

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Schubert)

Einfluss von Survivin, VEGF-C und Carboanhydrase IX auf die Prognose des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle

Dissertation

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

Vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin –Luther-Universität Halle Wittenberg

Von Katharina Bolte
Geboren am 19.11.1981 in Meppen

Betreuer: PD Dr. Dr. A.W. Eckert

Gutachter:
Prof. Dr. Dr. J. Schubert, Halle Saale
Prof. Dr. D. Vordermark, Halle Saale
Prof. Dr. Dr. M. Kunkel, Bochum

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 17.07.2012
Tag der öffentlichen Verteidigung: 11.04.2013

Meiner Familie

Referat

In den letzten Jahren hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate des Mundhöhlenkarzinoms, das zu den zehn häufigsten Malignomen des Menschen gehört, trotz Einführung neuer diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen nicht wesentlich verbessert und liegt zum gegenwärtigen Zeitpunkt bei rund 50%, wobei diesbezüglich in der Literatur unterschiedliche Angaben kursieren.

In der Vergangenheit sind immer wieder nachdrücklicher Forderungen nach verlässlichen Markern bezüglich der Prognoseabschätzung gestellt worden, die das TNM System sinnvoll ergänzen sollen. Hauptziel ist hierbei eine individualisierte Prognosestellung. In diesem Sinne erscheint die Analyse von sog. Hypoxie-assoziierten-Proteinen bzw. deren Targetproteinen Erfolg versprechend.

Anhand von immunhistochemischen Färbungen an 75 Paraffinschnitten von Mundhöhlenkarzinomen wurde die Expression der tumorrelevanten Proteine Survivin (Apoptosemarker), VEGF-C (Proliferationsmarker), und Carboanhydrase IX (CAIX) (Hypoxiemarker) untersucht und mit den klinisch-pathologischen Daten TNM-System, Grading und der 5-Jahres-Überlebensrate korreliert.

Die 5-Jahres-Überlebensrate aller untersuchten 75 Karzinompatienten betrug 61,0% und hing signifikant mit dem Stadium der Tumorerkrankung, der Größe des Primärtumors und dem Stadium des Lymphknotenbefalls zusammen.

Die Expression aller drei untersuchten Proteine war unabhängig von der Größe des Primärtumors, dem Stadium der Tumorerkrankung und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, das Survivin zeigte eine positive Korrelation zum Grading.

In der singulären Betrachtung von CAIX und VEGF-C ließ sich kein signifikant erhöhtes Risiko am Tumor zu versterben bei hoher Expression nachweisen, das Survivin zeigte eine schlechtere Überlebensrate bei starker im Vergleich zu schwacher Expression ohne Signifikanz. Die kombinierte Analyse konnte ein signifikant 5,1fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens bei starker Expression von Survivin und CAIX und gleichzeitig schwacher Expression von VEGF-C nachweisen.

Das Survivin scheint nach Betrachtung der Ergebnisse aus der Gruppe der untersuchten Proteine ein vielversprechender Marker zur Prognoseabschätzung zu sein. Es besteht Hoffnung, dieses Protein im Rahmen einer zügigen und kostengünstigen Nachweismethode in Probeentnahmen für die Abschätzung der Prognose des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle und zur Therapiestratifizierung heranziehen zu können.

Bolte, Katharina: Einfluss von Survivin, VEGF-C und Carboanhydrase IX auf die Prognose des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle. Halle (Saale), Med. Fak., Diss. 80 Seiten, 2012

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Das Mundhöhlenkarzinom..... | 1 |
| 1.2. Tumorgenese und Tumormarker | 6 |
| 1.3. Tumorhypoxie | 8 |
| 1.4. Apoptose | 9 |
| 1.5. Survivin..... | 11 |
| 1.6. VEGF-C | 13 |
| 1.7. Carboanhydrase IX | 15 |
| | |
| 2. Zielsetzung der Arbeit..... | 18 |
| | |
| 3. Material und Methoden | 19 |
| 3.1. Patienten | 19 |
| 3.2. Immunhistochemie..... | 20 |
| 3.3. Auswertung..... | 21 |
| 3.4. Statistische Auswertung..... | 23 |
| | |
| 4. Ergebnisse | 24 |
| 4.1. Patienten und Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit vom TNM- Stadium | 24 |
| 4.2. Immunhistochemie..... | 29 |
| 4.2.1. Survivin | 29 |
| 4.2.2. VEGF-C..... | 31 |
| 4.2.3. Carboanhydrase IX..... | 34 |
| | |
| 5. Überlebenswahrscheinlichkeit und Korrelation mit den einzelnen Proteinen | 38 |
| | |
| 6. Diskussion | 47 |
| 6.1. Patienten und Überlebenswahrscheinlichkeiten | 47 |
| 6.2. Survivin..... | 52 |
| 6.3. VEGF-C | 56 |
| 6.4. Carboanhydrase IX | 62 |
| | |
| 7. Zusammenfassung und Ausblick | 66 |
| | |
| 8. Literaturverzeichnis | 68 |
| | |
| 9. Thesen..... | 79 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|---|
| ABC-Methode | Avidin-Biotin-Complex |
| AJCC | American Joint Committee on Cancer |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCL2 | B-cell Lymphoma 2 |
| BIR | „baculovirus IAP repeats“ |
| CA | Carboanhydrase |
| CARD | Caspase-recruitment-domain |
| CIS | Carcinoma in situ |
| CIP | Computergestützte individuelle Prognosestellung |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DÖSAK | Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| EU | Europäische Union |
| GLUT | Glucose Transporter |
| Gy | Gray |
| HCO ₃ ⁻ | Bicarbonat |
| HDM2 | „Human-double-minute-2“ |
| HIF 1 α | Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 alpha |
| HPV | Humanes Papilloma Virus |
| HR | Hazard Ratio |
| IAP | Inhibitor of Apoptosis |
| IRS | Immunreaktiver Score nach Remmele |
| Kb | Kilo-Basenpaare |
| kDa | kilo Dalton |
| LK | Lymphknoten |
| PBS | Phosphate-buffered-Saline |
| PIGF | Placental Growth Factor |
| RAS | Rat Sarcoma, ein Protoonkogen |
| RB | Retinoblastom, ein Protoonkogen |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| TIP | Therapieabhängiger Prognoseindex |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| UICC | Union Internationale Contre Le Cancer |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |

1. Einleitung

1.1. Das Mundhöhlenkarzinom

Mundhöhlenkarzinome gehören zur Gruppe der Kopf-Hals-Karzinome und umfassen alle bösartigen Tumoren der Mundhöhle und der Zunge. Sie stehen weltweit an sechster Stelle der häufigsten Malignome des Menschen (Brocklehurst et al., 2010). Im Jahr 2004 wurden in der Europäischen Union (EU) 67.000 Neuerkrankungen registriert (Warnakulasuriya, 2010).

Die Epidemiologie des Mundhöhlenkarzinoms zeigt in den vergangenen Jahren einige Veränderungen. Lagen in Deutschland 1980 laut Statistik des Robert-Koch-Institutes noch 5.685 Neuerkrankungsfälle bei den Männern und 1.650 Fälle bei den Frauen vor, stieg die Zahl für das zuletzt erfasste Jahr 2010 auf 8.360 Neuerkrankungen bei den Männern und 3040 bei den Frauen. Interessanterweise ist seit Ende der achtziger Jahre eine steigende Inzidenz vor allem bei den Frauen zu beobachten, während sich die Anzahl der Neuerkrankungen männlicher Patienten in den letzten Jahren kaum verändert hat. Waren in der Vergangenheit deutlich mehr Männer von der Erkrankung betroffen, hat sich das Verhältnis über Jahrzehnte hinweg verschoben und liegt aktuell nur noch bei knapp 3:1 zugunsten der Männer (Robert-Koch-Institut, 2012b).

Ein deutlicher Negativtrend lässt sich bezüglich des Erkrankungsalters verfolgen. Noch vor einigen Jahren waren überwiegend Patienten jenseits des 50. Lebensjahres betroffen, aktuell zeigt sich eine zunehmende Tendenz in Richtung eines jüngeren Erkrankungsalters (Westra, 2009).

In 90% der Fälle handelt es sich beim Vorliegen eines Mundhöhlenkarzinoms um Plattenepithelkarzinome (Warnakulasuriya, 2009). Andere Formen sind z.B. das Nicht-Plattenepithelkarzinom, Sarkome, Lymphome und Melanome (Zini et al., 2010).

Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms sind Nikotin (25%) oder Alkohol (7-19%), mangelhafte Ernährung (10-15%), sowie eine unzureichende Mundhygiene hinreichend bekannt. Ein Zusammenhang mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) wird diskutiert (Warnakulasuriya, 2009). Weitere negative Faktoren können chronische Reizzustände durch schlecht sitzende Zahnprothesen darstellen (Vokes et al., 1993).

Limitierend für die klinische Prognose ist die Fähigkeit des Mundhöhlenkarzinoms zu metastasieren und destruierend zu wachsen (Schwenzer und Ehrenfeld, 2010).

Trotz zahlreicher Fortschritte in Diagnostik und Therapie stagniert das 5-Jahresüberleben der Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom in den letzten Jahrzehnten. Gegenwärtig beträgt es rund 50% (Warnakulasuriya, 2009).

Seit etwa einem Jahrzehnt beschäftigt sich die Wissenschaft mit der Selektierung molekularer Marker zur individualisierten Prognoseabschätzung dieser Tumorentität in Ergänzung zum etablierten TNM-System (Lothaire et al., 2006; Schliephake, 2003). Sehr Erfolg versprechende Ansätze konnten für die sog. Hypoxie-assoziierten Proteine verzeichnet werden (Bussink et al., 2003; Eckert et al., 2008).

Schon seit Jahren wurde in der Literatur diskutiert, inwieweit das klassische System aus TNM und Grading ausreichend ist, um die Prognose von Tumoren abschätzen zu können. Bereits 2000 sah Hausamen die TNM Klassifikation als nicht unumstritten an und berichtete über Forderungen verschiedener Autoren, histologische Parameter und sog. molekulare Tumormarker für die Prognosestellung zu berücksichtigen (Hausamen, 2000). Auch Bisoffi schätzte dieses System als nicht mehr suffizient und verlässlich ein (Bisoffi et al., 2006).

Tab. 1 zeigt die aktuell gültige TNM-Klassifikation des Mundhöhlenkarzinoms, die Abb. 1 und 2 entsprechende klinische und CT-morphologische Darstellungen von Mundhöhlenkarzinomen.

Tab. 1: TNM-Klassifikation des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle (Wittekind und Meyer, 2010)

| Stadium | Ausbreitung |
|------------------|---|
| T-Stadium | |
| Tx | kann nicht beurteilt werden |
| T0 | kein Anhalt für Primärtumor |
| Tis | Carcinoma in situ |
| T1 | < 2cm |
| T2 | > 2cm < 4cm |
| T3 | > 4cm |
| T4a | <u>Lippe</u> : Infiltration durch kortikalen Knochen, N. alveolaris inf., in Mundhöhlenboden oder in die Haut von Kinn oder Gesicht |

| | |
|------------------|---|
| T4b | <p><u>Mundhöhle:</u> Infiltration durch kort. Knochen in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus, M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut</p> <p><u>Lippe und Mundhöhle:</u> Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Proc. pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt A. carotis interna</p> |
| N-Stadium | |
| Nx | Regionäre LK nicht beurteilbar |
| N0 | ∅ regionären LK-Metastasen |
| N1 | Ipsilateral, solitär ≤ 3cm |
| N2a | Ipsilateral, solitär, 3-6cm |
| N2b | Ipsilateral, multipel, ≤ 6cm |
| N2c | Bilateral, kontralateral, ≤ 6cm |
| N3 | LK-Metastasen > 6cm |
| M-Stadium | |
| Mx | Nicht beurteilbar |
| M0 | Keine Fernmetastasen |
| M1 | Fernmetastasen vorhanden |

Das Tumorstadium ist wie folgt klassifiziert:

- 0 Tis, N0, M0
- I T1, N0, M0
- II T2, N0, M0
- III T1/T2, N1, M0
T3, N1, M0
- IVA T1/T2/T3, N2, M0
T4a, N0/N1/N2, M0
- IVB jedes T, N3, M0
T4b, jedes N, M0
- IVC jedes T, jedes N, M1

Aussagen über die histopathologische Differenzierung des Karzinoms können mittels des Gratings vorgenommen werden:

- Gx kann nicht beurteilt werden
- G1 gut differenziert
- G2 mäßig differenziert
- G3 schlecht differenziert
- G4 undifferenziert

Unterschieden werden die klinische (TNM) und die pathologische (pTNM) Klassifikation. Die pathologische Klassifizierung erfolgt anhand histopathologischer Untersuchungen von resezierten Tumoren, die klinische Klassifikation stützt sich prätherapeutisch auf bildgebende diagnostische Verfahren oder Biopsien.

Zur Beschreibung eines Residualtumors nach erfolgter Therapie kommt die R-Klassifikation zur Anwendung:

- RX kann nicht beurteilt werden
- R0 kein Residualtumor
- R1 Mikroskopischer Residualtumor
- R2 Makroskopischer Residualtumor (Wittekind und Meyer, 2010)



Abb.1: Klinisches und CT-morphologisches Bild eines Plattenepithelkarzinoms des anterioren Mundbodens bei einem 68-jährigen männlichen Patienten (pT4 pN1 M0 G2)



Abb. 2: Klinisches und CT-morphologisches Bild eines Alveolarfortsatzkarzinoms rechts bei einer 64-jährigen weiblichen Patientin (pT4 pN0 M0 G2)

1.2. Tumorgenese und Tumormarker

Seit den 90er Jahren werden Forderungen nach neuen Parametern zur Prognoseabschätzung des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle gestellt, die das weit verbreitete TNM-System sinnvoll ergänzen sollen.

Hierzu wurden in zahlreichen Studien sogenannte Tumormarker untersucht. Es handelt sich um Proteine, die während der Tumorgenese exprimiert werden bzw. an ihr beteiligt sind und mittels einfacher Nachweismethoden wie z.B. der Immunhistochemie relativ unkompliziert entdeckt werden können.

Die größte hierzu veröffentlichte Übersichtsarbeit stammt von Schliephake aus dem Jahr 2003, der die Tumormarker nach ihrer Funktion in vier verschiedene Gruppen einteilte (Schliephake, 2003):

Tab. 2: Einteilung der Tumormarker zur Prognoseabschätzung beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (nach Schliephake 2003)

| Gruppe | Funktion |
|---------------|--|
| I | Zellzyklusakzeleration und Proliferation |
| II | Tumorsuppression und Apoptose |
| III | Angiogenese |
| IV | Adhäsionsmoleküle und Matrixdegeneration |

Das Wachstum der Zellen im menschlichen Organismus unterliegt einer ständigen Regulation. Im Rahmen des Zellzyklus teilen sich Zellen und werden neue Zellen gebildet. Die Apoptose eliminiert Zellen nach einem exakten Plan aus dem Organismus.

Der Zellzyklus kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden: die Interphase mit ihren Unterphasen G1, S und G2, in der die Zelle neues Erbgut synthetisiert und dieses verdoppelt und die Mitose, in der es zur Teilung des Kerns kommt. Der Ablauf eines Zellzyklus wird in Abb. 3 verdeutlicht.

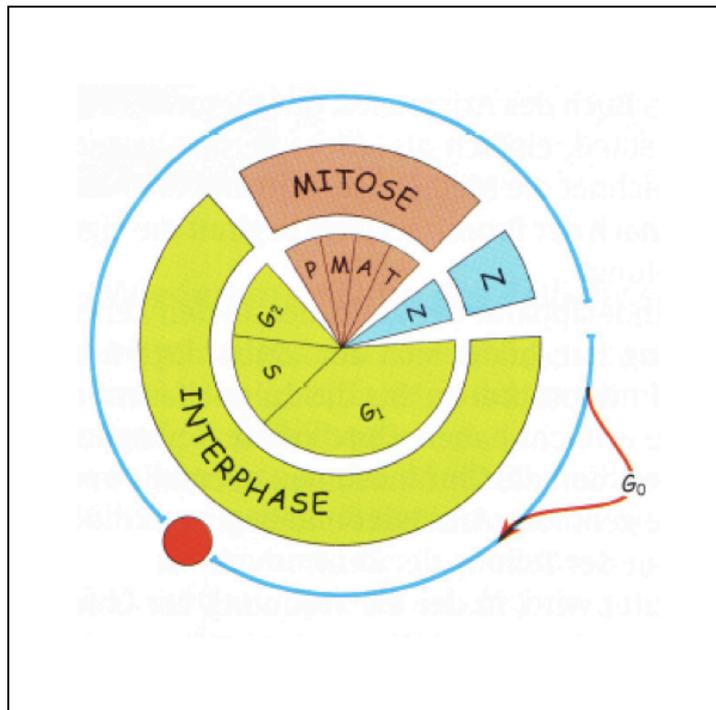


Abb. 3: Zellzyklus (Horn et al., 2003)

Verschiedene Proteine sind in den Zyklus eingeschaltet, um den geordneten Ablauf zu garantieren:

- Wachstumsfaktoren, die für die Differenzierung der Zellen verantwortlich sind, sind an Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität gekoppelt, die die Information an das Zellinnere weitergeben. Sie induzieren die Zellteilung. Werden einer Zelle Wachstumsfaktoren entzogen, geht sie in die Ruhephase, die G₀ Phase oder in die Apoptose über.
- Das RB-Protein (erstmalig entdeckt im Retinoblastom) ist ein Zellkernprotein und bildet einen zentralen Regulationspunkt im Zellzyklus. Durch Wachstumsfaktoren erfolgt die Phosphorylierung dieses Proteins, das daraufhin die Expression weiterer Gene, insbesondere Transkriptionsfaktoren erlaubt, die den Zellzyklus induzieren.
- Das P53-Gen ist neben dem RB-Protein ein weiteres wichtiges Protein zur Regulation des Zellwachstums. Es hat ein Molekulargewicht von 53 kD und verhindert die Teilung einer Zelle bzw. leitet deren Apoptose ein, wenn es zu einer Schädigung des Erbguts gekommen ist. In über der Hälfte aller menschlichen Tumoren findet sich eine Mutation des P53-Gens (Löffler und Petrides, 1998).

Geraten die Regulations- und Kontrollmechanismen im Organismus aus dem Gleichgewicht kann es zu unkontrolliertem Wachstum von Zellen, zu Mutationen und zur Entstehung von Tumoren kommen. Proliferationsgene zeigen eine erhöhte Aktivität, Antiproliferationsgene, auch Tumorsuppressorgene genannt, weisen eine verminderte Aktivität auf.

Sogenannte Tumormarker sind in der Lage, verschiedene Aspekte des dysregulierten Wachstums im Tumor aufzudecken.

1.3. Tumorhypoxie

Nicht nur die Aktivität der erwähnten Protoonko- und Tumorsuppressorgene ist für die Entstehung eines Tumors verantwortlich. Seit mehreren Jahrzehnten werden die Auswirkungen einer hypoxischen Situation im Tumor auf dessen Ausbreitung untersucht.

Die Hypoxie entsteht aus einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot- und bedarf. Tumorzellen scheinen in der Lage zu sein, sich an das minimierte Sauerstoffangebot zu adaptieren und unter den gegebenen Bedingungen zu proliferieren. Nicht nur für die Tumorentstehung und -progression haben diese Vorgänge entscheidende Auswirkungen, sondern hypoxische Tumoren zeigen auch eine erhöhte Resistenz gegenüber Strahlen- oder Chemotherapie, verbunden mit einer deutlich schlechteren Prognose (Janssen et al., 2005).

Zu unterscheiden ist die akute, durch Minderperfusion verursachte von der chronischen, durch mangelnde Diffusion bedingten Hypoxie. Tumorzellen sind unter hypoxischen Bedingungen in der Lage, ein eigenes Gefäßsystem auszubilden, um ihre Versorgung zu gewährleisten. Wachsen die Zellen jedoch schneller als das Gefäßsystem, kommt es zur Hypoxie (Isa et al., 2006).

Die Tumorhypoxie wird schon seit langer Zeit als essentieller Bestandteil der Tumorprogression vermutet. Bereits 1936 untersuchte Mottram das negative Ansprechen hypoxischer Tumorzellen auf eine Radiotherapie (Mottram, 1936), ebenso Thomlinson und Gray (Thomlinson and Gray, 1955). In den letzten Jahren ist eine Vielzahl an Studien zu dieser Thematik veröffentlicht worden. Alle belegen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der schlechten Prognose des Mundhöhlenkarzinoms und dem verminderten Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie mit der Hypoxie im Tumor. Die wichtigsten sind von Janssen 2005 in einer Übersichtsarbeit erfasst worden (Janssen et al., 2005). Isa et al konnten eine

Resistenz hypoxischer Zellen auch gegen Zytostatika wie Cisplatin, Bleomycin und 5-Fluoracil nachweisen (Isa et al., 2006).

Für den Einsatz in Diagnostik und Therapie unterscheidet man sog. endogene und exogene Hypoxiemarker. Als exogener Hypoxiemarker kann z.B. Pimonidazol, ein Radiosensitizer, eingesetzt werden, welcher in vivo einem Gewebe zugefügt werden muss, um dessen Sauerstoffspannung zu bestimmen (Airley et al., 2003). Gegenwärtig konzentriert sich die Forschung auf endogene, also im Tumor existente Hypoxiemarker. Mittlerweile ist eine Reihe solcher Marker bekannt, die auf eine Hypoxie im Tumor hinweisen. Zentrales Regulatorprotein der Sauerstoffversorgung von Zellen ist der Hypoxie-induzierbare Faktor mit seiner α -Untereinheit (HIF-1 α) (Harris, 2002; Semenza, 2011). Nach der in der Regel durch Hypoxie getriggerten Aktivierung von HIF-1 α wird letztlich eine ganze Kaskade sog. Regulatorproteine induziert. Dazu gehören auch zahlreiche membranständige Transportproteine und Enzyme (Bussink et al., 2003; Harris, 2002). Wesentliche in diesen Prozess involvierte Proteine sind u.a. die Glukosetransportmoleküle (GLUT) und die Carboanhydrase IX. Beide können durch immunhistochemische Nachweise entdeckt werden.

Einer der für die Angiogenese wichtigsten und am meisten untersuchten Wachstumsfaktoren, der Vascular endothelial growth factor (VEGF) wird ebenfalls durch eine hypoxische Situation aktiviert und gehört der Gruppe der endogenen Hypoxiemarker an.

1.4. Apoptose

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein Regulationsprozess zur Differenzierung und Eliminierung schädlicher oder im Organismus nicht mehr benötigter Zellen (Lo Muzio et al., 2005). Bei diesem Vorgang kommt es zunächst zur Schrumpfung des Zellkerns, die Plasmakernmembran zerfällt und die Zelle beginnt mit der Auflösung, die DNA wird abgebaut.

Die folgenden Erläuterungen basieren auf der Arbeit von Altieri aus dem Jahr 2003 (Altieri, 2003).

Sowohl in der Tumorentstehung, als auch in der Resistenzentwicklung maligner Zellen gegenüber Therapieverfahren spielt die Störung des dynamischen Gleichgewichts zwischen Zellproliferation durch mitotische Teilung und programmiertem Zelltod eine entscheidende Rolle.

Induziert werden kann die Apoptose durch zwei unterschiedliche Wege. Eine Gruppe von Enzymen, die sogenannten Caspasen, haben ebenso wie die Mitochondrien eine

wichtige Bedeutung im Rahmen des programmierten Zelltodes. Die Caspasen liegen in der gesunden Zelle als Procaspasen vor und werden durch Proteolyse aktiviert. Zu unterscheiden sind die Adaptercaspasen oder Initiatorcaspasen von den Effektorcaspasen.

Die Adaptercaspasen, vorwiegend Caspase 8 (extrinsischer Weg) und 9 (intrinsischer Weg), stellen die Verbindung zwischen dem apoptoseauslösenden Signal und den Effektorcaspasen her. Die Effektorcaspasen sind für die eigentliche Apoptose nach einem geordneten Programm verantwortlich. Als wichtigstes Mitglied ist hier die Caspase 3 zu nennen.

Zur intrinsisch eingeleiteten Apoptose kommt es bei Vorliegen eines Sauerstoffmangels oder einer DNA-Schädigung. Über eine Schädigung der Mitochondrien kann der Zelltod ausgelöst werden. Hierbei ist das p53-Protein, ein Transkriptionsfaktor, dessen Konzentration nach einer Schädigung der Zelle stark ansteigt, von entscheidender Bedeutung. Das p53 aktiviert seinerseits die Mitglieder der Bcl-2 Familie, die wiederum für die Freisetzung des Cytochrom c, einem Elektronentransporter der Atmungskette, aus der inneren Mitochondrienmembran ins Zytosol sorgen. Cytochrom c ist im Zytosol in der Lage, die Adaptercaspase 9 zu aktivieren, die daraufhin die Effektorcaspase 3 aktiviert und somit die Apoptose einleitet (Altieri, 2003).

Von extern (extrinsischer Weg) kann die Apoptose u.a. durch Strahlen,- Hitze,- oder chemische Schäden der DNA oder Entzug von Wachstumsfaktoren induziert werden. Ein Ligand, z.B. der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) bindet hierbei an einen Rezeptor der TNF-Familie (CD 95 (Fas L)). Über sog. Todesdomänen wird die Caspase 8 aktiviert (Altieri, 2003).

Am Ende des programmierten Zelltodes, also am Ende beider Wege, steht die Fragmentation des Genoms.

An der Regulation der Apoptose sind zwei Genfamilien beteiligt: Zum einen die Gruppe der sog. Apoptoseinhibitoren (IAP), zu denen auch das Survivin gehört und zum anderen die BCL-2-Protein-Familie, die die Freisetzung des Cytochrom c über die Regulation der Membranpermeabilität der Mitochondrien verhindern kann (Altieri, 2003).

Anders als bei der Nekrose kommt es im Rahmen der Apoptose nicht zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes (Löffler et al., 2006).

Abb. 4 zeigt eine schematische Darstellung des programmierten Zelltodes.

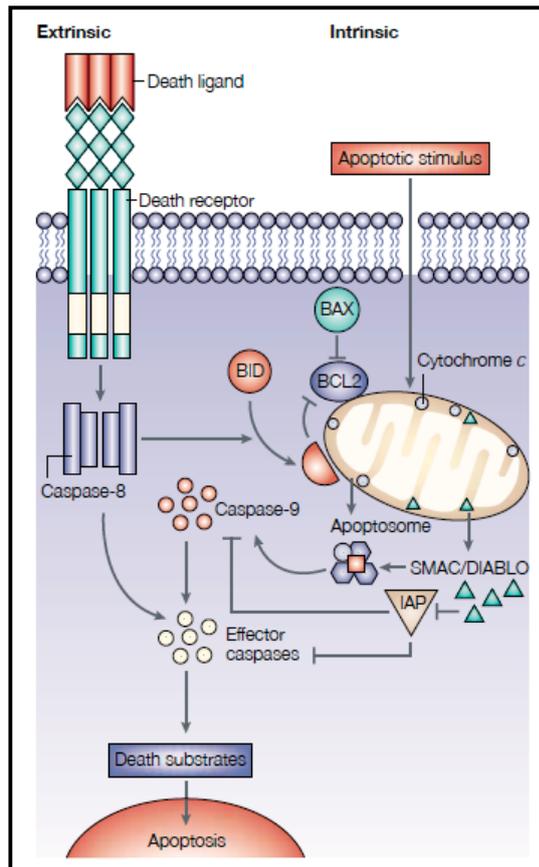


Abb. 4: Schematische Darstellung des programmierten Zelltodes aus: (Altieri, 2003)

1.5. Survivin

Das Survivin ist ein Protein aus der Gruppe der Apoptoseinhibitoren (IAP). Diese IAP beinhalten 1-3 Kopien einer sich wiederholenden Tandem-repeat-Domäne, die aus 70 Aminosäuren besteht und als baculovirus IAP repeat (BIR) bezeichnet wird. In einigen der IAP findet sich außerdem eine CARD-Domäne (caspase-recruitment-domain) und eine C-terminale Ring-Finger-Domäne, in deren Zentrum sich zwei Zinkionen befinden (Altieri, 2003).

Erstbeschreiber des Survivin waren Ambrosini et al 1997, die die Inhibition der Apoptose als wichtigen Faktor in der Entstehung neoplastischer Prozesse entdeckten und das Survivin als möglichen Angriffspunkt in der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze in der Tumorforschung prognostizierten (Ambrosini et al., 1997).

Ebenso wie die Proteine der Bcl-2-Familie sind auch die IAP fähig, den programmierten Zelltod zu verhindern. Im menschlichen Organismus konnten bisher acht verschiedene IAP detektiert werden. Im Fokus dieser Arbeit steht das Survivin.

Fünf Varianten dieses Proteins sind momentan bekannt:

- wt-Survivin
- Survivin- Δ Ex3
- Survivin-2 α
- Survivin-2B
- Survivin-3B (Caldas et al., 2005)

Das 16,5 kDa Protein Survivin ist das kleinste Mitglied der Familie der IAP Proteine und wird kaum in gesunden adulten Geweben, aber in hohem Maß in menschlichen Tumoren exprimiert. Ausnahmen bilden die embryonalen und fetalen Organe, die Zellen des Thymus, Stammzellen des Knochenmarks und die Basalzellen der Kolonschleimhaut (Altieri, 2003). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der IAP-Familie besitzt das Survivin nur eine BIR-Domäne. An seinem C-terminalen Ende findet sich anstatt eines Ring-Fingers eine α -helikale coiled-coil-Domäne (Altieri, 2003; Ambrosini et al., 1997).

Zwei Hauptfunktionen des Survivins sind zu nennen, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind: Zum einen spielt das Protein eine wichtige Rolle in der Regulation der Mitose. Das Survivin wird wie bereits beschrieben in Abhängigkeit der einzelnen Zyklusphasen unterschiedlich exprimiert und kann vor allem in der G2/M Phase gefunden werden, wo es bis zu 40fach stärker als in der G1-Phase ausgeprägt sein kann (Li et al., 1998). Verschiedene Studien konnten schwere Defekte in der Mitose im Falle einer Antagonisierung oder Blockade des Survivins nachweisen (Altieri and Marchisio, 1999; Li et al., 1998).

Neben der Regulation der Zellteilung ist das Protein in der Lage, den programmierten Zelltod zu verhindern. Es besitzt die Fähigkeit, sowohl den extrinsischen Fas-Ligand-induzierten als auch vorwiegend den internen mitochondrialen Pathway zu blockieren. (De Maria et al., 2009). Über eine Stabilisierung der Caspasen, insbesondere Caspase 9 verhindert das Survivin deren Freisetzung und inhibiert somit die Apoptose.

Die Expression des Proteins wird im Zusammenhang mit einer Progression maligner Erkrankungen, einem erhöhten Rezidivrisiko und einer Resistenz gegen etablierte therapeutische Konzepte diskutiert (Marusawa et al., 2003).

Diverse Studien konnten die Expression des Proteins in verschiedenen Tumorentitäten, z.B. dem Bronchial- (Monzo et al., 1999), Mamma- (Tanaka et al., 2000), Magen- (Lu et al., 1998), Blasen- (Swana et al., 1999), Kolon- (Kawasaki et al., 1998), Leber- (Ito et al., 2000), Prostata- (Xing et al., 2001) und Mundhöhlenkarzinom (Jane et al., 2006; Lo Muzio et al., 2001) jedoch kaum in physiologischen adulten Geweben nachweisen.

Diese Tatsache und die Fähigkeit des Survivins, Tumorzellen beim Wachsen und Überleben zu unterstützen bzw. ihren Zelltod zu verhindern, macht das Protein zu einem vielversprechenden Marker bezüglich der Prognosekalkulation und Therapie maligner Erkrankungen. Mögliche Therapieoptionen werden im Ergebnisteil näher erläutert.

1.6. VEGF-C

Die Sauerstoffversorgung von Geweben kann allein durch Diffusion lediglich über eine Strecke von 100-200 μm aufrechterhalten werden. Um die Oxygenierung auch darüber hinaus sicherzustellen, bedarf es eines hochentwickelten Gefäßsystems, das in der Lage ist, einen Sauerstofftransport auch über größere Distanzen hinweg zu gewährleisten (Hoeben et al., 2004). Die Bildung dieses Gefäßsystems (Angiogenese) besteht im „Sprossen“ von neuen Blutgefäßen aus bereits existierenden. Nicht nur physiologische Gewebe, sondern auch solide Tumoren wie das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle sind auf dieses Phänomen angewiesen.

Die Angiogenese lässt sich grob in vier wichtige Schritte einteilen:

1. Aktivierung von Endothelzellen
2. Migration und Proliferation von Endothelzellen
3. Ausbildung von Kapillaren
4. Differenzierung zu einem Blutgefäß (Hotfilder et al., 1997)

Einer der wichtigsten Mediatoren der Angiogenese ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der in die Gruppe der Wachstumsfaktoren gehört. Insgesamt sind sieben verschiedene Formen aus der Gruppe des VEGF bekannt: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F und der Placental Growth Factor (PlGF), dessen Rolle in der Tumorentstehung bis heute allerdings unzureichend erforscht ist (Hoeben et al., 2004).

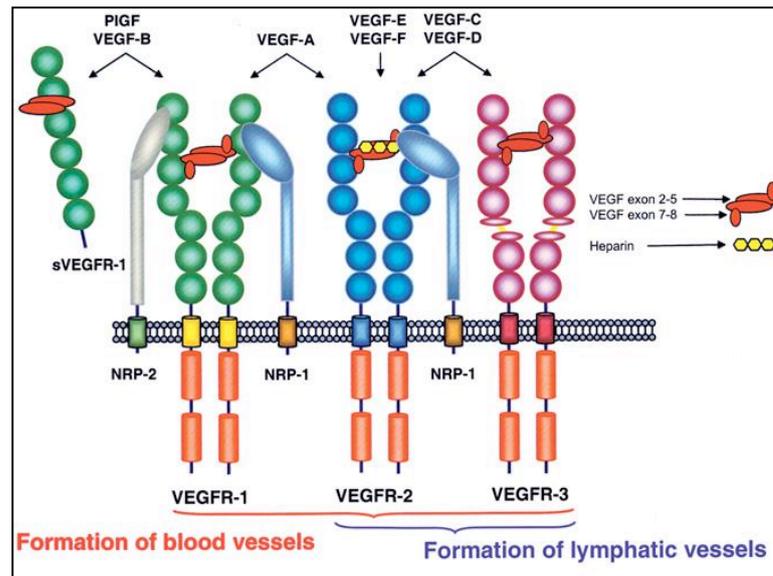


Abb. 6: Schematische Darstellung der VEGF Liganden und ihrer Rezeptoren aus: (Rosenthal, 2012)

Eine besondere Bedeutung in der Tumorgenese wird dem VEGF-A und dem VEGF-B im Rahmen der Gefäßangiogenese sowie dem VEGF-C und dem VEGF-D in der Lymphangiogenese zugeschrieben.

Nicht nur die Ausbildung eines Blutgefäßsystems, sondern auch die Formation eines eigenen Lymphgefäßsystems ist für die weitere Progression eines Tumors von großer Bedeutung. Prinzipiell muss zwischen beiden Sachverhalten unterschieden werden.

Lymphgefäße entstehen zum einen durch die Weiterentwicklung primärer Lymphoblasten zum anderen können sie sich durch Differenzierung venöser endothelialer Zellen ausbilden. Die im Rahmen der Tumorprogression wahrscheinlich wichtigsten Mediatoren sind VEGF-C und VEGF-D mit ihrem dazugehörigen Rezeptor dem VEGFR-3 (Alitalo and Carmeliet, 2002). Aufgabe des VEGF-C ist es, die lymphoepithelialen Zellen in Bezug auf Wachstum und Migration zu kontrollieren, aber auch ihr Überleben zu sichern, und so die Ausbreitung von Metastasen zu fördern.

Das Gefäßsystem eines Tumors bietet multiple Durchtrittsstellen, so dass den Tumorzellen eine weitgehend ungestörte Zirkulation ermöglicht wird. Durch die im Rahmen der Angiogenese neu gebildeten Gefäße können sich lymphogene Metastasen entwickeln (Alitalo and Carmeliet, 2002).

VEGF-C, ein 34-42 kD schweres multifunktionales Glykoprotein, aktiviert den VEGF-Rezeptor-3 (VEGFR-3). Es handelt sich hierbei um einen membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptor, der vorwiegend auf lymphatischen Endothelzellen lokalisiert ist

(Liu et al., 2009). Die Expression des VEGF-C steigt mit zunehmender Hypoxie im Tumorgewebe an. Im Rahmen therapeutischer Optionen, nicht nur zur Behandlung maligner Erkrankungen, wird die Verwendung von Inhibitoren des VEGF-C diskutiert. Laufende Studien machen Hoffnung auf einen Nutzen in der Therapie der Endometriose oder des Syndroms der polyzystischen Ovarien. In der Ophthalmologie könnte die Hemmung des Proteins in der Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration eingesetzt werden (Ferrara et al., 2003).

In den letzten Jahren wurden immer wieder Spekulationen geäußert, der VEGF-C könne als Tumormarker zur Prognoseabschätzung des Mundhöhlenkarzinoms eingesetzt werden, da er in dieser Tumorentität besonders hoch exprimiert wird (Yang et al., 2002).

1.7. Carboanhydrase IX

Die Carboanhydrase (CA) oder auch Carbonat Hydrolase ist ein Enzym, das die reversible Hydratation von Kohlendioxid und Wasser über Kohlensäure zu Hydrogencarbonat und Wasserstoffionen katalysiert (Beasley et al., 2001). Die Hydrogencarbonationen sind im Gegensatz zum Kohlendioxid gut wasserlöslich.



Erstmalig wurde das Enzym 1933 aus dem Blut von Ochsen durch die Cambridger Physiologen Meldrum und Roughton isoliert und konnte seitdem in den Geweben und Organen zahlreicher Organismen gefunden werden (Nogradi, 1998).

Vier verschiedene Gruppen der Carboanhydrasen sind bekannt: α -CA, β -CA, γ -CA und δ -CA, die menschlichen Isoformen sind den α -Carboanhydrasen zugeordnet (Picaud et al., 2009). Es handelt sich um Zink-Metalloenzyme, die an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt sind: Respiration, Säure-Basen-Haushalt, Kalzifizierung, Resorption von Knochen und an der Regulation des pH-Wertes von Körperflüssigkeiten wie Liquor, Urin, Speichel und Magensäure (Opavsky et al., 1996). Des Weiteren stellt die Carboanhydrase ein Schlüsselenzym bei der Kammerwasserproduktion des Auges dar.

Zwölf verschiedene Isoformen konnten bislang klassifiziert und nach ihrer Lokalisation eingeteilt werden. Zusätzlich ist eine Untergruppe von drei nicht katalysierenden Isoformen definiert: CA VIII, CA X und CA XI (Picaud et al., 2009).

Das Vorkommen der Carboanhydrase beim Menschen stellt Tab. 3 dar.

Tab. 3: Vorkommen der CA Isoformen im menschlichen Gewebe aus: (Picaud et al., 2009)

| Vorkommen | Isoform |
|-------------------|---------------------------------|
| zytosolisch | CAI, CAII, CAIII, CAVII, CAXIII |
| mitochondriell | CAVa, CAVb |
| sekretiert | CAVI |
| membranassoziiert | CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV |

Die Carboanhydrase I findet sich vorwiegend in Erythrozyten, die Carboanhydrase II ist ein zytosolisch lokalisiertes und zugleich das am besten erforschte Enzym dieser Gruppe. Carboanhydrase III findet sich an den roten Skelettmuskelzellen, die CA IV am Ziliarkörper des Auges. Die Carboanhydrase VI ist eine an die Membranen des Zentralnervensystems oder der Lunge gebundene Form.

Vorwiegend in den Mitochondrien findet sich die CA V, die Carboanhydrase VI wird im Speichel exprimiert. Die Carboanhydrase VIII ist im Kleinhirn lokalisiert (Picaud et al., 2009). Bisher kaum erforscht ist die Funktion der Carboanhydrase VII (Lindskog, 1997).

Abb. 7 zeigt die Arbeitsweise einer Carboanhydrase in einem komplexen System an der Zelloberfläche.

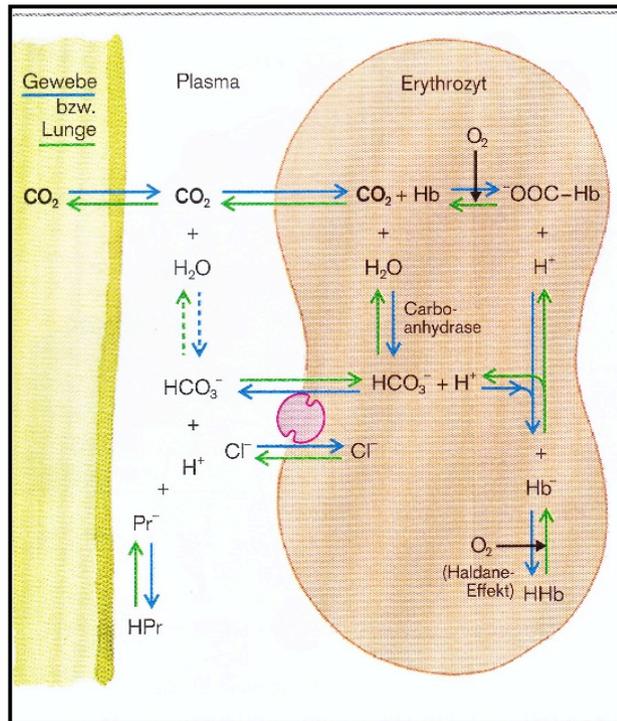


Abb. 7: Schematische Darstellung der Funktion der Carboanhydrase (übernommen aus Klinke und Silbernagel, 2003)

Die Carboanhydrase IX ist ein transmembranäres Glykoprotein, das an der Zelloberfläche eine N-terminale proteoglykanähnliche Struktur besitzt, als Ankerstelle dient der intraplasmatische Teil. Das Molekulargewicht liegt zwischen 54 und 58 kDa. Im gesunden Gewebe findet sie sich lediglich im Gastrointestinaltrakt (Opavsky et al., 1996). In physiologischen Zellen von Herz, Lunge, Prostata, Blut, Niere, Plazenta und Muskeln wird die CAIX nicht exprimiert (McKiernan et al., 1997). Die Carboanhydrase ist auch ein tumorassoziiertes Isoenzym. Sie schützt das Innere einer Tumorzelle vor einer Übersäuerung. Das durch die katalysierte Reaktion entstandene Bikarbonat kann gegen intrazelluläres Chlorid ausgetauscht werden und erhält somit die für das Wachstum der Tumorzelle notwendige Alkalose aufrecht. Ein Absinken des pH-Wertes würde die Tumorzelle gefährden (Hoogsteen et al., 2005). Gegenüber hypoxischem Stress ist die CAIX äußerst empfindlich, kommt es zu einem Absinken der Sauerstoffpartialdrücke im Tumorgewebe unter 20 mmHg für mehr als 16 Stunden ist eine kompensatorische Hochregulation der Carboanhydrase zu verzeichnen.

Diese Kenntnisse erlauben, das Enzym als möglichen Prediktor bezüglich der Prognose zahlreicher Malignome, u.a. des Mundhöhlenkarzinoms des Menschen,

heranzuziehen (Hoogsteen et al., 2005). Allerdings herrscht über ihren Stellenwert in der Prognosekalkulation maligner Erkrankungen in der Literatur noch Uneinigkeit (Nogradi, 1998).

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Studie war es, an einem monozentrischen Krankengut mit exzellent dokumentierten Behandlungsdaten die Proteine zu untersuchen, die beim Mundhöhlenkarzinom des Menschen einen Einfluss auf die Prognose haben könnten. Ausgewählt wurden die drei Proteine Survivin, VEGF-C und CAIX.

Im Ergebnis der Arbeit soll entschieden werden ob zum Zeitpunkt der Diagnosestellung diverse qualitative immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis der genannten Proteine sinnvoll sind.

Das Ziel einer individualisierten Prognosestellung ist dann die Ergänzung des etablierten TNM-Systems sowie des Tumorgradings durch einen solchen Tumormarker.

Dabei ist es wünschenswert, einen Marker zu benutzen, der in einem immunhistochemischen Verfahren schnell und kostengünstig nachgewiesen werden kann und bereits von der Entnahme der Probenbiopsie an zur Planung der Therapie herangezogen werden kann und der reproduzierbare Ergebnisse bezüglich der Prognose der Grunderkrankung liefert.

3. Material und Methoden

3.1. Patienten

Zwischen 1993 und 1999 befanden sich 106 Patienten mit einem primären Malignom der Mundhöhle zur Behandlung in der Klinik für Mund,- Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Hierbei handelte es sich in 99 Fällen um ein Plattenepithelkarzinom (93,4%). Aus diesen 99 Patienten konnten 75 Fälle zur Durchführung weiterer Untersuchungen ausgewählt werden. Voraussetzung zum Einschluss in die Studie waren die Kenntnis des Überlebens oder Versterbens in einem definierten Beobachtungszeitraum von fünf Jahren sowie ausreichend vorliegendes Gewebe für die Immunhistochemie. Nicht eingeschlossen werden konnten Patienten, deren Gewebeproben keinen adäquaten Tumoranschnitt zur immunhistochemischen Färbung boten oder deren Behandlungsdaten aufgrund mangelnder Nachsorge unvollständig waren.

Folgende klinische Parameter wurden bei allen Patienten erhoben: Alter, Geschlecht, Zeitpunkt der Diagnosestellung anhand einer Probeexzision, Noxen in Form von Alkohol und Nikotin.

Des Weiteren wurden die Tumorausdehnung (T), sowie das Ausmaß von regionären Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) nach den Vorgaben des American Joint Committee on Cancer (AJCC) bzw. Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) aus dem Jahre 1990 in einer TNM-Formel zusammengefasst.

Weiterhin wurden die histologische Differenzierung (Grading), das Auftreten von Rezidiven oder Residualtumoren (R-Klassifikation) sowie eventueller Todestag und Todesursache in die Datenbank einbezogen. Auch die Therapieform wurde erfasst. 41 (54,6%) der 75 Patienten wurden primär chirurgisch therapiert, 21 (28%) erhielten zusätzlich zur operativen Therapie eine Bestrahlung. Bei 7 (9,3%) Patienten wurde zusätzlich zum operativ/radiologischen Vorgehen eine Chemotherapie appliziert. 4 (5,3%) Patienten unterzogen sich lediglich einer Bestrahlung als singuläre Therapie, bei 2 (2,6%) Patienten war die Radiatio mit einer Chemotherapie kombiniert worden.

Alle Daten orientierten sich an den Anforderungen der DÖSAK (Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich).

Die genannten Parameter wurden in einer Datenbank zusammengestellt. Fehlende Informationen bezüglich Überleben oder Versterben eines Patienten sowie die genaue

Todesursache wurden mit Hilfe von Hausärzten, Krankenkassen und Einwohnermeldeämtern ergänzt.

3.2. Immunhistochemie

Die Gewebeproben der entsprechenden Patienten waren in Paraffinblöcken gelagert, welche freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg (damaliger Direktor: Univ.-Prof. Dr. S. Hauptmann) zur Verfügung gestellt wurden.

Mittels eines Mikrotoms wurden aus den Paraffinblöcken 2-4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Die immunhistochemische Färbung wurde mit der etablierten Avidin-Biotin-Komplex-Methode vorgenommen, die im folgenden Abschnitt beschrieben wird (Boenisch, 2003). Die Färbungen von CAIX und VEGF-C wurden von der Promovendin selbst, die Färbungen des Survivins von einer medizinisch-technischen Assistentin durchgeführt.

Als Negativkontrolle diente die Inkubation ohne Primärantikörper, als Positivkontrolle wurde Darmgewebe vom Kaninchen eingesetzt.

Die in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden zunächst für 30 min in Xylol (Carl Roth GmbH + Co Kg Deutschland, Karlsruhe) eingelegt und in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol, Biomed GmbH, Dessau, Deutschland) von 95% und 70% dehydriert, 30 sek in destilliertes H₂O und anschließend in PBS-Bad (Phosphate-buffered-Saline Puffer, Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingelegt. Zur Antigendemaskierung wurde ein Citratpuffer aus zwei Stammlösungen hergestellt. Lösung A setzt sich aus 10,5 g Zitronensäuremonohydrat in 500 ml Aqua zusammen, Lösung B aus 14,7 g Natriumcitrat-Dihydrat in 500 ml Aqua. Die Gebrauchslösung bestand aus 15 ml der Lösung A und 85 ml der Lösung B in 1000 ml Aqua, der pH-Wert betrug 6,0.

Die Demaskierung wurde in einem Mikrowellenofen durchgeführt (5 min. für die Carboanhydrase IX und 20 min. für das Survivin und den VEGF-C bei 100 °C).

Nach einer Abkühlzeit von 20 min. wurden die Objektträger 5 min. in PBS Puffer gespült und zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase 20 min. bei 4°C in einem Methanol/H₂O₂ Bad (vier Teile Methanol absolut, Carl-Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe, Deutschland, ein Teil Wasserstoffperoxid 3%) inkubiert.

Gemäß der LSAB Methode folgte die Zugabe von je 250 µl des Primärantikörpers (CA IX, H-120, SC 25599, Santa Cruz Biotechnology, Inc./ VEGF-C, 18-2255, Zymed Laboratories invitrogen immunodetection, San Francisco, CA/ Survivin R&D, AF886) verdünnt im Verhältnis 1:100 mit Antibody Diluent (DAKO REAL) auf die Schnitte und die Inkubation über 24 h im Kühlschrank bei ca. 4°C. Die Positivkontrolle wurde mit Aqua dest. gespült.

Nach Erwärmung auf Raumtemperatur schloss sich die 30 minütige Inkubation mit dem biotinylierten Brückenantikörper (Link, Biotinylated Secondary Antibody, Dako Cytomation), die dreimalige Spülung mit PBS Puffer und die Zugabe der Streptavidin Peroxidase (HRP, Dako Cytomation) für weitere 30 min. an. Anschließend erneut dreimalige Spülung mit PBS Puffer.

Die Farbreaktion erfolgte mit Substrate Buffer plus DAB Chromogen (Dako Cytomation, 1:50) mit einer Einwirkzeit von 10 min.

Markierte Stellen im Präparat stellen sich rotbraun als Antigen-Antikörper Bindungsstellen dar.

Anschließende Spülungen wurden mit Aquabidest, Gegenfärbung mit Hämalaun (Mayer, Merck KGaA, Darmstadt) in einer Verdünnung von 1:5 vorgenommen. Nach Spülung mit Leitungswasser, der Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96%) sowie 5 minütigem Bad in Xylol, erfolgte abschließend die Eindeckung mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt).

3.3. Auswertung

Die histologischen Schnitte wurden zunächst lichtmikroskopisch mit einer 25-fachen Vergrößerung von zwei unabhängigen Untersuchern (K.B., U.B.) ausgewertet, die weder die klinische noch die histologische Diagnose kannten. Zur Auswertung wurde der Remmele Score genutzt, ein Punktesystem, mit dessen Hilfe das Produkt (IRS – immunreaktiver Score) aus Färbintensität und Prozentsatz von Tumorzellen mit Immunreaktivität gebildet wird (Remmele and Stegner, 1987).

Bewertet wurden die Färbungen nach Quantität und Qualität:

Quantität: Prozentsatz von Tumorzellen oder Stroma mit Immunreaktivität

Qualität: Intensität der Färbung (keine Färbung, schwach, mäßig, stark)

Die Immunreaktivität wurde folgendermaßen klassifiziert:

- 0 Punkte: negativ
- 1 Punkt: < 10% positive Zellen
- 2 Punkte: 11-50% positive Zellen
- 3 Punkte: 51-80% positive Zellen
- 4 Punkte: 81-100% positive Zellen

Zur Färbeintensität kam folgende Wertung zur Darstellung:

- 0 Punkte: keine Färbeintensität
- 1 Punkt: schwache Färbeintensität
- 2 Punkte: mäßige Färbeintensität
- 3 Punkte: starke Färbeintensität

Anhand der o.g. Einteilung kam es zu einer Verteilung der Punktwerte zwischen 0 und 12. Aus diesen Werten ergaben sich die in Tabelle 4 genannten vier Gruppen.

Tab. 4: Einteilung der Färbemuster nach IRS

| IRS | Färbung |
|------------|----------------|
| 0-2 | Negativ |
| 3-4 | Schwach |
| 6-8 | Mäßig |
| 9-12 | Stark |

Für die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Proteinexpression sowie für die Korrelation der einzelnen Proteine untereinander wurden aus statistischen Gründen lediglich zwei Gruppen unterschieden: Proben mit schwacher und Proben mit starker Expression des jeweiligen Proteins.

Für das Survivin wurde somit die Gruppe mit einem IRS von 0-2 (schwache Färbung, n=19) der mit einem IRS von 3-12 (starke Färbung, n=56) gegenübergestellt. Der VEGF-C teilte sich wie folgt auf: IRS 0-2 (schwache Färbung, n=42) vs. IRS 3-12 (starke Färbung, n=33), bei der CAIX wurde ein IRS von 0-2 (schwache Färbung, n=44) gegen einen IRS von 3-12 (starke Färbung, n=31) berechnet.

Anhand der Paraffinschnitte aller 75 Patienten konnten immunhistochemische Untersuchungen zu den drei Tumormarkern Survivin, VEGF-C und CAIX durchgeführt werden.

Alle erhobenen Parameter wurden in eine bestehende Datenbank eingefügt. Diese an der Hallenser Universitätsklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie etablierte Datenbank erfasst sämtliche Parameter der inkludierten Patienten (Lautner, 2008).

3.4. Statistische Auswertung

Es kamen verschiedene statistische Tests zur Anwendung. Die Korrelation der Tumormarkerexpression mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, histopathologischer Differenzierung und dem Tumorstadium erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test bzw. mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher und kam im Sinne einer deskriptiven Statistik in Kreuztabellen zur Darstellung.

Des Weiteren erfolgten bivariate Korrelationsanalysen nach Pearson, um sowohl das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung als auch das Geschlecht der Patienten als mögliche Confounder auszuschließen.

Der Zusammenhang zwischen dem Überleben der Patienten und dem TNM-Stadium sowie dem Grading wurde im Sinne der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse grafisch dargestellt und mittels log-rank-Test angegeben.

Um das Risiko des tumorassoziierten Versterbens in Abhängigkeit von der Proteinexpression angeben zu können wurden COX-Regressionsanalysen (adjustiert nach TNM-Stadium und Grading) durchgeführt.

Als Grundvoraussetzung für die Erstellung einer COX Regressionsanalyse wurde überprüft, ob die Hazard ratio der jeweiligen Gruppen über die Zeit konstant ist und sich die Kurven nicht überschneiden. War dies der Fall, konnte eine COX-Regressionsanalyse durchgeführt und das Hazard ratio als Risiko für das tumorassoziierte Versterben angegeben werden.

Den statistischen Testverfahren wurden die üblichen Signifikanzniveaus zugrunde gelegt: signifikante Zusammenhänge bestanden bei p-Werten $< 0,05$; als hoch signifikant wurden Verhältnisse ab einem p-Wert $< 0,01$ gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Patienten und Überlebenschancen in Abhängigkeit vom TNM-Stadium

Der Altersdurchschnitt der 75 erfassten Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung insgesamt bei 59,1 Jahren. Die Männer erkrankten im Durchschnitt mit 56,8, die Frauen mit 65,6 Jahren. Der jüngste Patient wurde mit 23 Jahren, die älteste Patientin mit 83 Jahren behandelt. Es handelte sich um 55 Männer (73,3%) und 20 Frauen (26,7%). Alle relevanten klinischen und histopathologischen Daten sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Klinische und histopathologische Parameter der 75 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

| Variable | Anzahl | Prozent (%) |
|-----------------------------|---------------|--------------------|
| Alter | | |
| Mittelwert | 59,1 Jahre | |
| Geschlecht | | |
| Frauen | 20 | 26,7 |
| Männer | 55 | 73,3 |
| Tumorlokalisation | | |
| Zunge | 28 | 37,3 |
| Mundboden | 28 | 37,3 |
| Wangenschleimhaut | 3 | 4,1 |
| Oberkiefer/Gaumen | 16 | 21,3 |
| Klinisches T-Stadium | | |
| T1 | 21 | 28,0 |
| T2 | 28 | 37,3 |
| T3 | 9 | 12,0 |
| T4 | 17 | 22,7 |

| | | |
|--|----|------|
| Klinisches N-Stadium | | |
| N0 | 35 | 46,7 |
| N1 | 23 | 30,7 |
| N2 | 15 | 20,0 |
| N3 | 2 | 2,7 |
| Pathologisches T-Stadium | | |
| CIS | 1 | 1,3 |
| pT1 | 19 | 25,3 |
| pT2 | 27 | 36,0 |
| pT3 | 6 | 8,0 |
| pT4 | 17 | 22,7 |
| Keine Einteilung möglich | 5 | 6,7 |
| Pathologisches N-Stadium | | |
| N0 | 40 | 53,3 |
| N1 | 8 | 10,7 |
| N2 | 14 | 18,6 |
| N3 | 1 | 1,3 |
| Ohne Einteilung | 12 | 16,0 |
| Stadium der Tumorerkrankung | | |
| I | 17 | 22,7 |
| II | 19 | 25,3 |
| III | 10 | 13,3 |
| IV | 29 | 38,7 |
| Grading | | |
| G1 | 25 | 33,3 |
| G2 | 34 | 45,3 |
| G3 | 16 | 21,3 |

Die 5-Jahres-Überlebensrate des untersuchten Patientenkollektivs betrug 61,0%. Die entsprechende Kaplan-Meier Überlebenskurve geht aus Abb. 8 hervor.

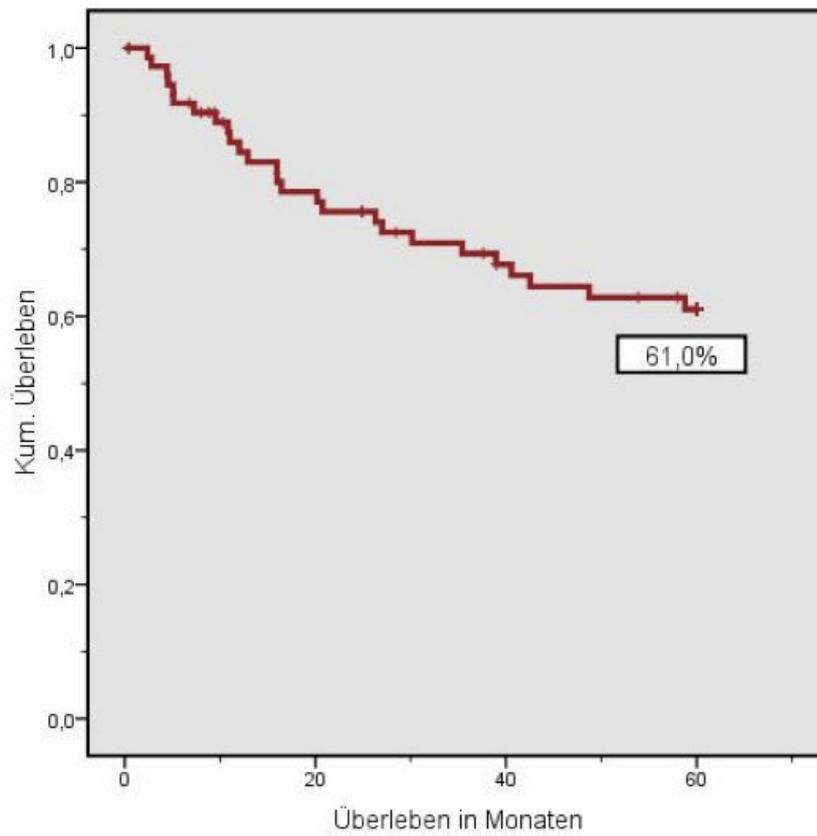


Abb. 8: 5-Jahresüberlebensrate aller 75 Patienten (61,0%)

Die Zusammenhänge zwischen dem Überleben nach Kaplan-Meier und den analysierten Parametern zeigen die Abb. 9-12 auf den folgenden Seiten:

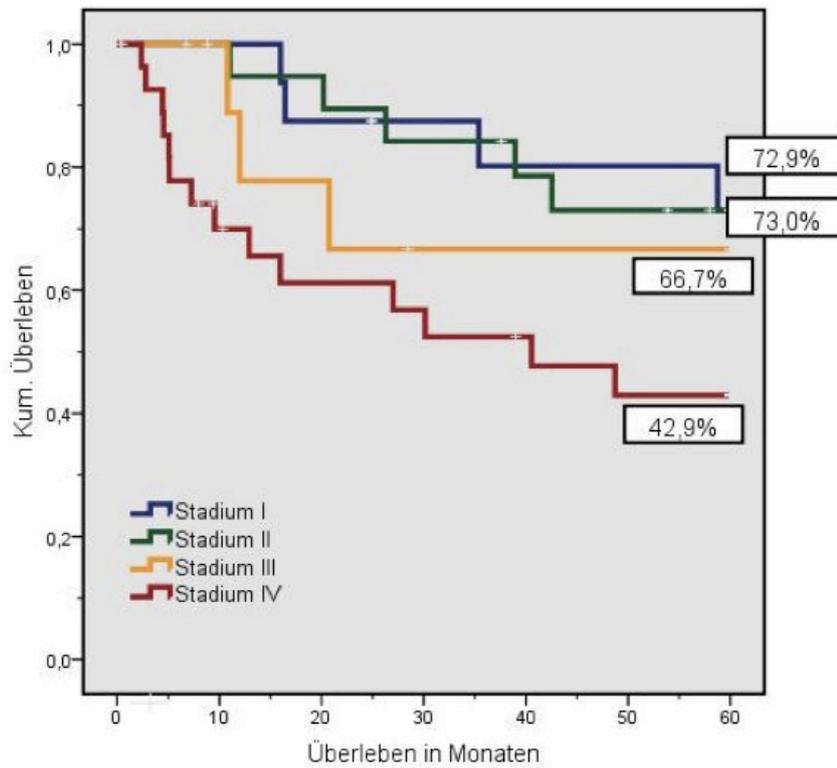


Abb. 9: Abhängigkeit der 5-Jahres-Überlebensrate vom Stadium der Tumorerkrankung (n=75, p=0,044)

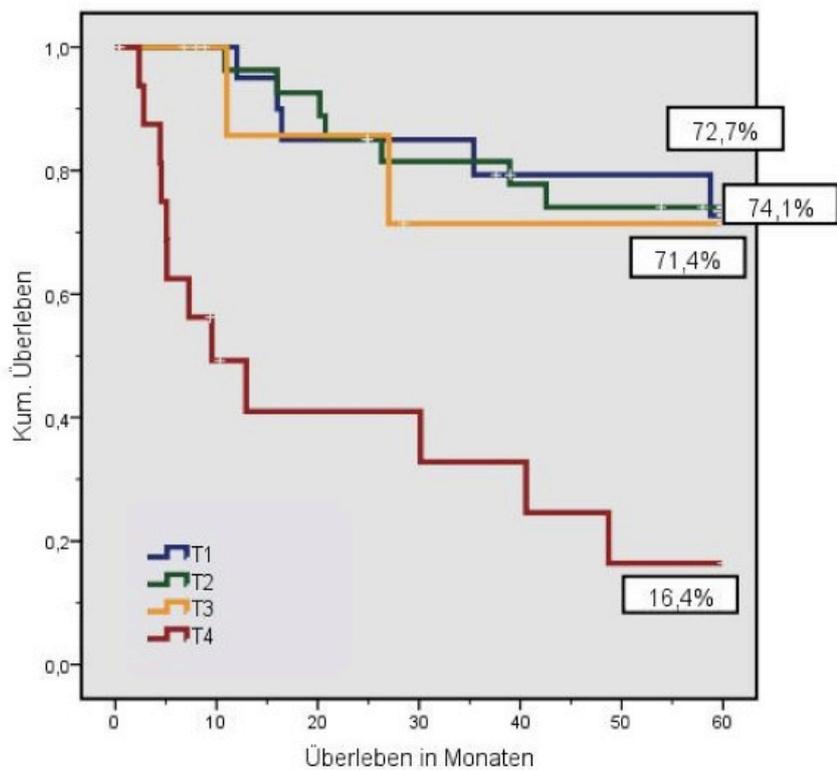


Abb. 10: Abhängigkeit der 5-Jahres-Überlebensrate von der Größe des Primärtumors (n=75; p<0,01)

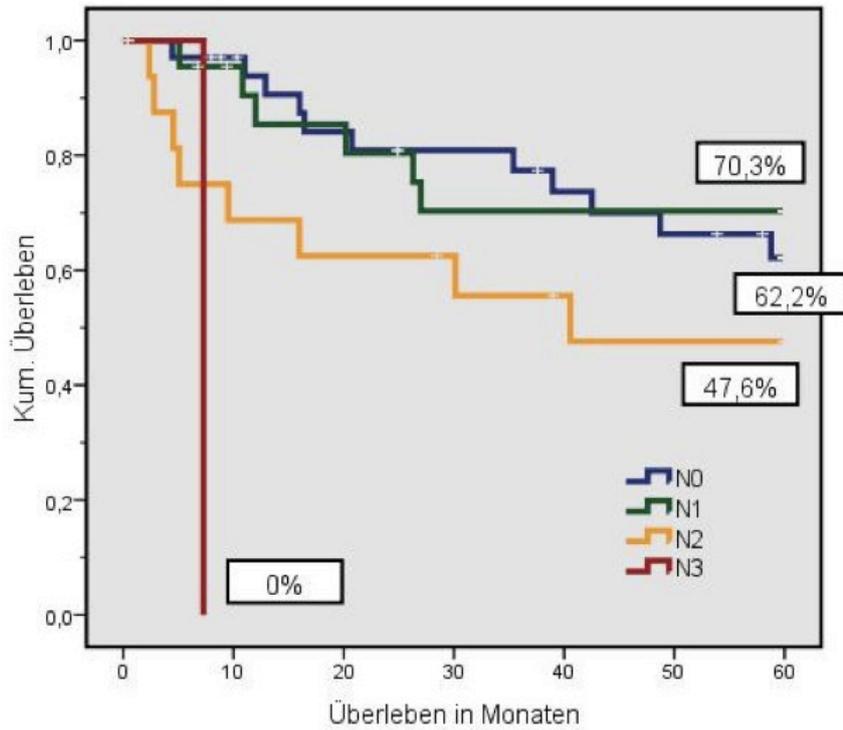


Abb. 11: Abhängigkeit der 5-Jahres-Überlebensrate vom Stadium der Lymphknoten-Metastasierung (n=75; p<0,01)

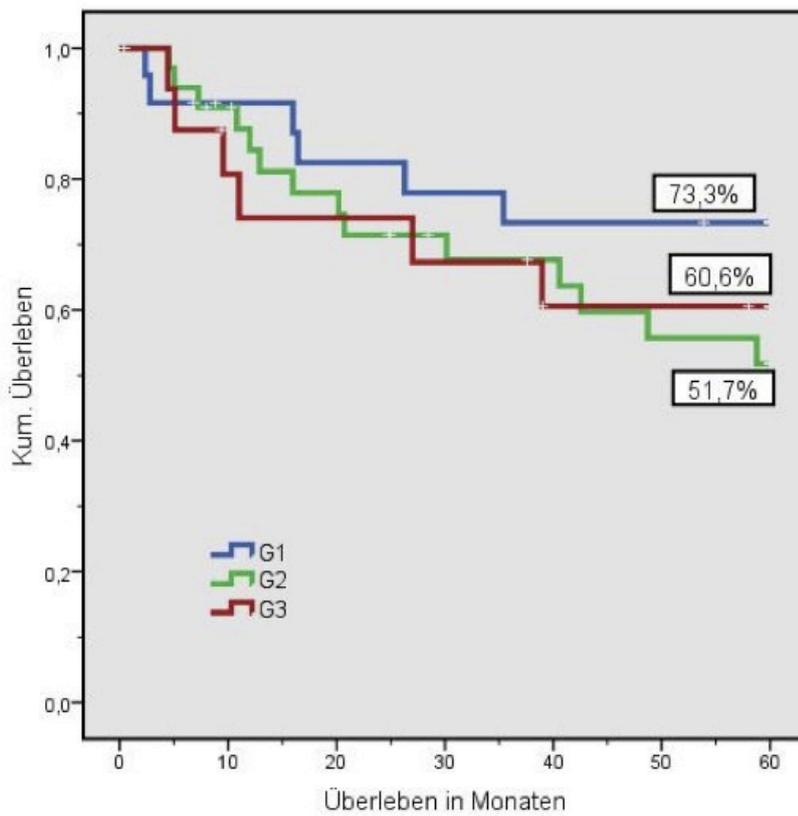


Abb. 12: Abhängigkeit der 5-Jahres-Überlebensrate vom Grading (n=75; p=0,42)

Ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang zeigte sich sowohl zwischen dem Überleben der Patienten und der Anzahl der Lymphknotenmetastasen (log rank-Test, $p=0,00001$, Abb. 11) als auch der Größe des Primärtumors (log rank-Test, $p=0,00001$, Abb. 10).

72,7% der Patienten mit einem T1 Tumor überlebten den Nachbeobachtungszeitraum von 5 Jahren, bei den T2 Tumoren waren es 74,1%, bei den T3 Tumoren 71,4% und bei den fortgeschrittenen T4 Tumoren lebten lediglich noch 16,4% nach 5 Jahren.

Während für das Vorliegen eines Lymphknotenstadiums N0 eine 5-Jahres-Überlebensrate von 62,2% gesichert werden konnte, fiel diese im Falle des Stadiums N2 auf nur noch 47,6% ab. Die 5-Jahresüberlebensrate im Stadium N1 betrug 70,3%.

Des Weiteren konnten statistisch signifikante Werte für das Überleben der Patienten in Abhängigkeit vom Stadium der Tumorerkrankung dargestellt werden (log rank-Test, $p=0,044$). Für das Stadium I der Tumorerkrankung konnte eine 5-Jahres-Überlebensrate von 72,9% detektiert werden, für das Stadium II waren es 73,0%, für das Stadium III 66,7%. Von den Patienten, deren Erkrankung sich im Stadium IV befand, waren nach 5 Jahren nur noch 42,9% am Leben.

Zwischen dem Grading (Differenzierung) des Karzinoms und dem Überleben fand sich interessanterweise kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,42$).

Von allen Patienten mit einem G1 Tumor lebten nach 5 Jahren noch 73,3%, für die G2 Tumoren war eine Überlebensrate von 51,7%, für die G3 Tumoren von 60,6% zu verzeichnen.

4.2. Immunhistochemie

4.2.1. Survivin

Lediglich 19 der 75 untersuchten Patienten wiesen eine negative Färbung des Survivins mit einem $IRS \leq 2$ auf, in den restlichen 56 Gewebeproben konnten positive Proteinexpressionen ($IRS \geq 3$) nachgewiesen werden.

Die Tabellen 6-9 veranschaulichen die Häufigkeitsverteilung der Intensität der Färbung des Survivins nach Tumorstadium, Größe des Primärtumors, Stadium der Lymphknotenmetastasierung und Grading.

Tab. 6: Survivinexpression und Stadium der Tumorerkrankung

| | | Stadium der Tumorerkrankung | | | |
|----------|---------------|-----------------------------|-----|------|-----|
| | | T1 | TII | TIII | TIV |
| Survivin | Negativ (0-2) | 6 | 4 | 1 | 8 |
| | Schwach (3-4) | 4 | 7 | 6 | 8 |
| | Mäßig (6-8) | 6 | 6 | 2 | 12 |
| | Stark (9-12) | 1 | 2 | 1 | 1 |

Tab. 7: Survivinexpression und Größe des Primärtumors

| | | Klinisches T-Stadium | | | |
|----------|---------------|----------------------|----|----|----|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 |
| Survivin | Negativ (0-2) | 8 | 2 | 4 | 5 |
| | Schwach (3-4) | 4 | 13 | 2 | 6 |
| | Mäßig (6-8) | 7 | 10 | 3 | 6 |
| | Stark (9-12) | 2 | 3 | 0 | 0 |

Tab. 8: Survivinexpression und Stadium der LK-Metastasierung

| | | Klinisches N-Stadium | | | |
|----------|---------------|----------------------|----|----|----|
| | | N0 | N1 | N2 | N3 |
| Survivin | Negativ (0-2) | 9 | 4 | 5 | 1 |
| | Schwach (3-4) | 14 | 10 | 1 | 0 |
| | Mäßig (6-8) | 9 | 8 | 9 | 0 |
| | Stark (9-12) | 3 | 1 | 1 | 0 |

Tab. 9: Survivinexpression und Grading

| | | Grading | | |
|----------|---------------|---------|----|----|
| | | G1 | G2 | G3 |
| Survivin | Negativ (0-2) | 8 | 9 | 2 |
| | Schwach (3-4) | 10 | 12 | 3 |
| | Mäßig (6-8) | 6 | 9 | 11 |
| | Stark (9-12) | 1 | 4 | 0 |

Mittels log-rank Test konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression des Survivins und dem Stadium der Tumorerkrankung ($p=0,650$), der Größe des Primärtumors ($p=0,202$) und dem Stadium des Lymphknotenbefalls ($p=0,339$) bestätigt werden. Allerdings fand sich eine Korrelation bezüglich der Färbung des Survivins und dem Grading. Die G1 und G2 Tumoren fielen überwiegend durch eine negative bis schwache Färbung als Ausdruck für negative und schwache Survivinexpressionen auf, während sich die stark ausgeprägten Färbemuster hauptsächlich in den G3 Tumoren zeigten. Hier konnte die statistische Signifikanz ($p<0,05$) erreicht werden.

4.2.2. VEGF-C

Im Gegensatz zum Survivin fiel die Mehrzahl der Proben von VEGF-C ($n=42$) durch eine negative Färbung ($IRS \leq 2$) auf. 33 Gewebeproben zeigten ein positives ($IRS \geq 3$) Färbemuster. In den folgenden Tabellen 10-13 ist das Expressionsmuster des VEGF-C in Verbindung mit dem Stadium der Tumorerkrankung, der Größe des Primärtumors, dem Stadium der Lymphknotenmetastasierung und dem Grading zusammengefasst.

Tab. 10: VEGF-C Expression und Stadium der Tumorerkrankung

| | | Stadium der Tumorerkrankung | | | |
|--------|---------------|-----------------------------|-----|------|-----|
| | | TI | TII | TIII | TIV |
| VEGF-C | Negativ (0-2) | 7 | 9 | 4 | 22 |
| | Schwach (3-4) | 8 | 6 | 5 | 4 |
| | Mäßig (6-8) | 2 | 4 | 1 | 2 |
| | Stark (9-12) | 0 | 0 | 0 | 1 |

Tab. 11: VEGF-C Expression und Größe des Primärtumors

| | | Klinisches T-Stadium | | | |
|--------|---------------|----------------------|----|----|----|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 |
| VEGF-C | Negativ (0-2) | 8 | 15 | 6 | 13 |
| | Schwach (3-4) | 10 | 8 | 3 | 2 |
| | Mäßig (6-8) | 3 | 5 | 0 | 1 |
| | Stark (9-12) | 0 | 0 | 0 | 1 |

Tab. 12: VEGF-C Expression und Stadium der LK-Metastasierung

| | | Klinisches N-Stadium | | | |
|--------|---------------|----------------------|----|----|----|
| | | N0 | N1 | N2 | N3 |
| VEGF-C | Negativ (0-2) | 20 | 9 | 13 | 0 |
| | Schwach (3-4) | 11 | 9 | 2 | 1 |
| | Mäßig (6-8) | 4 | 4 | 1 | 0 |
| | Stark (9-12) | 0 | 1 | 0 | 0 |

Tab. 13: VEGF-C Expression und Grading

| | | Grading | | |
|--------|---------------|---------|----|----|
| | | G1 | G2 | G3 |
| VEGF-C | Negativ (0-2) | 10 | 20 | 12 |
| | Schwach (3-4) | 11 | 10 | 2 |
| | Mäßig (6-8) | 4 | 3 | 2 |
| | Stark (9-12) | 0 | 1 | 0 |

Statistisch fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den erhobenen klinischen Parametern und der Expression des VEGF-C. Die Konzentration des Proteins korrelierte weder mit dem Stadium der Tumorerkrankung ($p=0,193$), der Größe des Primärtumors ($p=0,181$), dem Stadium der Lymphknotenmetastasierung ($p=0,747$) noch dem Grading ($p=0,299$).

Bezüglich der Lymphknotenmetastasierung fiel jedoch trotz verfehlter Signifikanz eine Tendenz auf. Die negativen und schwachen Färbungen zeigten sich vorwiegend in den günstigeren N-Stadien, woraus möglicherweise ein Hinweis auf eine zunehmende Absiedelung von Metastasen in Lymphknoten mit steigender Expression des VEGF-C im Tumor gezogen werden kann. Ähnliche Schlüsse konnten auch für das Grading und die Tumorgröße getroffen werden. Auch hier zeigte sich eine negative bis schwache Expression des Proteins bevorzugt in G1 und G2 sowie T1 und T2 Tumoren.

Abbildung 13 stellt exemplarisch einige Färbemuster des VEGF-C in unterschiedlicher Intensität und Vergrößerung dar.

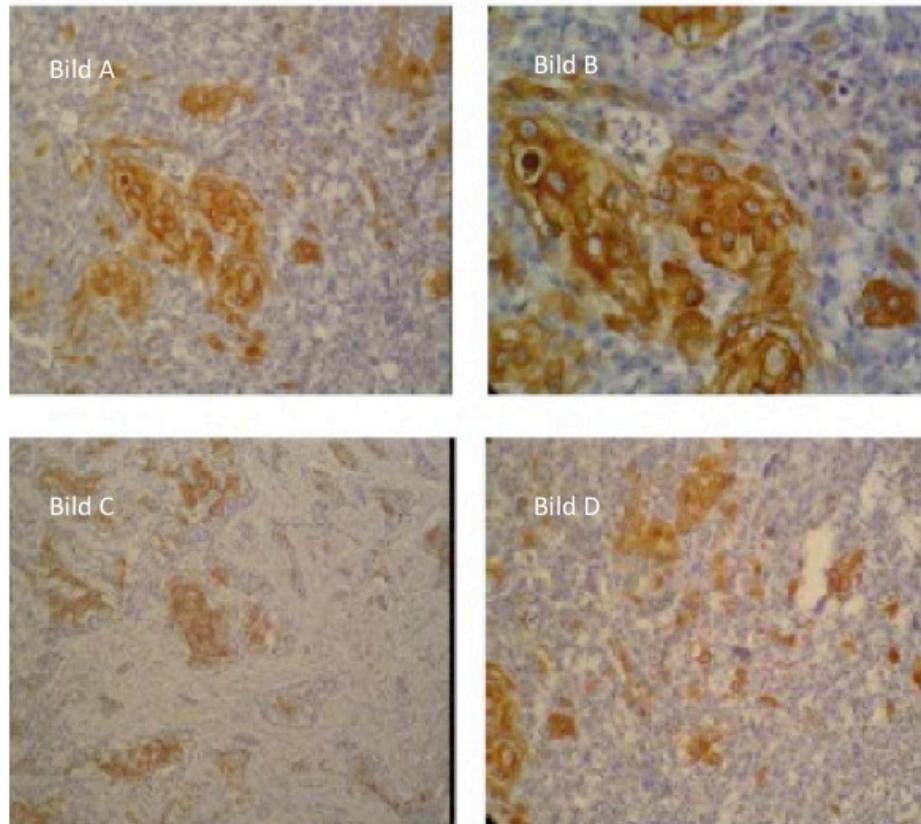


Abb. 13: Immunhistochemische Färbung des VEGF-C am Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

- Bild A: starke Expression (IRS 9, 100-fach vergrößert)
- Bild B: starke Expression (IRS 9, 200-fach vergrößert)
- Bild C: mäßige Expression (IRS 6, 100-fach vergrößert)
- Bild D: mäßige Expression (IRS 6, 200-fach vergrößert)

4.2.3. Carboanhydrase IX

In der histopathologischen Auswertung der 75 Mundhöhlenkarzinome bezüglich der Expression der Carboanhydrase IX zeigte sich ein positiver Nachweis des Proteins (IRS \geq 3) bei 31 Patienten, ein negativer Enzymnachweis (IRS 0-2) war in 44 Fällen zu verzeichnen.

Alle Ergebnisse zum Expressionsmuster der CAIX in Verbindung mit dem Stadium der Tumorerkrankung, der Größe des Primärtumors, dem Stadium der Lymphknotenmetastasierung und dem Grading sind in den Tabellen 14-17 dargestellt.

Tab. 14: CAIX Expression und Stadium der Tumorerkrankung

| | | Stadium der Tumorerkrankung | | | |
|------|---------------|-----------------------------|-----|------|-----|
| | | T1 | TII | TIII | TIV |
| CAIX | Negativ (0-2) | 11 | 12 | 6 | 15 |
| | Schwach (3-4) | 4 | 5 | 2 | 7 |
| | Mäßig (6-8) | 2 | 1 | 2 | 6 |
| | Stark (9-12) | 0 | 1 | 0 | 1 |

Tab. 15: CAIX Expression und Größe des Primärtumors

| | | Klinisches T-Stadium | | | |
|------|---------------|----------------------|----|----|----|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 |
| CAIX | Negativ (0-2) | 13 | 18 | 5 | 8 |
| | Schwach (3-4) | 5 | 5 | 3 | 5 |
| | Mäßig (6-8) | 3 | 4 | 1 | 3 |
| | Stark (9-12) | 0 | 1 | 0 | 1 |

Tab. 16: CAIX Expression und Stadium der LK-Metastasierung

| | | Klinisches N-Stadium | | | |
|------|---------------|----------------------|----|----|----|
| | | N0 | N1 | N2 | N3 |
| CAIX | Negativ (0-2) | 22 | 14 | 7 | 1 |
| | Schwach (3-4) | 7 | 4 | 7 | 0 |
| | Mäßig (6-8) | 6 | 4 | 1 | 0 |
| | Stark (9-12) | 0 | 1 | 1 | 0 |

Tab. 17: CAIX Expression und Grading

| | | Grading | | |
|------|---------------|---------|----|----|
| | | G1 | G2 | G3 |
| CAIX | Negativ (0-2) | 15 | 19 | 10 |
| | Schwach (3-4) | 7 | 10 | 1 |
| | Mäßig (6-8) | 2 | 5 | 4 |
| | Stark (9-12) | 1 | 0 | 1 |

Es fand sich weder ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von CA IX und dem Stadium der Tumorerkrankung ($p=0,91$) noch der Größe des Primärtumors ($p=0,91$). Auch für den Lymphknotenstatus ($p=0,447$) und das Grading ($p=0,365$) konnte kein statistischer Zusammenhang nachgewiesen werden.

Auch wenn die statistischen Signifikanzniveaus nicht erreicht werden, lässt sich für die Carboanhydrase ebenfalls eine Tendenz ableiten. Die negativen und schwachen Färbemuster dieses Proteins korrelieren vorwiegend mit geringeren Tumorgrößen, niedrigeren N-Stadien sowie G1 und G2 Tumoren.

Abbildung 14 zeigt einige Beispiele der beobachteten Färbungen der Carboanhydrase IX in unterschiedlicher Intensität.

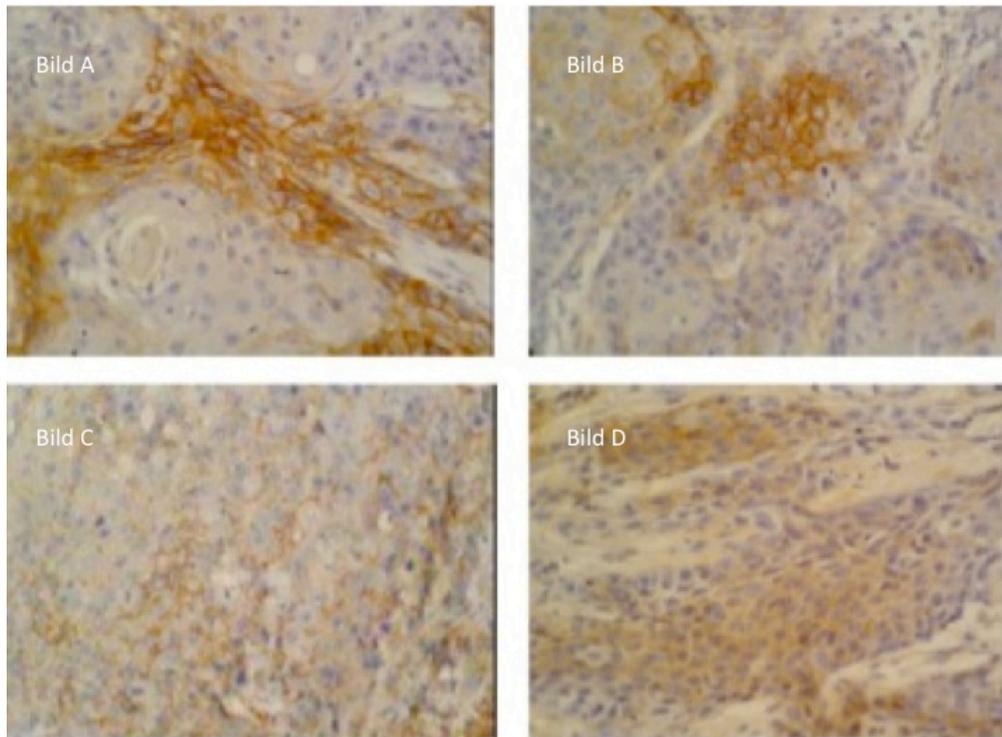


Abb. 14: Immunhistochemische Färbungen für die Carboanhydrase IX beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Typisches membranständiges Färbemuster)

Bild A: IRS 9 (200-fach vergrößert)

Bild B: IRS 6 (200-fach vergrößert)

Bild C: IRS 3 (200-fach vergrößert)

Bild D: IRS 4 (200-fach vergrößert)

5. Überlebenswahrscheinlichkeit und Korrelation mit den einzelnen Proteinen

Die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für die einzelnen Proteine sind in den Abbildungen 15-17 dargestellt. Die Hazard ratios (HR) bzw. die Risiken des tumorassoziierten Versterbens im Vergleich beider Gruppen werden im Text erläutert.

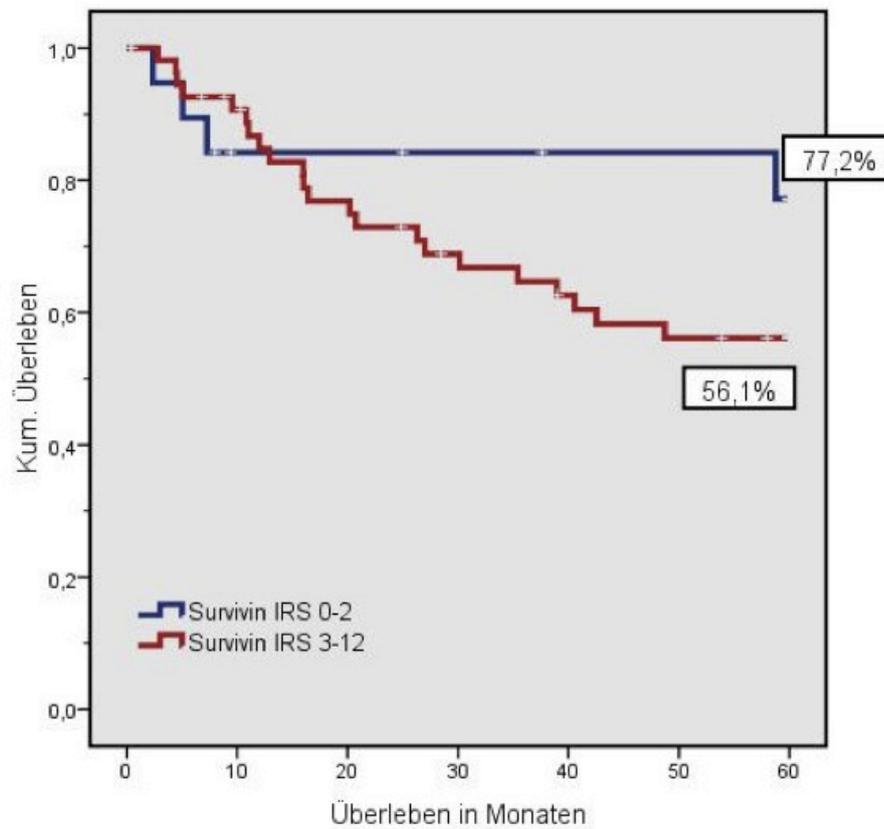


Abb. 15: 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der Survivin Intensität (n=75, p=0,198)

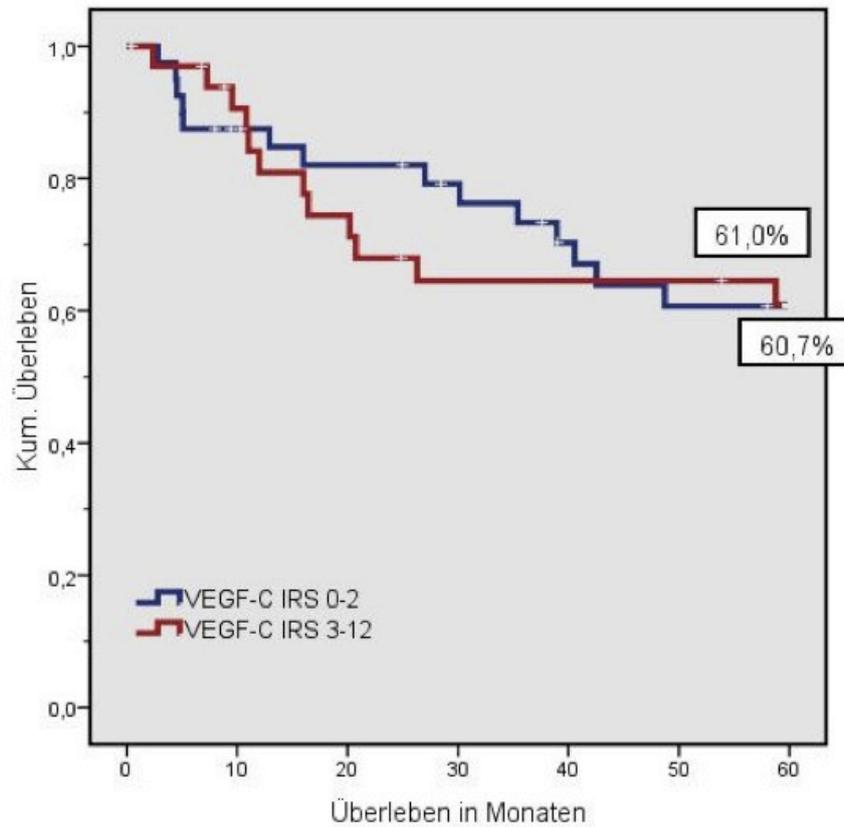


Abb. 16: 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der VEGF-C Intensität (n=75, p=0,905)

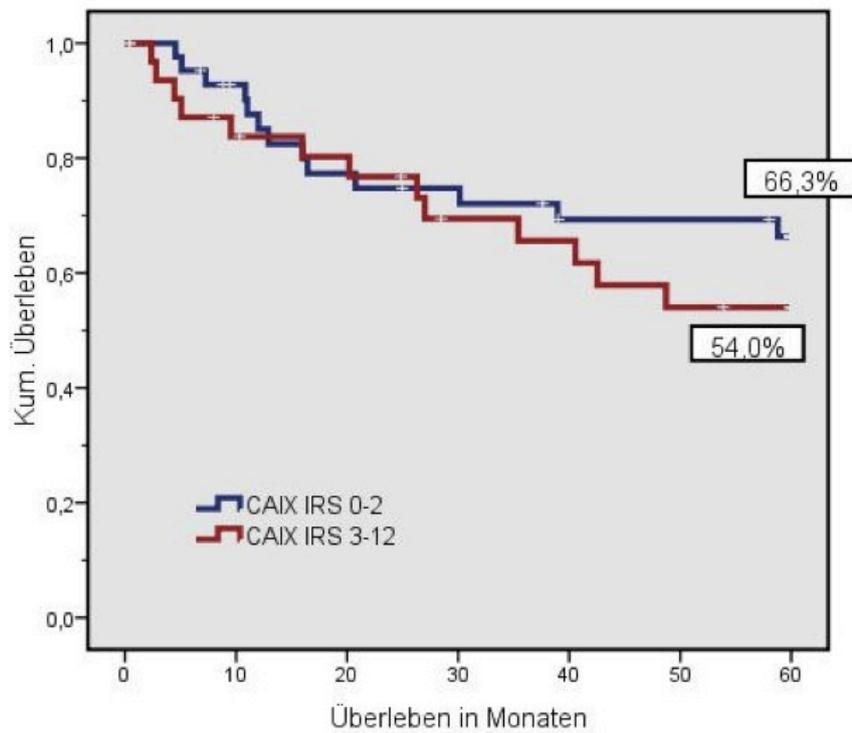


Abb. 17: 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der CAIX Intensität (n=75, p=0,347)

Für das Survivin konnte im Falle starker Expression eine Überlebenswahrscheinlichkeit nach 5 Jahren von 77,2% im Gegensatz zu einer deutlich niedrigeren Rate von lediglich 56,1% bei schwacher Expression nachgewiesen werden. Allerdings ist dieser Unterschied noch nicht signifikant ($p=0,198$). Das Risiko des tumorassoziierten Versterbens im Sinne der COX-Regressionsanalyse lag im Falle einer starken Expression 2,0fach höher als bei schwacher Expression ($p=0,207$).

Für VEGF-C konnte ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression und dem Überleben gefunden werden. Die Überlebensraten waren mit 60,7% für die schwache Expression des VEGF-C (IRS 0-2) und 61,0% für die starke Ausprägung des Proteins (IRS 3-12) annähernd identisch ($p=0,905$). Auch das Risiko am Tumor zu versterben zeigte sich bei starker Expression des Proteins im Gegensatz zur schwachen Expression nicht erhöht ($HR=1,04$, $p=0,905$).

Die CAIX zeigte zwar im Fall einer starken Expression mit 66,3% eine deutlich höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als bei schwacher Expression (54,0%). Auch hier wurde die statistische Signifikanz jedoch verfehlt ($p=0,347$). Das tumorassoziierte Versterben lag bei starker Proteinexpression 1,4fach höher als bei schwach ausgeprägter Färbung ($p=0,35$).

Auch wenn die Ergebnisse keine statistische Signifikanz aufweisen, lässt sich dennoch, vor allem für das Survivin, aber auch für die CAIX, eine deutlich niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit nach 5 Jahren im Falle einer starken im Vergleich zur schwachen Expression des Proteins nachweisen. Ebenso zeigt sich sowohl für das Survivin als auch für die CAIX ein deutlich erhöhtes Risiko, am Tumor zu versterben, wenn das Protein im Tumor stark exprimiert wird.

Von Interesse war schließlich nicht nur die singuläre Analyse der Expression einzelner Proteine, sondern eine gemeinsame Betrachtung. Oft kann sich durch eine derartige Koexpression das Potential der einzelnen Proteine am Prozess der Tumorprogression eingeschränkt oder verstärkt bemerkbar machen. Die dazugehörigen Kaplan-Meier-Kurven sind in den Abb. 18-20 dargestellt.

Um die Korrelation der einzelnen Marker bezüglich ihrer Prognose miteinander vergleichen zu können, wurden die Hazard ratios (adjustiert nach TNM-Stadium und Grading) mit angegeben.

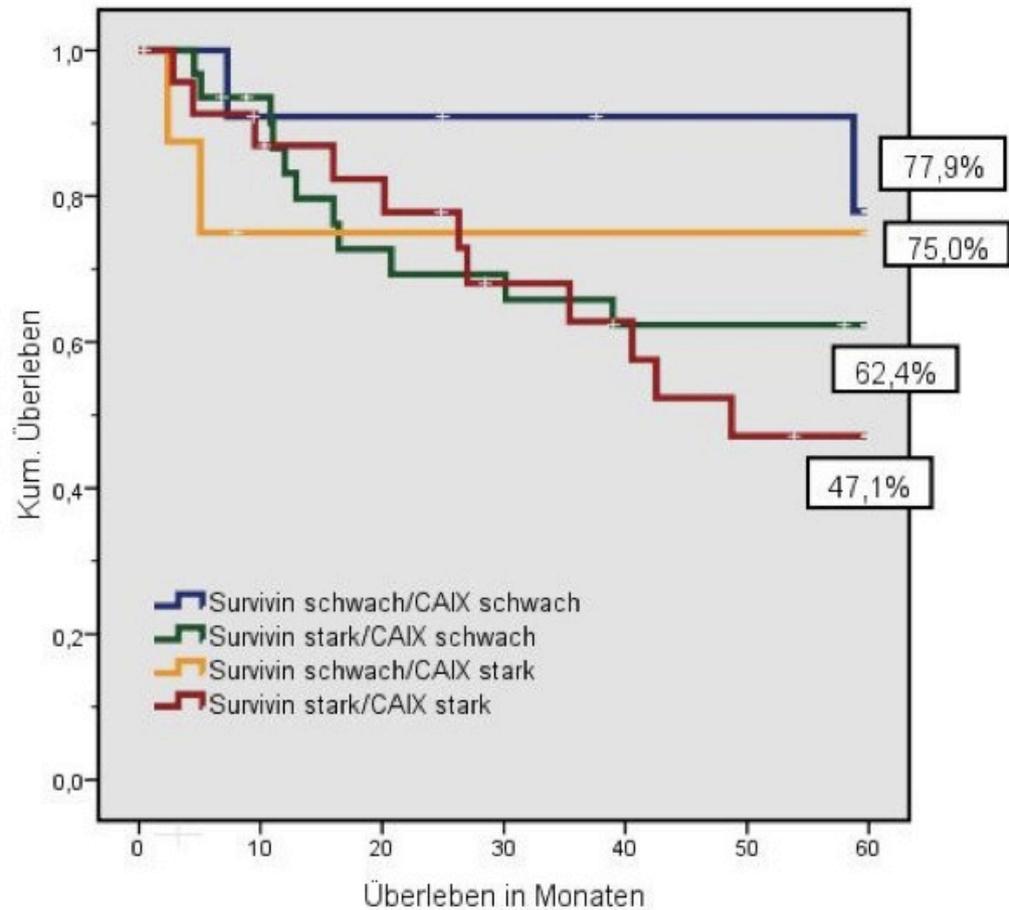


Abb. 18: 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der gleichzeitig vorliegenden Expression von Survivin und CAIX (n=75, p=0,481)

Lagen sowohl das Survivin als auch die CAIX im Tumorgewebe in schwacher Expression vor lag die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit bei 77,9%. Demgegenüber steht eine deutlich erniedrigte Rate von lediglich 47,1%, wenn beide Proteine stark exprimiert werden. Interessanterweise zeigt sich ebenfalls eine mit 62,4% deutlich herabgesetzte Überlebenswahrscheinlichkeit, wenn nur das Survivin stark, die CAIX hingegen schwach exprimiert wird.

Wie bereits die singuläre Analyse des Survivin im Tumorgewebe vermuten lässt, zeigt sich auch in der Koexpression mit der CAIX ein 2,9fach erhöhtes Risiko, am Karzinom zu versterben, wenn beide genannten Proteine im Tumorgewebe stark exprimiert werden im Vergleich zu schwacher Expression beider Proteine. Dieser Wert erreicht keine Signifikanz (p=0,162). Liegt die CAIX in einer schwachen Färbung, das Survivin in einer starken Expression vor, verbleibt immer noch ein 2,1fach höheres Risiko am Tumor zu versterben, allerdings wird die statistische Signifikanz auch hier verfehlt (p=0,330). Im Falle einer starken Expression von CAIX und einer schwachen des

Survivin besteht ebenfalls ein erhöhtes Risiko am Tumor zu versterben (HR=1,61, p=0,630).

Zusammengefasst weisen sowohl der Nachweis einer erhöhten Expression des Survivins als auch einer erhöhten Expression der CAIX ein erhöhtes Risiko auf, am Tumor zu versterben.

Auch wenn bei vorliegenden Fallzahlen die statistische Signifikanz nicht erreicht werden konnte, wird der eindeutig stärkere Einfluss des Survivins sowohl auf die 5-Jahresüberlebensrate als auch auf das Risiko des tumorassoziierten Versterbens deutlich.

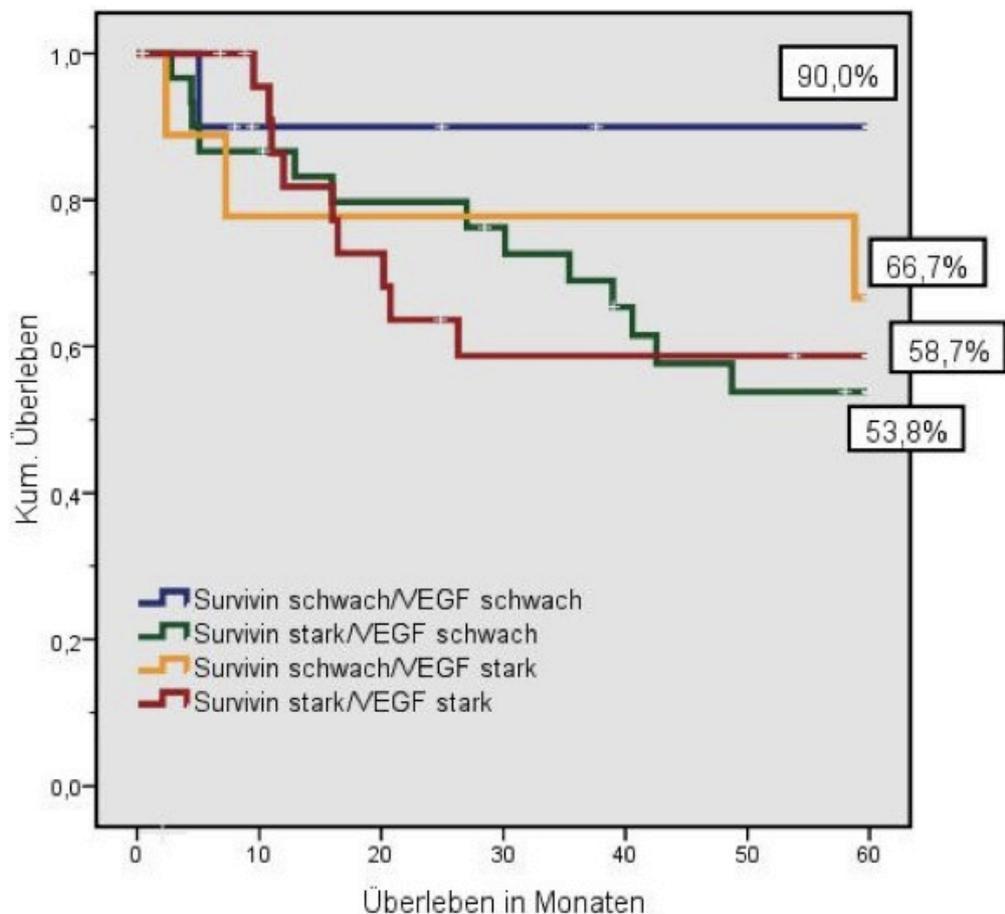


Abb. 19: 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der gleichzeitig vorliegenden Expression von Survivin und VEGF-C (n=75, p=0,531)

Vergleichbare Ergebnisse zeigen sich auch für die Koexpression von Survivin und VEGF-C. Im Falle einer starken Expression beider Proteine besteht ein 3,7fach erhöhtes Sterberisiko im Vergleich zur schwachen Ausprägung beider Proteine

($p=0,214$). Liegt nur das Survivin in einer starken, der VEGF-C jedoch in einer schwachen Färbung vor, besteht sogar ein 3,9fach erhöhtes Risiko ($p=0,183$) am Tumor zu versterben. Im umgekehrten Fall (Survivin schwach, VEGF-C stark) besteht weiterhin ein deutlich erhöhtes Risiko ($HR=2,8$, $p=0,365$) des tumorassoziierten Versterbens. Auch hier zeigt sich wie schon bei der Koexpression des Survivins mit der CAIX ein deutlich erhöhtes Risiko, am Tumor zu versterben bei starker Expression des Survivins. Für VEGF-C kann ebenfalls ein negativer, wenn auch schwächerer Einfluss als für das Survivin, auf die Überlebensrate und das tumorassoziierte Versterben nachgewiesen werden.

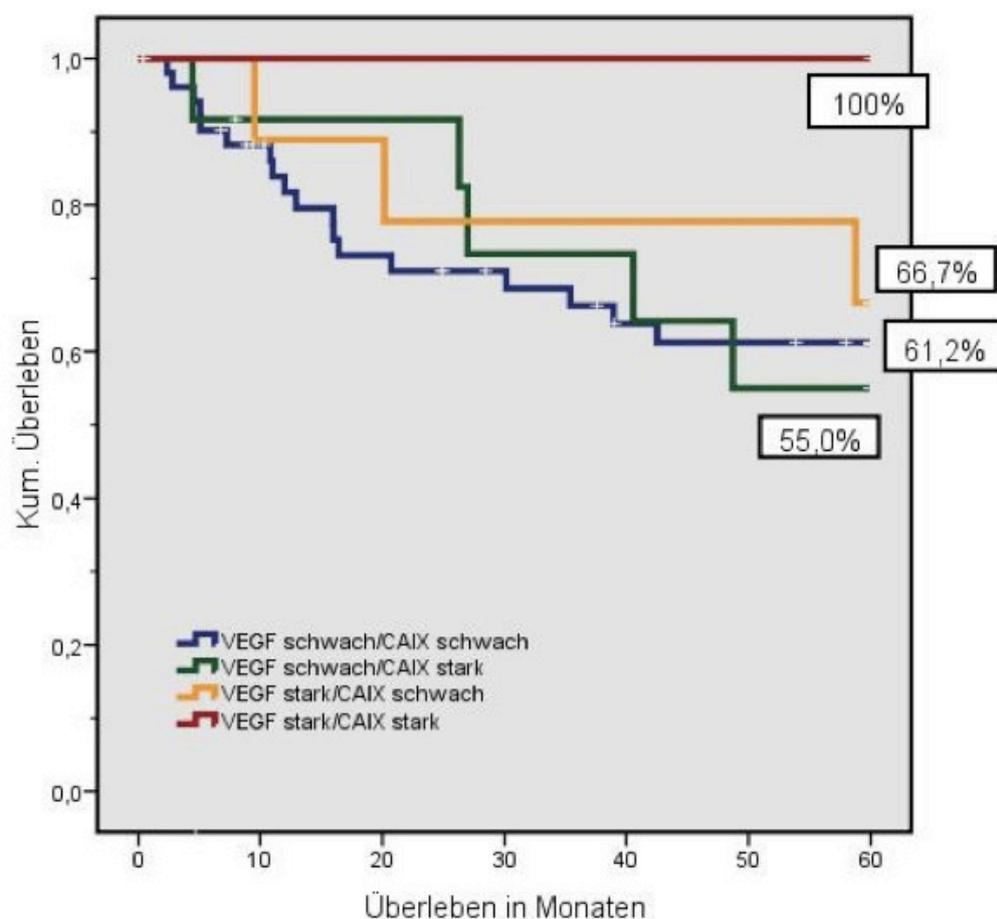


Abb. 20: 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der gleichzeitig vorliegenden Expression von VEGF-C und CAIX ($n=75$, $p=0,863$)

Lagen sowohl VEGF-C als auch die CAIX im Tumorgewebe in schwacher Expression vor zeigte sich eine Überlebensrate von 55% nach fünf Jahren. Bei schwacher Expression des VEGF-C und starker Expression der CAIX lag die 5-Jahresüberlebensrate bei lediglich 55% im Gegensatz zu 66,7% im umgekehrten Fall (VEGF stark/CAIX schwach)

Die Koexpression von VEGF-C und CAIX erbrachte für eine gleichzeitig vorliegende starke Expression beider Marker kein deutlich erhöhtes Risiko (HR=1,4, p=0,613). Interessanterweise ergab sich im Falle einer schwachen Ausprägung des VEGF-C und starker Expression der CAIX ein 2,6fach höheres Risiko am Tumor zu versterben als bei schwacher Expression beider Proteine (p=0,081). Dieser Trend ließ sich bereits in der univariaten Regressionsanalyse der Carboanhydrase vermuten. Im gegensätzlichen Beispiel (VEGF-C stark, CAIX schwach) lag das relative Risiko immer noch bei 1,9 (p=0,228).

Neben der Darstellung der Koexpression von zwei verschiedenen Proteinen wurde auch die gleichzeitig vorliegende Expression aller drei Proteine betrachtet. Die entsprechende COX-Regressionsanalyse ist grafisch in Abbildung 21 dargestellt, im Text wird das Risiko des tumorassoziierten Versterbens im Sinne des Hazard ratio erläutert.

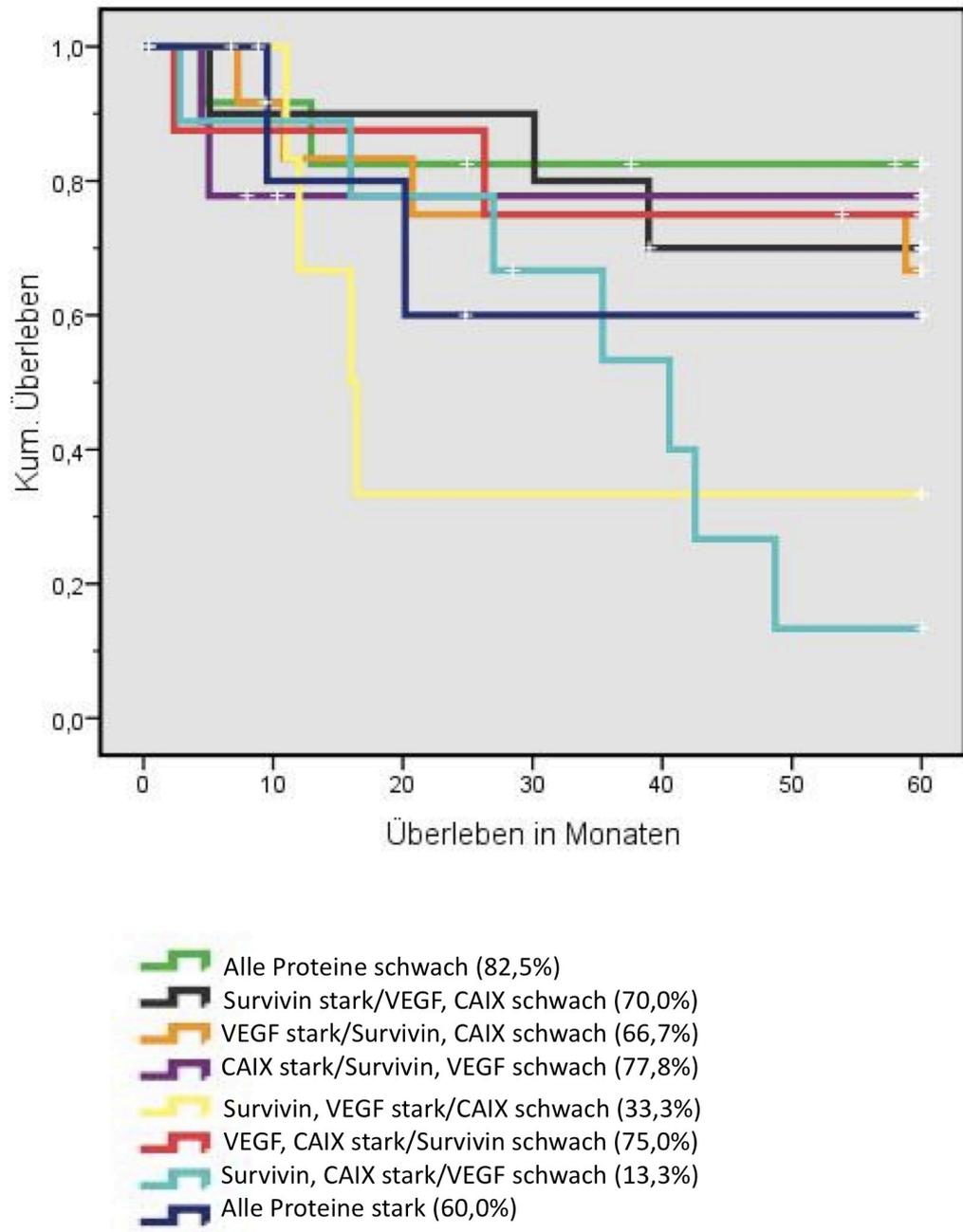


Abb. 21: 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der gleichzeitig vorliegenden Expression von Survivin, VEGF-C und CAIX

Auch diese gemeinsame Betrachtung aller drei Proteine nebeneinander unterstützt die bisher erhobenen Ergebnisse. Für eine starke Expression von Survivin und CAIX bei gleichzeitig schwacher Expression von VEGF-C lässt sich im Rahmen der COX-Regressionsanalyse ein statistisch signifikantes, 5,1fach erhöhtes Risiko am Tumor zu versterben detektieren ($p=0,042$). Ein ebenfalls deutlich erhöhtes Risiko ($HR=4,8$) zeigt sich bei starker Expression von Survivin und VEGF-C bei gleichzeitig schwacher

Expression der CAIX wobei die statistische Signifikanz knapp verfehlt wird ($p=0,071$). Werden alle drei Proteine stark exprimiert, liegt das Risiko, am Tumor zu versterben immer noch 2,7fach höher als bei schwacher Expression aller drei Marker ($p=0,318$). Interessanterweise zeigt sich im Falle einer alleinigen starken Expression des Survivins bei gleichzeitig schwacher Expression von VEGF und CAIX lediglich ein 1,5fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens ($p=0,614$). Gleiches gilt für die alleinige starke Expression des VEGF-C ($HR=1,7$, $p=0,522$) und der CAIX ($HR=1,5$, $p=0,652$).

Auch die in Abb. 21 dargestellte Kaplan-Meier-Überlebenskurve veranschaulicht den negativen Einfluss vor allem des Survivins auf die 5-Jahresüberlebensrate.

Liegen alle drei Proteine in starker Expression im Tumorgewebe vor, liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit bei 60%. Sind nur das Survivin und VEGF-C stark ausgeprägt sinkt diese Rate auf 33,3%. Bei gleichzeitig starker Expression von Survivin und CAIX in Kombination mit einer schwachen Expression des VEGF-C im Tumor liegt die 5-Jahresüberlebensrate lediglich noch bei 13,3%.

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich in der multivariaten COX-Regressionsanalyse das Survivin eindeutig als prognostisch assoziiertes Protein mit dem stärksten negativen Einfluss auf das Risiko des tumorassoziierten Versterbens bei Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom identifizieren. Es bestätigt sich der negativ verstärkende Effekt auf das Sterberisiko in Koexpression mit VEGF-C oder der CAIX. Der zweitstärkste Einfluss zeigt sich, wie bereits in der Korrelation von zwei Proteinen miteinander dargestellt, für die CAIX. Den geringsten Einfluss auf das tumorassoziierte Versterben hat nach den vorliegenden Ergebnissen VEGF-C.

6. Diskussion

6.1. Patienten und Überlebenschancen

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle gilt in der Bevölkerung bis heute als unterschätzte Tumorentität, obwohl es mittlerweile zu den zehn häufigsten Malignomen des Menschen gehört (Scully and Bagan, 2009).

Nicht nur die Inzidenz, sondern auch das Erkrankungsalter und vor allem die betroffene Patientenklientel haben sich in den letzten Jahren deutlich gewandelt. Während noch vor einigen Jahren der klassische Patient ein älterer Mann mit einem ausgeprägten Nikotin- und Alkoholabusus war (Westra, 2009), sind heute zunehmend jüngere Patienten, gehäuft auch Frauen ohne Risikofaktoren, betroffen. Die in der eigenen Studie untersuchten, zwischen 1993 und 1999 erfassten Patienten, wiesen ein mittleres Erkrankungsalter von 59,1 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auf. Die Männer erkrankten im Durchschnitt mit 56,8 Jahren die Frauen mit 65,6 Jahren. Der jüngste Patient wurde mit 23 Jahren eingeschlossen. Es wurden 50 Männer und 25 Frauen untersucht. Das Verhältnis von 2:1 bestätigt zahlreiche Ergebnisse anderer bereits erfolgter Studien (Divaris et al., 2010; La Vecchia et al., 1997; Warnakulasuriya, 2010). Das Robert-Koch-Institut (RKI) beschreibt für das Jahr 1990 ein mittleres Erkrankungsalter der Männer von 58 Jahren, für die Frauen von 63 Jahren. Die Erkrankungsrate männlicher Patienten ist laut RKI im Vergleich zu den Frauen aktuell um etwa das Dreifache erhöht (Robert-Koch-Institut, 2012a). Die Daten der eigenen Studie entsprechen somit aber trotzdem annähernd dem typischen Mundhöhlenkarzinompatienten in Deutschland in den 90er Jahren. Die Ursache für die zunehmende Erkrankungshäufigkeit der Frauen begründete sich möglicherweise in der steigenden Anzahl von Raucherinnen.

Die Behandlung des Mundhöhlenkarzinoms besteht aktuell aus einer Kombination von radikalchirurgischer Therapie, Radio- und Chemotherapie (Hausamen, 2000). Die drei Säulen werden in Abhängigkeit von der histologischen Klassifizierung des Tumors, aber auch nach individuellen Indikationen bzw. Kontraindikationen seitens des Patienten in verschiedener Weise eingesetzt. Ein korrektes prätherapeutisches Staging ist dafür unerlässlich (Sklenicka et al., 2010).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben sich bei durchschnittlich 17% der Patienten bereits regionäre Metastasen abgesiedelt (Sklenicka et al., 2010). Shrim et al untersuchten in einer 2009 veröffentlichten Studie den Vorhersagewert des Verhältnisses von tatsächlich befallenen zu entfernten Lymphknoten an 143 Patienten,

die im Rahmen ihrer radikal chirurgischen Therapie eine Neck dissection erhalten hatten. Je niedriger das Verhältnis, also je weniger der entnommenen Lymphknoten befallen waren, desto höher lag die postoperative Überlebensrate (Shrime et al., 2009). Dem entsprechen u.a. die eigenen Ergebnisse, dass ein fortgeschrittenes N-Stadium in einer geringeren Überlebensrate resultiert.

Trotz Fortschritten in der Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien (Computertomografie, Sonografie, Magnetresonanztomografie, Positronenemissionstomografie, Einführung der Mikrochirurgie) konnte in den letzten Jahren nur eine geringe Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate verzeichnet werden (Warnakulasuriya, 2009).

Im Sinne der Feldkanzerogenisierung ist zudem zu erwähnen, dass bei betroffenen Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung von einem erhöhten Risiko (10-30%) für das Auftreten eines Zweitkarzinoms im Mund- und Gesichtsbereich auszugehen ist (Schwenzer und Ehrenfeld, 2010).

Die Angaben zu den Überlebensraten divergieren in der Literatur erheblich und werden mit Werten von 30% (Sargeran et al., 2008) bis zu 65% (Metelmann, 2000) angegeben. Hierbei spielt sicherlich auch eine Rolle, ob es sich um eine Studie aus einem hochzivilisierten Industriestaat oder einem Entwicklungsland handelt. Razak et al mussten in einer 2010 publizierten Studie an 118 Patienten der Universität Malaysia eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 18% verzeichnen (Razak et al., 2010). Im Gegensatz dazu steht eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2004 einer Würzburger Klinik mit einer außergewöhnlich hohen Rate von 75% im Nachbeobachtungszeitraum von fünf Jahren (Müller, 2004).

Erklärt werden können diese enormen Schwankungen durch die zum Teil nicht ausreichend selektierten Diagnosen. Lippenkarzinome bieten beispielsweise eine bessere Prognose, so dass der Einschluss dieser Patienten die 5-Jahres-Überlebensrate einer untersuchten Gruppe zu deutlich positiveren Ergebnissen verschiebt (Bilkay et al., 2003), die auch statistisch signifikant sind (Tischendorf et al., 1985). Karzinome im Bereich des Unterkiefers zeigen hingegen die schlechtesten Überlebenszeiten (De Vicente et al., 2001).

Der DÖSAK (Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich) gibt in einer Registerdatenbank eine 5-Jahresüberlebensrate von 46,5% bis 71% an. Eingeschlossen wurden 30 Kliniken, deren Fallzahl bei mindestens 50 Patienten lag (Eckardt, 2001).

Die in der eigenen Studie berechnete 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 61,0% und bewegt sich damit im oberen Drittel der verglichenen Literatur der letzten Jahre. Im Vergleich zu einer für die Hallenser Klinik belegten Überlebensrate von ca. 50% für

den Behandlungszeitraum der Jahre 1948-1980 ist also eine Verbesserung von etwa 10% zu verzeichnen (Tischendorf, 1990). Ursächlich für diese im oberen Drittel der beschriebenen Überlebenswahrscheinlichkeiten angesiedelte Rate könnte im Vergleich zur Studie von Tischendorf die Einführung mikrochirurgischer Techniken in den 80er Jahren sein. Im Beobachtungszeitraum zwischen 1993 und 1998 wurde knapp die Hälfte der eingeschlossenen Patienten mit einem mikrochirurgisch anastomosierten Unterarmklappen versorgt. Vor Einführung dieser Technik galt etwa die Hälfte aller Patienten im Tumorstadium IV als inoperabel (Schimann, 2004). Ein weiterer Grund für die recht hohe Überlebensrate im Vergleich zur vorliegenden Literatur könnte die Selektion der Patienten sein. Vorteil der hier präsentierten Daten ist die streng homogene Patientengruppe. In allen 75 Fällen handelt es sich ausschließlich um Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle mit bekanntem klinischen Verlauf. Es wurden nur die Todesfälle der Patienten eingeschlossen, die entweder am Tumor oder mit Zeichen einer deutlichen Tumorprogression verstorben waren. Eine fehlende Differenzierung der Todesursache könnte zum einen die Überlebensrate verfälschen und zu schlechteren Ergebnissen verschieben, zum anderen könnte der Einschluss typischer altersabhängiger Todesursachen dazu führen, dem Alter einen falsch negativen Einfluss auf das Überleben des Mundhöhlenkarzinoms zuzuschreiben. In der eigenen Studie konnten sowohl das Alter als auch das Geschlecht als Einflussfaktoren auf das Überleben mittels bivariater Korrelation nach Pearson ausgeschlossen werden. Ähnliche Schlüsse trafen auch Kim et al. in ihrer 2005 veröffentlichten Studie über 113 am Mundhöhlenkarzinom erkrankter Patienten. Die Gruppe der älteren Patienten über 58 Jahre zeigte zwar eine Tendenz zur schlechteren Überlebensrate, allerdings wurde die statistische Signifikanz verfehlt. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen dem Überleben und dem Geschlecht der Patienten festgestellt werden.

Die Tumorgöße beeinflusst hingegen signifikant die Prognose des Malignoms (Kim et al., 2005). Ein bedeutender Faktor bezüglich der Überlebensrate ist das auch das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Von Chen und Mitarbeiter konnte dies in einer retrospektiven Studie mit 703 Patienten eindrucksvoll bestätigt werden. Für alle Patienten im Stadium I lag die 5-Jahresüberlebensrate bei durchschnittlich 72%, im Stadium II bei 38,9%, im Stadium III bei 26,7%. Im Tumorstadium IV zeigte sich nur noch eine Überlebensrate von 11,8% nach fünf Jahren.

Als weitere Faktoren, die das Überleben beeinflussen, gelten die Größe des Tumors, der Befall von Lymphknoten, die chirurgische Therapie, das Staging sowie die histopathologische Differenzierung (Chen et al., 1999). Diese Daten entsprechen den Ergebnissen von Lo et al aus dem Jahre 2003 (Lo et al., 2003).

Die eigenen erhobenen Daten decken sich weitgehend mit der genannten Studienlage. In Abhängigkeit vom Tumorstadium verschlechterte sich das Überleben entsprechend. Einer Überlebensrate von 72,9% im Tumorstadium I stehen nur 42,9% der Patienten mit einem Tumorstadium IV gegenüber. Für die Größe des Primärtumors und das Stadium des Lymphknotenbefalls konnten hoch signifikante bzw. signifikante Zusammenhänge bezüglich des Überlebens der Patienten aufgezeigt werden. Von allen Patienten mit einem T1 Tumor lebten nach fünf Jahren noch 72,7% im Gegensatz zu 16,4% mit einem T4 Tumor. Für das Lymphknotenstadium N0 konnte eine Überlebensrate von 62,2%, für das Stadium N2 nur eine Rate von 47,6% aufgezeigt werden. Lediglich für das Grading ließ sich, ausgehend von den eigenen Daten keine Abhängigkeit darstellen.

Neben den bereits genannten Parametern beeinflusst auch die Therapie nachweislich die Prognose der Erkrankung, wobei zwischen einem kurativen und einem palliativen Vorgehen unterschieden wird. Zahlreiche Autoren haben sich mit dem Überleben in Abhängigkeit von der gewählten Therapie beschäftigt. Ausdruck für den signifikanten Einfluss der Therapie war die Ausarbeitung des TPI (therapieabhängiger Prognoseindex) wie auch später des CIP (computergestützte individuelle Prognosestellung) durch den DÖSAK (Platz et al., 1982). Sklenicka et al konnten eine positive Auswirkung der radikal chirurgischen Therapie auf das Überleben zeigen (Sklenicka et al., 2010). Weitere, z.T. primär radiotherapeutische Arbeiten zeigten eine Verbesserung der Überlebensrate auf 50% durch Fortschritte der Radiochemotherapie bei fortgeschrittenen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich (Kuhnt, 2007).

Freier et al konnten in einer Gruppe von 207 Patienten eine 5-Jahresüberlebensrate von 49,5% verzeichnen. Alle Patienten hatten eine neoadjuvante Therapie, kombiniert aus einer 40 Gy Bestrahlung und einer Chemotherapie mit Cisplatin erhalten (Freier et al., 2008).

Ebenfalls entscheidend für die Prognose des Mundhöhlenkarzinoms ist die frühzeitige Diagnosestellung und daran anknüpfend die Einleitung einer entsprechenden, individualisierten Therapie (La Vecchia et al., 1997). So ist z.B. die Sentinellymphknotenbiopsie in der Lage, okkulte Karzinome unabhängig von ihrer Größe zu finden (Goerkem et al., 2010).

Eine 2005 in den USA veröffentlichte Studie bestätigte die negative Auswirkung von schlecht differenzierten Karzinomen sowie deren Tumorgröße auf die Prognose der Erkrankung.

Zur Individualisierung und zur spezifischeren Therapie eines jeden Patienten, aber auch zur Einschätzung des persönlichen Risikos wurden von Brandwein-Gensler et al neben den bekannten und klinisch anerkannten Faktoren neue Parameter gefordert,

die sich vermehrt mit den molekularbiologischen Vorgängen der Tumorgenese beschäftigen (Brandwein-Gensler et al., 2005). Bereits in den Achtziger Jahren war auf den Einfluss solcher histochemischer Faktoren auf die Prognose des Mundhöhlenkarzinoms u.a. auch an der Hallenser Klinik hingewiesen worden (Quade, 1984; Tischendorf et al., 1985). Ende der Neunziger Jahre hatte Hausamen sogenannten Tumormarker (Proteine, die an der Entstehung von Malignomen beteiligt sind) ergänzend zum TNM-System und dem Grading für diagnostische und therapeutische Aussagen empfohlen (Hausamen, 2000). Ganz ähnliche Forderungen äußerte 2006 auch Bisoffi, indem er das TNM System als alleiniges prognostisches System als unzureichend bezeichnete (Bisoffi et al., 2006). Parallel dazu war Anfang der Neunziger Jahre das neu eingeführte Verfahren der sog. Computergestützten Individuellen Prognosestellung (CIP) vorgestellt worden. Es versprach eine individuelle Prognoseanalyse und -stellung für den einzelnen Patienten unter Einbeziehung prätherapeutischer klinischer und histopathologischer Faktoren (Platz et al., 1992). Allerdings konnte im Rahmen einer retrospektiven Studie der Vorhersagewert dieses CIP-Systems nicht bestätigt werden (Odenwald, 2007). Die mittels CIP ermittelten Überlebensdaten wurden denen einer bereits bestehenden Tumordatenbank gegenübergestellt und konnten erhebliche Differenzen belegen. Ursächlich hierfür waren vermutlich zum einen das relativ veraltete zu Grunde liegende Datenmaterial aus den Jahren 1977-1982, zum anderen wurden wichtige Parameter wie der Alkohol- und Nikotinkonsum der Patienten außer acht gelassen. Molekulargenetische Faktoren wurden ebenso nicht berücksichtigt. Die wahrscheinlich entscheidenden molekularen Rückschlüsse auf die Pathobiochemie der Karzinome waren somit nicht möglich. Die Kenntnis und Einbeziehung molekulargenetischer Vorgänge in der Tumorgenese und im Tumor selbst scheint für eine gezielt auf den jeweiligen Patienten zugeschnittene Therapieplanung bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung unerlässlich.

Die individualisierte Therapie verspricht die Möglichkeit, die Lebensqualität und das rezidivfreie Intervall insbesondere bei fortgeschrittenen oder inoperablen Tumoren zu verbessern.

Aus der Fülle der am Tumorprozess beteiligten Proteine werden nachfolgend die Proteine Survivin als Apoptoseinhibitor, VEGF-C als Proliferationsmarker und CAIX als Hypoxiemarker hinsichtlich ihres Einflusses auf die Tumorprogression und die Prognose des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle diskutiert.

6.2. Survivin

Survivin ist als Inhibitor der Apoptose mittlerweile hinreichend bekannt. Bei einer Überexpression des Proteins wird der programmierte Zelltod umgangen. Es resultiert dann u.a. eine entsprechende Resistenz dieser Tumorzellverbände gegen Radio- und Chemotherapie (Zaffaroni et al., 2005). Daraus lässt sich für die Zukunft möglicherweise ein neuer Therapieansatz für zahlreiche Tumoren ableiten.

Diverse Studien konnten die Expression des Apoptoseinhibitors Survivin in verschiedenen Tumorentitäten, z.B. dem Bronchial- (Monzo et al., 1999), Mamma- (Tanaka et al., 2000), Magen- (Lu et al., 1998), Blasen- (Swana et al., 1999), Kolon- (Kawasaki et al., 1998), Leber- (Ito et al., 2000) und Prostatakarzinom (Xing et al., 2001) nachweisen (Tabelle 18). In der Regel konnte ein inverser Zusammenhang zwischen Expression und Überleben nachgewiesen werden. Je stärker das Survivin im jeweiligen Tumorgewebe exprimiert wurde, desto ungünstiger war die Prognose.

Tab. 18: Übersicht der Studien zum Einfluss von Survivin auf verschiedene Tumorentitäten

| Einfluss von Survivin | Malignom | Autor | Jahr |
|---|-----------------|-----------------|-------------|
| - erhöhte Expression - schlechtere Prognose - Grading - Invasivität | Oesophagus | Takeo et al. | 2010 |
| - schlechtere Überlebensrate - kein Zusammenhang zu klinisch-pathologischen Parametern | Lunge | Monzo et al. | 1999 |
| - erniedrigter Apoptoseindex - schlechtere Prognose | Mamma | Tanaka et al. | 2000 |
| - verminderte apoptotische Aktivität | Magen | Lu et al. | 1998 |
| - Korrelation zum Auftreten von Rezidiven - Grading | Harnblase | Swana et al. | 1999 |
| - verminderter Apoptoseindex - schlechtere Überlebensrate | Kolon/Rektum | Kawasaki et al. | 1998 |
| - Einfluss auf Proliferation | Leber | Ito et al. | 2000 |
| - Expression in neuroendokrinen Zellen | Prostata | Xing et al. | 2001 |

Auch für Sarkome gelten entsprechende Zusammenhänge: aus einer starken oder mäßig starken Survivinexpression im Kern und im Zytoplasma von Weichteilsarkomen (Synovialzellsarkom, Leiomyosarkom) resultiert eine signifikant erniedrigte Überlebensrate (Taubert et al., 2010).

Neben diesen, z.T. exzellent dokumentierten Studien, konzentriert sich das wissenschaftliche Interesse seit gut einem Jahrzehnt auf die Survivinexpression im Mundhöhlenkarzinom. De Maria et al konnten einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression des Survivins und der Aggressivität des Tumorstadiums und der Prognose des Mundhöhlenkarzinoms darstellen. Sie untersuchten allerdings nur 22 Patienten. In 19 Fällen, entsprechend einem Prozentsatz von 86,4%, konnte eine erhöhte Survivinexpression nachgewiesen werden (De Maria et al., 2009). Die eigene, weitaus größer angelegte Studie, bestätigte diese Resultate. In etwa 2/3 der untersuchten Tumorgewebe wurde ebenfalls eine positive Survivinexpression nachgewiesen. Auch wenn in der eigenen Studie die statistische Signifikanz verfehlt wurde, zeigte sich dennoch eine schlechtere Prognose für die Survivin-positiven im Vergleich zu den Survivin-negativen Fällen.

Jane et al untersuchten insgesamt 55 indische Patienten. Einschlusskriterium war u.a. ein Nikotinabusus von mind. 10 Jahren. Allerdings wiesen nur 38 der Patienten ein primäres Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle auf, 17 litten an einer oralen Leukoplakie. Die Autoren korrelierten die histopathologische Differenzierung mit der Expression des Survivins im Tumorgewebe. Es zeigte sich, ähnlich dem Expressionsmuster im gesunden Normalgewebe, in hochdifferenzierten Tumoren lediglich eine geringe Expression. Im Gegensatz dazu konnte bei allen schlecht differenzierten Karzinomen eine mäßige bis starke Survivinexpression nachgewiesen werden (Jane et al., 2006). In Analogie zur eigenen Studie wurde aber in Abhängigkeit von der Entdifferenzierung der Mundhöhlenkarzinome ein Anstieg der Survivinexpression im Tumorgewebe verzeichnet. Der wahrscheinlich interessanteste Aspekt dieser Untersuchung ist die Tatsache, dass sich auch mehr als die Hälfte der oralen Leukoplakien (65%) positiv bzw. stark positiv für Survivin färben ließen. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zum Einschlusskriterium Rauchen. Es bleibt abzuwarten, ob sich mit Hilfe des Survivins eine Möglichkeit ergibt, bereits bei Präkanzerosen frühzeitig deren malignes Potential abschätzen zu können.

Auch Lo Muzio et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen der Survivinexpression und der Entwicklung von Karzinomen aus präkanzerösen intraoralen Läsionen und kamen zu vergleichbaren Ergebnissen wie Jane et al. Zwar war die Stichprobe klein, dennoch konnte der Einfluss von Survivin im Rahmen der malignen Transformation gezeigt werden. Aus nahezu allen Läsionen, die dieses

Protein exprimierten (99%), entwickelte sich im Verlauf ein Plattenepithelkarzinom (Lo Muzio et al., 2003a). Es muss somit davon ausgegangen werden, dass Survivin in der malignen Transformation sehr zeitig Einfluss gewinnt. Möglicherweise gelingt es, durch zusätzliche immunhistochemische Färbungen des Survivins, obligate Präkanzerosen frühzeitig sicher zu detektieren. Wenn diese dann chirurgisch entfernt werden, könnte in derartigen Fällen vielleicht die maligne Transformation in ein definitives Karzinom umgangen werden.

In einer taiwanischen Untersuchung von 96 Fälle eines Plattenepithelkarzinoms und 62 Fälle einer epithelialen Dysplasie konnte in 97% der Dysplasien und in 98% der Malignome eine erhöhte Survivinexpression nachgewiesen werden (Lin et al., 2005). Auch hier zeigen sich Parallelen zur Arbeit von Jane et al. Wahrscheinlich kann Survivin somit auch als Marker innerhalb der Kanzerogenese herangezogen werden. Bezüglich der Dysplasien lag die Proteinexpression bei den Fällen, die später zu Karzinomen transformierten, deutlich höher als in der Vergleichsgruppe der nicht entarteten Fälle. Außerdem konnte belegt werden, dass Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom und einer hohen Expression von Survivin, einem höhergradigen Tumorstadium, einer fortgeschrittenen Tumorgroße oder dem Nachweis von Lymphknotenmetastasen eine deutlich geminderte Überlebensrate aufwiesen.

In einer weiteren Studie zum Survivin und seiner Rolle als potenzieller Prediktor der Prognose des Mundhöhlenkarzinoms konnte in der immunhistochemischen Analyse keine signifikante Korrelation zwischen der Expression des Proteins und dem Alter der Patienten, dem Geschlecht, der Tumorgroße, dem Lymphknotenbefall und dem Vorhandensein von Fernmetastasen in 110 Fällen gefunden werden. Das Survivin war aber vorwiegend in den schlechter differenzierten Karzinomen zu finden. Die eigene Studie konnte in Ergänzung dazu sogar einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Grading und der Expression des Survivins nachweisen. Je schlechter die Differenzierung des Karzinoms, desto höher lag die Survivinexpression im Tumorgewebe. Weiterhin zeigten die Patienten der eigenen Studie trotz verfehlter Signifikanz schlechtere Überlebensraten bei starker Proteinexpression. Diese Aussage bestätigt sich in den bereits zitierten Untersuchungen von Lo Muzio et al., deren Ergebnisse bezüglich des Überlebens und der Survivinexpression sogar signifikant waren. Vorteil dieser präsentierten Studie war zudem die relativ große Stichprobe von 110 Patienten (Lo Muzio et al., 2003b).

Im Weiteren konnten Lo Muzio et al. erneut anhand von immunhistochemischen Untersuchung von Mundhöhlenkarzinomen ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Survivin-Proteinlevel und einer geringeren Überlebensrate nachweisen und somit die bereits 2003 postulierten Ergebnisse bestätigen (Lo Muzio et al., 2005).

Diese Ergebnisse sind für weitere Forschungsaspekte deshalb so wichtig, weil sie belegen, dass mittels Immunhistochemie als schnelle und kostengünstige Nachweismethode der Proteingehalt an Survivin im Tumorgewebe bestimmt werden kann. Die eigenen Daten unterstützen Lo Muzios Studie, da sie einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression des Survivins und dem Grading des Tumors belegen. Die stark ausgeprägten Färbemuster fanden sich vorwiegend in den G3-Tumoren. Dass analog zu den Analysen von Lo Muzio et al. noch keine Korrelation zur TumorgroÙe und zum Stadium der Lymphknotenmetastasierung gefunden wurde, liegt möglicherweise auch an der vergleichbar kleinen Anzahl von Tumorproben.

Moderne Analysen befassen sich mit dem Nachweis von Survivin-mRNA im Tumorgewebe. Es konnte somit anhand 113 Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom auf Proteinebene gezeigt werden, dass erhöhte Survivin-Proteinkonzentrationen signifikant mit einem schlechteren Überleben einhergingen. Die COX-Regression bestätigte, fast analog zu den eigenen Ergebnissen, ein 2,5fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens, wenn Survivin mRNA vermehrt im Tumorgewebe isoliert werden konnte (Kim et al., 2005). Basierend auf diesen Ergebnissen empfahlen die Autoren schon 2005, beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle das TNM-System für prediktive Informationen durch die Kenntnis des Survivin-mRNA-Gehaltes zu ergänzen. Wünschenswert wären hier additive Analysen, welche eine Korrelation der Survivin-mRNA mit den Ergebnissen/Färbemustern der Immunhistochemie belegen. Somit könnte bewiesen werden, dass in der Tat immunhistochemische Untersuchungen ausreichend Aussagekraft haben, Survivinexpression im Tumorgewebe für eine mögliche Therapiestratifizierung zu detektieren.

Eine neuere Studie aus dem Jahr 2010 befasste sich mit der Survivinexpression in Lymphknotenmetastasen von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Kein Zusammenhang konnte zwischen dem Survivin und der histologischen Differenzierung, der Mikrogefäßdichte und dem Tumorstadium nachgewiesen werden. Signifikant negative Auswirkungen einer hohen Survivinexpression zeigten sich aber auf die Überlebensrate und die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen. Metastasierte Tumoren exprimierten nahezu immer (95,2%) hochgradig Survivin, während nicht alle hohen Expressionen dieses Proteins automatisch zu Lymphknotenmetastasen führten. Diese umfassende Studie von Kim und Mitarbeitern stellte zusätzlich mittels Western blot fest, dass Survivin in 6 Zelllinien von Mundhöhlenkarzinomen, nicht aber im Normalgewebe nachgewiesen werden konnte. Die Autoren konnten ferner zeigen, dass im Tiermodell (Karzinogenese der Wange) Survivin bereits zu Beginn der Karzinogenese nachweisbar war und schlussfolgerten, dass bisher die Rolle des Proteins Survivin am Gesamtprozess maligner Transformationen unterschätzt und

lediglich auf einen Apoptoseverlust und konsekutiv verminderte Effektivität der Strahlentherapie reduziert worden war (Kim et al. 2010).

Die fehlenden Korrelationen zwischen der Survivin-Expression einerseits und dem Stadium der Tumorerkrankung sowie dem T- und N-Stadium andererseits lassen in der eigenen Untersuchung die Vermutung zu, dass sich in der Tat Survivin als unabhängiger Prognosemarker beim Mundhöhlenkarzinom erweisen könnte. Trotz der teilweise verfehlten Signifikanz betrachten wir Survivin als vielversprechenden Prognosefaktor für das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Die einschlägige Literatur, sowohl zum Mundhöhlenkarzinom aber auch zu diversen anderen Tumorentitäten untermauert diese Aussage. Noch detaillierter Schlüsse könnten möglicherweise anhand einer größeren multizentrischen Patientengruppe gezogen werden, die u.a. eine noch differenziertere Betrachtung der verschiedenen Färbemuster des Survivins erlauben würde. Deshalb überrascht es nicht, dass bereits 2003 Altieri über einen möglichen therapeutischen und diagnostischen Einsatz des Proteins spekulierte. Als potentielle Optionen nannte er die Entwicklung von Antisense-Nukleotiden zur Blockade der Translation oder immunologische Therapieansätze (Altieri, 2003).

6.3. VEGF-C

Entscheidend für die Entstehung und die Progression eines Malignoms ist ein tumoreigenes Gefäßsystem. Dieser als Angiogenese bezeichnete Prozess wurde bereits 1971 von Folkman beschrieben (Folkman, 2002). Derartige tumoreigene Gefäßsysteme und die Absiedelung von Metastasen bilden zuletzt den limitierenden Faktor für die Prognose und das Überleben eines am Tumor erkrankten Patienten (Cheng et al., 2008).

Bis heute haben sich zahlreiche Autoren mit der Erforschung der Tumorangio-genese beschäftigt. Im Vordergrund des Interesses steht hierbei die Gruppe der VEGF (vascular endothelial growth factor) als wichtiger Mediator der Neubildung von Gefäßen. Bereits seit gut einem Jahrzehnt konzentriert sich auch beim Mundhöhlenkarzinom die Forschung auf die Expression von VEGF im Tumorgewebe. Bereits 2002 erhoffte man sich dadurch zusätzliche Aspekte hinsichtlich der Prognosekalkulation beim Mundhöhlenkarzinom erhalten zu können (Yang et al., 2002).

Munoz-Guerra et al. untersuchten 2004 den Einfluss einer frühzeitigen Angiogenese auf die Prognose anhand von 61 Zungenkarzinom Patienten. Schon intratumoral hatte sich bei mehr als 50% der T1 und T2 Tumoren eine erhöhte Lymphangiogenese gezeigt. Die 5-Jahresüberlebensrate dieser Patienten lag bei 67,2% und erhöhte sich im Falle einer negativen Lymphgefäßformation auf 89,6%. Somit konnte ein statistisch signifikanter negativer Einfluss einer frühen Lymphangiogenese auf das krankheitsfreie Intervall des Zungenkarzinoms gezeigt werden (Munoz-Guerra et al., 2004).

Die schlechtere Prognose des Mundhöhlenkarzinoms bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen ist seit Jahren bewiesen. Für das Zungenkarzinom konnte bestätigt werden, dass das Auftreten zervikaler Lymphknotenmetastasen sowohl durch die Infiltrationstiefe als auch durch die Größe des Primärtumors beeinflusst wird. Im Tumorstadium 2 zeigten 50% der untersuchten Tumoren Lymphknotenmetastasen, im Stadium 1 waren es nur 25% (Keski-Santti et al., 2007). Möglicherweise beginnt die Ausbildung eines Lymphgefäßsystems bereits vor Auftreten des eigentlichen Karzinoms bzw. dessen Metastasen und kann somit frühzeitig nachgewiesen werden. Hierbei scheint insbesondere VEGF-C eine entscheidende Rolle zu spielen.

Während die ersten Arbeiten mehr oder weniger summarisch die VEGF-Proteinexpression untersuchten bzw. dessen Einfluss auf die Gefäßangiogenese betrachteten, liegt nunmehr ein Schwerpunkt auf der durch VEGF-C vermittelten Lymphangiogenese. In neuesten klinisch-pathologischen Studien zu dieser Problematik wurde ein direkter Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Proliferationsrate der Tumorzellen und einer starken Expression des VEGF-C in der Proteinanalyse gefunden. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass mittels shRNA gezielt der VEGF-C-Proteingehalt im Tumor herunterreguliert werden kann (Benke et al., 2010). Außerdem konnte an Zelllinien gezeigt werden, dass VEGF-C die Tumorzellproliferation nachhaltig zu steigern vermag. Es kann sogar angenommen werden, dass VEGF-C einen positiven Einfluss auf die Mobilität der Mundhöhlenkarzinom-Tumorzellen und somit einen weiteren supportiven Effekt auf die Metastasierungskaskade hat. Möglicherweise könnte dadurch ein neuer therapeutischer Ansatz im Sinne einer gezielten Inhibition des Lymphangiogeneseprogenitors VEGF-C etabliert werden.

Ein möglicher therapeutischer Ansatz durch Inhibition der Lymphangiogenese lässt sich auch anhand einer allerdings sehr kleinen Stichprobe von 14 Patienten ableiten. Die Expression von VEGF-C einen Einfluss auf die Metastasierung des Mundhöhlenkarzinoms und steht auch in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten von Rezidiven (Neuchrist et al., 2003).

Zu den histopathologisch-klinischen Studien gehört auch jene von Cicco et al. Die Autoren konnten eine deutlich erhöhte Expression von VEGF-C im Falle von Lymphknotenmetastasen eines Zungenkarzinoms nachweisen (Cicco de et al., 2004). Der wesentliche Nachteil der Studie war die sehr kleine Stichprobenzahl von lediglich 15 Patienten.

Zu ganz ähnlichen Ergebnissen kamen Sedivy et al. Sie bewiesen einen Zusammenhang zwischen der lymphatischen Mikrogefäßdichte und dem Vorkommen von Lymphknotenmetastasen bei insgesamt 28 Patienten. Die Autoren konnten eine signifikant erhöhte Expression von VEGF-C bei erhöhter lymphatischer Mikrogefäßdichte belegen. Zudem zeigte sich eine deutliche Zunahme der Metastasierung in den Lymphknoten. Diesen Ergebnissen folgend wurde VEGF-C als möglicher Prognosemarker vorgeschlagen und gefordert, ihn neben dem TNM System und dem Grading zur Prognosekalkulation mit aufzunehmen. Nachteil der Studie ist das Fehlen von Überlebenszeitanalysen (Sedivy et al., 2003).

Interessanterweise konnte in der eigenen Studie weder ein signifikanter Einfluss des VEGF-C auf das Überleben der Tumorpatienten noch zwischen den klinisch-pathologischen Parametern und der Expression von VEGF-C bestätigt werden. Da aber tendenziell bei den klinisch-pathologisch günstigeren N-Stadien auch die geringeren VEGF-C-Proteinexpressionen gefunden wurden, könnte das statistische Signifikanzniveau möglicherweise bei größeren Probandenzahlen erreicht werden.

Insgesamt bleibt aber abzuwarten, ob in der größeren multivariaten Analyse VEGF-C als unabhängiger, prognostischer Faktor beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle bestätigt werden kann. Welchen detaillierten Einfluss VEGF-C auf die Tumorentwicklung und -progression beim Mundhöhlenkarzinom hat lässt sich möglicherweise nur anhand eines längeren Nachbeobachtungszeitraumes ermitteln. Durch Hinzuziehung der 10-Jahres-Überlebensdaten könnten in diesem Zusammenhang wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden. Das Interesse läge dann auf Lymphknotenmetastasen-Rezidiven, welche sich aus sog. „schlafenden Metastasen“ entwickeln. Letztere sind klinisch und bildmorphologisch nicht nachweisbare Mikrometastasen, die über längere Zeiträume klinisch nicht relevant werden. Die Kenntnis des VEGF-C-Expressionsmusters könnte hier helfen, klinische und pathologische, sog. „N0-Hälse“, hinsichtlich derartiger Mikrometastasen zu screenen. Der therapeutische Ansatz in der Zukunft bestünde dann darin, auch bei klinischer Metastasenfreiheit aber gleichzeitig hoher VEGF-C-Expression neben der Neck dissection eine protektive Radiatio in Erwägung zu ziehen.

Auch andere Tumorentitäten sind hinsichtlich der VEGF-Expression umfassend untersucht worden. Zur besseren Übersicht sind die hierzu veröffentlichten Studien und der Einfluss von VEGF auf das jeweilige Malignom in Tab. 19 dargestellt.

Tab. 19: Übersicht der Studien zum Einfluss des VEGF auf verschiedene Tumorentitäten

| Einfluss von VEGF | Malignom | Autor | Jahr |
|--|------------------|------------------------|-------------|
| - Stimulation der Lymphangiogenese - vermehrtes Auftreten von Lymphknotenmetastasen | Oesophagus | Kitadai et al. | 2001 |
| - Vermehrtes Auftreten lymphatischer Metastasen | Mamma | Skobe et al. | 2001 |
| - schlechtere Überlebensrate - höhere Proteinlevel bei höhergradigen T- und N-Stadien und Grading | Oesophagus | Liu et al. | 2009 |
| erniedrigte Serumlevel von VEGF nach kombinierter Applikation von Radio- und Chemotherapie | Kolon/Rektum | Loven et al. | 2008 |
| - erhöhte Serumlevel in malignen Ovarialtumoren | Ovar | Abu-Jawdeh et al. | 1996 |
| - erhöhte Malignität - Ausbildung eines intratumoralen Gefäßsystems | Mamma | Brown et al. | 1995 |
| vermehrte hämatogene Metastasierung | Magen/Oesophagus | Driessen et al. | 2006 |
| progredienter Dysplasiegrad | Vulva | Bancher-Todesca et al. | 1997 |

(Abu-Jawdeh et al., 1996; Bancher-Todesca et al., 1997; Brown et al., 1995; Driessen et al., 2006; Kitadai et al., 2001; Liu et al., 2009; Loven et al., 2008; Skobe et al., 2001)

Da die einzelnen Subtypen der VEGF-Familie bekanntlich unterschiedliche Funktionen ausüben, ist ein gravierender Mangel der meisten bisherigen Studien die fehlende Differenzierung innerhalb der VEGF Familie. Im Allgemeinen gilt VEGF als Stimulus der Permeabilität und Migration in der Entstehung neuer Tumoren, die einzelnen Untergruppen spielen aber auch im Rahmen der Wundheilung oder bei entzündlichen Veränderungen eine generelle Rolle (Sauter et al., 1999; Senger et al., 1993). Es erscheint aussichtsreich, jeden Subtypen getrennt von den anderen bezüglich seiner Funktion in der Tumorgenese zu betrachten um explizit die jeweiligen Prozesse im Rahmen der Tumorprogression besser verstehen zu können. Ein weiteres Manko

zahlreicher bisher publizierter Ergebnisse ist, dass in der Regel der Zusammenhang zwischen der VEGF-Expression und dem Überleben der Tumorpatienten fehlt. Die eigenen Untersuchungen heben im Gegensatz dazu speziell den Einfluss von VEGF-C auf die Lymphknoten-Metastasierung und den entsprechenden Einfluss auf das Überleben der Patienten hervor.

Hierzu gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt nur wenige Untersuchungen, die sich mit dem Verhältnis zwischen VEGF-C, Lymphangiogenese und daraus folgend der Entstehung von Lymphknotenmetastasen beschäftigen. Eine der wenigen Studien dazu stammt aus Japan. Insgesamt 62 Mundhöhlenkarzinome wurden immunhistochemisch auf das Vorliegen einer VEGF-C Expression untersucht. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen wurden leider keine Abstufungen bezüglich der Expression vorgenommen sondern lediglich zwischen positiv und negativ unterschieden (Kishimoto et al., 2003). Die Autoren konnten neben einem deutlichen Einfluss des VEGF-C auf das Überleben auch eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von VEGF-C und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen für Tumoren im frühen Stadium also T1 und T2 Tumoren belegen. Interessanterweise konnte für die fortgeschritteneren Stadien T3 und T4 kein signifikanter Zusammenhang unter Beweis gestellt werden. VEGF-C kann somit möglicherweise vor allem in frühen Tumorstadien bzw. zu Beginn einer Therapie als Prognosemarker eingesetzt werden. Er gilt als unabhängiger Prognosemarker, der im Zusammenhang mit der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen, nicht aber mit der histologischen Differenzierung oder dem T-Stadium steht (Kishimoto et al., 2003). Vorteil der eigenen Analyse ist, mittels des REMMELE Scores graduelle Unterschiede zur jeweiligen VEGF-C-Expression treffen zu können. Nur dadurch gelingt es, den Einfluss dieses Proteins im Tumorsystem zu verstehen. Allerdings konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Expression des VEGF-C und dem Grading, der Tumorgöße und dem Stadium der Erkrankung hergestellt werden und es zeigten sich lediglich Tendenzen zum Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Möglicherweise lässt sich ein Zusammenhang zwischen der VEGF-C-Expression und einer ungünstigeren Prognose im Sinne von Lymphknotenmetastasen beim Mundhöhlenkarzinom anhand einer größeren Probandengruppe belegen. Ein negativer Einfluss auf das Überleben fand sich ebenfalls nicht.

Eckert empfahl 2009, VEGF-C gemeinsam mit anderen Hypoxie-assoziierten Proteinen als sog. Tumormarker für die Therapieauswahl mit einzubeziehen. Eine positive VEGF-C-Expression könnte möglicherweise auf okkulte Lymphknotenmetastasen hinweisen und die Indikation zur Neck dissection sollte großzügig gestellt werden. Prinzipielles Problem einer okkulten

Lymphknotenmetastasierung ist der nicht zuverlässige diagnostische Nachweis durch die gängigen bildgebenden Verfahren (CT, MRT etc.). Die Immunhistochemie könnte bei Nachweis einer entsprechenden Sensitivität in diesem Zusammenhang eine relativ unaufwendige, schnelle und kostengünstige Nachweismethode zur Therapiestratifizierung bieten. Sie kann im Rahmen der histopathologischen Aufarbeitung einer Probebiopsie durchgeführt werden (Eckert, 2009).

Gegensätzlich hierzu stehen die aktuell veröffentlichten Untersuchungen der Universität Hamburg, die anhand von 86 Mundhöhlenkarzinomen keinen Zusammenhang zwischen dem Nachweis des VEGF-C und der Tumorgöße oder der regionalen Ausbreitung feststellen konnte. Die Autoren sahen die Verwendung des Proteins als Marker zur Abschätzung der Prognose der Erkrankung als äußerst kritisch und nicht aussagekräftig an (Friedrich et al., 2010). Ebenso widerlegen Faustino et al diese Aussage. Es wurden 87 Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom im Stadium T1 oder T2 untersucht. 64 Fälle unterzogen sich einer selektiven Neck dissection. In 22% dieser Fälle konnten zwar okkulte Lymphknotenmetastasen aber keine statistische Signifikanz zwischen dem Auftreten der Metastasen und einer positiven oder negativen Expression des VEGF-C nachgewiesen werden (Faustino et al., 2008).

Eine Studie mit einer kleineren Population von 54 Fällen konnte eine signifikante Korrelation zwischen der VEGF-C Expression und der Lymphangiogenese beschreiben, ließ aber ebenfalls kaum Schlüsse auf das Überleben zu (O-charoenrat et al., 2001), da der Nachbeobachtungszeitraum lediglich 20 Monate umfasste.

Dass der signifikante Zusammenhang zwischen der VEGF-C-Proteinexpression und dem Überleben der Patienten eine Frage der Stichprobengröße sein könnte, belegt eine recht aktuelle Studie. In der retrospektiven Analyse von 160 Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom fand sich ein signifikant negativer Einfluss der Expression von VEGF-C auf das postoperative Überleben der Patienten (Sugiura et al., 2009). Ähnliche Resultate fanden ein Jahr später Chen und Mitarbeiter zu 67 Patienten. Sie wiesen ein signifikant höheres Vorkommen von Lymphknotenmetastasen bei VEGF-C positiven Karzinomen im Gegensatz zur negativen Expression nach. Kein Zusammenhang konnte zwischen dem Nachweis des Proteins und der Tumorlokalisation, der histopathologischen Differenzierung und dem Geschlecht der Patienten gesehen werden. Aussagen zu Überlebenschancen wurden leider nicht getroffen (Chen et al., 2010).

Insgesamt kommen die einschlägigen Arbeiten zur Expression von VEGF-C im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle zu teils kontroversen Ergebnissen. In welchem Maße sich dieses sicher hoch interessante Mitogen für prognostische Aussagen beim Mundhöhlenkarzinom eignet, kann möglicherweise nur durch breit angelegte Multicenterstudien geklärt werden. Für die spätere Anwendung in der Klinik wäre zudem von Interesse, in welchem Ausmaß die gefundenen immunhistochemischen Färbeintensitäten mit dem tatsächlichen Proteinniveau im Tumor korrelieren. Sollte sich ein derartiger Zusammenhang bestätigen, kann in der Tat VEGF-C für eine Individualisierung der Therapie parallel zur klinischen Routine immunhistochemisch bestimmt werden. In solchen Fällen wäre der Erkenntnisgewinn bei gleichzeitig geringen Kosten und geringem Zeitaufwand der Methodik groß.

6.4. Carboanhydrase IX

Ein weiteres in dieser Arbeit untersuchtes Enzym ist die Carboanhydrase IX. Sie wird ebenso wie der VEGF-C durch den hypoxieinduzierbaren Transkriptionskomplex 1α [HIF- 1α] reguliert (Harris, 2002).

Die zentrale Bedeutung der Tumorphypoxie mit allen Regulatorproteinen inklusive der pH-Regulation durch CAIX wird in einer aktuellen Arbeit von Semenza detailliert dargestellt (Semenza, 2011).

Tumorzellen können unter hypoxischen Bedingungen in den programmierten Zelltod, die Apoptose, übergehen. Der extrazelluläre pH-Wert sinkt, wenn es unter einer Hypoxie zum Wechsel des aeroben in den anaeroben Stoffwechsels kommt. Wird der pH-Wert durch zelluläre Regulationsprozesse konstant gehalten, kann die Tumorzelle überleben. Ein entscheidender Mediator dieser Stabilisierung des Säure-Basen-Gleichgewichtes, welchen sich nach neueren Erkenntnissen auch maligne Zellen zu Nutzen machen, ist die Carboanhydrase IX. Deshalb wird das Protein als entscheidender Faktor im Rahmen der Tumorprogression vermutet. Seine potentielle Aussagekraft für die Prognosekalkulation maligner Erkrankungen wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert. Über das Mundhöhlenkarzinom sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt hierzu vergleichsweise wenige Arbeiten veröffentlicht worden.

Die Carboanhydrase IX garantiert als Teil des komplexen Systems der pH-Regulation von Tumorzellen gemeinsam mit diversen Ionenaustauschern garantiert sie einen stabilen intrazellulären pH-Wert (pHi). Eine erhöhte Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers an der Zellmembran sowie eine vermehrte Expression der H^+ -ATPase senken den

extrazellulären pH-Wert und halten den intrazellulären pH (pHi) auf einem konstanten Level. Die Carboanhydrase IX katalysiert die reversible Reaktion von Wasser und Kohlendioxid zu Kohlensäure, die zu Bicarbonat und Wasserstoffionen zerfällt. Diese Bicarbonationen werden im Austausch gegen Chloridionen zurück in das Zellinnere befördert, während die Wasserstoffionen im Extrazellulärraum verbleiben und dort den pH-Wert senken. Das entstehende saure Milieu begünstigt das Tumorwachstum, indem es zur Zerstörung der extrazellulären Matrix beiträgt (Opavsky et al., 1996).

Eine dauerhafte Senkung des intrazellulären pH-Wertes durch Blockade der genannten beteiligten Transportmechanismen inhibiert das Wachstum und zerstört maligne Zellen (Beasley et al., 2001).

Im Gegensatz zu physiologischen Geweben zeigt die Tumorzelle einen erhöhten intrazellulären und einen erniedrigten extrazellulären pH-Wert. Dieses Milieu fördert die Progression des malignen Wachstums, Absiedelung von Metastasen und befähigt die Tumorzelle, sich der Apoptose zu entziehen. Daher spielt die Carboanhydrase eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes (Webb et al., 2011).

In der eigenen Studie ließ sich keine Abhängigkeit der Prognose der Tumorerkrankung von der Expression der Carboanhydrase IX in der univariaten COX-Regressionsanalyse nachweisen. Allerdings zeigte sich bei starker Expression der CAIX und gleichzeitig schwacher Expression von VEGF-C ein erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens (HR=2,6). Bei gleichzeitiger starker Expression von CAIX und Survivin ist das Risiko sogar 5,1fach erhöht, am Tumor zu versterben. Möglicherweise ist auch hier die Probandenzahl von 75 Patienten nicht ausreichend, um die Carboanhydrase wie auch VEGF-C bei alleiniger Expression als Prognosemarker signifikant zu bestätigen. Ähnliches gilt für die histopathologischen Parameter, für die sich kein signifikanter Zusammenhang darstellen lässt. Allerdings lässt sich, auch wenn die statistischen Signifikanzniveaus nicht erreicht werden, für die Carboanhydrase ähnlich wie für VEGF-C, eine Tendenz ableiten. Die negativen und schwachen Färbemuster dieses Proteins korrelieren vorwiegend mit geringeren Tumorgrößen, niedrigeren N-Stadien sowie G1 und G2 Tumoren.

Ähnliche Ergebnisse konnte auch eine 2008 an der Hallenser Universitätsklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie durchgeführte Studie präsentieren. Anhand von 34 Patienten mit einem fortgeschrittenen Mundhöhlenkarzinom wurde für die gleichzeitig vorliegende Expression der CAIX und dem Hypoxie-induzierbaren Transkriptionskomplex (HIF-1 α) eine um zwei Jahre erniedrigte Überlebensrate nachgewiesen (Kappler et al., 2008). Möglicherweise ist CAIX ein recht spät in den Tumorprogress eingreifendes Regulatorprotein. Es ist denkbar, dass es als eindeutig

HIF-1 α -abhängiges Protein erst in der gemeinsamen Betrachtung mit weiteren prognoserelevanten Proteinen zur Risikokalkulation herangezogen werden kann. Unter Berücksichtigung des Expressionsstatus von HIF-1 α konnte jedenfalls gezeigt werden, dass eine signifikant bessere Überlebensrate im Falle einer niedrigen Expression von HIF-1 α und CAIX im Tumorgewebe vorlag (Eckert et al., 2010). Ähnliche Ergebnisse fanden sich in einer Studie mit einer Stichprobe von 320 Patienten. Es konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Prognose und alleiniger positiver oder negativer Expression dieses Proteins gefunden werden (Eriksen and Overgaard, 2007).

Ein anderes Bild zeigt sich bei Betrachtung anderer Tumorlokalisationen.

Für das Mammakarzinom wurde an 114 Patienten im Falle einer positiven Proteinexpression von Carboanhydrase IX eine Überlebensrate von 83% nach fünf Jahren gegenüber 96% bei niedriger Expression gefunden. Die Autoren folgerten, dass die Carboanhydrase IX zu prognostischen Zwecken beim Vorliegen eines Mammakarzinoms herangezogen werden könnte (Hussain et al., 2007). Unabhängig vom Lymphknotenstatus und der Tumorgroße zeigt sich eine erhöhte Malignität des Mammakarzinoms bei Vorliegen einer vermehrten Carboanhydraseexpression. Es gilt als unstrittig, dass die Proteinexpression einen negativen Einfluss auf die Überlebensrate dieser Tumorentität hat (Trastour et al., 2007).

Für Tumoren im Bereich des Magens und des Oesophagus konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Überleben der Patienten und dem Nachweis der Carboanhydrase IX bestätigt werden (Driessen et al., 2006). Bei negativem Proteinnachweis überlebten 47% der Patienten, bei positiver Expression waren es nur noch 27%. Des Weiteren untersuchten sie den Zusammenhang zwischen der Expression der Carboanhydrase IX und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen anhand des Oesophagus- und Magenkarzinoms. Bei den positiv getesteten Tumoren konnten bei 56% der Patienten Metastasen nachgewiesen werden, bei den negativen Fällen waren es nur 39%. Die Autoren folgerten hieraus, dass es sich bei der Carboanhydrase IX nicht um ein enzymatisch wirkendes Protein allein, sondern auch um einen Mediator von Adhäsionsprozessen im Rahmen der Zellproliferation handelt.

Keinen Zusammenhang zwischen dem erhöhten Nachweis der Carboanhydrase IX, der histopathologischen Differenzierung und dem klinischen Tumorstadium konnten Niemela et al. trotz der großen Stichprobe von 1134 Gewebeschnitten für das kolorektale Karzinom nachweisen (Niemela et al., 2007). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Kim und Mitarbeitern zum Bronchialkarzinom. Es konnte eine eindeutige Korrelation zwischen der Expression der Carboanhydrase IX und der Prognose der Patienten gezeigt werden (Kim et al., 2005).

Takacova et al. wiesen in einer tierexperimentellen Studie nach, dass die Carboanhydrase IX innerhalb der Tumorentstehung einen deutlichen Einfluss auf das Aggressionspotential hat. Bei Vorliegen einer hypoxischen Stresssituation kommt es zur Aktivierung des Enzyms (Takacova et al., 2007).

In Zusammenschau der eigenen erhobenen Ergebnisse und unter Berücksichtigung der Literatur der letzten Jahre kann gefolgert werden, dass die Carboanhydrase IX durchaus als prognostischer Marker für verschiedene Tumorentitäten wie das Mamma-, - das Bronchial-, - das Oesophagus- oder Magenkarzinom herangezogen werden kann. Für das Mundhöhlenkarzinom konnte jedoch bisher in der alleinigen Betrachtung der CAIX noch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Prognose der Erkrankung und der Expression des Enzyms nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie zeigte sich jedoch das deutlich erhöhte Risiko (HR=2,6) am Tumor zu versterben, im Falle einer starken Expression der Carboanhydrase IX bei schwacher Expression des VEGF-C und bei starker Expression sowohl von CAIX als auch Survivin (HR=5,1). Die statistische Signifikanz wurde für die Korrelation mit dem Survivin erreicht.

Wie für VEGF-C gelingt auch im Falle der CA IX möglicherweise ein klarer Zusammenhang mit anderen Prognosefaktoren nur bei größeren Probandenzahlen. Für beide Proteine ist außerdem festzustellen, dass die immunhistochemischen Untersuchungen in der Mehrzahl der Fälle negative Färbemuster erbrachten. Ursächlich hierfür könnte entweder die Methodik selbst oder auch die Qualität der benutzten Marker sein.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Das Mundhöhlenkarzinom gehört zu den zehn häufigsten Malignomen des Menschen. Als Risikofaktoren für die Genese dieser Tumorentität sind hauptsächlich Nikotin- und Alkoholkonsum sowie eine mangelhafte Mundhygiene zu nennen. Vorwiegend ältere männliche Patienten sind betroffen, in den letzten Jahren musste jedoch auch eine erhöhte Anzahl an Neuerkrankungen bei jüngeren weiblichen Patientinnen ohne Risikofaktoren beobachtet werden. Kernprobleme des Mundhöhlenkarzinoms sind trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie die stagnierende Überlebensrate und die noch nicht gelungene Verbesserung der Früherkennungsrate.

Neben den bekannten histopathologischen Parametern in Form des TNM-Systems und des Gradings werden seit einigen Jahren von zahlreichen Autoren weitere Kriterien gefordert, um Therapie und Prognose der Erkrankung individualisierter kalkulieren zu können. Dazu scheinen vor allem Tumormarker geeignet.

In einer umfassenden multifaktoriellen Analyse wurden anhand von 75 Gewebeproben von Patienten mit diagnostiziertem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle immunhistochemische Färbungen für den Apoptoseinhibitor Survivin, den Proliferationsmarker VEGF-C und das hypoxierelevante Enzym Carboanhydrase IX durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden mit einer bestehenden Datenbank, in der die klinischen und histopathologischen Daten der 75 Patienten lückenlos dokumentiert waren, korreliert.

Den deutlichsten Einfluss auf das Überleben hat das Survivin, erkennbar auch am eindeutigen Zusammenhang mit dem Grading. Die Untersuchungen zum VEGF-C erbrachten zwar keine statistischen Signifikanzen, jedoch war eine Tendenz zwischen erhöhter Expression des Proteins und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen zu erkennen.

Die aktuellen Untersuchungen konnten der CAIX leider nicht die zuvor erwartete Prognoserelevanz bescheinigen. Es bleibt abzuwarten, ob dieses Enzym in breiter angelegten Studien mit deutlich größeren Fallzahlen für prognostische Vorhersagen genutzt werden kann. Interessant wären auch Korrelationen mit anderen hypoxierelevanten Proteinen wie z.B. Glukosetransportmolekülen. Möglicherweise könnte die CAIX im Rahmen eines sog. „Markerpanels“ auch wichtige zusätzliche Aussagen für die extrazelluläre Matrixdegeneration als essentiellen Schritt in der Tumorprogression liefern.

Die hier untersuchten Proteine stellen allerdings nur einen Teil des Bemühens der Prognosekalkulation und -verbesserung dar. Die exzellent dokumentierte Datenbank

fordert zu weiteren Analysen heraus. Denkbare Ansätze der individualisierten Prognoseabschätzung wären z.B. Genanalysen zur Nachweis einer erblichen Disposition wie sie bereits z.B. für das Mamma- oder Kolonkarzinom bekannt sind. Zunächst kann als Ergebnis formuliert werden, dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt Survivin als Prognosemarker zur Kalkulation einer individualisierten Therapie das TNM-System und Grading ergänzen sollte. Die Bestimmung kann an Paraffinschnitten von Probebiopsien immunhistochemisch mit überschaubarem Zeit,- Material- und Personalaufwand realisiert werden.

8. Literaturverzeichnis

- Abu-Jawdeh GM, Faix JD, Niloff J, Tognazzi K, Manseau E, Dvorak HF, Brown LF (1996) Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. *Lab Invest* 74:1105-1115
- Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, Harris AL, Davidson SE, Hunter RD, West CM, Stratford IJ (2003) GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding. *Int J Cancer* 104:85-91
- Alitalo K, Carmeliet P (2002) Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 1:219-227
- Altieri DC (2003) Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 3:46-54
- Altieri DC, Marchisio PC (1999) Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* 79:1327-1333
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3:917-921
- Bancher-Todesca D, Obermair A, Bilgi S, Kohlberger P, Kainz C, Breitenecker G, Leodolter S, Gitsch G (1997) Angiogenesis in vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 64:496-500
- Beasley NJ, Wykoff CC, Watson PH, Leek R, Turley H, Gatter K, Pastorek J, Cox GJ, Ratcliffe P, Harris AL (2001) Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis, and microvessel density. *Cancer Res* 61:5262-5267
- Benke EM, Ji Y, Patel V, Wang H, Miyazaki H, Yeudall WA (2010) VEGF-C contributes to head and neck squamous cell carcinoma growth and motility. *Oral Oncol* 46:19-24
- Bilkay U, Kerem H, Ozek C, Gundogan H, Guner U, Gurler T, Akin Y (2003) Management of lower lip cancer: a retrospective analysis of 118 patients and review of the literature. *Ann Plast Surg* 50:43-50
- Bisoffi M, Heaphy CM, Griffith JK (2006) Telomeres: prognostic markers for solid tumors. *Int J Cancer* 119:2255-2260
- Boenisch T: Handbuch immunhistochemische Färbungen. 3. Aufl. DakoCytomation, Carpinteria Hamburg, 2003, S. 34-39

- Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, Genden E, Urken ML, Wang BY (2005) Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol* 29:167-178
- Brocklehurst P, Kujan O, Glenny AM, Oliver R, Sloan P, Ogden G, Shepherd S (2010) Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev*:CD004150
- Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ (1995) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 26:86-91
- Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ (2003) Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol* 67:3-15
- Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM, Altura RA (2005) Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* 24:1994-2007
- Chen SX, Li XY, Kong XL, Feng Y (2010) [The expression of vascular endothelial growth factor-C in oral squamous cell carcinoma and its associations with angiogenesis, lymphangiogenesis and lymph node metastasis]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 28:319-323
- Chen YK, Huang HC, Lin LM, Lin CC (1999) Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan. *Oral Oncol* 35:173-179
- Cheng GZ, Zhang W, Wang LH (2008) Regulation of cancer cell survival, migration, and invasion by Twist: AKT2 comes to interplay. *Cancer Res* 68:957-960
- Cicco de R, Watson J, Bassi D, Litwin S, Klein-Szanto A (2004) Simultaneous Expression of Furin and Vascular Endothelial Growth Factor in Human Oral tongue Squamous Cell Carcinoma Progression. *Clin Cancer Res* 10:4480-4488
- De Maria S, Pannone G, Bufo P, Santoro A, Serpico R, Metafora S, Rubini C, Pasquali D, Papagerakis SM, Staibano S, De Rosa G, Farina E, Emanuelli M, Santarelli A, Mariggio MA, Lo Russo L, Lo Muzio L (2009) Survivin gene-expression and splicing isoforms in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 135:107-116
- De Vicente JC, Recio OR, Pendas SL, Lopez-Arranz JS (2001) Oral squamous cell carcinoma of the mandibular region: A survival study. *Head Neck* 23:536-543

- Divaris K, Olshan AF, Smith J, Bell ME, Weissler MC, Funkhouser WK, Bradshaw PT (2010) Oral health and risk for head and neck squamous cell carcinoma: the Carolina Head and Neck Cancer Study. *Cancer Causes Control* 21:567-575
- Driessen A, Landuyt W, Pastorekova S, Moons J, Goethals L, Haustermans K, Naftoux P, Penninckx F, Geboes K, Lerut T, Ectors N (2006) Expression of carbonic anhydrase IX (CA IX), a hypoxia-related protein, rather than vascular-endothelial growth factor (VEGF), a pro-angiogenic factor, correlates with an extremely poor prognosis in esophageal and gastric adenocarcinomas. *Ann Surg* 243:334-340
- Eckardt A (2001) Neue Studien zum Mundhöhlenkarzinom - Therapiekonzepte oder Prognosefaktoren? *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 Suppl 5:323-325
- Eckert AW (2009) Einfluss der Tumorhypoxie auf die Prognose beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Habilitationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Med. Fakultät
- Eckert AW, Lautner MH, Dempf R, Schubert J, Bilkenroth U (2009) [Prognostic factors for oral squamous cell carcinoma]. *Chirurg* 80:138-143
- Eckert AW, Lautner MH, Schutze A, Bolte K, Bache M, Kappler M, Schubert J, Taubert H, Bilkenroth U (2010) Co-expression of Hif1alpha and CAIX is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *J Oral Pathol Med* 39:313-317
- Eckert AW, Lautner MH, Taubert H, Schubert J, Bilkenroth U (2008) Expression of Glut-1 is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma patients. *Oncol Rep* 20:1381-1385
- Eriksen JG, Overgaard J (2007) Lack of prognostic and predictive value of CA IX in radiotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck with known modifiable hypoxia: an evaluation of the DAHANCA 5 study. *Radiother Oncol* 83:383-388
- Faustino SE, Oliveira DT, Nonogaki S, Landman G, Carvalho AL, Kowalski LP (2008) Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37:372-378
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-676
- Folkman J (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29:15-18
- Freier K, Engel M, Lindel K, Flechtenmacher C, Muhling J, Hassfeld S, Hofele C (2008) Neoadjuvant concurrent radiochemotherapy followed by surgery in advanced

- oral squamous cell carcinoma (OSCC): a retrospective analysis of 207 patients. *Oral Oncol* 44:116-123
- Friedrich RE, Klapdor R, Hagel C, Bartel-Friedrich S (2010) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in sera of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res* 30:1765-1766
- Goerkem M, Braun J, Stoeckli SJ (2010) Evaluation of clinical and histomorphological parameters as potential predictors of occult metastases in sentinel lymph nodes of early squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Ann Surg Oncol* 17:527-535
- Harris AL (2002) Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47
- Hausamen JE (2000) [Tumor surgery]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1:142-154
- Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA (2004) Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56:549-580
- Hoogsteen IJ, Marres HA, Wijffels KI, Rijken PF, Peters JP, van den Hoogen FJ, Oosterwijk E, van der Kogel AJ, Kaanders JH (2005) Colocalization of carbonic anhydrase 9 expression and cell proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11:97-106
- Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B: *Biochemie des Menschen*. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2003, S. 257
- Hotfilder M, Nowak-Gottl U, Wolff JE (1997) Tumorangiogenesis: a network of cytokines. *Klin Padiatr* 209:265-270
- Hussain SA, Ganesan R, Reynolds G, Gross L, Stevens A, Pastorek J, Murray PG, Perunovic B, Anwar MS, Billingham L, James ND, Spooner D, Poole CJ, Rea DW, Palmer DH (2007) Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. *Br J Cancer* 96:104-109
- Isa AY, Ward TH, West CM, Slevin NJ, Homer JJ (2006) Hypoxia in head and neck cancer. *Br J Radiol* 79:791-798
- Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A (2000) Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 31:1080-1085
- Jane C, Nerurkar AV, Shirsat NV, Deshpande RB, Amrapurkar AD, Karjodkar FR (2006) Increased survivin expression in high-grade oral squamous cell carcinoma: a study in Indian tobacco chewers. *J Oral Pathol Med* 35:595-601

- Janssen HL, Haustermans KM, Balm AJ, Begg AC (2005) Hypoxia in head and neck cancer: how much, how important? *Head Neck* 27:622-638
- Kappler M, Taubert H, Holzhausen HJ, Reddemann R, Rot S, Becker A, Kuhnt T, Dellas K, Dunst J, Vordermark D, Hansgen G, Bache M (2008) Immunohistochemical detection of HIF-1alpha and CAIX in advanced head-and-neck cancer. Prognostic role and correlation with tumor markers and tumor oxygenation parameters. *Strahlenther Onkol* 184:393-399
- Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N (1998) Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 58:5071-5074
- Keski-Santti H, Atula T, Tikka J, Hollmen J, Makitie AA, Leivo I (2007) Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol* 43:1007-1013
- Kim MJ, Lim KY, Kim JW, Nam IW, Lee JH, Myoung H (2005) Stage and mRNA expression of survivin in lymph node as prognostic indicators in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 224:253-261
- Kim SJ, Rabbani ZN, Dewhirst MW, Vujaskovic Z, Vollmer RT, Schreiber EG, Oosterwijk E, Kelley MJ (2005) Expression of HIF-1alpha, CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 49:325-335
- Kim YH, Kim SM, Kim YK, Hong SP, Kim MJ, Myoung H (2010) Evaluation of survivin as a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 39:368-375
- Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G, Matsumura T (2003) Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 39:391-396
- Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, Matsutani N, Yasui W, Chayama K (2001) Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 93:662-666
- Klinke R, Silbernagel S: *Lehrbuch der Physiologie*. 4. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2003, S. 250
- Kuhnt T (2007) Optimierung der Strahlentherapie von Tumoren im Kopf-Hals Bereich: Biologische und technische Entwicklungen. Habilitationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Med. Fakultät
- La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E (1997) Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 33:302-312

- Lautner M (2008) Rolle des Tumorphoxiemarkers Glut-1 in Ergänzung zu klinischen Parametern für prognostische Aussagen beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Med. Fakultät
- Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396:580-584
- Lin CY, Hung HC, Kuo RC, Chiang CP, Kuo MY (2005) Survivin expression predicts poorer prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol* 41:645-654
- Lindskog S (1997) Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther* 74:1-20
- Liu P, Chen W, Zhu H, Liu B, Song S, Shen W, Wang F, Tucker S, Zhong B, Wang D (2009) Expression of VEGF-C correlates with a poor prognosis based on analysis of prognostic factors in 73 patients with esophageal squamous cell carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 39:644-650
- Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Pezzetti F, Stabellini G, Laino G, Santarelli A, Pannone G, Bufo P, de Lillo A, Carinci F (2005) Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett* 225:27-33
- Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, Staibano S, Mignogna MD, De Rosa G, Kudo Y, Takata T, Altieri DC (2003a) Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *J Dent Res* 82:923-928
- Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Rubini C, Mariggio MA, Procaccini M, Ferrari F, De Rosa G, Altieri DC (2003b) Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 89:2244-2248
- Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, Chieffi P, Tramontano D, De Rosa G, Altieri DC (2001) Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 70:249-254
- Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RC (2003) Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg* 61:751-758
- Löffler G, Petrides PE: *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, 1998, S. 206-224
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich P: *Biochemie und Pathobiochemie*. 4. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006, S. 677-689

- Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, Castro G, Jr., Awada A (2006) Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck* 28:256-269
- Loven D, Be'ery E, Yerushalmi R, Koren C, Sulkes A, Lavi I, Shaked Y, Fenig E (2008) Daily low-dose/continuous capecitabine combined with neo-adjuvant irradiation reduces VEGF and PDGF-BB levels in rectal carcinoma patients. *Acta Oncol* 47:104-109
- Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N (1998) Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 58:1808-1812
- Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC (2003) HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 22:2729-2740
- McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, Stifelman MD, Katz AE, Chen MW, Olsson CA, Sawczuk IS (1997) Expression of the tumor-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 57:2362-2365
- Metelmann HR (2000) [Chemotherapy and radiochemotherapy in tumors of the head-neck area]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 Suppl 1:155-159
- Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A, Abad A (1999) A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 17:2100-2104
- Mottram J (1936) A factor of importance in the radio sensitivity of tumours. *Br J Radiol* 9:606-664
- Müller S (2004) Heilungsergebnisse und Überlebensraten von Patienten mit Karzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx - Retrospektive Studie 1981-2001. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Med. Fakultät
- Munoz-Guerra MF, Marazuela EG, Martin-Villar E, Quintanilla M, Gamallo C (2004) Prognostic significance of intratumoral lymphangiogenesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 100:553-560
- Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A, Fischer MB, Steiner GE, Hollemann D, Gedlicka C, Saaristo A, Burian M (2003) Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck* 25:464-474
- Niemela AM, Hynninen P, Mecklin JP, Kuopio T, Kokko A, Aaltonen L, Parkkila AK, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Orntoft TF, Kruhoffer M,

- Haapasalo H, Parkkila S, Kivela AJ (2007) Carbonic anhydrase IX is highly expressed in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:1760-1766
- Nogradi A (1998) The role of carbonic anhydrases in tumors. *Am J Pathol* 153:1-4
- O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA (2001) Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 92:556-568
- Odenwald C (2007) Computergestützte individuelle Prognosestellung (CIP). Vergleich der vom CIP geschätzten 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit mit der tatsächlichen Überlebensdauer bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Med. Fakultät
- Opavsky R, Pastorekova S, Zelnik V, Gibadulinova A, Stanbridge EJ, Zavada J, Kettmann R, Pastorek J (1996) Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* 33:480-487
- Picaud SS, Muniz JR, Kramm A, Pilka ES, Kochan G, Oppermann U, Yue WW (2009) Crystal structure of human carbonic anhydrase-related protein VIII reveals the basis for catalytic silencing. *Proteins* 76:507-511
- Platz H, Fries R, Hudec M (1992) Computer-aided individual prognoses of squamous cell carcinomas of the lips, oral cavity and oropharynx. *Int J Oral Maxillofac Surg* 21:150-155
- Platz H, Fries R, Hudec M (1982) Therapieabhängiger Prognoseindex für Karzinome der Lippen, der Mundhöhle und des Oropharynx. Eigenvervielfältigung, Linz/Wien
- Quade R (1984) Multifaktorielle Malignitätsanalyse-moderne Erkenntnisse in der praktischen Diagnostik von Kopf-Hals-Tumoren. *Laryngo-Rhino-Otol* 63:448-452
- Razak AA, Saddki N, Naing NN, Abdullah N (2010) Oral cancer survival among Malay patients in Hospital Universiti Sains Malaysia, Kelantan. *Asian Pac J Cancer Prev* 11:187-191
- Remmele W, Stegner HE (1987) [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 8:138-140
- Robert-Koch-Institut (2012a)
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html. Downloaded 10.03.2012

- Robert-Koch-Institut (2012b)
http://www.rki.de/cln_226/nn_204124/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Datenbankabfragen/datenbankabfragen_node.html?_nnn=true. Downloaded 10.03.2012
- Rosenthal Laboratory (2012)
http://www.rosenthallab.com/gallery/images/VEGF_VEGFR.jpeg
 Downloaded 10.03.2012
- Sargeran K, Murtomaa H, Safavi SM, Vehkalahti MM, Teronen O (2008) Survival after diagnosis of cancer of the oral cavity. *Br J Oral Maxillofac Surg* 46:187-191
- Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Klein-Szanto A, Litwin S, Herlyn M (1999) Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 5:775-782
- Schimann J (2004) Therapiekonzepte und Prognose des Mundschleimhautkarzinoms im Wandel der Zeit - eine retrospektive Untersuchung am Patientengut der Klinik für Mund,- Kiefer- und Gesichtschirurgie, Plastische Operationen der Helios Kliniken in Schwerin. Dissertation, Universität Hamburg, Med. Fakultät
- Schliephake H (2003) Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32:233-245
- Schwenzer N, Ehrenfeld M: Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. 4. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2010, S. 57-100
- Scully C, Bagan J (2009) Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol* 45:301-308
- Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, Battistutti W, Honigschnabl S (2003) Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med* 32:455-460
- Semenza GL (2011) Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 365:537-547
- Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF (1993) Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12:303-324
- Shrime MG, Ma C, Gullane PJ, Gilbert RW, Irish JC, Brown DH, Goldstein DP (2009) Impact of nodal ratio on survival in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 31:1129-1136
- Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB (2010) Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg* 68:1270-1275

- Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M (2001) Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* 159:893-903
- Sugiura T, Inoue Y, Matsuki R, Ishii K, Takahashi M, Abe M, Shirasuna K (2009) VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. *Int J Oncol* 34:673-680
- Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC (1999) Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 341:452-453
- Takacova M, Barathova M, Hulikova A, Ohradanova A, Kopacek J, Parkkila S, Pastorek J, Pastorekova S, Zatovicova M (2007) Hypoxia-inducible expression of the mouse carbonic anhydrase IX demonstrated by new monoclonal antibodies. *Int J Oncol* 31:1103-1110
- Takeo S, Yamashita S, Takahashi Y, Ono K, Kamei M, Moroga T, Kawahara K (2010) Survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma: its prognostic impact and splice variant expression. *Eur J Cardiothorac Surg* 37:440-445
- Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N (2000) Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 6:127-134
- Taubert H, Heidenreich C, Holzhausen HJ, Schulz A, Bache M, Kappler M, Eckert AW, Wurl P, Melcher I, Hauptmann K, Hauptmann S, Schaser KD (2010) Expression of survivin detected by immunohistochemistry in the cytoplasm and in the nucleus is associated with prognosis of leiomyosarcoma and synovial sarcoma patients. *BMC Cancer* 10:65
- Thomlinson RH, Gray LH (1955) The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 9:539-549
- Tischendorf L (1990) Kliniksbezogene retrospektive Studie zum Wandel von Prognose und prognostisch relevanten Faktoren operativ behandelter Mund,- Kiefer- und Gesichtstumoren zwischen 1948 und 1982. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Med. Fakultät
- Tischendorf L, Schubert J, Grimm G (1985) Erwiderung zur Stellungnahme der Autoren des TPI. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 9:398-400
- Tischendorf L, Schubert J, Grimm G (1985) Überprüfung des therapieabhängigen Prognoseindex (TPI) des DÖSAK am Krankengut der Hallenser Kieferchirurgischen Klinik. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 9:65-69

- Trastour C, Benizri E, Ettore F, Ramaioli A, Chamorey E, Pouyssegur J, Berra E (2007) HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer* 120:1451-1458
- Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK (1993) Head and neck cancer. *N Engl J Med* 328:184-194
- Warnakulasuriya S (2009) Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 45:309-316
- Warnakulasuriya S (2010) Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol* 46:407-410
- Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL (2011) Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer* 11:671-677
- Westra WH (2009) The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. *Head Neck Pathol* 3:78-81
- Wittekind C, Meyer HJ: TNM Klassifikation maligner Tumoren. 7. Aufl. Wiley VCH, Weinheim, 2010, S. 25-28
- Xing N, Qian J, Bostwick D, Bergstralh E, Young CY (2001) Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. *Prostate* 48:7-15
- Yang W, Lin Z, Li L, Zhang G (2002) [Expression of VEGF, EGFR, p16 in lip cancers and oral squamous cell carcinomas and their clinic significance]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 37:99-101
- Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG (2005) Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med* 9:360-372
- Zini A, Czerninski R, Sgan-Cohen HD (2010) Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *J Oral Pathol Med* 39:299-305

9. Thesen

1. Der Altersdurchschnitt des untersuchten Patientenkollektivs mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei 59,1 Jahren. Die Männer erkranken im Durchschnitt mit 56,8, die Frauen mit 65,6 Jahren. Die Daten entsprechen annähernd den Daten eines typischen Mundhöhlenkarzinompatienten in Deutschland in den 90er Jahren.
2. Die 5-Jahresüberlebensrate im analysierten Patientenkollektiv beträgt 61,0%. Sie liegt damit im oberen Drittel der in der Literatur der vergangenen Jahre beschriebenen Überlebensraten.
3. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist signifikant abhängig vom Stadium der Tumorerkrankung, von der Anzahl der Lymphknotenmetastasen und der Größe des Primärtumors. Kein Zusammenhang besteht zwischen dem Überleben und dem Grading.
4. Die Expression der drei Proteine Survivin, VEGF-C und CAIX ist unabhängig von Größe des Primärtumors, Stadium der Tumorerkrankung und Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Lediglich Tendenzen sind zu erkennen.
5. Für das Survivin besteht ein signifikanter Zusammenhang zum Grading. Eine positive Expression des Proteins korreliert mit einer schlechteren Differenzierung. Für VEGF-C und CAIX kann kein Zusammenhang zum Grading nachgewiesen werden.
6. Kombinierte Analysen der Faktoren erhöhen den Aussagewert. Für das Survivin lässt sich bei starker Expression in Kombination mit ebenfalls starker Expression der CAIX und schwacher Expression von VEGF-C ein signifikant 5,1fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens nachweisen.
7. Die singuläre Betrachtung des Survivins zeigt eine schlechtere Überlebensrate bei starker im Vergleich zu schwacher Expression ohne Signifikanz.
8. Für VEGF-C lässt sich bei starker Expression in Kombination mit ebenfalls starker Expression von Survivin und schwacher Expression von CAIX ein 4,8fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens nachweisen. Die statistische Signifikanz wird verfehlt.

9. Zwischen der singulären Expression der Proteine VEGF-C und CAIX und dem Risiko des tumorassoziierten Versterbens zeigt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang in der univariaten COX-Regressionsanalyse. Für die CAIX können Tendenzen eines erhöhten Risikos des tumorassoziierten Versterbens bei starker Expression des Proteins im Tumorgewebe nachgewiesen werden.

10. Zur Ergänzung des TNM-Systems und der histologischen Differenzierung sollte nach gegenwärtigem Wissensstand zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wenigstens der Expressionsstatus von Survivin bestimmt werden. Ob die beiden anderen Proteine CAIX und VEGF-C Aussagekraft für den Verlauf von Mundhöhlenkarzinomen erlangen, kann nur in weiterführenden, umfangreicheren, möglichst multizentrischen Studien belegt werden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katharina Bolte
Geburtsdatum/ort: 19.11.1981/Meppen
Familienstatus: ledig
Nationalität: Deutsch
Konfession: evangelisch

Familie

Vater: Hans-Joachim Bolte
Rechtsanwalt/Notar
Mutter: Barbara Schulte to Brinke-Bolte
Erzieherin

Schulbildung

1988-1992 Johannes-Gutenberg-Grundschule Meppen
1992-1994 Johannesschule Meppen (Orientierungsstufe)
1994-2001 Windthorst-Gymnasium Meppen
2001 Allgemeine Hochschulreife

Sonstige Ausbildung

November 2001- März 2002 Vorsemester Medizin am Rheinischen Bildungsinstitut Köln
April -Juli 2002 Ausbildung und Staatliche Prüfung zur Rettungssanitäterin

Universitäre Ausbildung

2003-2009 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg
Juni 2009 Approbation als Ärztin
Seit August 2009 Assistenzärztin an der Universitätsklinik für Orthopädie und physikalische Medizin, Halle/Saale (Direktor Prof. Dr. K.-St. Delank)

Famulaturen

| | |
|----------------|--|
| September 2005 | Endoklinik Hamburg, Gelenkchirurgie/Orthopädie |
| März 2006 | Krankenhaus Ludmillenstift Meppen, Unfallchirurgische Notfallambulanz |
| August 2006 | Hanseklinikum am Sund Stralsund, Innere Medizin/Kardiologie |
| August 2007 | Universitätsklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie, Halle/Saale |
| September 2007 | Krankenhaus Ludmillenstift Meppen, Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie |

Praktisches Jahr

| | |
|--------------------------------|--|
| Februar-Juni 2008 | Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannstrost, Halle/Saale Medizinische Klinik (Akademisches Lehrkrankenhaus der MLU Halle-Wittenberg) |
| Juni- September 2008 | Kantonsspital Baden, Schweiz Abteilung für Perioperative Medizin (Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Zürich) |
| September 2008- Januar 2009 | Universitätsklinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der MLU Halle-Wittenberg |

Promotion

| | |
|-----------|--|
| Seit 2006 | Universitätsklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie, Halle/Saale (Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Schubert) Thema: Einfluss von Survivin, CA IX und VEGF-C auf die Prognose des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle |
|-----------|--|

Katharina Bolte

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen entsprechend mittels Quellen gekennzeichnet habe. Weder diese noch eine andere Dissertation wurde von mir an einer anderen Fakultät zum Zwecke der Promotion eingereicht.

Dies ist mein erstes Promotionsverfahren und ich habe in der Vergangenheit keine weiteren Promotionsversuche unternommen.

Halle, den

Katharina Bolte

Publikation

Teilergebnisse der vorliegenden Studie sind wie folgt veröffentlicht worden:

Eckert AW, Lautner MH, Schütze A, *Bolte K*, Bache M, Kappler M, Schubert J, Taubert H, Bilkenroth U.

Co-expression of HIF1alpha and CAIX is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients.

J Oral Pathol Med. 2010 Apr;39(4):313-7. Epub 2009 Sep 17.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Johannes Schubert, Direktor der Universitäts- und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchführen zu können.

Ein besonders herzlicher Dank gebührt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Dr. Alexander W. Eckert, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und immer an die Fertigstellung dieser Arbeit geglaubt hat. Ich bedanke mich für die großartige Unterstützung, die rasche Bearbeitung der Korrekturen und die anregenden und unterhaltsamen Diskussionen in persönlicher und schriftlicher Form.

Herrn Dr. Matthias Kappler danke ich sehr für die Hilfestellung in statistischen und allen weiteren aufkommenden Fragen und Problemen, ein immer offenes Ohr und den niemals reißenden Geduldsfaden.

Den MTAs Frau Kathrin Hammje und Frau Kathrin Spröte danke ich für die Anleitung und Hilfestellung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Herrn Dr. Udo Bilkenroth danke ich für die mikroskopische Zweitbefundung der histopathologischen Präparate.

Außerdem danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. David Wohlrab, leitendem Oberarzt der Universitäts- und Poliklinik für Orthopädie und physikalische Medizin. Ohne seine nicht enden wollenden Sticheleien wäre diese Arbeit (auch wenn einige runde Geburtstage vergehen mussten) jetzt nicht dort wo sie ist.

Besonders am Herzen liegt mir, mich bei meinen lieben Eltern zu bedanken, die mir das Studium ermöglicht und meinen Weg voller Spannung und Stolz verfolgt haben. Gleiches gilt für meine Oma Gisela, die sich über die Fertigstellung dieser Arbeit ganz besonders freut.

Meinem lieben Freund Dr. Patrick Kellner danke ich für zahlreiche gemeinsame Abende vor dem Computer, aufmunternde Worte, viel Verständnis für wenig Zeit und den manchmal recht plötzlichen Wechsel zwischen Jubel und Wutausbrüchen.

Meiner Nachbarin Dr. Beatrice Herzog danke ich für die ein oder andere statistisch geprägte Sitzung auf dem Balkon.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden für eine wunderschöne Studienzeit und (fast) 10 gemeinsame Jahre in Halle bedanken!