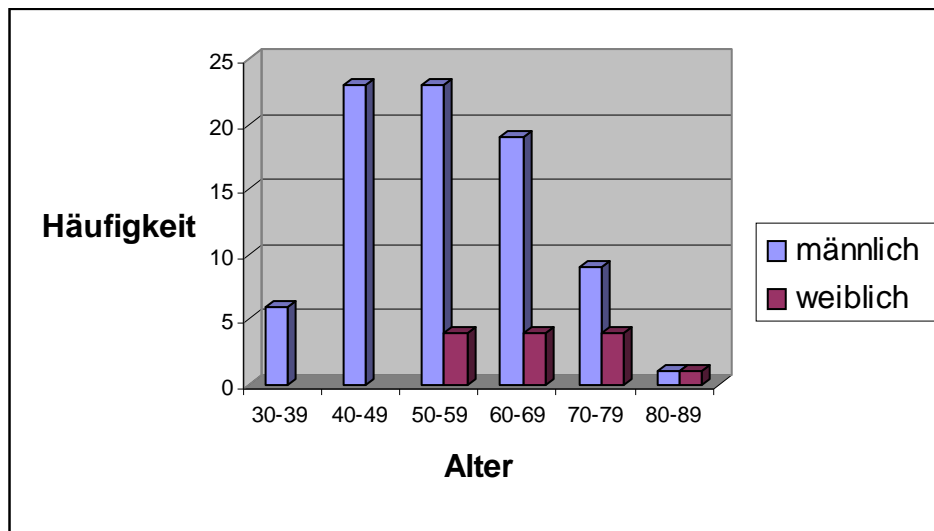


Abbildung 3: Anzahl diagnostizierter Plattenepithelkarzinome in Lebensdekaden

4.3 Grading

Beim Grading zeigte sich, dass in 57 % der Fälle ein mittelgradig differenziertes, in 22 % ein gut differenziertes, in 19 % ein gering differenziertes und in lediglich zwei Prozent ein undifferenziertes Plattenepithelkarzinom vorlag (Tab. 6, Abb. 4)

Tabelle 6: Anzahl Plattenepithelkarzinome in Bezug auf das Grading

Grading	Anzahl	Prozent
1	21	22
2	53	57
3	18	19
4	2	2

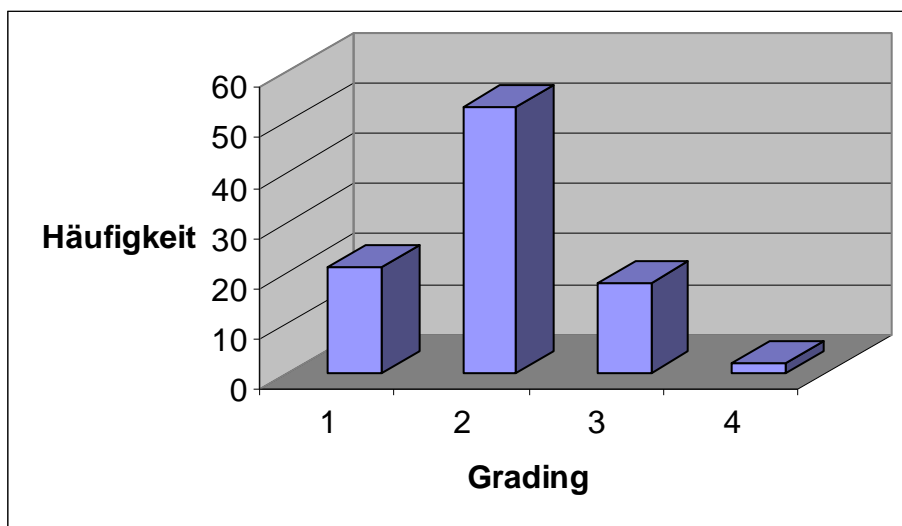


Abbildung 4: Anzahl Plattenepithelkarzinome in Bezug auf das Grading

4.4 Lokalisation

In der Mundhöhle befanden sich 36, im Oropharynx 58 der in die Studie aufgenommenen Plattenepithelkarzinome. Sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen waren mehr Karzinome im Oropharynx lokalisiert (Tab. 7, Abb. 5).

Bei der genaueren Aufteilung der Lokalisationen nach dem Tumorlokalisationschlüssel der ICD-O zeigte sich, dass die Tumoren über fast die gesamte Mundhöhle verteilt waren, mit Schwerpunkten an Zunge und Mundboden. Im Oropharynx kamen die Karzinome vermehrt an den Gaumentonsillen vor, gefolgt vom Zungengrund (Tab. 8).

Tabelle 7: Anzahl diagnostizierter Plattenepithelkarzinome in Bezug auf die Lokalisation

Lokalisation	männlich Anzahl	männlich %	weiblich Anzahl	weiblich %
Mundhöhle	33	40,7	3	23,1
Oropharynx	48	59,3	10	79,9

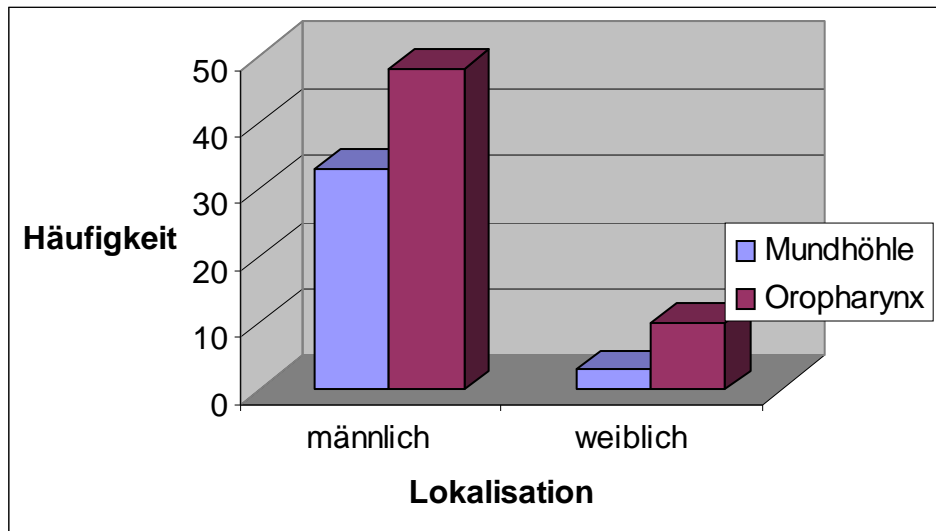


Abbildung 5: Anzahl diagnostizierter Plattenepithelkarzinome in Bezug auf die Lokalisation

Tabelle 8: Anzahl diagnostizierter Plattenepithelkarzinome nach ICD-O- Schlüssel

ICD-O	Lokalisation	Anzahl	Prozent
C01.9	Zungengrund	15	16
C02.0	Zungenrücken	11	11,7
C02.1	Zungenrand	4	4,3
C02.2	Zungenunterfläche	2	2,1
C02.3	Zunge, vordere 2/3	1	1,1
C02.9	Zunge o.n.A.	4	4,3
C04.9	Mundboden o.n.A.	9	9,6
C05.0	harter Gaumen	1	1,1
C05.1	weicher Gaumen	6	6,4
C05.2	Uvula	2	2,1
C06.0	Wangenschleimhaut	2	2,1
C09.0	Tonsillennische	3	3,2
C09.1	Gaumenbogen	4	4,3
C09.8	Tonsille (mehrere Teilbereiche)	1	1,1
C09.9	Tonsille o.n.A.	22	23,4
C10.8	Oropharynx (mehrere Teilbereiche)	1	1,1
C10.9	Oropharynx o.n.A.	4	4,3

4.5 p53

Bei p53-positiven Proben waren die Tumorzellinseln gut durch die rotbraunen Zellkerne zu erkennen. In den meisten Fällen beschränkte sich die positive Reaktion auf den Zellkern, wenige Zellen zeigten auch eine schwache Markierung des Zytoplasmas. Besonders intensive und häufige Färbung zeigten erwartungsgemäß die Zellkerne in den basalen Schichten des Tumorepithels. Auch das tumornahe, nicht neoplastische Plattenepithel wies in einigen Fällen eine nukleäre Färbung auf. Diese war im Stratum basale des Epithels besonders intensiv, weiter differenzierte Zellen in mittleren und superfiziellen Epithelschichten zeigten häufig nur eine geringere oder gar keine Färbung (Abb. 6-Abb. 8).

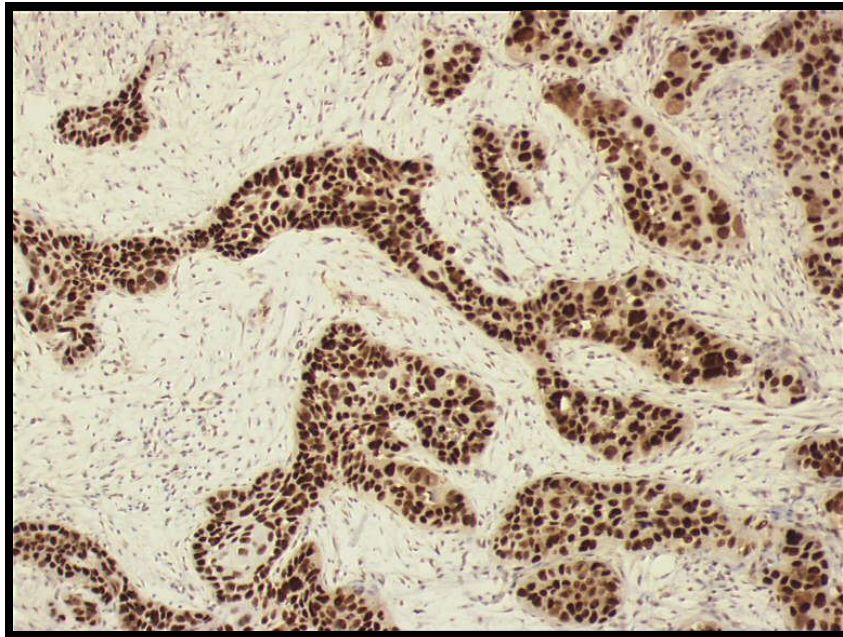


Abbildung 6: p53-Markierung: Es ist eine deutliche Färbung der Tumorzellinseln erkennbar; Originalvergrößerung x4

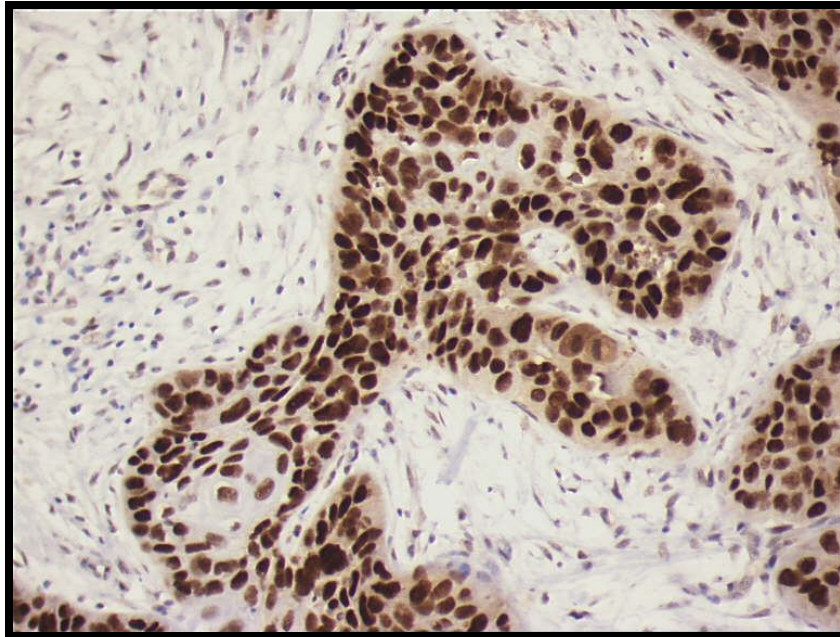


Abbildung 7: p53-Markierung: Vor allem Zellkerne in den basalen Schichten weisen ein intensive Färbung auf; Originalvergrößerung x10

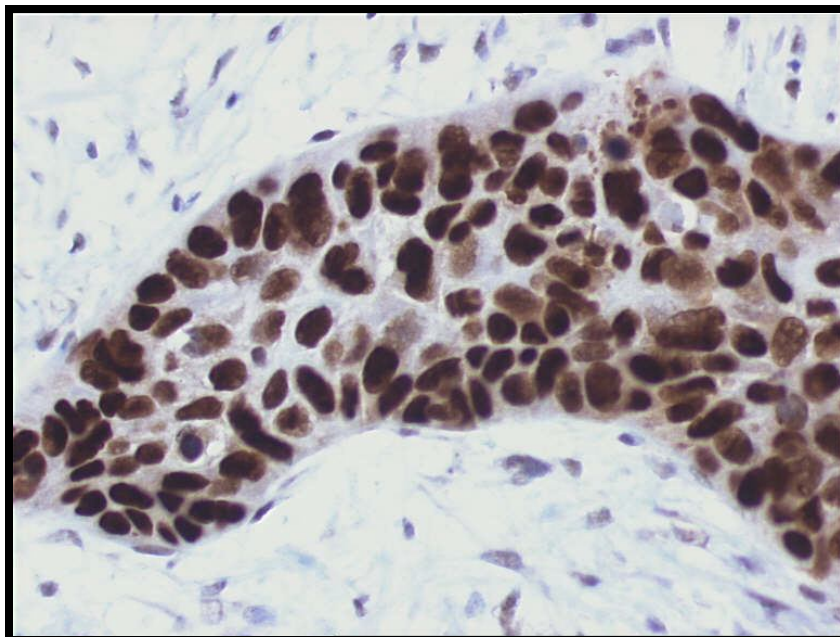


Abbildung 8: p53-Markierung: In einigen Zellen sind auch Teile des Zytoplasmas gefärbt; Originalvergrößerung x20

Bei p53 waren 15 Fälle negativ und die anderen Fälle gleichmäßig über die anderen Rubriken verteilt. Bei der Intensität der Färbung überwog die Zahl der stark angefärbten

Zellen gegenüber den schwach oder mäßig angefärbten Zellen (Tab. 9, Tab. 10, Abb. 9).

Tabelle 9: p53: Anzahl gefärbter Zellen

Anzahl gefärbter Zellen	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	15	16
1 = bis 1/3	25	26,6
2 = 1/3 bis 2/3	28	29,8
3 = 2/3 bis alle	26	27,7

Tabelle 10: p53: Färbungsintensität

Intensität der Färbung	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	15	16
1 = schwach	24	25,5
2 = mäßig	24	25,5
3 = stark	31	33

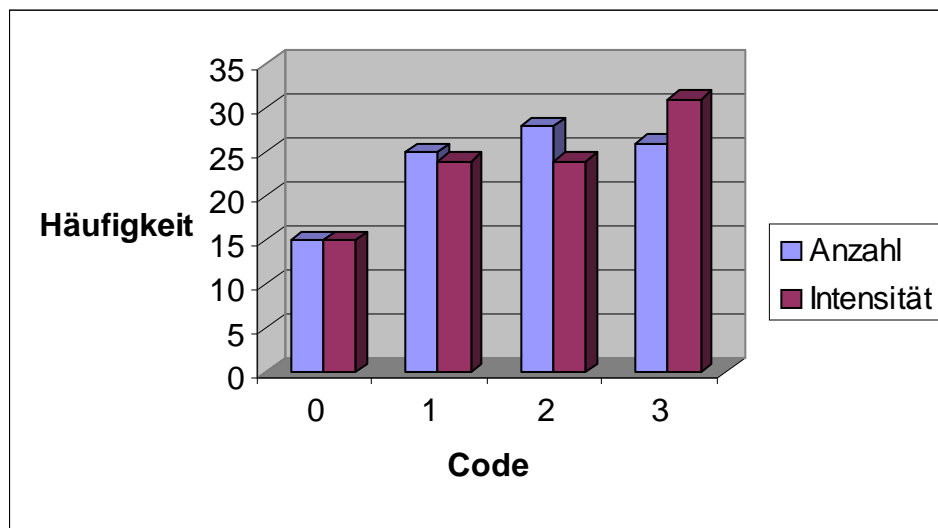


Abbildung 9: p53: Quantität und Intensität der Markierung

Bei Angabe des immunhistochemischen Score-Wertes finden sich bei Wert drei gar keine Fälle, bei Wert sechs nur sieben Fälle und bei Wert neun mit 25 zahlreiche Fälle.

Die übrigen Fälle zeigen einen immunhistochemischen Score-Wert, der sich annähernd gleichmäßig auf die Werte null, eins, zwei und vier verteilt (Tab.11, Abb. 10).

Tabelle 11: p53: immunhistochemischer Score

Immunhistochemischer Score	Häufigkeit	Prozent
0	15	16
1	17	18,1
2	15	16
3	0	0
4	15	16
6	7	7,4
9	25	26,6

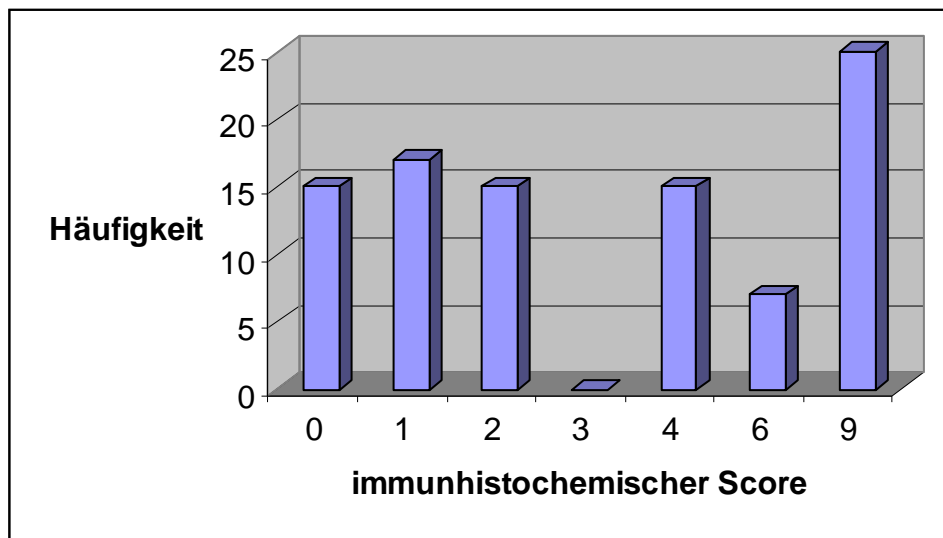


Abbildung 10: p53: Häufigkeit beim immunhistochemischen Score

4.6 Ki-67

Bei der Untersuchung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 zeigten sich unterschiedlich intensive Färbungen der Zellkerne. Häufig waren die positiven Zellen über das gesamte Tumorgewebe verteilt.

Waren nur wenige Zellkerne angefärbt, so befanden diese sich vor allem in basalen, also proliferationsaktiven Schichten (Abb. 11, Abb. 12).

Auch in nicht neoplastischen Gewebeabschnitten außerhalb des invasiv wachsenden Tumors waren erwartungsgemäß Zellschichten, in denen vermehrt Zellproliferation stattfindet, positiv markiert.

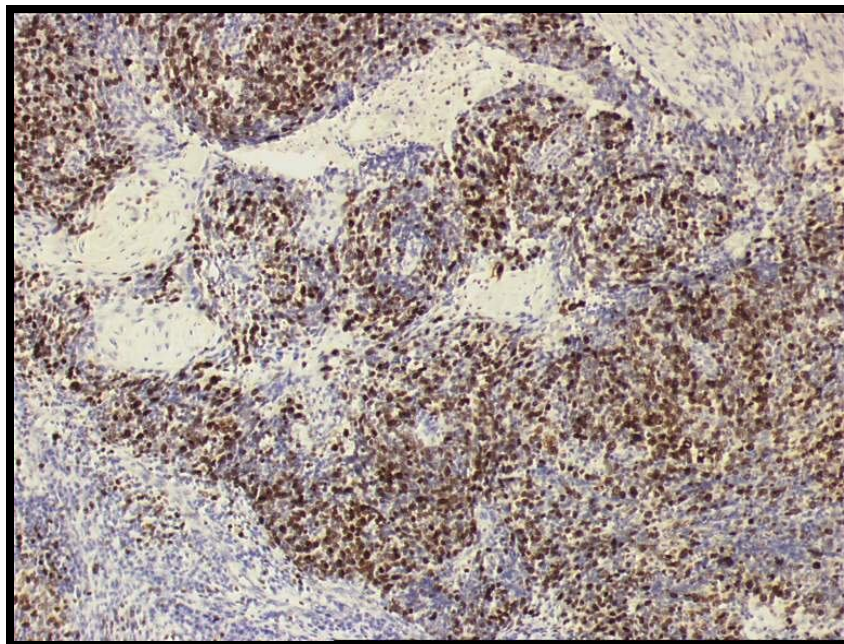


Abbildung 11: Ki-67-Markierung: Verteilung der stark gefärbten Zellkerne über den gesamten Tumorzellverband; Originalvergrößerung x4

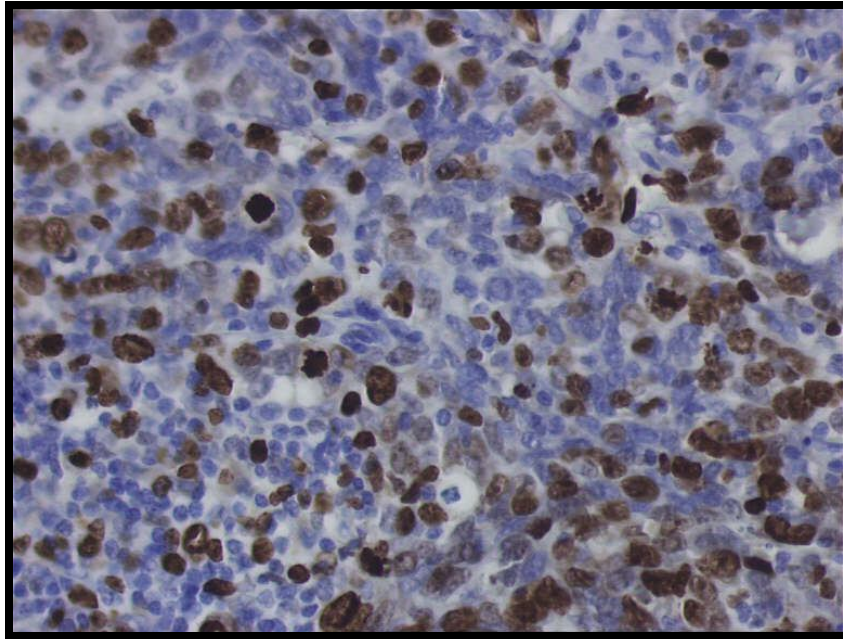


Abbildung 12: Ki-67-Markierung: Die unterschiedlich intensive Färbung der Zellkerne lässt proliferationsaktive Zellen besonders dunkel erscheinen; Originalvergrößerung x20

Nur eine geringe Anzahl der Schnitte zeigte gar keine Färbung. Die meisten untersuchten Areale wiesen eine Färbung von ein Prozent bis 40 % auf. Nur sehr wenige Schnitte zeigten eine hundertprozentige Anfärbung, das heißt, alle Tumorzellen waren angefärbt (Tab. 12, Abb. 13).

Tabelle 12: Ki-67: Anzahl gefärbter Zellen

Prozent der gefärbten Zellen	Häufigkeit	Prozent
Negativ	2	2,1
1-20	37	39,4
21-40	33	35,1
41-60	15	16
61-80	5	5,3
81-100	2	2,1

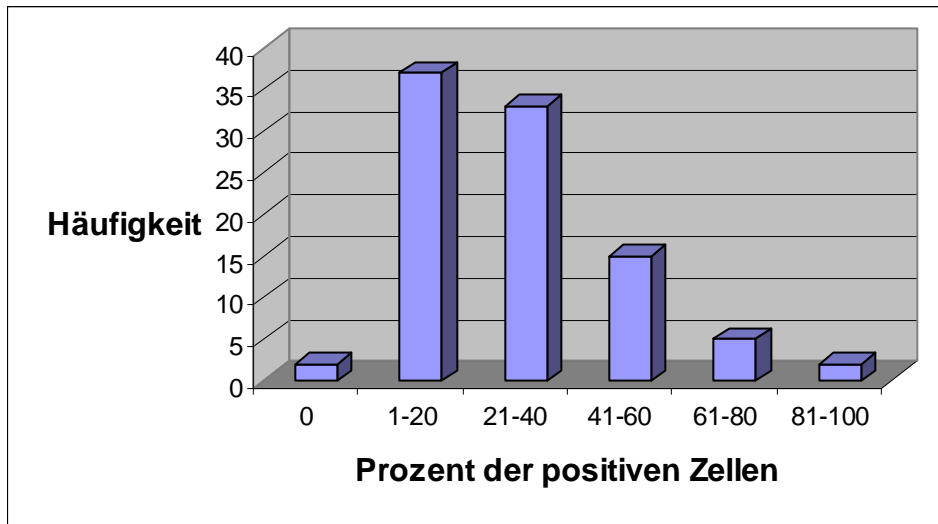


Abbildung 13: Ki67: Häufigkeit positiver Zellen

4.7 Cyclin D1

Die meisten positiven Zellen zeigten sich bei Cyclin D1 in den äußeren Zelllagen, wobei im Stratum basale auch negative Zellen zu finden waren. Die zentral gelegenen Zellen der Tumorzellnester zeigten meist keine Reaktion. Damit waren erwartungsgemäß die proliferationsaktiven Zellen gefärbt.

Die Tumorareale waren gut an den intensiv gefärbten Zellkernen zu erkennen, wobei in Zellen mit nukleärer Färbung häufig auch eine leichte Reaktion des Zytoplasmas zu erkennen war (Abb.14- Abb.16).

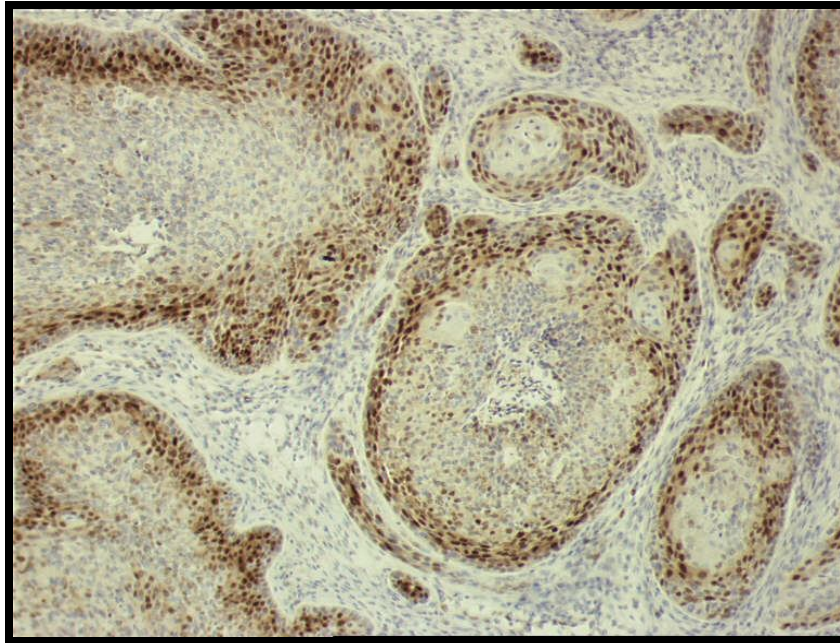


Abbildung 14: Cyclin D1-Färbung: In den äußeren Zelllagen der Tumorformation ist eine deutliche nukleäre Färbung zu erkennen; Originalvergrößerung x4

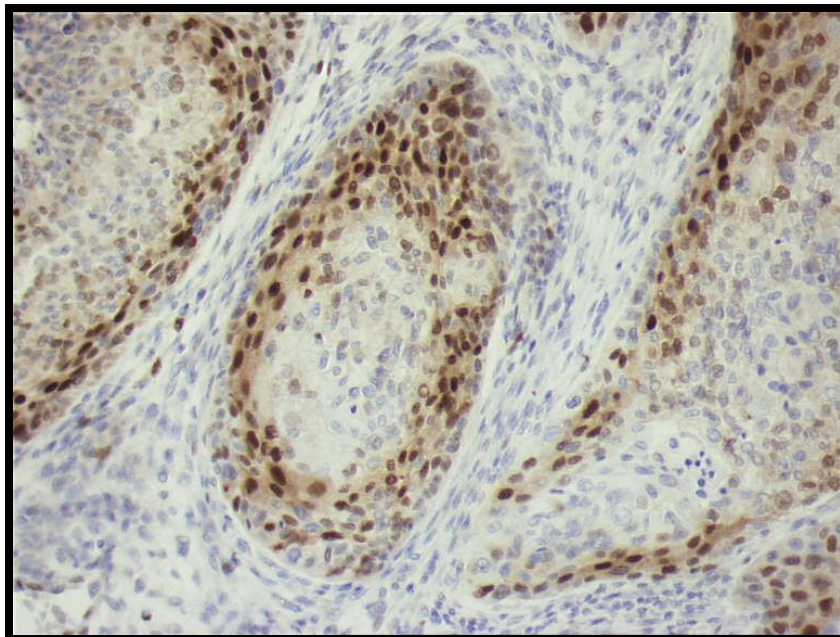


Abbildung 15 : Cyclin D1-Markierung: Zentrale Areale der Tumorzellnester weisen häufig keine Färbung auf. Originalvergrößerung x10

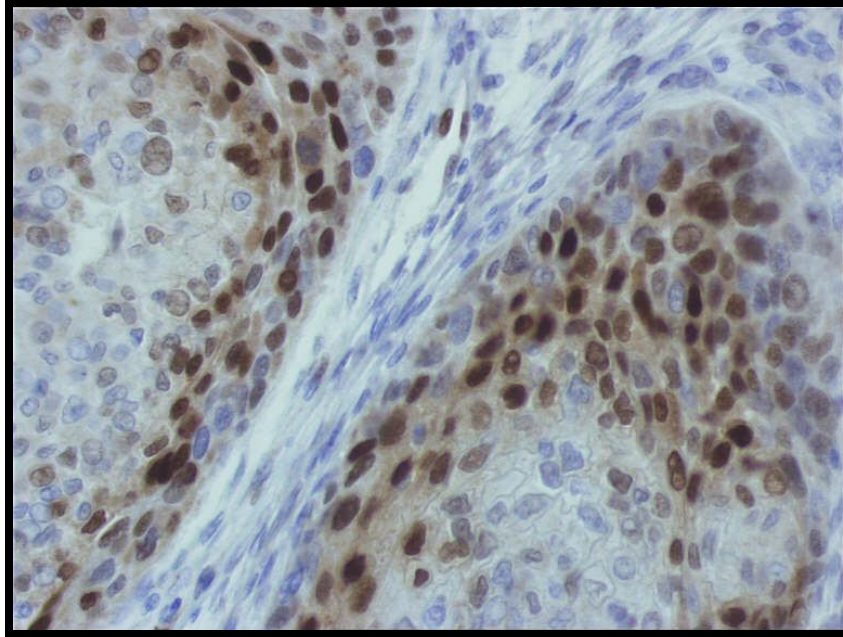


Abbildung 16: Cyclin D1: Vor allem in Zellen mit nukleärer Färbung lässt sich auch eine geringe positive Reaktion des Zytoplasmas feststellen. Originalvergrößerung x20

Bei Cyclin D1 hatten die Anzahl der gefärbten Zellen und deren Intensität eine ähnliche Verteilung mit etwa der Hälfte aller Fälle in der Kategorie zwei. Nur eine Probe zeigte gar keine Färbung (Tab. 13, Tab. 14, Abb. 17).

Tabelle 13: Cyclin D1: Anzahl gefärbter Zellen

Anzahl gefärbter Zellen	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	1	1,1
1 = bis 1/3	25	26,6
2 = 1/3 bis 2/3	53	56,4
3 = 2/3 bis alle	15	16

Tabelle 14: : Cyclin D1: Intensität

Intensität der Färbung	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	1	1,1
1 = schwach	25	26,6
2 = mäßig	47	50
3 = stark	21	22,3

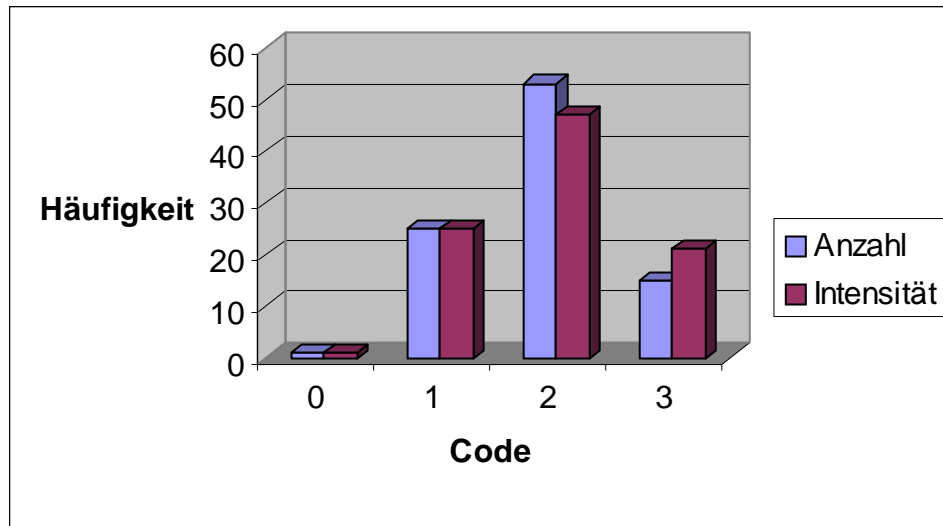


Abbildung 17: Cyclin D1: Quantität und Intensität der Markierung

Der immunhistochemische Score wies eine Häufung der Fälle bei Wert vier, gefolgt von sechs, neun, eins und vier auf. Kein Schnitt zeigte Wert zwei oder drei (Tab. 15, Abb. 18).

Tabelle 15: Cyclin D1: Immunhistochemischer Score

Immunhistochemischer Score	Häufigkeit	Prozent
0	1	1,1
1	25	26,6
2	0	0
3	0	0
4	46	48,9
6	8	8,5
9	14	14,9

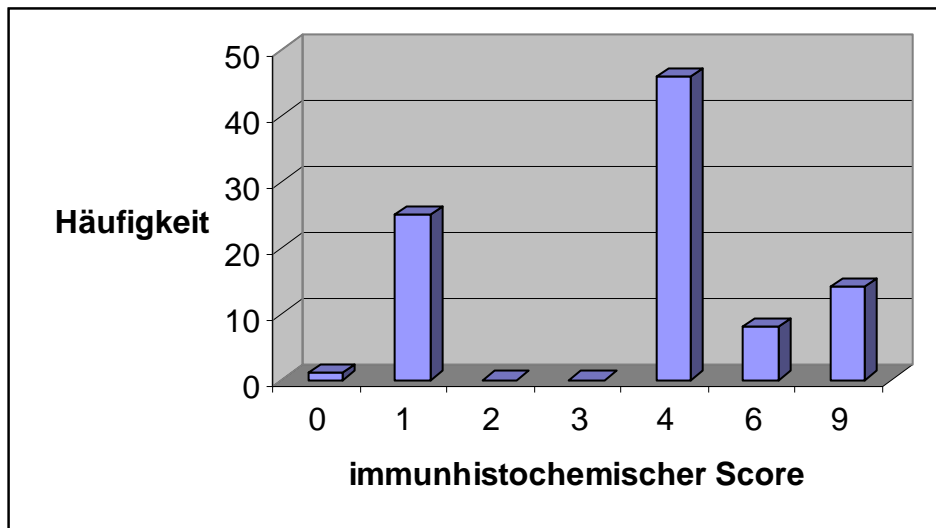


Abbildung 18: Cyclin D1: Häufigkeit beim immunohistochemischen Score

4.8 EGFR

Die EGFR-positiven Tumorzellen waren deutlich an einer intensiven Färbung zu erkennen. Wie erwartet färbten sich die basalen Zellschichten, der Sitz des EGF-Rezeptors, besonders intensiv, wobei dort auch eine positive Reaktion des Zytoplasmas zu verzeichnen war. In den inneren Lagen der Tumorzellen wiesen die Zellen häufig keine zytoplasmatische Färbung auf; die nicht gefärbten Zellkerne traten besonders deutlich hervor (Abb. 19 - Abb. 21).

Im normalen Plattenepithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumors zeigte sich vor allem in der Basalmembran eine positive Reaktion.

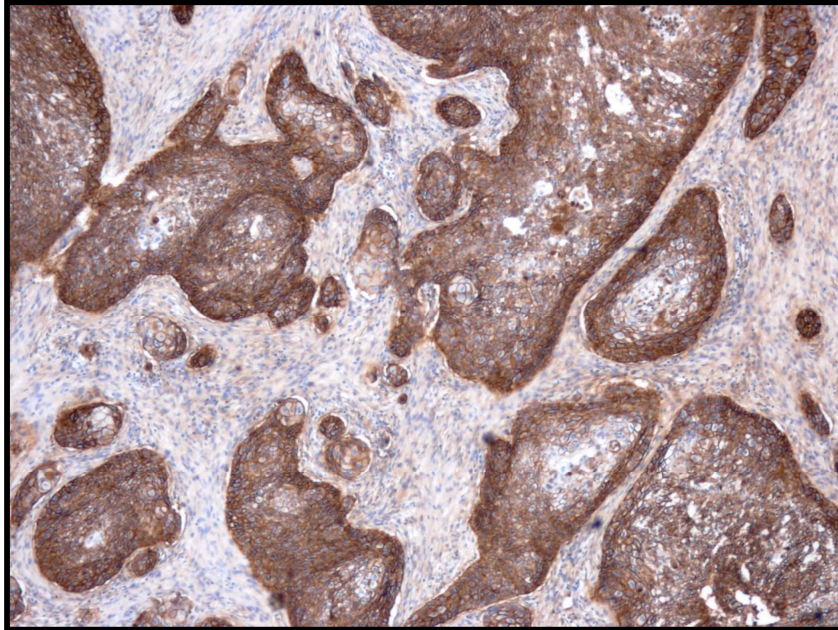


Abbildung 19: EGFR-Markierung: Die Tumorareale sind intensiv gefärbt; Originalvergrößerung x4

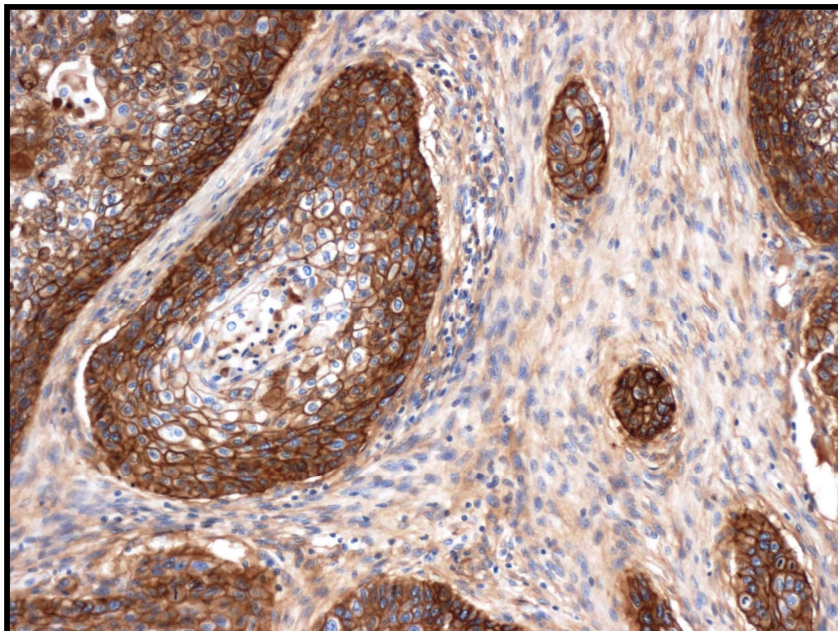


Abbildung 20: EGFR-Markierung: Die Färbung ist in den äußeren Schichten der Tumorzellcluster besonders intensiv; Originalvergrößerung x10

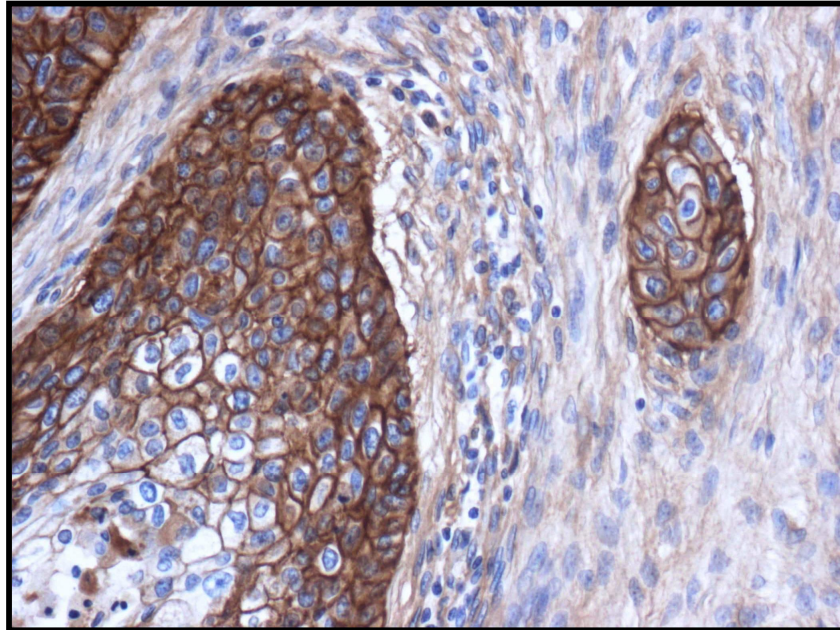


Abbildung 21: EGFR-Markierung: Die Zellmembranen zeigen in allen Tumoranteilen eine positive Reaktion, in den äußeren Zelllagen ist auch das Zytoplasma gefärbt; Originalvergrößerung x20

Alle Fälle zeigten eine Färbung, die nur in etwa 19 % mäßig intensiv ausfiel, alle anderen zeigten eine starke Intensität. In über 95 % der Fälle waren 2/3 bis alle Zellen gefärbt (Tab. 16, Tab. 17, Abb. 22).

Tabelle 16: EGFR: Anzahl gefärbter Zellen

Anzahl gefärbter Zellen	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	0	0
1 = bis 1/3	0	0
2 = 1/3 bis 2/3	4	4,2
3 = 2/3 bis alle	92	95,8

Tabelle 17: EGFR: Intensität

Intensität der Färbung	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	0	0
1 = schwach	1	1,1
2 = mäßig	17	17,7
3 = stark	78	81,2

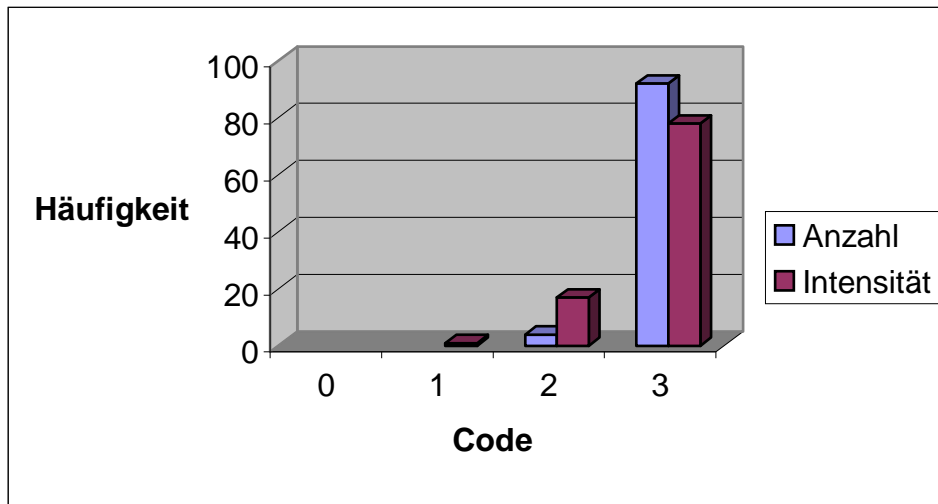


Abbildung 22: EGFR: Quantität und Intensität der Markierung

Das deutliche Ergebnis bei der Anzahl der gefärbten Zellen und der Intensität der Färbung spiegelt sich auch im immunhistochemischen Score. Über 80 % der Fälle haben den Wert neun, zeigen also sehr viele positive Zellen, die zugleich intensiv gefärbt sind (Tab. 18).

Tabelle 18: EGFR: Immunhistochemischer Score

Immunhistochemischer Score	Häufigkeit	Prozent
0	0	0
1	0	0
2	1	1,1
3	0	0
4	3	3,1
6	13	13,5
9	79	82,3

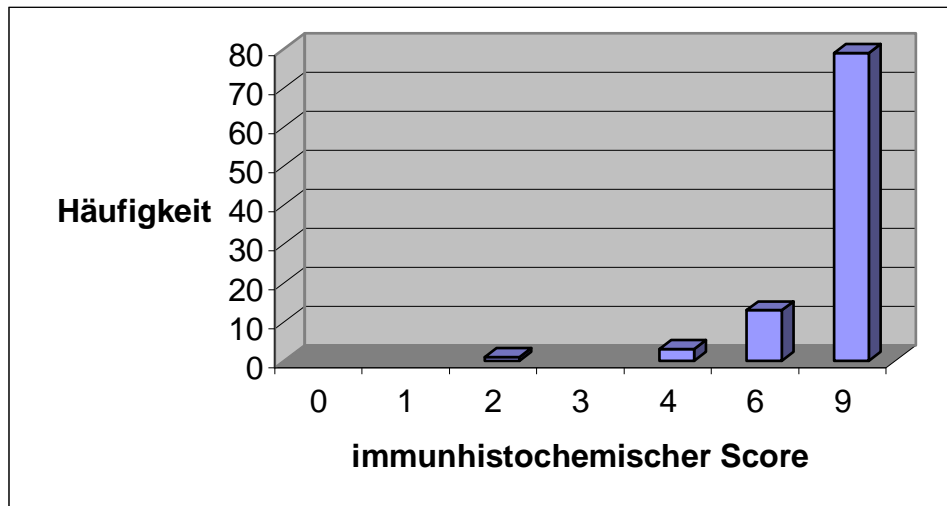


Abbildung 23: EGFR: Häufigkeit beim immunohistochemischen Score

4.9 EGFR innere Domäne

Erwartungsgemäß zeigte sich bei EGFR innere Domäne ein ähnliches Färbungsmuster wie bei EGFR, allerdings in deutlich schwächerer Intensität. Auch hier waren in den basalen Schichten der Tumorzellcluster die Zellmembran und das Zytoplasma deutlich gefärbt. Im Inneren der Tumornester zeigte sich meist nur eine membranöse Reaktion (Abb. 22 - Abb. 24).

Das Plattenepithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumors wies eine Färbung der Zellmembran in den äußeren Zellschichten auf.

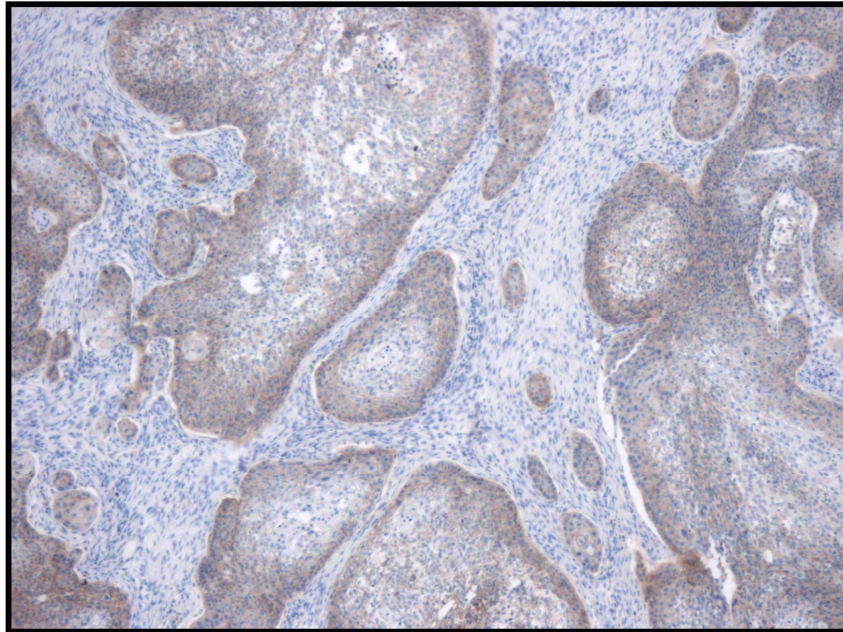


Abbildung 24: Markierung von EGFR innere Domäne: Die Färbung erscheint insgesamt schwächer als bei EGFR; Originalvergrößerung x4

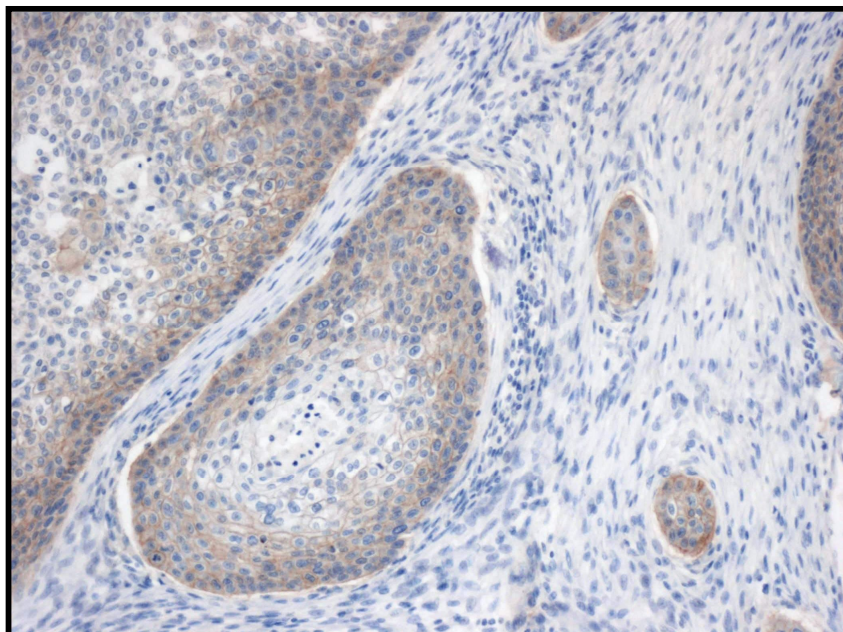


Abbildung 25: Markierung von EGFR innere Domäne: Die basalen Zellschichten sind intensiver gefärbt als das Innere der Tumorinseln; Originalvergrößerung x10

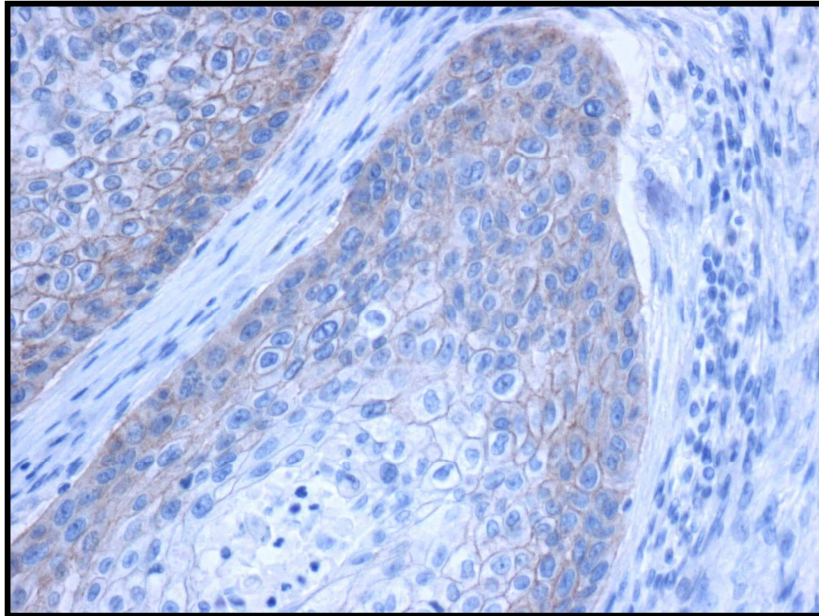


Abbildung 26: Markierung von EGFR innere Domäne: Die äußeren Zellschichten zeigen eine deutliche Färbung des Zytoplasmas, die positive Reaktion der Zellmembran ist auch im Inneren der Tumoringeln erkennbar; Originalvergrößerung x20

Die Ergebnisse bei EGFR innere Domäne sind weniger deutlich als bei EGFR, die Tumoren zeigen aber auch immer eine positive Reaktion und in lediglich zwei Fällen sind nur bis zu 1/3 der Zellen gefärbt. In über 85 % der Fälle liegt die Intensität bei mäßig oder stark, wobei mehr Zellen eine mäßige Färbung aufweisen (Tab 19, Tab. 20, Abb. 27).

Tabelle 19: EGFR innere Domäne: Anzahl gefärbter Zellen

Anzahl gefärbter Zellen	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	0	0
1 = bis 1/3	2	2,1
2 = 1/3 bis 2/3	18	18,8
3 = 2/3 bis alle	76	79,1

Tabelle 20: EGFR innere Domäne: Intensität

Intensität der Färbung	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	0	0
1 = schwach	14	14,6
2 = mäßig	45	46,9
3 = stark	37	38,5

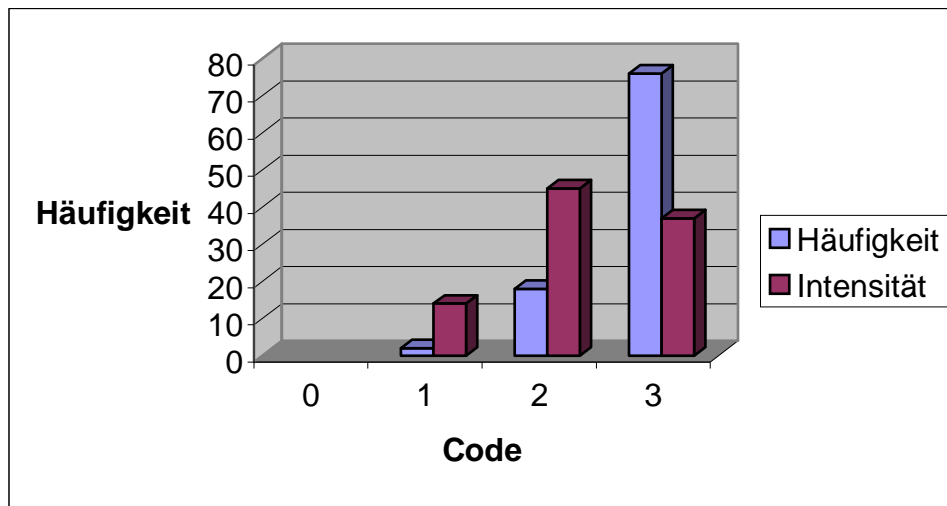


Abbildung 27: EGFR innere Domäne: Quantität und Intensität der Markierung

Beim immunhistochemischen Score zeigt sich bei EGFR innere Domäne eine breitere Verteilung als bei EGFR, es liegen aber etwa 80 % bei Wert sechs und neun (Tab. 21, Abb. 28).

Tabelle 21: EGFR innere Domäne: Immunhistochemischer Score

Immunhistochemischer Score	Häufigkeit	Prozent
0	0	0
1	1	1,1
2	12	12,5
3	1	1,1
4	6	4,3
6	38	39,5
9	38	39,5

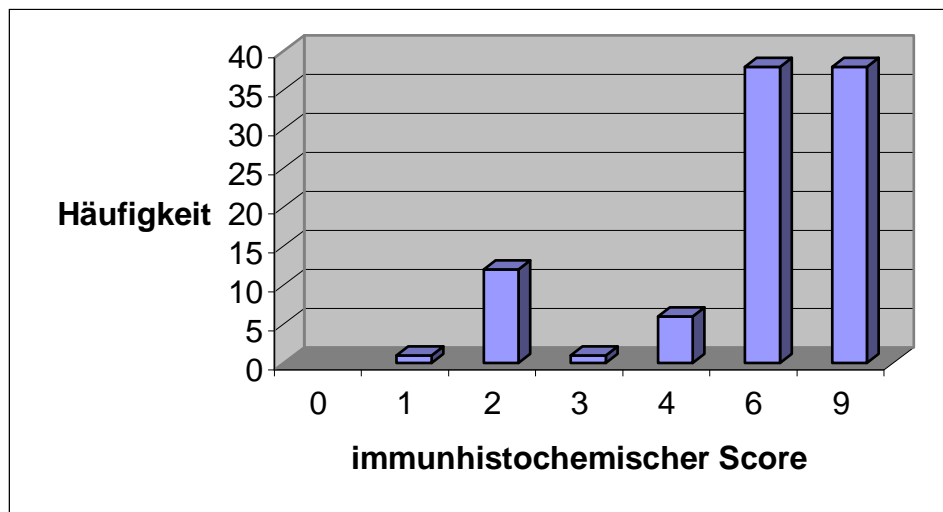


Abbildung 28: EGFR innere Domäne: Häufigkeit beim immunohistochemischen Score

4.10 PDGFR α

Die positiven Zellen zeigten eine Reaktion des Zytoplasmas, wobei die Intensität der Färbung bei verschiedenen Fällen deutlich variierte. Eine Häufung im basalen Bereich war nicht zu erkennen, was auf Grund der Rolle von PDGFR α bei der Proliferation der Zelle zu erwarten gewesen wäre (Abb. 25, Abb. 26).

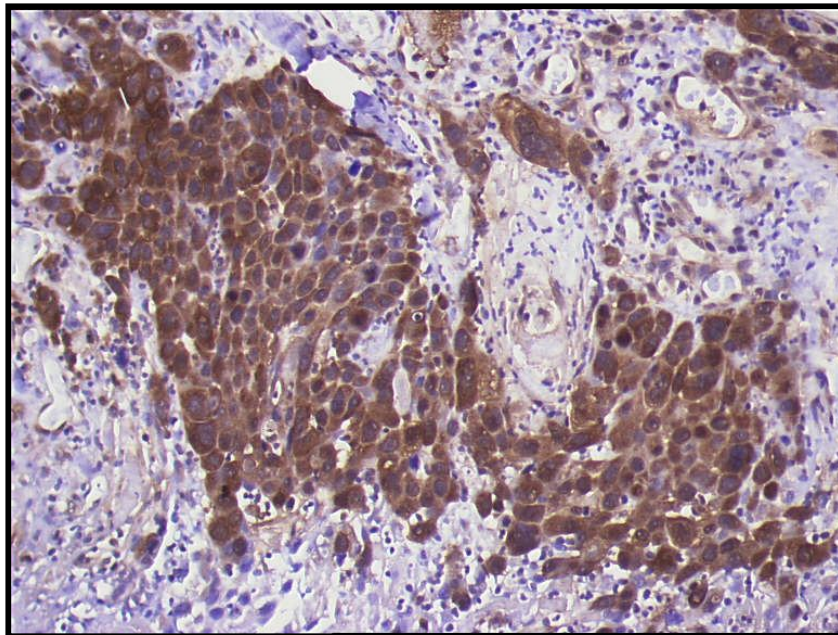


Abbildung 29: PDGFR α -Markierung: Deutliche zytoplasmatische Färbung in nahezu allen Tumorzellen; Originalvergrößerung x10

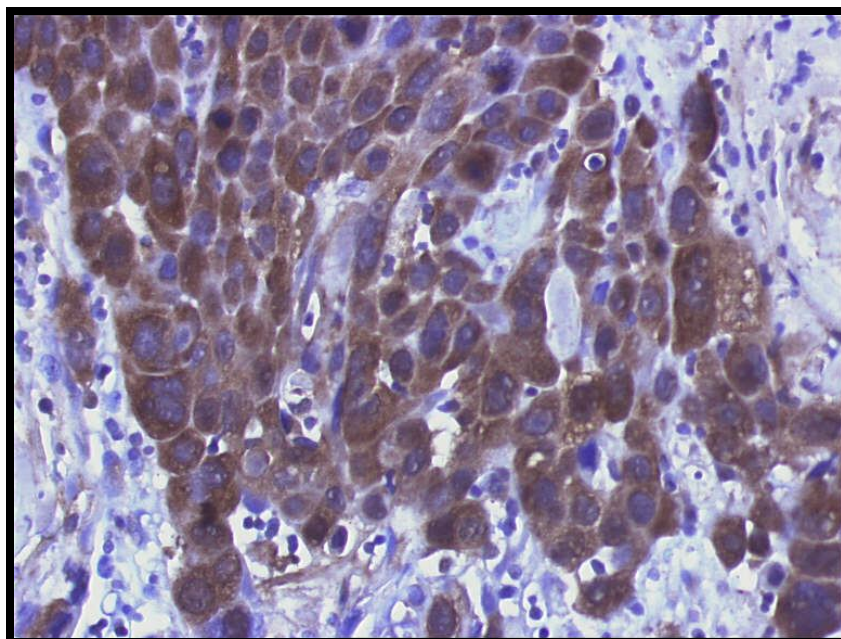


Abbildung 30: : PDGFR α -Markierung: Die zytoplasmatische Färbung zeigt in allen Zellschichten eine ähnliche Intensität; Originalvergrößerung x20

Die meisten Fälle befanden sich in Bezug auf die Anzahl der gefärbten Zellen in Gruppe 3, das heißt, 2/3 bis alle Tumorzellen waren markiert. Es gab nur einen Fall, in dem sich gar keine Färbung zeigte. Die Intensität der Färbung zeigte eine gleichmäßige Steigerung der Fälle von schwach über mäßig bis stark (Tab. 22, Tab. 23, Abb. 27).

Tabelle 22: PDGFR α : Anzahl gefärbter Zellen

Anzahl gefärbter Zellen	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	1	1,1
1 = bis 1/3	2	2,1
2 = 1/3 bis 2/3	20	21,3
3 = 2/3 bis alle	71	75,5

Tabelle 23: PDGFR α : Intensität

Intensität der Färbung	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	1	1,1
1 = schwach	17	17
2 = mäßig	35	37,2
3 = stark	42	44,7

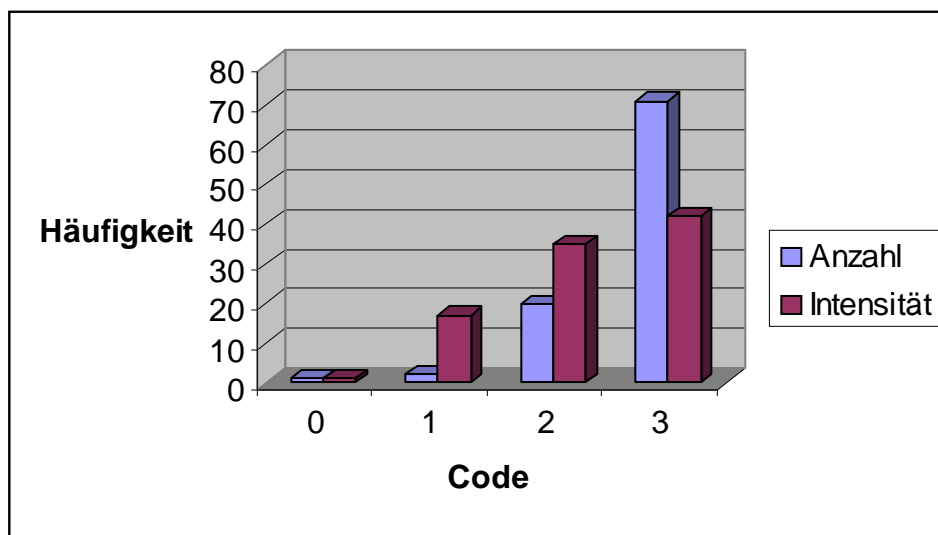


Abbildung 31: PDGFR α : Quantität und Intensität der Markierung

Bei der Zusammenfassung von Anzahl der gefärbten Zellen und Intensität der Färbung im immunhistochemischen Score zeigte sich eine Steigerung der Häufigkeit im Zusammenhang mit der Steigerung des Wertes (Tab. 24, Abb. 28).

Tabelle 24: PDGFR α : Immunhistochemischer Score

Immunhistochemischer Score	Häufigkeit	Prozent
0	1	1,1
1	2	2,1
2	6	6,4
3	8	8,5
4	11	11,7
6	27	28,7
9	39	41,5

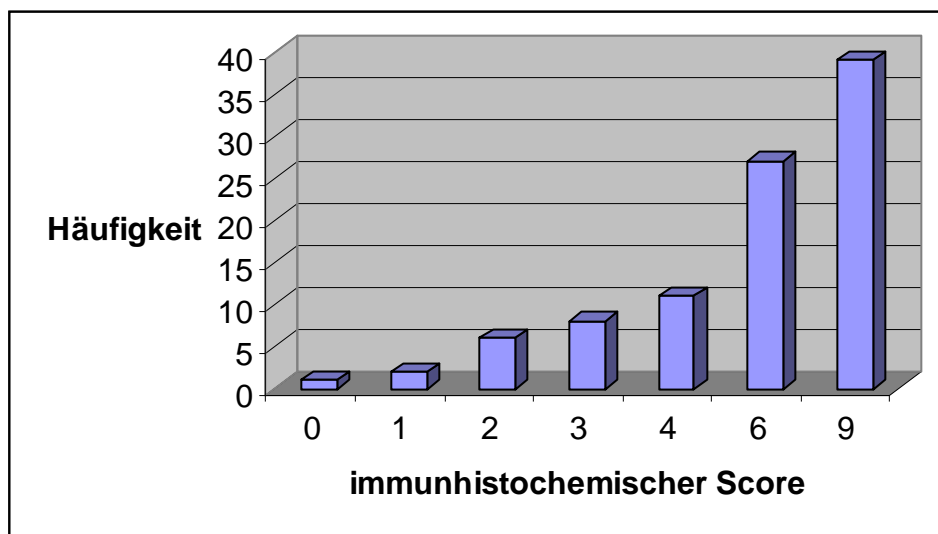


Abbildung 32: PDGFR α : Häufigkeit beim immunhistochemischen Score

4.11 *bcl-2*

Das Zytoplasma *bcl-2*-positiver Zellen hatte häufig eine gleichmäßig intensive Färbung. Die Zellkerne waren nur in vereinzelt Fällen positiv, zeigten aber häufig eine besonders intensive Färbung perinukleär. Wiesen nur Teile des Tumors eine Färbung auf, so war diese vor allem in den äußeren Zellschichten lokalisiert. Im Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumors war *bcl-2* nicht nachweisbar. Es liegt also nur innerhalb des Tumorgewebes eine verminderte Apoptoserate vor, was auch zu vermuten war (Abb. 29- Abb. 31).

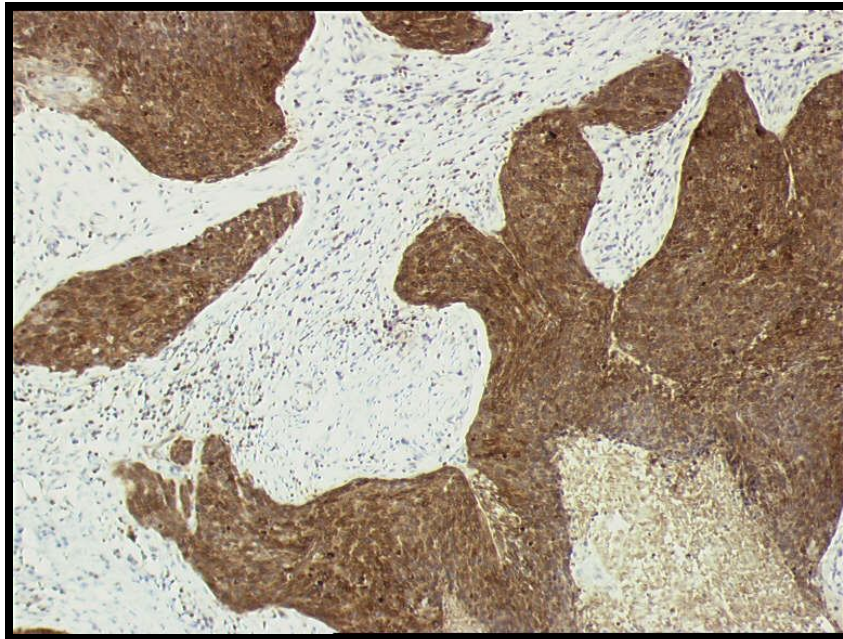


Abbildung 33: bcl-2-Markierung: Die Tumoreareale treten durch intensive Färbung stark hervor; Originalvergrößerung x4

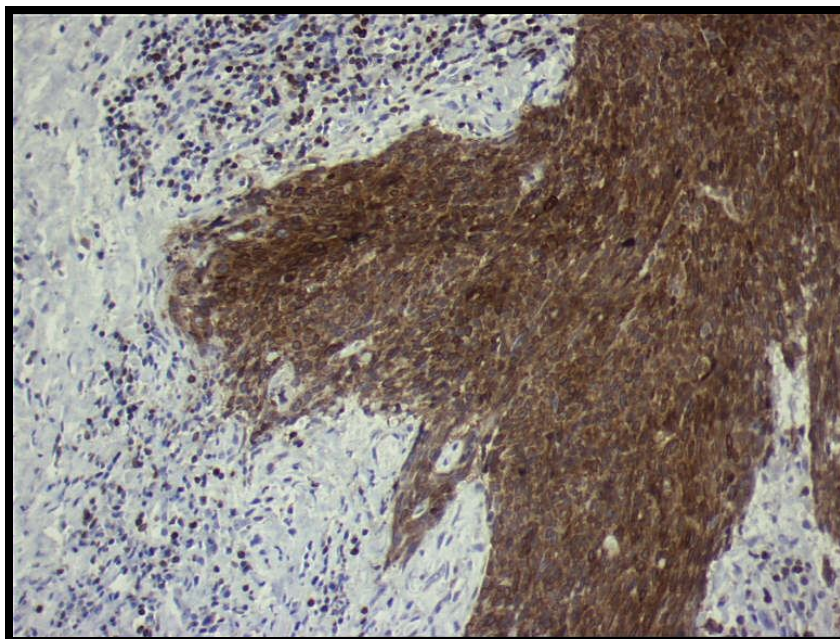


Abbildung 34: bcl-2-Markierung: In allen Tumorbereichen ist eine gleichmäßig intensive Färbung erkennbar, Originalvergrößerung x10

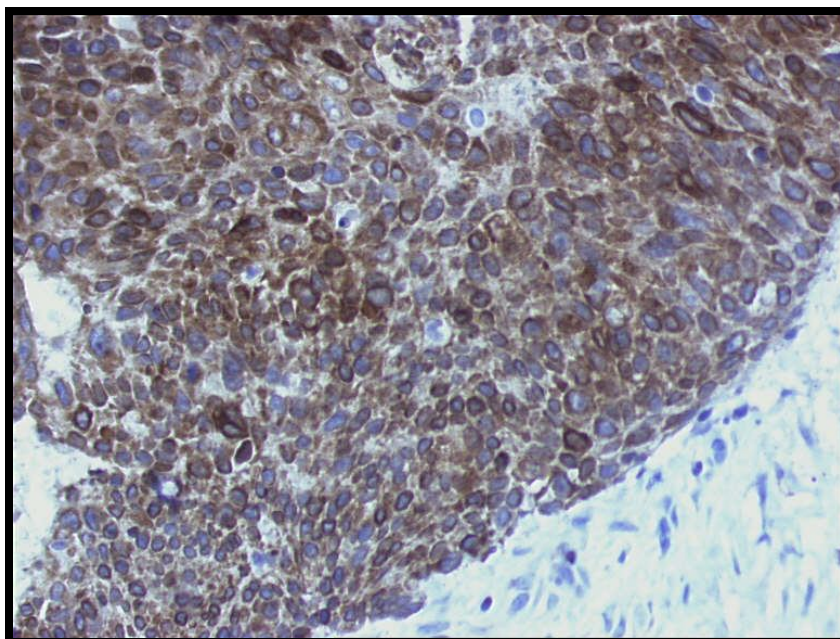


Abbildung 35: bcl-2-Markierung: Eine starke perinukleäre Färbung ist deutlich zu erkennen; Originalvergrößerung x20

Etwa die Hälfte der untersuchten Schnitte zeigte gar keine Färbung der Tumorzellen. Die restlichen Proben verteilten sich ziemlich gleichmäßig über die drei anderen Rubriken 1 bis 3. Die meisten der gefärbten Zellen zeigten eine schwache Färbung, weniger eine mäßige und noch weniger eine starke Färbung (Tab. 25, Tab. 26, Abb. 32).

Tabelle 25: bcl-2: Anzahl gefärbter Zellen

Anzahl gefärbter Zellen	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	51	54,3
1 = bis 1/3	15	16
2 = 1/3 bis 2/3	13	13,7
3 = 2/3 bis alle	15	16

Tabelle 26: bcl-2: Intensität

Intensität der Färbung	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	51	54,3
1 = schwach	19	20,2
2 = mäßig	14	14,9
3 = stark	10	10,6

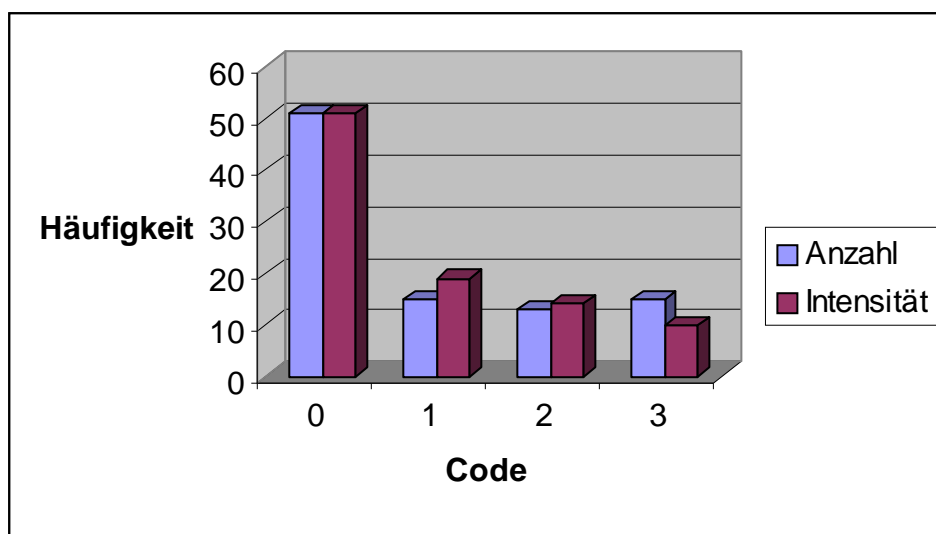


Abbildung 36: bcl-2: Quantität und Intensität der Markierung

Beim immunhistochemischen Score lässt sich die Abnahme der Häufigkeit hin zu den höheren Werten nicht erkennen. Wenige Schnitte zeigen einen Wert von zwei und drei, jeweils acht Schnitte einen Wert von vier, sechs und neun und 15 einen Wert von eins (Tab. 27, Abb. 33).

Tabelle 27: bcl-2: Immunhistochemischer Score

Immunhistochemischer Score	Häufigkeit	Prozent
0	51	54,3
1	15	16
2	3	3,2
3	1	1,1
4	8	8,5
6	8	8,5
9	8	8,5

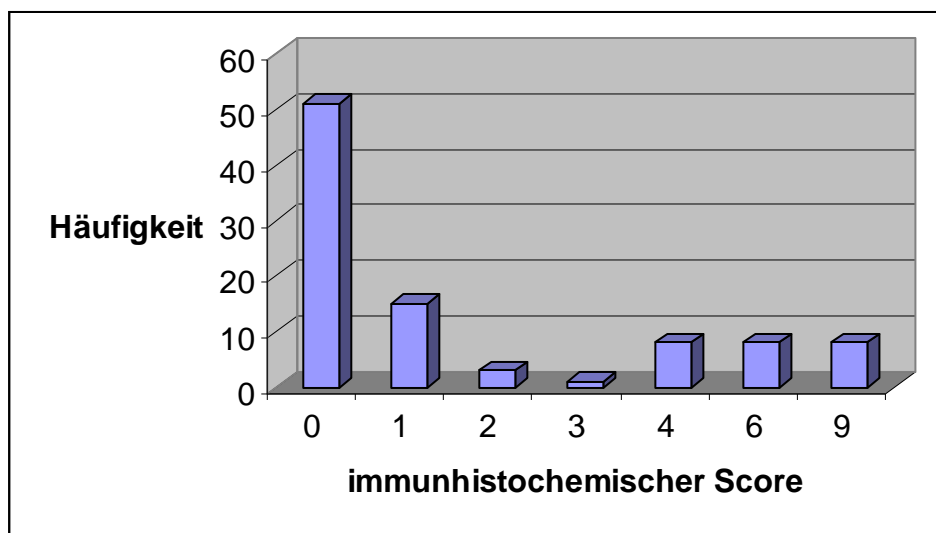


Abbildung 37: bcl-2: Häufigkeit beim immunhistochemischen Score

4.12 E-Cadherin

Beim immunhistologischen Nachweis von E-Cadherin ergab sich eine intensive rotbraune Färbung in der Zellmembran der Tumorzellen. Bei Fällen mit besonders intensiver Färbung war auch eine leichte positive Reaktion des Zytoplasmas und manchmal des Zellkerns zu verzeichnen (Abb. 34- Abb. 36). Das Epithel außerhalb des invasiv wachsenden Tumors zeigte eine noch deutlichere membranöse Färbung. Also

fand sich die erwartete intakte Zelladhäsion außerhalb und zumindest in einigen Fällen die reduzierte Zelladhäsion innerhalb des Tumors.

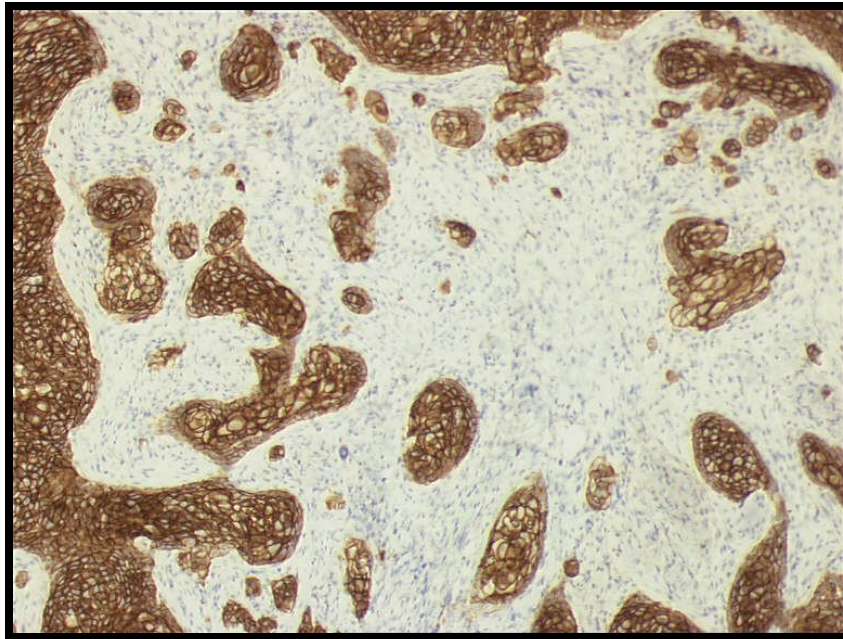


Abbildung 38: E-Cadherin-Markierung: Die Tumorzellinseln treten deutlich hervor; Originalvergrößerung x4

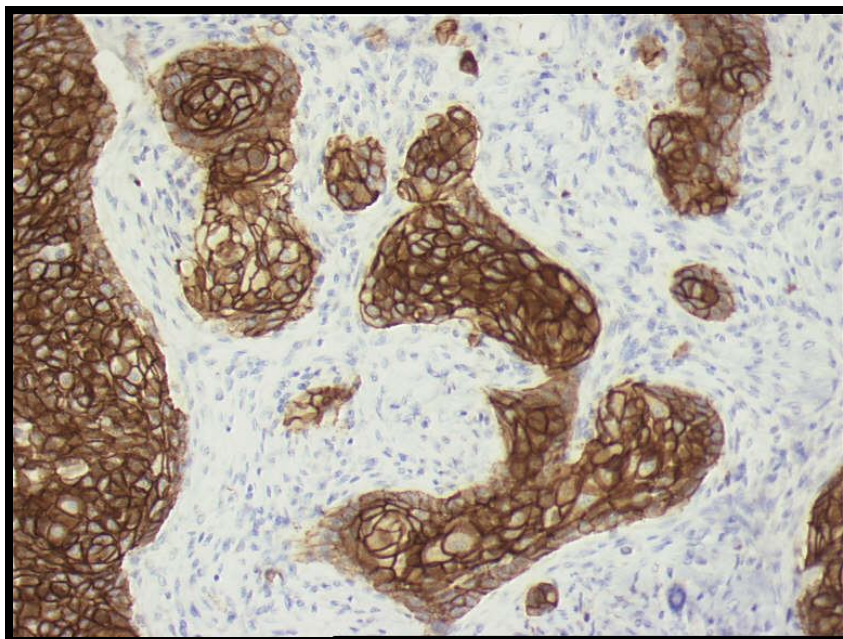


Abbildung 39: E-Cadherin-Markierung: Die Zellmembran ist intensiv gefärbt; Originalvergrößerung x10

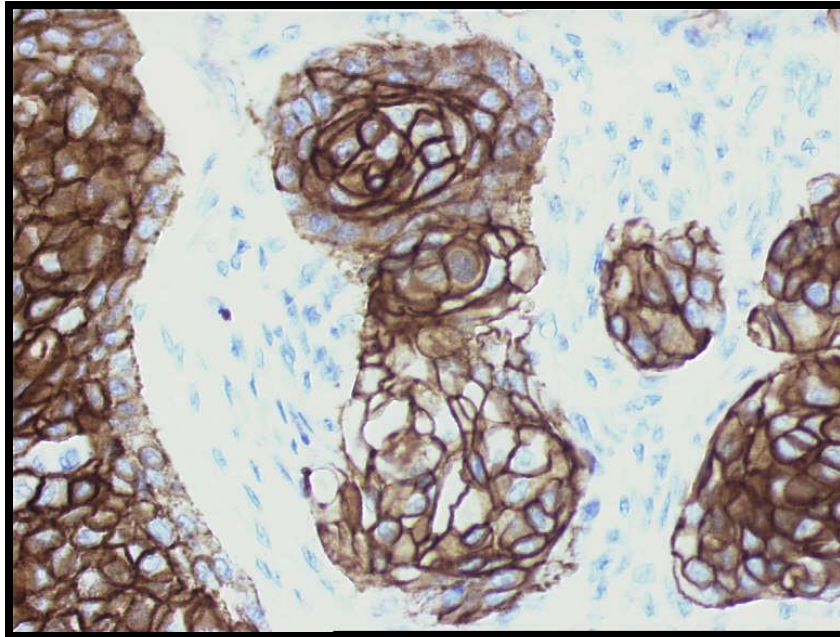


Abbildung 40: E-Cadherin-Markierung: In einigen Zellen sind auch Zytoplasma und Zellkern angefärbt; Originalvergrößerung x20

Nur eine Probe zeigte eine negative Färbung, bei über 90 % waren mehr als 2/3 der Zellen gefärbt und wiesen dabei sehr oft eine starke oder zumindest mäßige Intensität der Färbung auf (Tab. 28, Tab. 29, Abb. 37).

Tabelle 28: E-Cadherin: Anzahl gefärbter Zellen

Anzahl gefärbter Zellen	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	1	1,1
1 = bis 1/3	0	0
2 = 1/3 bis 2/3	7	7,4
3 = 2/3 bis alle	86	91,5

Tabelle 29: E-Cadherin: Intensität

Intensität der Färbung	Häufigkeit	Prozent
0 = negativ	1	1,1
1 = schwach	0	0
2 = mäßig	13	13,8
3 = stark	80	85,1

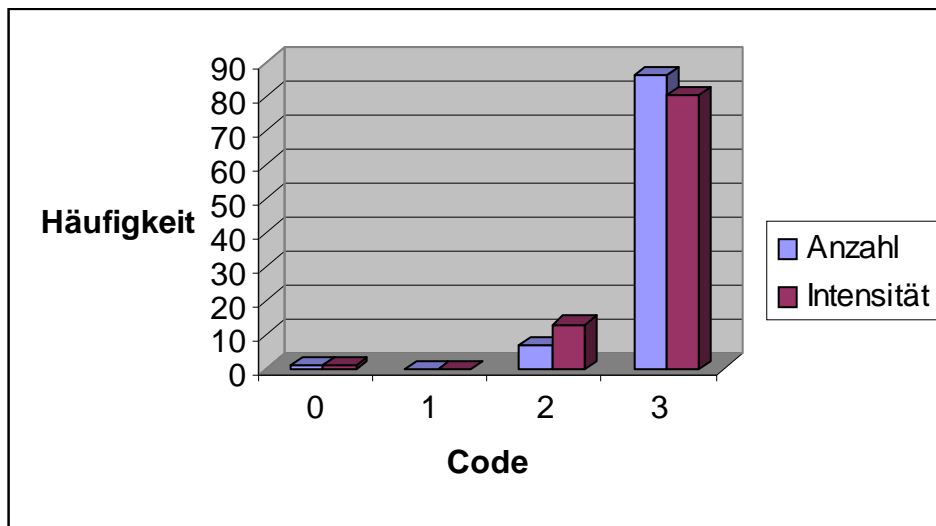


Abbildung 41: E-Cadherin: Quantität und Intensität der Markierung

Auch beim immunhistochemischen Score hatten 85,1 % den Wert neun, nur wenige Wert vier und sechs (Tab. 30, Abb. 38).

Tabelle 30: E-Cadherin: Immunhistochemischer Score

Immunhistochemischer Score	Häufigkeit	Prozent
0	1	1,1
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	7	7,4
6	6	6,4
9	80	85,1

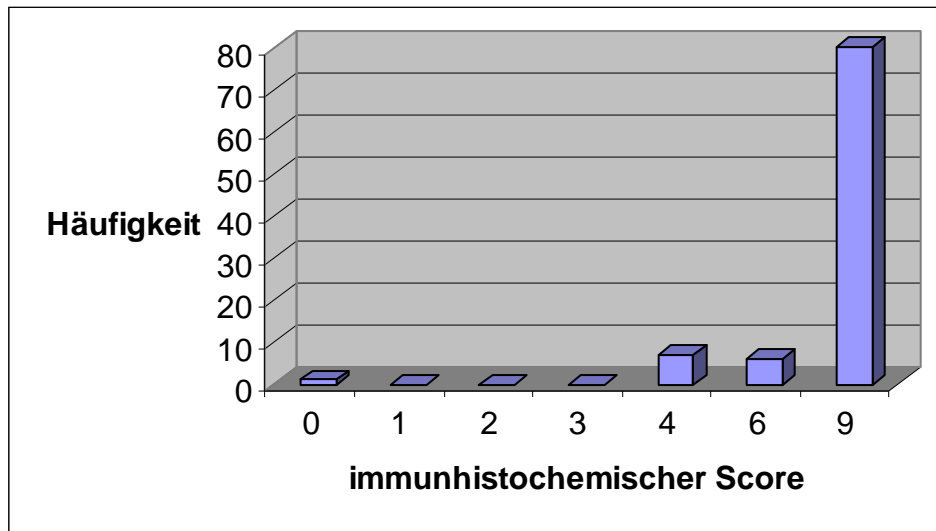


Abbildung 42: E-Cadherin: Häufigkeit beim immunohistochemischen Score

4.13 *c-erb-B2* und *c-kit*

Bei Anwendung der in Abschnitt 3.3 beschriebenen standardisierten immunohistochemischen Technik zeigte sich weder eine nukleäre noch eine membranöse Markierung.

4.14 *Statistische Auswertung der Ergebnisse*

Um einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Grading und den einzelnen Markern sowie den Markern untereinander zu zeigen, wurde der Spearman'sche Korrelationskoeffizient bestimmt. Er dient dem Vergleich des linearen Zusammenhangs zweier Variablen. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

Da eine reduzierte interzelluläre Adhäsion, wie sie bei Karzinomen vorkommt, für eine verringerte Expression von E-Cadherin spricht, wurden für diesen Marker die Werte in der Korrelationsanalyse umgekehrt. Eine geringe Expression bei E-Cadherin konnte mit einer erhöhten Expression der anderen Marker und einer größeren Entdifferenzierung verglichen werden.

Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen dem Grading und den einzelnen Markern untersucht. Dies ist in Tabelle 31 dargestellt. Dabei zeigte sich nur ein signifikanter Zusammenhang aller ermittelten Werten bei bcl-2 und bei Ki67. Eine Annäherung an das Signifikanzniveau zeigte noch der Wert PDGFR α Anzahl.

Tabelle 31: Korrelation der Marker mit dem Grading

Marker		Grading	Spearman	p-Niveau
p53 Anzahl	↔	Grading	0,041	0,695
p53 Intensität	↔	Grading	0,011	0,917
p53 immunhistochemischer Score	↔	Grading	0,074	0,474
Ki67	↔	Grading	0,218	0,034
Cyclin D1 Anzahl	↔	Grading	0,135	0,193
Cyclin D1 Intensität	↔	Grading	0,148	0,153
Cyclin D1 immunhistochemischer Score	↔	Grading	0,124	0,231
EGFR Anzahl	↔	Grading	-0,083	0,423
EGFR Intensität	↔	Grading	-0,120	0,246
EGFR immunhistochemischer Score	↔	Grading	-0,116	0,261
EGFR innere Domäne Anzahl	↔	Grading	0,028	0,790
EGFR innere Domäne Intensität	↔	Grading	0,077	0,460
EGFR innere Domäne immunhistochemischer Score	↔	Grading	0,083	0,427
PDGFR α Anzahl	↔	Grading	0,199	0,054
PDGFR α Intensität	↔	Grading	0,005	0,964
PDGFR α immunhistochemischer Score	↔	Grading	0,050	0,633
bcl-2 Anzahl	↔	Grading	0,391	0,000
bcl-2 Intensität	↔	Grading	0,379	0,000
bcl-2 immunhistochemischer Score	↔	Grading	0,336	0,001
E-Cadherin Anzahl	↔	Grading	-0,053	0,611
E-Cadherin Intensität	↔	Grading	-0,084	0,419
E-Cadherin immunhistochemischer Score	↔	Grading	-0,113	0,275

Beim Vergleich des ermittelten Wertes für Anzahl, Intensität und dem immunhistochemischen Score eines jeden Markers zeigte sich stets ein höchst signifikanter Zusammenhang (Tab. 32).

Tabelle 32: Korrelationen zwischen Anzahl, Intensität und immunhistochemischem Score

			Spearman	p-Niveau
p53 Anzahl	↔	p53 Intensität	0,901	0,000
p53 Anzahl	↔	p53 immunhistochemischer Score	0,933	0,000
p53 Intensität	↔	p53 immunhistochemischer Score	0,925	0,000
Cyclin D1 Anzahl	↔	CyclinD1 Intensität	0,926	0,000
Cyclin D1 Anzahl	↔	CyclinD1 immunhistochemischer Score	0,900	0,000
Cyclin D1 Intensität	↔	CyclinD1 immunhistochemischer Score	0,903	0,000
EGFR Anzahl	↔	EGFR Intensität	0,691	0,000
EGFR Anzahl	↔	EGFR immunhistochemischer Score	0,852	0,000
EGFR Intensität	↔	EGFR immunhistochemischer Score	0,968	0,000
EGFR i. Domäne Anzahl	↔	EGFR i. Domäne Intensität	0,578	0,000
EGFR i. Domäne Anzahl	↔	EGFR i. Domäne immunhistochemischer Score	0,756	0,000
EGFR i. Domäne Intensität	↔	EGFR i. Domäne immunhistochemischer Score	0,965	0,000
PDGFR α Anzahl	↔	PDGFR α Intensität	0,550	0,000
PDGFR α Anzahl	↔	PDGFR α immunhistochemischer Score	0,698	0,000
PDGFR α Intensität	↔	PDGFR α immunhistochemischer Score	0,951	0,000
Bcl-2 Anzahl	↔	bcl-2 Intensität	0,938	0,000
bcl-2 Anzahl	↔	bcl-2 immunhistochemischer Score	0,931	0,000
bcl-2 Intensität	↔	bcl-2 immunhistochemischer Score	0,965	0,000
E-Cadherin Anzahl	↔	E-Cadherin Intensität	0,891	0,000
E-Cadherin Anzahl	↔	E-Cadherin immunhistochemischer Score	0,895	0,000
E-Cadherin Intensität	↔	E-Cadherin immunhistochemischer Score	0,968	0,000

Weiterhin wurden die drei Werte aller Marker untereinander verglichen. In Tabelle 33 sind die signifikanten Zusammenhänge ($p \leq 0,05$) zwischen den Markern mit einem χ^2 dargestellt. Die meisten Signifikanzen mit anderen Markern zeigte CyclinD1. Es war ein signifikanter Zusammenhang mit den meisten Werten von EGFR, EGFR innere Domäne und E-Cadherin, außerdem mit dem Wert p53 Anzahl erkennbar. E-Cadherin zeigte ebenso eine signifikante Beziehung zu EGFR Anzahl und Werten bcl-2 Intensität und bcl-2 Immunhistochemischer Score. Weitere signifikante Zusammenhänge ergab der Vergleich von PDGFR α Anzahl mit allen drei Werten von EGFR und P53. PDGFR α Immunhistochemischer Score korrelierte mit p53.

Ein p-Niveau, das sich um nicht mehr als 0,05 vom Signifikanzniveau unterschied, ist in Tabelle 33 mit ~ gekennzeichnet. Es zeigten sich also einige Zusammenhänge, die jedoch nicht signifikant waren.

Tabelle 33: Signifikanzen der Marker untereinander

	Ki67	p53 Anz	p53 Int	p53 IS	Cyclin D1 Anz	Cyclin D1 Int	Cyclin D1 IS	EGFR Anz	EGFR Int	EGFR IS	EGFR i. D. Anz	EGFR i. D. Int	EGFR i. D IS	PDGFRα Anz	PDGFRα Int	PDGFRα IS	bcl-2 Anz	bcl-2 Int	bcl-2 IS	E-Cadherin Anz	E-Cadherin Int	E-Cadherin IS	
Ki67																							
P53 Anz					X	X								X		X	~	~					
P53 Int														X		X		~					
P53 IS											~	X	X	X		X							
Cyclin D1 Anz		X						X	X	X	X	X	X	~						X	X	X	
Cyclin D1 Int		X						~	X	X	X	X	X							X	X		
Cyclin D1 IS									~	~	X	X	X		~					X	~		
EGFR Anz					X	~								X						X	X		
EGFR Int					X	X	~							X									
EGFR IS					X	X	~							X									
EGFR i. D. Anz				~	X	X	X																
EGFR i. D. Int				X	X	X	X																
EGFR i. D IS				X	X	X	X																
PDGFRα Anz		X	X	X	~			X	X	X										~	~		
PDGFRα Int							~																
PDGFRα IS		X	X	X																			
bcl-2 Anz	~	~																		~	X	X	
bcl-2 Int		~	~																	~	X	X	
bcl-2 IS																					X	X	
E-Cadherin Anz					X	X	X	X						~			~	~					
E-Cadherin Int					X	X	~	X						~			X	X	X				
E-Cadherin IS					X	X											X	X	X				

Anz= Anzahl, Int= intensität, IS= Immunhistochemischer Score

5 Diskussion

5.1 Diskussion zu Material und Methode

5.1.1 Diskussion zum Patientengut

Das Klinikum Bad Saarow hatte bereits vor der Umwandlung in ein öffentliches Krankenhaus einen Versorgungsauftrag für die Zivilbevölkerung der Region und es wurden auch die Familien der Militärangehörigen behandelt. Berufssoldaten der NVA verpflichteten sich für 25 Jahre, so dass auch nicht nur junge Militärangehörige behandelt wurden.

Es ist trotz der Tatsache, dass es sich um eine militärische Einrichtung handelte, davon auszugehen, dass das Patientengut einen annähernd normalen Bevölkerungsdurchschnitt darstellt, mit einem leicht überdurchschnittlichen Anteil an jüngeren Männern.

Da die Militärangehörigen und ihre Familien überwiegend nicht aus der Region Ost-Brandenburg stammten, wurden sie nicht unbedingt über den ganzen Zeitraum ihrer Erkrankung in der Bad Saarower Klinik behandelt, so dass über die Anzahl der Rezidive oder Überlebensraten keine sicheren Aussagen getroffen werden können.

Mit der Einrichtung des Tumorzentrums hat die Anzahl der Krebsfälle zugenommen, das Krankenhaus also mehr den Charakter einer Spezialklinik erhalten.

5.1.2 Diskussion zur Datenerfassung

Bei der Datenerfassung konnte lediglich auf die von der einsendenden Abteilung gelieferten Daten zurückgegriffen werden. Jahr, Name, Alter und Geschlecht der Patienten konnten problemlos erfasst werden. Auch die Lokalisation der Plattenepithelkarzinome war in der Regel genau angegeben. In manchen Fällen, vor allem bei größeren OP-Präparaten, wurde nur ein Gebiet ohne nähere Angaben beschrieben, was aber auch unproblematisch in den Tumorlokalisatsschlüssel der ICD-O übertragen werden konnte.

Die meisten Präparate waren von dem untersuchenden Pathologen bereits in die Differenzierungsgrade eingeteilt worden. In 15 Fällen fehlte diese Angabe und wurde

nachträglich vorgenommen. Dabei ist zu bedenken, dass im Zeitraum von 1990 bis 2002 unterschiedliche Klassifizierungen galten. Die ursprünglich drei Differenzierungsgrade unterscheidende Einteilung von Broders [16] wurde 1997 im Rahmen der TNM-Klassifikation auf vier Differenzierungsgrade erweitert [156]. Da es sich in der Definition tatsächlich nur um eine Erweiterung um das Prädikat „undifferenziert“ handelte und die anderen drei Klassifizierungen gleich geblieben sind, stellt dies kein Problem dar. Bei den Ergebnissen zeigten sich auch lediglich zwei Präparate als undifferenziert (G4), die in der statistischen Analyse mit G3 zusammengefasst wurden.

Die Erfassung der TNM-Klassifikation ließ sehr zu wünschen übrig. Nur etwa die Hälfte der Präparate waren OP-Präparate, bei denen eine Klassifizierung vorlag oder an Hand der klinischen Angaben geschlussfolgert werden konnte. Bei den Biopsien war es häufig weder dem Chirurgen noch dem Pathologen möglich, eine Klassifikation des Tumors vorzunehmen. Dies ließ sich auch nicht im Nachhinein bewerkstelligen, da die auf eine Biopsie folgende Operation nicht in jedem Falle im Humaine-Klinikum stattfand und auch die Daten zu befallenen Lymphknoten und Fernmetastasen nicht zuverlässig erhoben werden konnten. Mit einer vollständigen Erfassung der TNM-Klassifikation wären auch Aussagen zu Überlebensraten und zur Prognose sinnvoller gewesen.

Auch klinische Risikofaktoren, wie die Frage nach Alkohol- und Nikotingenuss, anderen Vorerkrankungen oder Dispositionen, die die Lebensumstände der Patienten betrafen, konnten nicht erhoben werden.

5.2 Diskussion zu Geschlechterverteilung und Altersverteilung

Der in dieser Studie ermittelten Geschlechtsverteilung mit 14 % weiblichen zu 86 % männlichen Patienten stehen die vom Robert-Koch-Institut veröffentlichten 28 % weibliche zu 72 % männliche Patienten gegenüber. Beim DÖSAK ergibt sich ein Verhältnis von 23 % weiblich zu 77 % männlich. Somit liegt der Anteil der an einem Plattenepithelkarzinom erkrankten Männer über dem der anderen Datenbanken.

Bei der Betrachtung der Verteilung hinsichtlich des Geschlechts muss beachtet werden, dass im Klinikum Bad Saarow bis zur Umwandlung in ein öffentliches Krankenhaus tendenziell mehr Männer behandelt wurden. So lässt sich erklären, dass erst ab dem Jahr 1994 überhaupt bei Frauen Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des

Oropharynx diagnostiziert wurden und auch die Gesamtzahl gegenüber den Männern deutlicher abweicht als bei den Daten des Robert-Koch-Institutes.

Erst 1992 wurde das Klinikum zum Tumorzentrum Ost-Brandenburg und in der darauf folgenden Zeit ist die Gesamtzahl der diagnostizierten Plattenepithelkarzinome gestiegen.

Das durchschnittliche Alter der Männer liegt in dieser Studie mit 55,5 Jahren unter den vom Robert-Koch-Institut ermittelten 59 Jahren. Auch dies lässt sich mit der besonderen Situation als Armeekrankenhaus der DDR erklären, da das Alter in einem Patientengut, das sich zu einem Teil aus Soldaten zusammensetzt, insgesamt etwas niedriger ist. Allerdings liegt der hier ermittelte Wert genau in der Mitte des vom DÖSAK angegebenen Häufigkeitsgipfels zwischen 50 und 60 Jahren. Ein deutlicher Häufigkeitsgipfel lässt sich in dieser Studie nicht erkennen, da die Werte im fünften und sechsten Lebensjahrzehnt mit 23 Fällen gleich sind und im siebten Lebensjahrzehnt auch noch bei 19 liegen. Man könnte hier also von einem Häufigkeitsgipfel sprechen, der sich über drei Jahrzehnte erstreckt.

Bei den Frauen zeigt sich ein höherer Altersdurchschnitt (65,9) als bei den Erhebungen des Robert-Koch-Institutes (63), wobei die Gesamtzahl der weiblichen Fälle nur bei 13 liegt und somit nicht als repräsentativ zu werten ist. Beim DÖSAK wird hier ein längerer Zeitraum als bei den Männern für einen Häufigkeitsgipfel angegeben: 50 bis 75 Jahre. Auch in dieser Studie liegt ein Gipfel, sofern man bei der geringen Anzahl von Fällen davon sprechen kann, in den drei Lebensjahrzehnten nach dem 50. Lebensjahr.

5.3 Diskussion zu Grading

Die Erfassung des Gradings zeigt mit 57 % einen deutlichen Gipfel bei dem Wert zwei, also bei den mittelgradig (mäßig) differenzierten Plattenepithelkarzinomen. Der DÖSAK gibt in seinen Erhebungen etwa 2/3 als mäßig differenziert an [60], das liegt etwas über, aber in der Nähe des hier ermittelten Wertes. Im Sachbericht des Tumorzentrums Land Brandenburg wird mit 40,9 % aus den Jahren 2000-2002 und 47,5 % aus den Jahren 2003-2005 für G2 ein etwas geringerer Wert angegeben, wobei auffällig viele Fälle (22,5 %, bzw. 17,5 %) gar nicht hinsichtlich ihrer Differenzierung beurteilt wurden. Hier ist zu beachten, dass auch Karzinome der Tonsillen, des Hypopharynx und des Nasopharynx erfasst worden sind [124].

Verglichen mit anderen Studien zu immunhistochemischen Markern an Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich ergibt sich ein sehr uneinheitliches Bild bei der Betrachtung des ermittelten Gradings (Tab. 34).

Tabelle 34: Literaturangaben zum Grading

Quelle	G1 in %	G2 in %	G3 in %	Gesamtzahl
Stoll, C. [139]	20	67	13	107
Heinze, R. [52]	48	42	10	334
Knüfermann, R. F. [77]	50	47	3	103
Lehmann, K. [87]		55	45	40
Schimming, R. [126]	10	75	15	52
de Vicente, J. C. et al. [151]	63	31	6	35
Tanaka, N. et al. [145]	57	34	9	53
Khademi, B. et al. [75]	20	67	13	107
eigene Ergebnisse	22	57	21	94

Bei Stoll [139], Lehmann [87], Schimming [126] und Khademi [75] ist auch G2 am häufigsten vertreten, bei den anderen überwiegt G1. Hier spielen unter Umständen die Auswahlkriterien der untersuchten Proben eine Rolle, die in diesen Studien allerdings nicht beschrieben werden. Die Gesamtzahl der in die Studien aufgenommenen Patienten scheint bei dieser Verteilung keine Rolle zu spielen.

Kritisch zu beurteilen ist in der vorliegenden Studie, dass nicht genau ermittelt werden konnte, ob es sich um primäre Karzinome oder um Rezidive handelt. Wurden bei einem Patienten über mehrere Jahre Biopsien und von der Klinik angegebene Rezidive eingesandt, so wurden möglichst die Präparate der ersten Operation in die Studie aufgenommen, schon gekennzeichnete Rezidive wurden ausgeschlossen. Dennoch ist es möglich, dass Rezidivpatienten mit bereits in anderen Kliniken operierten Plattenepithelkarzinomen einbezogen wurden, wenn von der einsendenden Abteilung keine dementsprechenden Angaben vorlagen. Beim Grading können Rezidive nicht unbedingt mit Primärtumoren verglichen werden, da sie möglicherweise eine geringere Differenzierung aufweisen.

Beim Vergleich des Gradings mit den immunhistochemischen Markern zeigte sich nur bei Ki67 und bcl-2 ein signifikanter Zusammenhang. Alle anderen Marker scheinen nicht

geeignet zu sein, um eine Aussage zur Entdifferenzierung machen zu können. Bei PDGFR α ist zwar der Wert bei der Anzahl der gefärbten Zellen fast signifikant, die Werte zur Intensität und zum immunhistochemischen Score sind jedoch weit entfernt vom Signifikanzniveau.

5.4 *Diskussion zur Lokalisation*

Bei der Betrachtung der Lokalisation der untersuchten Plattenepithelkarzinome muss bedacht werden, dass das Humaine-Klinikum Bad-Saarow während des untersuchten Zeitraumes nicht über eine Abteilung für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie verfügte und somit die meisten Einsendungen aus der Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenkrankheiten kamen. Jedoch ist zu bemerken, dass dennoch nahezu alle Regionen der Mundhöhle vertreten waren, wobei sich vermuten lässt, dass Patienten mit sehr ausgedehnten oder große Ansprüche an die Wiederherstellung stellenden Läsionen der Mundhöhle an eine Fachklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie überwiesen wurden. Dies veranlasst sicherlich häufig schon der erstuntersuchende Hausarzt oder Zahnarzt. So lässt sich auch das häufigere Vorkommen im Oropharynx (62 %) im Gegensatz zur Mundhöhle (38 %) erklären, was stark abweicht von den Werten des DÖSAK, der 88 % der Fälle in der Mundhöhle und lediglich vier % im Oropharynx angibt [60]. Bei den im DÖSAK beteiligten Kliniken wiederum handelt es sich um Mund-Kiefer-Gesichts-Kliniken.

Innerhalb der Mundhöhle treten Karzinome gehäuft sich an der Zunge und dem Mundboden auf, was den Literaturangaben entspricht [60, 129].

Die häufigste Lokalisation von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx lag im Bereich der Tonsillen, gefolgt vom Zungengrund. Ähnlich sind die Ergebnisse von Andersen et al. [6], die folgende prozentuale Verteilung herausfanden: 70 % laterale Oropharynxwand (Tonsillen, Gaumenbogen), 15 % vordere Wand (Zungengrund), 12 % obere Wand (weicher Gaumen, Uvula) und ein Prozent hintere Oropharynxwand, zwei Prozent ohne nähere Angaben.

5.5 *Diskussion zu den immunhistochemischen Markern*

5.5.1 **p53**

Mit den erfassten 83,5 % positiven Proben liegt das Resultat über den in der Literatur angegebenen Ergebnissen (Tab. 35). Häufig wurden dort erst Färbungen ab zehn bzw.

15 % als positiv gewertet. Bei der vorliegenden Studie wurde eine Dritteileinteilung vorgenommen, sodass sich ein Wert von 57,5 % ergibt, wenn erst ab einer positiven Färbung von mehr als einem Drittel der Zellen ausgegangen wird.

Tabelle 35: Literaturangaben zur positiven Färbung bei p53

Quelle	Positive Fälle	Anzahl Patienten
Chow, V. et al. [24]	62 %	28
Girod, S.C. et al. [44]	71 %	90
Iamaroon, A. et al. [63]	79 %	19
Jayasurya, R. et al. [65]	69 %	125
Lam, K.Y. et al. [83]	73 %	56
Lim, S.C. et al. [91]	55,3 %	56
Nylander, K. et al. [106]	55 %	80
Piatelli, A. et al. [115]	55,5 %	36
Stoll, C. et al. [138]	50,5 %	107
de Vicente J.C. et al. [151]	52,7 %	91
Yao, L. et al. [162]	60 %	52
eigene Ergebnisse	83,5 % (57,5 %)	94

Die immunhistochemische Untersuchung von p53 wird durch verschiedene Faktoren in ihrer Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit beeinflusst: Die unterschiedlichen kommerziell zur Verfügung stehenden Antikörper zum Nachweis von p53 besitzen jeweils eigene Spezifitäten und Sensitivitäten, sodass die gewonnenen Ergebnisse auch eine Abhängigkeit zum gewählten Antikörper aufweisen. Studien an gleichen Tumorschnitten anderer Körperregionen konnten zum Teil differierende Ergebnisse bei der Nutzung verschiedener Antikörper zeigen [6, 84].

Art und Länge der Fixation und Vorbehandlung der Gewebeschnitte sowie die Konzentration der primären Antikörper und das Verfahren der Darstellung der Proteine beeinflussen das Endergebnis signifikant [19].

Die p53-Expression kann innerhalb des gleichen Präparates stark variieren [132]. In der vorliegenden Studie konnte dies an einigen Präparaten auch beobachtet werden; es wurden zur quantitativen Bewertung stets Areale des Tumors ausgesucht, in denen eine deutliche Reaktion zu erkennen war.

Für einen sicheren Nachweis von Mutationen des p53-Gens ist ein direkter Nachweis in der DNA nötig. In vergleichenden Untersuchungen jedoch ergab sich eine deutliche

Korrelationen zwischen dem immunhistologischen Nachweis des p53-Proteins und Mutationen im TP53-Locus [21, 107].

Zwischen dem Grading und der Häufigkeit oder Intensität der Anfärbung konnte kein Zusammenhang gefunden werden. DeVicente et al. [151] fanden einen negativen Zusammenhang zwischen dem p53-Status und dem histologischen Grad der Differenzierung. Bei Yanamoto et al. [160], Stoll et al. [138], Lam et al. [83], Yao et al. [162] zeigte sich hingegen kein Zusammenhang. Der immunhistochemische Nachweis des p53-Gens in prätherapeutischen Gewebeproben könnte einen prognostischen Hinweis auf die Radiosensitivität eines Tumors geben [44].

In dieser Studie fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den ermittelten Werten bei p53 und den Werten bei PDGFR α Anzahl und Immunhistochemischer Score. Auch die Werte Cyclin D1 Anzahl und Intensität sowie EGFR innere Domäne Intensität und Immunhistochemischer Score zeigten eine signifikante Korrelation mit Werten von P53. Hier war eine Beziehung zwischen dem Funktionsverlust von p53 und der damit verringerten Überleitung in die Apoptose und einem gesteigerten Wachstum festzustellen.

Die Werte von p53 und bcl-2 erreichten nicht ganz das Signifikanzniveau, es konnte jedoch ein Zusammenhang erkannt werden, der so auch zu erwarten war. Bei beiden Markern führt eine gesteigerte Expression zu einer verminderten Apoptoserate.

Da die p53-Expression in oralen Plattenepithelkarzinomen häufig abweicht, könnte eine Einführung von Wildtyp-p53 in die Tumorzelle die apoptotischen Mechanismen wiederherstellen [61]. Clayman et al. entwickelten ein Adenovirus, das ein Wildtyp-p53-Gen trägt, und zeigten im Tiermodell, dass eine Infektion mit dem Adenovirus die Größe eines subcutanen Tumores reduzierte [26]. Sie injizierten das Virus außerdem in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome, worauf sich bei einigen Patienten eine verbesserte Prognose zeigte [25].

Die p53-Mutation ist ein zuverlässiger Marker, um die Wirkung einer Radiotherapie vorherzusagen, da p53-positive Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches signifikant schlechter auf eine Bestrahlung ansprechen [159].

Das Tumorsuppressorgen p53 kann auch durch Hemmung des p53-Inhibitors Hdm-2 aktiviert werden. Dies gelingt durch eine neue Klasse von Substanzen, den Nutlinen,

die an Hdm-2 binden und hierdurch die Interaktion von Hdm-2 mit p53 behindern. Dies stellt in Hdm-2 überexprimierenden Tumorzellen die p53-Funktion wieder her und endet in Zellzyklusarrest oder Apoptose [31].

5.5.2 Ki-67

Da Ki-67 als Proliferationsmarker in jedem aktiven Gewebe positive Reaktionen hervorbringen wird, ist das absolute Ergebnis mit etwa 98 % gefärbter Proben nicht von Bedeutung. Interessanter ist die Verteilung der Prozente gefärbter Zellen und der Zusammenhang mit pathohistologischen Parametern.

Bereits vorliegende Studien zeigen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Knüfermann [77], Jones et al. [68], Spafford et al. [136] fanden keine Zusammenhänge mit klassischen Prognoseparametern wie Grading oder TNM-Klassifikation. Welkoborsky et al. [155] konnten eine Signifikanz zwischen der Ki-67-Expression und dem Auftreten von Rezidiven feststellen. In Studien von Lörz und Meyer-Breiting [92], Zöller et al. [167] und Zidar et al. [166] zeigte sich eine Beziehung zum histopathologischen Grading.

In der vorliegenden Studie wurde eine signifikante Beziehung zu dem pathohistologischen Grading gefunden.

Knüfermann schlägt Ki-67 als Kontrollinstrument der präoperativen Therapie vor. In seiner Studie waren die proliferierenden Zellen erwartungsgemäß nach der präoperativen Therapie deutlich reduziert [77].

5.5.3 Cyclin D1

Mit nur einer für Cyclin D1 negativen Probe zeigte sich in dieser Studie eine hohe Sensitivität für diesen Marker. Bei 35 Patienten in einer Untersuchung von de Vicente et al. [152] waren mit vier negativen Fällen ebenso nur wenige Schnitte nicht angefärbt. Andere Untersuchungen zeigten jedoch eine deutlich geringere Anzahl von positiven Fällen. So waren bei Akervall et al. [4], Koontongkaew et al. [79], Odajima et al. [109], Schoelch et al. [128] und Xu et al. [158] etwa 40 % der Fälle positiv (Tab. 36).

Tabelle 36: Literaturangaben zur positiven Färbung bei Cyclin D1

Quelle	Positive Fälle	Anzahl Patienten
Akervall, J.A. et al. [4]	41 %	75
Koontongkaew, S. et al. [79]	39 %	53
Lam, K. Y. et al. [83]	63 %	56
Michalides, R.J. et al. [98]	49 %	115
Odajima, T. et al. [109]	39,1 %	110
Schoelch, M.L. et al. [128]	40 %	35
de Vicente, J.C. et al. [152]	88,57 %	35
Xu, J. et al. [158]	38 %	29
Eigene Ergebnisse	98,9 %	94

Nach Lam et al. [83] sollten die verschiedenen Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereiches nicht als eine Einheit betrachtet werden. In ihrer Studie wiesen alle Proben aus dem Oropharynx und dem weichen Gaumen, aber nur 25 % der Proben aus der Zunge eine positive Färbung auf. Xu et al. [158] und Akervall et al. [4] kamen jedoch zu ganz anderen Ergebnissen bezüglich der Lokalisationen. Lam et al. [83] erklären dies mit möglichen epidemiologischen Unterschieden oder den verschiedenen untersuchten Rassen.

Die vielen positiven Ergebnisse in der vorliegenden Studie lassen sich nicht mit der großen Anzahl an Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Oropharynx und mit einer möglicherweise mit dieser Lokalisation verbundenen höheren Positivrate erklären. Auch dürften sich die Ergebnisse nicht so stark von schwedischen oder niederländischen Zahlen unterscheiden, wenn man von Differenzen bei den verschiedenen Rassen ausgehen will. Die Gesamtzahl von 94 Patienten ist groß genug, um eine zufällige Häufung auszuschließen.

Es ist aber zu bedenken, dass in fast 80 % der positiven Fälle meist nur bis zu 2/3 der Zellen gefärbt waren, mit ebenso mäßiger Intensität. Eine übermäßige Färbung, bedingt durch einen Fehler im Färbevorgang, liegt also nicht vor.

Es fand sich in der vorliegenden Studie kein signifikanter Zusammenhang mit dem Grading. Die Korrelation mit p53 wurde bereits in Kapitel 6.5.1 beschrieben. Eine weitere signifikante Korrelation ergab der Vergleich mit EGFR und EGFR innere Domäne. Hier zeigte sich ein Zusammenhang zwischen an der Kinaseaktivierung beteiligten Proteinen. Auch mit E-Cadherin zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang.

Lam et al. [83] fanden einen Zusammenhang zwischen der Cyclin D1-Expression und der Differenzierung des Tumors; bei de Vicente et al. [152] korrelierte eine Überexpression mit der Tumorgröße und mit Lymphknotenmetastasen. Eine schlechte Prognose zeigten Tumoren mit sehr starker Expression bei Akervall et al. [4]. Demnach ist Cyclin D1 nicht nur als Prognosefaktor wichtig, sondern kann auch hilfreich sein, um die richtige Therapie zu finden.

5.5.4 EGFR

Alle in dieser Studie untersuchten Proben zeigten eine positive Reaktion und eine hohe Anzahl an gefärbten Zellen, die in fast 80 % der Fälle eine starke Intensität aufwies. Nur bei Aebersold et al. [2] und Harari [49] fand sich ebenfalls eine so hohe Anzahl positiver Fälle. In vergleichbaren anderen Studien waren es deutlich weniger (Tab. 37).

Tabelle 37: Literaturangaben zur positiven Färbung bei EGFR

Quelle	Positive Fälle	Anzahl Patienten
Maiorano, E. et al. [94]	36 %	100
Smith, B.D. et al. [135]	64 %	56
Shiraki, M. et al. [131]	46 %	140
Aebersold, D. M. et al. [2]	100 %	95
Harari, P. M. [49]	80-100%	?
eigene Ergebnisse	100 %	94

Für den EGF-Rezeptor konnte bereits früh gezeigt werden, dass die Hemmung der Ligandenbindung einen Wachstumsarrest in Zellen mit konstitutiv aktiviertem EGFR auslöst. Ein solcher blockierender monoklonaler Antikörper, Cetuximab, zeigt Aktivität in der Monotherapie, insbesondere aber in Kombination mit Radio- und/oder Chemotherapie in Phase-I/II-Studien bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren oder Kolonkarzinomen. Cetuximab bindet an die Domäne III des EGFR und hemmt hierdurch die Bindung von Liganden und die für die Rezeptorbindung wichtige Homodimerisierung des Rezeptors [31].

Cetuximab hemmt dosisabhängig die Proliferation menschlicher Tumorzellen. Diese Hemmung der Proliferation bewirkt einen Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase und/oder einen Anstieg der Apoptose. Außerdem hemmt Cetuximab die Produktion des vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) und somit die Angiogenese [49].

Einen statistischen Zusammenhang ergab der Vergleich mit Cyclin D1 und PDGFR α Anzahl.

5.5.5 EGFR innere Domäne

Der immunhistochemische Marker für die innere Domäne des EGF-Rezeptors ist in der Literatur kaum beschrieben worden. Im Bereich der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches gibt es bisher keine veröffentlichten Studienergebnisse.

Die Untersuchung der inneren Domäne des EGFR ist aber von besonderem Interesse, da zwei Medikamente der zielgerichteten Tumorthherapie genau an dieser katalytischen Domäne angreifen: Beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom belegen aktuelle Daten die Wirksamkeit von Gefitinib und Erlotinib bei einer Untergruppe von Patienten mit aktivierenden Mutationen des EGFR [32].

Gefitinib und Erlotinib zeigen besonders gute Ergebnisse in der Kombination mit einer Chemotherapie, wobei bei Gefitinib der Erfolg nicht von der EGFR-Expression abhängt [49].

Die Untersuchung von EGFR innere Domäne zeigte in der eigenen Analyse weniger gefärbte Zellen als EGFR und eine geringere Intensität. Das weist auf eine größere Spezifität dieses Markers hin und sollte im Zusammenhang mit den schon vorhandenen Medikamenten getestet werden.

5.5.6 c-erb-B2

Die immunhistochemische Färbung von c-erb-B2 zeigte keine Reaktion. Andere Untersuchungen weisen eine Überexpressionsrate von elf bis 60 % auf (Tab. 37).

Tabelle 38: Literaturangaben zur positiven Färbung bei c-erb-B2

Quelle	Positive Fälle	Anzahl Patienten
Craven, J.M. et al. [29]	41 %	93
Field, J.K. et al. [35]	60 %	75
Khan, A.J. et al. [76]	17 %	67
Scheer, M. et al. [125]	11,3 %	97
eigene Ergebnisse	0 %	94

Als Grund für dieses Ergebnis kommen methodische Ursachen bei der Gewebepreparation und Färbung in Frage. Da bei dieser Studie formalinfixiertes Archivmaterial untersucht wurde, musste vor der Anwendung des Primärantikörpers eine Demaskierung des Epitops erfolgen. Vergleichende Untersuchungen von Press et al. [121] konnten bei Biopsien von Mammakarzinomen unterschiedliche Sensitivitätsraten in Abhängigkeit von der verwendeten Technik nachweisen. Ebenso zeigte Frischmaterial deutlich höhere Positivitätsraten als formalinfixiertes Gewebe.

Auch die Sensitivität und Spezifität verschiedener kommerziell erhältlicher Antikörper scheinen der Grund für die variierenden Überexpressionsraten bei Mammakarzinomen zu sein [121, 99].

Im gleichen immunhistochemischen Labor wird jedoch mit identischer Methode die Bestimmung des c-erb-B2-Status an Gewebe von Mammakarzinomen erfolgreich durchgeführt. Es kann auch geschlossen werden, dass im vorliegenden Material von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx keine Überexpression von c-erb-B2 vorhanden ist und somit kein Ansatz für eine zielgerichtete Therapie vorliegt. Eine weiterführende Untersuchung mit molekularpathologischen Methoden, bzw. eine In-situ-Hybridisierung wäre interessant.

Scheer et al. [125] und Khan et al. [76] fanden keinen Zusammenhang mit pathohistologischen Daten oder dem Überleben. Xia et al. [157] ermittelten aber ein verkürztes Überleben bei erhöhter c-erbB2-Expression.

Beim Mammakarzinom wird bereits ein von der FDA zugelassenes semiquantitatives immunhistochemisches Testkit (Hercep-Test®) zur Bestimmung des c-erbB2-Status verwendet [45]. Als Testverfahren vor einer geplanten Therapie mit Trastuzumab (Herceptin®) hat die Immunhistochemie als einfaches Verfahren große Bedeutung erlangt [125].

Der Anti-Her2/Erb-B2-Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) entfaltet seine Wirkung, indem er die Heterodimerbildung zwischen Her2/neu und dem EGF-R blockiert und dadurch mit der Signaltransduktion von Her2/neu interferiert. Ein natürlicher Ligand konnte für Erb-B2 bisher nicht nachgewiesen werden. Durch diese Blockade der Signaltransduktion vermittelt Trastuzumab in Her2/neu überexprimierenden Zellen eine

Wachstumshemmung und sensibilisiert diese Zellen für die Apoptoseinduktion, z. B. durch Chemotherapeutika [31].

Bisher lässt sich auf Grund der unterschiedlichen Ergebnisse beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Oropharynx dieses Verfahren nicht übertragen.

5.5.7 c-kit

Bei der Untersuchung von c-kit ließ sich ebenfalls keine Färbung erkennen. Eine c-kit Überexpression wurde bisher in GISTs (gastrointestinal stromal tumors) [56], der Uvea [5], kleinzelligen Lungenkarzinomen [104], nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen [116], akuten myeloblastischen Leukämien [64], Keimzelltumoren [141], Brustkrebs [55, 104], einigen Arten von Speicheldrüsenkarzinomen [66], Keimzelltumoren des Hodens [104] und Glioblastomen [88] gefunden.

Am besten untersucht ist c-kit an soliden Tumoren in Zusammenhang mit GISTs. Hier wird in der Therapie auch schon der kompetitive Hemmer der Tyrosinkinase Imatinib (STI571, Glivec®) angewandt. Imatinib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der den c-kit-Tyrosinkinase-Oberflächenrezeptor blockiert. Ebenfalls auf c-kit ansprechende Inhibitoren sind PKC412 (Midostaurin) und PTK 787 (Vatalanib), die sich noch in der Entwicklung bzw. Testung befinden [15].

Bruce et al. [18] zeigten in einer in-vitro-Studie, dass Imatinib eine wachstumshemmende Wirkung bei Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches hat. Außerdem zeigt Imatinib einen synergistischen Effekt in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin.

Die eigenen Untersuchungsergebnisse legen nahe, dass Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx, zumindest anhand der bei c-kit gewonnenen Resultate, nicht von einer Therapie mit Glivec® profitieren würden. Dem stehen die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen mit PDGFR α gegenüber (s. S. 78).

Verweisend auf die Diskussion der negativen Untersuchungsergebnisse mit c-erb-B2 (s. S. 76) wäre auch hier eine weiterführende molekulargenetische Untersuchung zur Überprüfung der konventionellen immunhistochemischen Methoden zu erwägen, was jedoch im Rahmen dieser Studie nicht vorgesehen war.

5.5.8 PDGFR α

Fast 99 % der untersuchten Proben waren positiv und eine hohe Anzahl der Fälle zeigte viele und stark angefärbte Zellen. Es lag eine hohe Sensitivität für PDGFR α vor.

Li et al. [90], Aebersold et al. [2] und Ongkeko et al. [111] fanden auch eine ziemlich hohe Anzahl an positiven Fällen, wobei die Ergebnisse von Li et al. und Aebersold et al. mit unter 80 % noch deutlich unter dem in der vorliegenden Studie ermittelten Ergebnis liegen (Tab. 38).

Tabelle 39: : Literaturangaben zur positiven Färbung bei PDGFR α

Quelle	positive Fälle	Anzahl Patienten
Li, C. et al. [90]	72,4 %	98
Aebersold, D.M. [2]	75 %	95
Ongkeko, W.M. [111]	100 %	38
eigene Ergebnisse	98,9 %	94

In der statistischen Auswertung zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zu Werten von p53 und EGFR, die bereits in Kapitel 6.5.1 und 6.5.4 beschrieben wurden.

Im Bereich des Kopfes und des Halses ist PDGFR α bisher wenig untersucht worden, das Ergebnis dieser Studie sollte jedoch als Anstoß dienen, weitere Untersuchungen anzustreben. Es liegen bereits mehrere Untersuchungen über die Expression bei Prostatakarzinomen, Glioblastomen, Eierstockkrebs, GISTs, Kaposi-Sarkomen u.v.m. vor [15, 78, 123].

Für die Therapie von menschlichen soliden Tumoren sind eine Reihe von PDGFR-Kinase-Inhibitoren entwickelt worden. Viele dieser Medikamente sind noch immer in einem frühen Stadium der Entwicklung und es muss bedacht werden, dass sie häufig nicht spezifisch für PDGFR sind und auf mehrere Tyrosinkinase ansprechen.

Der am besten untersuchte und für die Therapie von GISTs und der chronischen myeloischen Leukämie zugelassene Inhibitor ist Imatinib, worauf schon im Zusammenhang mit c-kit hingewiesen wurde. Imatinib ist auch ein Inhibitor für die PDGFR-Kinase und zeigt in diesem Zusammenhang schon gute Ergebnisse beim Dermatofibrosarcoma protuberans, beim Prostatakarzinom und beim Glioblastom [15].

Die Ergebnisse bei PDGFR α in der vorliegenden Studie lassen hoffen, dass der Einsatz von Imatinib auch im Kopf-Hals-Bereich möglich wird.

Weitere Inhibitoren für die PDGFR-Kinase sind SU6, SU11248, SU101 (Lefunamide), Bay43-9006, PKC412 (Midostaurin), PTK787 (Vatalanib), CPD860 und CP-673,451 (alle noch in der Entwicklung, bzw. Testung) [15].

5.5.9 bcl-2

Die Anzahl der positiv bewerteten Proben lässt sich mit anderen Arbeiten schwer vergleichen. Der Grenzwert, ab welchem eine Probe als positiv bezeichnet wird, liegt bei sehr unterschiedlichen Prozentsätzen (Tab. 39). Auch zeigen die Studien untereinander große Unterschiede in den ermittelten Werten.

Tabelle 40: Literaturangaben zur positiven Färbung bei bcl-2

Quelle	Positive Fälle	Anzahl Patienten	Bewertungsschwelle
Jayasurya, R. et al. [65]	59 %	125	
Jordan, R.C. et al. [69]	60 %	30	>25 % der Zellen positiv
Kannan, K. et al. [70]	23 %	39	>25 % der Zellen positiv
Lehmann, K. [87]	30 %	20	>25 % der Zellen positiv
Singh, B.B. et al. [134]	25 %	60	
Stoll, C. [139]	31,8 %	107	
Yao, L. et al. [162]	5 0%	52	>10 % der Zellen positiv
eigene Ergebnisse	45,7 % (16 %)	94	> 33,3 % der Zellen positiv

Wenn davon ausgegangen wird, dass in dieser Studie zunächst alle Proben, in denen Zellen angefärbt waren, positiv gewertet wurden, liegt die ermittelte Anzahl mit 45,7 % zwischen den in der Erfassung vergleichbaren Werten von Jayasurya et al. [65] (59 %) und Stoll [139] (31,8 %) bzw. Singh et al. [134] (25 %). 29,7 % der untersuchten Tumoren zeigten eine Färbung von mehr als einem Drittel der Tumorzellen, woraus deutlich wird, dass mit 16 % eine hohe Anzahl der ausgewerteten Schnitte nur eine geringe Färbung zeigten.

Es ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression des bcl-2 und dem Grading. Stoll [139], Singh et al. [134], Jordan et al. [69] und Yao et al. [162] fanden ebenso einen Zusammenhang zwischen der bcl-2-Expression und dem Grad der histologischen Differenzierung. Dies entspricht wohl der natürlichen Funktion des bcl-2, Keimgewebe vor dem Untergang durch Apoptose zu bewahren [139].

Einen weiteren signifikanten Zusammenhang ergab der Vergleich mit den Werten von E-Cadherin. Es lässt sich vermuten, dass Zellen, die an Adhäsion verlieren, vermehrt der Apoptose zugeführt werden. Die Korrelationen mit p53 und Cyclin D1, die jedoch nicht signifikant waren, wurden bereits in den Kapiteln 6.5.1 und 6.5.3 erläutert.

Ein viel versprechender Ansatz, den bcl-2-Signalweg in der zielgerichteten Therapie zu nutzen, ist der Einsatz von niedermolekularen bcl-2-Antagonisten. In der Monotherapie von Bronchiolalkarzinomen, Leukämien und Lymphomen zeigt ABT-737 eine eindrucksvolle Aktivität [110].

5.5.10 E-Cadherin

Mit über 99 % war eine sehr hohe Anzahl der Tumoren positiv, lediglich ein Fall zeigte keine Färbung. Ein geringer Teil von sieben Prozent zeigte eine geringere Anzahl gefärbter Zellen, bei 13 % war die Intensität der Färbung lediglich mäßig.

Stoll [139] fand bei 15,4 % der von ihm untersuchten Fälle gar keine Färbung. Die Patienten, die an einem solchen Plattenepithelkarzinom erkrankt waren, hatten eine schlechtere Prognose (Tab. 40). Bei Tanaka et al. [145] war bei 23,3 % weniger als ein Viertel der Zellen positiv. Es war ein Zusammenhang mit dem Auftreten von regionären Lymphknotenmetastasen erkennbar. Shinohara et al. [133] ermittelten bei 3,5 % keine oder eine sehr geringe Färbung. Die E-Cadherin-Expression korrelierte mit invasivem Verhalten der Tumoren und der Ausbildung von Metastasen. In allen drei Studien wurde kein Zusammenhang zwischen einer verringerten Färbung und der Differenzierung gefunden.

Tabelle 41: Literaturangaben zur Färbung bei E-Cadherin

Quelle	Fälle	Anzahl Patienten	Bewertungsschwelle
Stoll, C. [139]	15,4 %	107	komplett negativ
Tanaka, N. et al. [145]	23,3 %	159	< 25 % positiv
Shinohara, M. et al. [133]	3,5 %	52	sehr wenig oder negativ
eigene Ergebnisse	1 %	94	komplett negativ

In der vorliegenden Studie wurde auch keine Korrelation zwischen der E-Cadherin-Expression und dem Grading gefunden. Ein signifikanter Zusammenhang zeigte sich jedoch mit Cyclin D1 und bcl-2, was schon in den Kapiteln 6.5.3 und 6.5.9 beschrieben wurde.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden retrospektiven Studie wurden die Befunde der pathohistologischen Routineuntersuchung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx mit Ergebnissen immunhistochemischer Marker verglichen.

Das untersuchte Material bestand aus 95 Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx. Histologische Schnitte dieser Plattenepithelkarzinome wurden im Institut für Pathologie des HELIOS-Klinikums Bad Saarow untersucht. Dabei wurden zunächst klinische und pathologische Daten erfasst: Jahr, Alter, Geschlecht, Lokalisation, Grading und TNM-Klassifikation. Nach Herstellung weiterer Schnitte fand eine Färbung nach der Labeled-StreptAvidin-Biotin-Methode mit zehn immunhistochemischen Markern statt: p53, Ki-67, Cyclin D1, EGFR, EGFR innere Domäne, c-erb-B2, c-kit, PDGFR α , bcl-2 und E-Cadherin.

Die klinischen Daten ergaben eine Geschlechterverteilung von 86 % männlichen zu 14 % weiblichen Patienten. Das Durchschnittsalter lag bei den Männern bei 55,5 Jahren, bei den Frauen bei 65,9 Jahren. Ab dem Jahr 1997 war ein deutlicher Anstieg der Patientenzahlen zu vermerken.

Die Erfassung des Grading zeigte, dass 57 % der Fälle mittelgradig differenzierte Plattenepithelkarzinome waren, 22 % waren gut differenziert, 19 % waren gering differenziert und lediglich zwei Prozent undifferenziert. Von den in die Studie aufgenommenen Plattenepithelkarzinomen betrafen 36 die Mundhöhle und 58 den Oropharynx.

Zur Beurteilung der immunhistochemischen Reaktionsergebnisse wurden zwei Werte erfasst: die Anzahl gefärbter Zellen und die Intensität der Färbung. Aus diesen beiden Werten wurde der immunhistochemische Score des Markers ermittelt.

Der etablierte Marker Ki-67 zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit dem pathohistologischen Grading, p53 jedoch nicht.

In der Gruppe der Tyrosinkinaserzeptoren wiesen Antikörper gegen c-erb-B2 und c-kit keine immunhistochemischen Markierungen auf. Damit lässt sich der beim Mammakarzinom schon routinemäßig angewandte Hercep-Test nicht auf Plattenepithelkarzinome in der Region Mundhöhle und Oropharynx übertragen. Auch

die Erfahrung aus der Anwendung von c-kit bei GISTs lässt sich hier nicht nutzen, d.h. auf der Basis der eigenen Untersuchungen scheint die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie nicht zu bestehen. Diese Ergebnisse sollten durch weiterführende molekularpathologische Untersuchungen am gleichen Material überprüft werden.

EGFR innere Domäne zeigte weniger gefärbte Zellen als EGFR und eine geringere Intensität, was auf eine größere Spezifität dieses Markers hinweist.

Es wurde eine Überexpression von bcl-2 und damit eine verringerte Apoptoserate nachgewiesen. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang ergab sich zwischen der Expression von bcl-2 und dem Differenzierungsgrad.

Eine geringe Anzahl von Proben zeigte eine verringerte Expression von E-Cadherin, ein Zusammenhang mit der Entdifferenzierung ließ sich jedoch nicht erkennen.

Die positiven Resultate der Markierungen mit Cyclin D1, bcl-2, PDGFR α , EGFR und EGFR innere Domäne sollten durch molekularpathologische Methoden am eigenen Material und immunhistochemische Untersuchungen an weiteren Proben kontrolliert werden, um eine zielgerichtete Therapie auch bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx zu ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

1. Adams JM, Cory S: The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 281 (1998), 1322-1326.
2. Aebbersold DM, Froehlich SC, Jonczyk M, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Djonov V: Expression of transforming growth factor- α , epidermal growth factor receptor and platelet-derived growth factors A and B in oropharyngeal cancers treated by curative radiation therapy. *Radiother Oncol* 63 (2002), 275-283.
3. Aitasalo K, Relander M, Virolainen E: The success rate of the flaps after preoperative radiation in head and neck reconstruction. *Annu Chir Gynaecol* 86 (1997), 311-317.
4. Akervall JA, Michalides RJ, Hiroyuki M, Balm A, Borg A, Dictor MR, Jin Y, Loftus B, Mertens F, Wennerberg JP: Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer* 79 (1997), 380-389.
5. All- Ericsson C, Girnita L, Muller-Brunotte A, Brodin B, Seregard S, Ostman A, Larsson O: c-Kit dependent growth of uveal melanoma cells: a potential therapeutic target? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (2004), 2075-2085.
6. Anderssen AP, Bertelsen K, Elbrond O: Malignant tumors of the oropharynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 16 (1977), 63-72.
7. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2002, S. 16.
8. Baas IO, Mulder IR, Offerhaus JA, Vogelstein B, Hamilton SR: An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 172 (1994), 5-12.
9. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA: The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319 (1986), 226-230.
10. Barreton G, Xun L, Stoll C, Fischer-Brandies E, Schmidt M, Löhrs U: Prognostic significance of DNA ploidy in oral squamous cell carcinomas. A

- retrospective flow and image cytometric study with comparison of DNA ploidy in excisional biopsy specimens and resection specimens, primary tumors, and lymph node metastasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79 (1995), 68-76.
11. Bartkova J, Lukas J, Müller H, Strauss M, Gusterson B, Bartek J: Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer. *Cancer Res* 55 (1995), 949-956.
 12. Beckhardt RN, Kiyokawa N, Xi L, Liu TJ, Hung MC, el-Naggar AK, Zhang HZ, Clayman GL: HER-2/neu oncogene characterization in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121 (1995), 1265-1270.
 13. Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu F, Bergold PJ, Ledermann L, Snyder HW Jr, Brodeur D, Zuckerman EE, Hardy WD: A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase family. *Nature* 320 (1986), 415-421.
 14. Birchmeier W, Hulsken J, Behrens J: E-cadherin as an invasion suppressor. *Ciba Found Symp* 189 (1995), 124-136.
 15. Board R, Jayson GC: Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): A target for anticancer therapeutics. *Drugs Res Updates* 8 (2005), 75-83.
 16. Broders AC: The microscopic grading of cancer. *Surg Clin North Am* 21 (1941), 947-962.
 17. Broudy VC, Smith FO, Lin N, Zsebo KM, Egrie J, Bernstein ID: Blasts from patients with acute myelogenous leukaemia express functional receptors for stem cell factor. *Blood* 80 (1992), 60-67.
 18. Bruce IA, Slevin NJ, Homer JJ, McGown AT, Ward TH: Synergistic effects of imatinib (STI 571) in combination with chemotherapeutic drugs in head and neck cancer. *Anti-Cancer Drugs* 16 (2005), 719-726.
 19. Bruner JM, Saya H, Moser RP: p53-Protein immunostaining in routinely processed paraffin-embedded sections. *Mod Pathol* 6 (1993) 189-194.

20. Brunin F, Mosseri V, Jaulerry C, Point D, Cosset JM, Rodriguez J: cancer of the base of the tongue. Past and future. *Head Neck* 109 (1999), 751-759.
21. Calzolari A, Chiarelli I, Bianchi S, Tesserini L, Gallo O, Porfirio B, Mattiuz PL: Immunohistochemical vs molecular biology methods. Complementary techniques for effective screening of p53 alterations in head and neck cancer. *Am J Clin Pathol* 107 (1997), 7-11.
22. Chandler D, El-Naggar AK, Brisbay S, Redline RW, McDonnell TJ: Apoptosis and expression of the bcl-2 proto-oncogene in the fetal and adult human kidney: evidence for the contribution of bcl-2 expression to the renal cancerogenesis. *Hum Pathol* 25 (1994), 49-52.
23. Chiou SK, Rao L, White E : BCL-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 14 (1994), 2556-2563.
24. Chow V, Yuen AP, Lam KY, Ho WK, Wei WI: Prognostic significance of serum protein and p53 antibody in patients with surgical treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 23 (2001), 286-91.
25. Clayman GL, el-Naggar Ak, Lippman SM, Henderson YC, Frederick M, Meritt JA et al.: Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 16/6 (1998), 2221-2232.
26. Clayman GL, Liu TJ, Overholt SM, Mobley SR, Wang M, Janot F et al.: Gene therapy for head and neck cancer. Comparing the tumor suppressor gene p53 and cell cycle regulator WAF1/CIP1 (p21). *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122/5 (1996), 489-493.
27. Copper MP, Bing Tan I, Oppelaar H, Ruevekamp MC, Stewart FA: Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck.. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129 (2003), 709-711.
28. Cordon-Cardo C: Mutation of cell cycle regulators. *Am J Pathol* (1995), 545-560

29. Craven JM, Pavelic ZP, Stambrook PJ, Pavelic L, Gapany M, Kelley DJ, Gapany S, Gluckman JL: Expression of c-erbB-2 gene in human head and neck carcinoma. *Anticancer Res* 12 (1992), 2273-2276.
30. Dabrow MB, Francesco MR, McBrearty FX: The effects of platelet-derived growth factor and receptor on normal and neoplastic human ovarian surface epithelium. *Gynecol Oncol* 71 (1998), 29-37.
31. Daniel P: Molekulare Grundlagen der zielgerichteten Tumorthherapie. *Onkologe* 13 (2007), 8-19.
32. Dietel M: Prädikative Biomarker. *Onkologe* 13 (2007), 56-66.
33. Doglioni C, Dei-Tos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale G: The prevalence of Bcl-2-immunoreactivity in breast carcinomas and its clinicopathological correlates, with particular reference to oestrogen receptor status. *Virchows Arch* 424 (1994), 47-51.
34. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356 (1992), 215-221.
35. Field JK, Spandidos DA, Yiagnisis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM: C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 12 (1992), 613-619.
36. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schluter C, Gerdes J: Assignment of the human Ki-67 gene (MKI-67) to 10q25-qter. *Genomics* 11 (1991), 476-477.
37. Frederiksson L, Li H, Eriksson U: The PDGF family: four gene products from five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 15 (2004), 197-204.
38. Freeman RS, Donoghue DJ: Protein kinases and protooncogenes: biochemical regulators of the eukaryotic cell cycle. *Biochemistry* 30 (1991), 2293-2302.
39. Frixen UH, Nagamine Y: Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion. *Cancer Res* 53 (1993), 3518-3623.

40. Fudge K, Wang CY, Stearns ME: Immunohistochemistry analysis of platelet-derived growth factor A and B chains and platelet-derived growth factor alpha and beta receptor expression in benign prostatic hyperplasia and Gleason-graded human prostate adenocarcinomas. *Mod Pathol* 7 (1994), 549-554.
41. Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G: Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 168 (1992), 85-86
42. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133 (1984), 1710-1715.
43. Gerdes J, Li L, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD: Immunobiochemical and molecular biological characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138 (1991), 867-873.
44. Girod SC, Kaupe M, Pfeiffer P, Pape HD: p53 als Biomarker in der Radiotherapie der Mundhöhlenkarzinome. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2 (1998), 11-13.
45. Graziano C: HER-2 breast assay to herceptin, wins FDA's okay. *CAP Today* 12 (1998), 13-16.
46. Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 281 (1998), 1309-1312.
47. Green DR: Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94 (1998), 695-698.
48. Gumbiner BM: Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84 (1996), 345-357.
49. Harari PM: Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-Related Cancer* 11 (2004), 689-708.
50. Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer. *Science* 266 (1994), 1821-1829.

51. Hausamen JE: Tumorchirurgie. Mund Kiefer Gesichtschir 4 (2000), S142-S145.
52. Heinze R: Untersuchung zur prognostischen Relevanz der p53- Expression im Plattenepithelcarcinom der Mundhöhle. Med. Dissertation (1998), Universität Frankfurt am Main.
53. Hermanek P, Hutter R, Sobin LH, Wagner G, Wittekind Ch (Hrsg.): TNM-Atlas. Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren. 4. Auflage, Berlin Heidelberg New York: Springer, 1998.
54. Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nister M: Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 10 (1992), 3213-3219.
55. Hines SJ, Organ C, Kornstein MJ, Krystal GW: Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth Differ* 6 (1995), 769-779.
56. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Tunio GM, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y: Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279 (1998), 577-580.
57. Hockenberry D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348 (1990), 334-336.
58. Hofele C, Joos S, Flechtenmacher C, Bosch FX, Lichter P, Mühling J, Freier K: Möglichkeiten und Chancen der Gewebechiptechnologie bei Kopf-Hals-Tumoren. *Mund Kiefer Gesichtschir* 6 (2002), 394-401.
59. Honn KV, Tang DG: Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer Metast Rev* 11 (1992), 353-375.
60. Howaldt HP, Vorast H, Blecher JC, Reicherts M, Kainz M: Ergebnisse aus dem DÖSAK-Tumorregister. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 (2000), S216-S225.

61. Hsu S, Singh B, Schuster G: Induction of apoptosis in oral cancer cells: agents and mechanisms for potential therapy and prevention. *Oral Oncol* 40 (2004), 461-473.
62. Hunter T, Pines J: Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79 (1994), 573-582.
63. Iamaroon A, Khemaleekul U, Pongsiriwet S, Pintong J: Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 33 (2004), 30-36.
64. Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, Kanayama Y, Yonezawa T, Tarui S, Griffin JD: Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukaemia cells. *Blood* 78 (1991), 2962-2968.
65. Jayasurya R, Francis G, Kannan S, Lekshminarayanan K, Nalinakumari KR, Abraham T, Abraham EK, Nair MK: p53, p16 and cyclin D1: Molecular determinants of radiotherapy treatment response in oral carcinoma. *Int J Cancer* 109 (2004), 710-716.
66. Jeng YM, Lin CY, Hsu HC: Expression of the c-kit protein is associated with certain subtypes of salivary gland carcinoma. *Cancer Lett* 154 (2000), 107-111.
67. Jiang WG: E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg* 83 (1996), 437-446.
68. Jones AS, Roland NJ, Caslin AW, Cooke TG: A comparison of cellular proliferation markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Laryngol Otol* 108 (1994), 859-864.
69. Jordan RCK, Catzavelos GC, Barrett AW, Speight PM: Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 32B (1996), 394-400.
70. Kannan K, Lakshimi Latha PN, Shanmugam G: Expression of bcl-2 oncoprotein in Indian oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 34 (1998), 373-377.

71. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73 (1994), 2013-2026.
72. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 (1972), 239-257.
73. Kessler PA, Bloch-Birkholz A, Leher A, Neukam FW, Wiltfang J: Evaluation of quality of life of patients with oral squamous cell carcinoma. Comparison of two treatment protocols in a prospective study. *Radiother Oncol* 70 (2004), 275-282.
74. Kessler T, Mesters RM, Berdel WE: Angiogenesehemmung in der Onkologie. *Onkologe* 13 (2007), 20-31.
75. Khademi B, Shirazi FM, Vasei M, Doroudchi M, Gandomi B, Modjtahedi H, Pezeshki AM, Ghaderi A: The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Letters* 184 (2002), 223-230.
76. Khan AJ, King BL, Smith BD, Smith GL, DiGiovanna MP, Carter D, Haffty BG: Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridisation analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 8 (2002), 540-548.
77. Knüfermann RF: Expression von RB, p53 und Ki 67 in oropharyngealen Karzinomen- Histopathologie und klinische Prognose. Dissertation (1996), Universität Köln
78. Koon HB, Bublej GJ, Pantanowitz L, Masiello D, Smith B, Crosby K, Proper J, Weeden W, Miller TE, Chatis P, Egorin MJ, Tahan SR, Dezube BJ: Imatinib-induced regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 10/23 (2005), 982-989.
79. Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, Leelakriangsak M, Amornphimoltham P: Alterations of p53, pRb, cyclin D1 and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 36 (2000), 334-339.

80. Kroll T, Höffken K, Clement JH: Intrazelluläre Signaltransduktionshemmung. *Onkologe* 13 (2007), 32-45.
81. Kusenda J: Bcl-2 family proteins and leukemia (minireview). *Neoplasma* 45 (1998), 117-122.
82. Kuwashima Y, Uehara T, Kishi K, Shiromizu K, Matsuzawa M, Takayama S: Immunohistochemical characterization of undifferentiated carcinomas of the ovary. *J Cancer Res Clin Oncol* 120 (1994), 672-677.
83. Lam KY, Ng IO, Yuen AP, Kwong DL, Wei W: CyclinD1 expression in oral squamous cell carcinomas: clinicopathological relevance and correlation with p53 expression. *J Oral Pathol Med* 29 (2000), 167-172.
84. Lambkin HA, Mothersill CM, Kelehan P: Variations in immunohistochemical detection of p53-protein overexpression in cervical carcinoma with different antibodies and methods of detection. *J Pathol* 172 (1994) 13-18.
85. Lane DP: P53, guardian of the genome. *Nature* 358 (1992), 15-16.
86. Lauwers GY, Scott GV, Karpeh MS: Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. *Cancer* 75 (1995) 2209-2213.
87. Lehmann K: Immunhistochemischer Nachweis von p53, mdm-2 und bcl-2 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und der Vergleich ihrer Expression in Abhängigkeit von der Entfernung zum Tumorzentrum. Dissertation (2000) Humboldt-Universität Berlin.
88. Lerner NB, Nocka KH, Cole SR, Qiu F, Strife A, Ashman LK, Besmer P: Monoclonal antibody YB5-B8 identifies the human c-kit protein product. *Blood* 77 (1991), 1876-1883.
89. Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351 (1991), 453-456.
90. Li C, Shintani S, Terakado N, Klosek SK, Ishikawa T, Nakashiro K, Hamakawa H: Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived growth factor in oral squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34 (2005), 559-565.

91. Lim SC, Zhang S, Ishi G, Endoh Y, Kodama K, Miyamoto S, Hayashi R, Ebihara S, Cho, JS, Ochiai A: Predictive markers for late metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res* 10 (2004), 166-172.
92. Lörz M, Meyer-Breiting E: Bestimmung der Zellproliferation mit Hilfe monoklonaler Antikörper: Untersuchungen an 21 Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich. *Laryngol Rhinol Otol* 67 (1988), 539-542.
93. Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G, Bartek J: Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines. *Oncogene* 9 (1994), 707-718.
94. Maiorano E, Favia G, Maisonneuve P, Viale G: Prognostic implications of epidermal growth factor receptor immunoreactivity in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 185 (1998), 167-174.
95. McDonnell TJ, Nunez G, Platt FM, Hockenberry D, London L, McKearn JP, Korsmeyer SJ: Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol* 10 (1990), 1901-1907.
96. Merkel DE, McGuire WL: Ploidy, proliferative activity and prognosis. *Cancer* 65 (1990), 1194-1205.
97. Meyer D, Birchmeyer C: Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378 (1995), 386-390.
98. Michalides RJ, van Veelen NM, Kristel PM, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, Balm AJ: Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123 (1997), 497-502.
99. Mitchell MS, Press MF: The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridisation for HER-2/neu in assessing the prognosis of breast cancer. *Semin Oncol [Suppl 12]* 26 (1999), 108-116.
100. Mohr C, Bohndorf W, Carstens J : Preoperative radio-chemotherapy and radical surgery in comparison with radical surgery alone. A prospective,

- multicentric, randomised DOSAK study of advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity and the Oropharynx (a 3-year-follow –up). *Int J Oral Maxillofac Surg* 23 (1994), 140-148.
101. Mork J: Forty years of monitoring head and neck cancer in Norway-no good news. *Anticancer Res* 18 (1998), 3705-3708.
102. Mosesson Y, Yarden Y: Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy. *Sem Cancer Biol* 14 (2004), 262-270.
103. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Ventura I, Slamon D, Fendly BM: Expression of the p185 encoded by the HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer* 45 (1990), 457-461.
104. Natali PG, Nicotra MR, Sures I, Santoro E, Bigotti A, Ullrich A: Expression of c-kit receptor in normal and transformed human nonlymphoid tissues. *Cancer Res* 52 (1993), 6139-6143.
105. Ninck S, Reisser C, Dyckhoff G, Helmke B, Bauer H, Herold-Mende C: Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 106 (2003), 34-44.
106. Nylander K, Nilsson P, Mehle C, Roos G: p53 mutations, protein expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 71 (1995), 826-830.
107. Nylander K, Schildt EB, Erikson M, Roos G: PCNA, Ki-67, p53, bcl-2 and prognosis in intraoral squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anal Cell Pathol* 14 (1997), 101-110.
108. O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA: The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 38 (2002), 627-640.
109. Odajima T, Sasaki Y, Tanaka N, Kato-Mori Y, Asanuma H, Ikeda T, Satoh M, Hiratsuka H, Tokino T, Sawada N: Abnormal β -catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki-67 labeling index, and clinicopathological features. *Human Pathol* 36 (2005), 234-241.

110. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR: An inhibitor of BCL-2 family proteins induces regression of solid tumors. *Nature* 435 (2005), 677-681.
111. Ongkeko WM, Altuna X, Weismann RA, Wang-Rodriguez J: Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 124/1 (2005), 71-76.
112. Paccagnella A, Orlando A, Marchiori C, Zorat PL, Cavaniglia G, Silens VC, Birillo A, Tomio L, Fila G, Fede A: Phase III trial of initial chemotherapy in stage III or IV head and neck cancers: a study by the Gruppo di Studio sui Tumori della Testa del Collo. *J Natl Cancer Inst* 86 (1994), 265-272.
113. Parkin DN, Läärä E, Muir CS: Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 41 (1988), 184.
114. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, Harris A, Gatter KC, Mason DY: Bcl-2 protein in non-small lung carcinoma. *N Engl J Med* 329 (1993), 690-694
115. Piatelli A, Rubini C, Fioroni M, Iezzi G, Sntinelli A: Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 60 (2002), 532-540.
116. Pietsch T, Nicotra MR, Fraioli R, Wolf HK, Mottolese M, Natali PG : Expression of the c-kit receptor and its ligand SCF in non-small cell carcinoma. *Int J Cancer* 75 (1998), 171-175.
117. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L: Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. *Lancet* 355 (2000), 949-955.
118. Pilotti S, Collini P, Del Bo R, Cattoretti G, Pierotti MA, Rilke F: A novel panel of antibody that segregates immunocytochemically poorly differentiated carcinoma from undifferentiated carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 18 (1994) 1054-1064.
119. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I: Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa, 2nd edition. Berlin: Springer (1997).

120. Platz H, Fries R, Hudec M: Einführung in die "Prospektive DÖSAK-Studie" über Plattenepithelkarzinome der Lippen, der Mundhöhle und des Oropharynx. Dtsch Z Mund-Kiefer-GesichtsChir 12 (1988), 293.
121. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ: Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. Cancer Res 54 (1994), 2771-2777.
122. Remmele W, Stegner HE: Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweis im Mammakarzinomgewebe. Pathologe 8 (1987), 138-140
123. Rossi G, Valli R, Bertolini F, Marchioni A, Cavazza A, Mucciarini C, Migali M, Federico M, Trentini GP, Sgambato A: PDGFR expression in differential diagnosis between KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and other primary soft-tissue tumours of the gastrointestinal tract. Histopathol 46/5 (2005), 522-531.
124. Sachbericht Onkologie, Tumorzentrum Land Brandenburg 2006.
125. Scheer M, Prange W, Petmecky K, Schirmacher P, Zöller JE, Kübler AC: Überexpression/Amplifikation des her-2/neu-Protoonkogenes in oralen Plattenepithelkarzinomen. Mund Kiefer GesichtsChir 3 (2003), 138-145.
126. Schimming R: Zur Prognoserelevanz von p53, Ki-67 und DNA-Ploidie bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Med. Dissertation (1997), Technische Universität Dresden.
127. Schlag PM: Targeted Therapies. Onkologe 13 (2007), 7.
128. Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Ng IO, McMillan A, Ziober BL, Le QT, Silverman S, Fu KK: Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 35 (1999), 333-342.
129. Scholzen T, Gerdes J: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol 182 (2000), 311-322.

130. Seifert G: Orale Karzinome. In: Seifert G (Hrsg.): Oralpathologie. Springer Berlin 2000.
131. Shiaraki M, Odajima T, Ikeda T, Sasaki A, Satoh M, Yamaguchi A, Noguchi M, Nagai I, Hiratsuka H: Combined expression of p53, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor improves estimation of prognosis in curatively resected oral cancer. *Mod Pathol* 18 (2005), 1482-1489.
132. Shin DM, Kim J, Ro, Hittelman J, Roth JA, Hong WK, Hittelman WN: Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 54 (1994), 321-326.
133. Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K, Garrod DR: Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-Cadherin staining, and with tumour behaviour. *J Pathol* 184 (1998), 369-381.
134. Singh BB, Chandler FW, Whitaker B, Forbes-Nelson AE: Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 6 (1998), 692-697.
135. Smith BD, Smith GL, Carter D, DiGiovanna MP, Kasowitz K, Sasaki CT, Haffty BC: Molecular marker expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127 (2001), 780-785.
136. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA: Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122 (1996), 627-632.
137. Stewart BW: Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 86 (1994), 1286-1296.
138. Stoll C, Baretton G, Löhrs U: The influence of p53 and associated factors on the outcome of patients with oral squamous cell carcinoma. *Virch Arch* 433 (1998), 427-433.
139. Stoll C: Phänotypische Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung Proliferations- und Apoptose-assoziiierter Faktoren sowie der Expression von

- Adhäsionsmolekülen in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx. Med. Habilitationsschrift (2001), Humboldt-Universität Berlin.
140. Strachen DS: Histology of the oral mucosa and tonsils. In: Avery, J.K., Steele, P.F., eds.: Oral development and histology, 2nd edition. New York: Thieme (1994), 298-320.
 141. Strohmeyer T, Peter S, Hartmann M, Munemitsu R, Ackermann R, Ullrich A, Slamon DJ: Expression of the hst-1 and c-kit protooncogenes in human testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 51 (1991), 1811-1816.
 142. Sudbø J, Bryne M, Mao L, Reuben L, Reith A, Kildal W, Davidson B, Søland TM, Lippmann SM: Molecular based treatment of oral cancer. *Oral Oncol* 9 (2003), 749-758.
 143. Takeichi M: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251 (1991), 1451-1455.
 144. Takeichi M: Functional correlation between cell adhesion properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 75 (1977), 464-474.
 145. Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M: Expression of E-cadherin, α -catenin, and β -catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 89 (2003), 557-563.
 146. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM: Cloning of the chromosomes breakpoint of neoplastic B cellc with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226 (1984), 1097-1099.
 147. Tucker SL, Thames HD: The effect of patient-to-patient variability on the accuray of predictive assays of response to radiotherapy-a theoretical evaluation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 17 (1989), 145-157.
 148. Ullrich A, Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61 (1990), 203-212.
 149. Utela M, Lauren J, Bergsten E, LI X, Horelli-Kuitunen N, Eriksson U: Chromosomal location, exon structure, and vascular expression patterns of the human PDGFC and PDGFD genes. *Circulation* 103 (2001), 2242-2247.

150. Verwij J, Jong PC de, Mulder M de: Induction chemotherapy with cisplatin and continuous infusion 5-fluorouracil in locally far-advanced head and neck cancer. *Am J Clin Oncol* 12 (1989), 420-424.
151. Vicente de JC, Junquera Gutierrez LM, Zapatero AH, Forcelledo Fresno MF, Hernandez-Vallejo G, Lopez Arranz JS: Prognostic significance of p53 expression in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. *Head Neck* 26 (2004), 22-30.
152. Vicente de JC, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, Lopez-Arranz JS: Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol* 38 (2002), 301-308.
153. Vogelstein B, Kinzler KW: p53 function and dysfunction. *Cell* 70 (1992), 523-526.
154. Wagner G (Hrsg): *Tumorlokalisationsschlüssel*. 5. Auflage, Berlin Heidelberg New York: Springer, 1993.
155. Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP, Mann WJ: Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104 (1995), 503-510.
156. Wittekind Ch, Wagner G (Hrsg.): *Klassifikation maligner Tumoren*. 5. Auflage, Berlin Heidelberg New York: Springer, 1997.
157. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, Li L, Katz RL, Hung MC: Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 Is a Stronger Predictor for the Outcome of Oral Squamous Cell Carcinoma Than Any Individual Family Members. *Clin Cancer Res* 5 (1999), 4164-4174.
158. Xu J, Gimenez-Conti IB, Cunningham JE, Collet AM, Luna MA, Lanfranchi HE, Spitz MR, Conti CL : Alterations of p53, cyclin D1, Rb and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. *Cancer* 83 (1998), 204-212.
159. Yamazaki Y, Chiba I, Hirai A, Notani K, Kashiwazaki H, Tei K, Totsuka Y, Iizuka T, Kohgo T, Fukuda H: Radioresistance in oral squamous cell

- carcinoma with p53 DNA contact mutation. *Am J Clin Oncol* 36/5 (2003), 124-129.
160. Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Mizuno A: p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: Relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 94 (2002), 593-600.
161. Yang E, Korsmeyer SJ: Molecular thanatopsis: A discourse on the BCL2 family and cell death (review). *Blood* 88 (1996), 386-401.
162. Yao L, Iwai M, Furuta I: Correlations of bcl-2 and p53 expression with the clinicopathological features in tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 35 (1999), 56-62.
163. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A: Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 6 (1987), 3341-3351.
164. Yarden Y, Ullrich A: Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57 (1988), 443-478.
165. Zetter BR: Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 4 (1993), 219-229.
166. Zidar N, Gale N, Cor A, Kambic V: Expression of Ki-67-Antigen and proliferative cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the larynx. *J Laryngol Otol* 110 (1996), 440-445.
167. Zoeller J, Flentje M, Sinn P, Born IA: Evaluation of AgNOR and Ki-67 antigen as cell kinetic parameters in oral dysplasias and carcinomas. *Anal Cell Pathol* 7 (1994), 77-88.
168. Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL, Hsu RY, Birkett NC, Okino KH, Murdock DC, Jacobsen FW, Langley KE, Smith KA, Takeishi T, Cattanchi BM, Galli SJ: Stem cell factor is encoded at the sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63 (1990), 213-224.

Danksagung

Besonderer Dank gilt PD Dr. med. habil. Stefan Koch für die Überlassung des Themas und die anregende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen des Institutes für Pathologie in Bad Saarow danke ich für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Danken möchte ich auch Dr. Peter Kläring für die Hilfe bei der Statistik, Frau Veronika Linke für die Durchsicht des Manuskriptes und meinen Eltern und meinem Lebensgefährten Dr. Ralf Wussogk für ihre anhaltende Unterstützung und ihren Zuspruch.

Lebenslauf

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

Erklärung

Ich, Ursula Höfle, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Immunhistochemische Untersuchungen von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx in Hinblick auf Anwendungsmöglichkeiten einer innovativen zielgerichteten Therapie („targeted therapy“)" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

