

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

**Untersuchung zur Expression zellulärer Marker beim
metastasierenden Kopf-Hals-Karzinom im Primärtumor und
in den Metastasen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Jana-Teresa Stratmann
aus Unterhaching

Würzburg, September 2012

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent Urs Müller-Richter

Koreferent: Prof. Dr. med. dent Alfred Renk

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2013

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Ätiologie	3
1.1.3. Klassifikation	4
1.1.4. Symptome	8
1.1.5. Diagnostik	9
1.1.6. Therapie	11
1.1.7. Prognose	16
1.2. Tumorantigene	17
1.3. Aufgabenstellung	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Patientenkollektiv	22
2.2. Antikörper	23
2.2.1. MAGE-A Antikörper 57B	23
2.2.2. VEGF	25
2.2.3. EGFR	34
2.2.4. C-Src	38
2.3. Immunhistochemische Färbung	44
2.4. Auszählung der gefärbten Zellen	46
2.5. Statistische Analyse	47
3. Ergebnisse	50
3.1. MAGE-A Antikörper 57B	50
3.1.1. Expressionsmuster	50
3.1.2. Korrelation der Scores der Primärtumore mit den Scores der Lymphknotenmetastasen	51
3.1.3. Korrelation der Scores mit der pT-Klassifikation	51
3.1.4. Korrelation der Scores mit der pN-Klassifikation	52
3.1.5. Korrelation der Scores mit dem histologischen Grading	53

3.1.6. Korrelation der Scores mit der Tumorverhornung	54
3.1.7. Korrelation der Scores mit dem Alter des Patienten	54
3.1.8. Korrelation der Scores mit dem Geschlecht des Patienten	55
3.2. VEGF A-20	59
3.2.1. Expressionsmuster	59
3.2.2. Korrelation der Scores der Primärtumore mit den Scores der Lymphknotenmetastasen	60
3.2.3. Korrelation der Scores mit der pT-Klassifikation	60
3.2.4. Korrelation der Scores mit der pN-Klassifikation	61
3.2.5. Korrelation der Scores mit dem histologischen Grading	61
3.2.6. Korrelation der Scores mit der Tumorverhornung	62
3.2.7. Korrelation der Scores mit dem Alter des Patienten	62
3.2.8. Korrelation der Scores mit dem Geschlecht des Patienten	63
3.3. VEGF C	65
3.3.1. Expressionsmuster	65
3.3.2. Korrelation der Scores der Primärtumore mit den Scores der Lymphknotenmetastasen	66
3.3.3. Korrelation der Scores mit der pT-Klassifikation	66
3.3.4. Korrelation der Scores mit der pN-Klassifikation	67
3.3.5. Korrelation der Scores mit dem histologischen Grading	67
3.3.6. Korrelation der Scores mit der Tumorverhornung	67
3.3.7. Korrelation der Scores mit dem Alter des Patienten	68
3.3.8. Korrelation der Scores mit dem Geschlecht des Patienten	68
3.4. EGFR	71
3.4.1. Expressionsmuster	71
3.4.2. Korrelation der Scores der Primärtumore mit den Scores der Lymphknotenmetastasen	72
3.4.3. Korrelation der Scores mit der pT-Klassifikation	72
3.4.4. Korrelation der Scores mit der pN-Klassifikation	72
3.4.5. Korrelation der Scores mit dem histologischen Grading	74
3.4.6. Korrelation der Scores mit der Tumorverhornung	74

3.4.7. Korrelation der Scores mit dem Alter des Patienten	74
3.4.8. Korrelation der Scores mit dem Geschlecht des Patienten	75
3.5. C-src Tyrosinkinase	78
3.5.1. Expressionsmuster	78
3.5.2. Korrelation der Scores der Primärtumore mit den Scores der Lymphknotenmetastasen	79
3.5.3. Korrelation der Scores mit der pT-Klassifikation	79
3.5.4. Korrelation der Scores mit der pN-Klassifikation	79
3.5.5. Korrelation der Scores mit dem histologischen Grading	80
3.5.6. Korrelation der Scores mit der Tumorverhornung	80
3.5.7. Korrelation der Scores mit dem Alter des Patienten	81
3.5.8. Korrelation der Scores mit dem Geschlecht des Patienten	82
3.6. Korrelation der Scores der verschiedenen Antikörper	84
4. Diskussion	85
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich dieser mit bisherigen Studien	86
4.2. Klinische Relevanz: Die Bedeutung der Expression zellulärer Marker in der Diagnostik, Prognostik und Therapie von Kopf- und Halskarzinomen	95
5. Zusammenfassung	104
6. Literaturverzeichnis	107
7. Abkürzungsverzeichnis	125
Danksagung	
Lebenslauf	

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Mitglieder der VEGF-Familie und die verschiedenen Rezeptortypen.	28
Abbildung 2: Bedeutung von VEGF in der Tumorangio-genese.	31
Abbildung 3: EGFR/ErbB-Familie	35
Abbildung 4: Folgen einer erhöhten EGFR-Expression	36
Abbildung 5: Strategien zur EGFR-Inhibition	38
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur der c-Src-Kinase..	40
Abbildung 7: Inaktive und aktive Konformation von c-Src	41
Abbildung 8: Regulation der Aktivität von c-Src.	42
Abbildung 9: Score - pN-Klassifikation (Primärtumore, MAGE)	53
Abbildung 10: Score – Geschlecht (Primärtumore, MAGE)	56
Abbildung 11: Score - Geschlecht (Lymphknotenmetastasen, MAGE)	56
Abbildung 12: Anfärbung eines gering verhornten Plattenepithelkarzinom des Pharynx mit dem MAGE-A Antikörper 57 B	57
Abbildung 13: Anfärbung einer Lymphknotenmetastase eines gering verhornten Plattenepithelkarzinom des hinteren Gaumenbogens mit dem MAGE-A Antikörper 57 B	57
Abbildung 14: Anfärbung von Tumorresiduen eines gering verhornten Plattenepithelkarzinoms des Mundbodens mit dem MAGE-A Antikörper 57 B	58
Abbildung 15: Anfärbung eines verhornten Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle mit dem VEGF A Antikörper	64
Abbildung 16: Anfärbung einer Lymphknotenmetastase eines gering verhornten Plattenepithelkarzinoms der Tonsille mit dem VEGF A Antikörper	64
Abbildung 17: Anfärbung eines nicht verhornten Plattenepithelkarzinoms der Zunge mit dem VEGF C Antikörper	69
Abbildung 18: Anfärbung einer Lymphknotenmetastase eines gering verhornten Plattenepithelkarzinoms des hinteren Gaumenbogen mit dem VEGF C Antikörper	70
Abbildung 19: Score – pN-Klassifikation (Primärtumore, EGFR)	73
Abbildung 20: Anfärbung eines kleinherdig verhornten Plattenepithelkarzinoms	

der Uvula mit dem EGFR Antikörper	76
Abbildung 21: Anfärbung eines nicht verhornten Plattenepithelkarzinoms des Mundbodens mit dem EGFR Antikörper	76
Abbildung 22: Anfärbung einer Lymphknotenmetastase eines verhornten Plattenepithelkarzinoms der Zunge mit dem EGFR Antikörper	77
Abbildung 23: Anfärbung eines gering verhornten Plattenepithelkarzinom der Zunge mit dem C-Src Tyrosinkinase Antikörper	82
Abbildung 24: Anfärbung eines verhornten Plattenepithelkarzinom des Oropharynx mit dem C-Src Tyrosinkinase Antikörper	83
Abbildung 25: Anfärbung einer Lymphknotenmetastase eines gering verhornten Plattenepithelkarzinom des Pharynx mit dem C-Src Tyrosinkinase Antikörper	83

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinom	5
Tabelle 2: Diagnosesicherungsgrad (C-Faktor)	6
Tabelle 3: Tumorresiduen (R-Situation)	7
Tabelle 4: Stadieneinteilung auf Grundlage der TNM-Klassifikation	7
Tabelle 5: Histopathologisches Grading	8
Tabelle 6: Verwendete Antikörper mit jeweiliger Verdünnung	46
Tabelle 7: Einteilung der Anzahl der gefärbten Zellen in Scores	47
Tabelle 8: Score Primärtumore (MAGE)	50
Tabelle 9: Score Lymphknotenmetastasen (MAGE)	51
Tabelle 10: Altersgruppen	54
Tabelle 11: Score-Geschlecht (MAGE)	55
Tabelle 12: Score Primärtumore (VEGF A)	59
Tabelle 13: Score Lymphknotenmetastasen (VEGF A)	59
Tabelle 14: Score - pT-Klassifikation (Primärtumore, VEGF A)	60
Tabelle 15: Score - pT-Klassifikation (Lymphknotenmetastasen, VEGF A)	61
Tabelle 16: Score - Altersgruppen (Lymphknotenmetastasen, VEGF A)	63
Tabelle 17: Score (Primärtumore, VEGF C)	65
Tabelle 18: Score (Lymphknotenmetastasen, VEGF C)	65
Tabelle 19: Score – pT-Klassifikation (Primärtumor, VEGF C)	66
Tabelle 20: Score – pT-Klassifikation (Lymphknotenmetastase, VEGF C)	67
Tabelle 21: Score – Tumorverhornung (VEGF C)	67
Tabelle 22: Score – Alter (Lymphknotenmetastasen, VEGF C)	68
Tabelle 23: Score – Geschlecht (VEGF C)	68
Tabelle 24: Score Primärtumor (EGFR)	71
Tabelle 25: Score Lymphknotenmetastasen (EGFR)	72
Tabelle 26: Score – Geschlecht (EGFR)	75
Tabelle 27: Score Primärtumor (C-src)	78
Tabelle 28: Score Lymphknotenmetastasen (C-src)	78
Tabelle 30: Score – pN-Klassifikation (Lymphknotenmetastasen, C-src)	80
Tabelle 31: Score – Alter (Lymphknotenmetastasen, C-Src)	81
Tabelle 32: Score – Geschlecht (C-Src)	82

Tabelle 33: Korrelation der Scores der verschiedenen Antikörper (signifikant)	84
Tabelle 34: Korrelation der Scores der verschiedenen Antikörper	84

1. Einleitung

1.1. Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches (engl.: head and neck squamous cell carcinoma = HNSCC) wird definiert als eine invasive epitheliale Neoplasie mit unterschiedlicher Epitheldifferenzierung und der Eigenschaft früher und ausgedehnter Lymphknotenmetastasen [1].

Unter Kopf- und Hals-Karzinomen werden im engeren Sinn Karzinome des Pharynx, des Larynx, der Lippe und der Mundhöhle zusammengefasst. Tumoren der Speicheldrüsen und der Nasen- und Kieferhöhlen werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Ätiologie, Histologie und Therapie oft innerhalb der Kopf- und Hals-Tumoren gesondert behandelt. Mit über 90% machen Plattenepithelkarzinome den weitaus größten Teil der malignen Tumoren des Kopf-Halsbereiches aus [2].

1.1.1. Epidemiologie

Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches stellen ein globales Gesundheitsproblem dar. Sie stehen weltweit in der Häufigkeit der Krebserkrankungen an sechster Stelle und machen etwa 6% aller malignen Neoplasien aus. Jährlich erkranken über 600.000 Menschen global an einem Plattenepithelkarzinom des Kopf- oder Halsbereiches [3]. Hierbei bestehen erhebliche geographische Unterschiede. So z.B. machen die Kopf- und Hals-Tumoren in Süd-asien circa 20% aller bösartigen Krebserkrankungen aus. Auch innerhalb Europas lassen sich eindeutige Unterschiede erkennen. Vergleichsweise hohe Inzidenzraten weisen Länder wie Frankreich und Belgien bei Männern und Frankreich und Dänemark bei Frauen auf. Dagegen relativ niedrige Inzidenzraten weisen Länder wie Schweden, Norwegen, Finnland und England bei Männern und Schweden, Finnland und Österreich bei Frauen auf. Im Vergleich mit den

Erkrankungsraten anderer EU-Länder liegt die Inzidenz in Deutschland für Frauen und Männer im mittleren Bereich. Die Anzahl aller Neuerkrankungen in Deutschland beträgt etwa 50 von 100.000 Einwohnern.

Die aktuelle Schätzung des Robert Koch-Instituts weist für das Jahr 2006 insgesamt 10.860 Neuerkrankungen an einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle oder des Rachens in Deutschland aus. Hierunter befinden sich etwa 8.000 Männer und 3.000 Frauen. Die Häufigkeit für Frauen an einem Tumor der Mundhöhle oder des Rachens zu erkranken ist damit weitaus niedriger als für Männer. Sie ist jedoch in den letzten Jahren steigend. Im Durchschnitt sind Männer zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einer Neoplasie der Mundhöhle oder des Pharynx 60 Jahre alt und Frauen etwa 64 Jahre. An Kehlkopfkrebs erkranken nach den Angaben des Robert Koch-Instituts jedes Jahr ca. 4.000 Menschen in Deutschland. Die Geschlechtsdisposition männlich:weiblich liegt hier bei ungefähr 8:1, womit Männer erheblich häufiger erkranken. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für beide Geschlechter bei 64 Jahren [4]. Ursächlich für die unterschiedliche Verteilung von Malignomen des Kopf- und Halsbereiches zwischen den beiden Geschlechtern ist der höhere Alkohol- und Tabakkonsum bei Männern. Allgemein aber ist die Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches bei der männlichen Bevölkerung tendenziell rückläufig, dahingegen beim weiblichen Geschlecht leicht ansteigend [5].

Die Inzidenz von Fernmetastasen bei Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege ist, im Vergleich zu vielen anderen malignen Neoplasien, relativ gering. Angaben zum Vorkommen von Fernmetastasen zum Zeitpunkt der initialen Vorstellung liegen bei Größen zwischen 1,5% und 16,8%. Diese wird maßgeblich beeinflusst durch die Lokalisation des Primärtumors, die Tumorgroße und die Situation der regionären Lymphknoten. Das Auftreten von Fernmetastasen ohne vorausgehende lymphogene Metastasierung gehört zu den seltenen Ausnahmen [6].

1.1.2. Ätiologie

Bei der Genesis von Neoplasien unterscheidet man im Allgemeinen zwischen den primär exogenen und endogenen Ursachen. Wobei hauptsächlich die exogenen Noxen für die Entstehung von Karzinomen verantwortlich sind.

Tabak- und übermäßiger Alkoholkonsum, insbesondere der Genuss hochprozentigen Alkohols, sind die Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von Tumoren der Kopf- und Halsregion [7, 8]. Vor allem der gleichzeitige Genuss beider Gifte hat einen starken Einfluss, da sich die schädlichen Auswirkungen des Alkoholmissbrauchs und Rauchens nicht nur summieren, sondern in der Kombination auch potenzieren [9]. Der übermäßige Konsum von Alkohol vervielfacht die toxische Wirkung von Tabak wahrscheinlich über eine Schwächung der epithelialen Schleimhautbarriere. Obwohl Alkohol und Tabak die weitaus größten Risikofaktoren sind, entwickelt nur ein kleiner Teil aller Menschen, die diesen Giftstoffen ausgesetzt sind, ein Karzinom des oberen Aerodigestivtrakt. Das genetische Risiko an einem malignen Tumor zu erkranken zeigt folglich beträchtliche Abweichungen zwischen den einzelnen Individuen. Dementsprechend besteht eine Assoziation zwischen der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen und Genmutationen als endogene Ursache [10-13].

Als weitere Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren sind Viruserkrankungen, beruflich bedingte Exposition gegenüber von Karzinogenen, UV- und radioaktive Strahlen, eine Immunschwäche (z.B. HIV), fehlerhafte Ernährung, schlechte Mundhygiene, chronische Traumen (z.B. scharfe Zahnkanten, Prothesendruckstellen) und in Ländern Asiens der Genuss von Betelnüssen zu nennen.

Studien konnten belegen, dass die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und des Halses immer häufiger auf eine Infektion mit Humanen Papilloma Viren, insbesondere HPV-16 zurückgeht [14-17]. Interessanterweise scheint diese Untergruppe von Patienten, bei denen eine Assoziation zu HPV steht, eine insgesamt bessere Prognose zu haben und auch besser auf die Tumorbehandlung anzusprechen. Eine genaue Erklärung für diesen Zusam-

menhang gibt es aber offensichtlich noch nicht [18-21]. Auch der Epstein-Barr-Virus scheint eine Rolle bei der Tumorgenese zu spielen. Bei entsprechender genetischer Disposition besteht die Vermutung, dass eine Infektion mit diesem Virus zu Plattenepithelkarzinomen des Nasopharynx führen kann [22, 23].

Der Einfluss von mangelhafter Ernährung auf die Entstehung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich wird in verschiedenen Studien diskutiert. Obst und Gemüse hat aufgrund seines Gehaltes an Antioxidantien u.a. einen tumorprotektiven Effekt [24-28]. Im Gegensatz hierzu bestehen Annahmen, dass ein übertriebener Verzehr von Fleisch und Chili-Gewürzen ein Risikofaktor darstellt. [29, 30]. Petridou et al. schlussfolgerten aus ihrer Studie mit 106 Patienten, die an einem oralen Karzinom erkrankt waren, dass Früchte, Cerealien, Milchprodukte und Olivenöl einen protektiven Effekt haben [31].

Beruflich bedingte Karzinogene, welche die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms begünstigen, sind z.B. Farben, Lacke, Lösungsmittel, Asbest, Holz und weitere Stäube. Der Exposition mit diesen Arbeitsplatz-assoziierten Risikofaktoren kommt aber heutzutage nur noch eine untergeordnete Bedeutung zu.

1.1.3. Klassifikation

Um eine Therapie von Tumoren, insb. maligner Neoplasien exakt planen zu können, muss ein möglichst genauer Befund zur Tumorart und Tumorausdehnung sowie zum Vorkommen von lokoregionalen Metastasen und/oder Fernmetastasen vorliegen. Diesen Vorgang, in dem das Tumorstadium erfasst wird nennt man Staging [32]. Die klinische Einteilung von malignen Tumoren basiert auf der anatomischen Ausbreitung des Primärtumors, sowie auf der lymphogenen und hämatogenen Streuung. Nachfolgend ist das System der Union International Contre le Cancer (UICC) aufgeführt, welches die Tumorausbreitung nach den Kriterien **T** (Tumor), **N** (Node, Lymphknoten) und **M** (Metastase) klassifiziert. T beschreibt die Größe des Primärtumors (T1 bis T4), N das Ausmaß der lymphogenen Metastasierung (N0 bis N3) und M das Auftreten von Fernmetastasen (M0 oder M1).

T	Primärtumor
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anzeichen für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor \leq 2 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor $>$ 2, \leq 4 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor $>$ 4 cm im größten Durchmesser
T4a	Tumor infiltriert den kortikalen Knochen, den Mundboden, die Zungenmuskulatur, den N. alveolaris inf. oder die Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert ins Spatium masticatorium, die Schädelbasis oder umschließt die Carotis externa

N	regionäre Lymphknotenmetastasen
Nx	regionäre Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anzeichen für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, \leq 3 cm im größten Durchmesser
N2a	Metastase in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, $>$ 3 cm, \leq 6 cm im größten Durchmesser
N2b	Metastase in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, \leq 6 cm im größten Durchmesser
N2c	Metastase in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, \leq 6 cm im größten Durchmesser
N3	Metastase in einem Lymphknoten, $>$ 6 cm im größten Durchmesser

M	Fernmetastasen
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	kein Anzeichen für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinom (UICC 2009) [33]

Nach erfolgter posttherapeutischer, histopathologischer Untersuchung, wird durch den Pathologen eine neue TNM-Klassifikation aufgestellt. Diese wird dann mit dem Buchstaben **p** (Pathologie) beschrieben (pT pN pM). Die pathologische Klassifikation kann sich von der klinischen Klassifikation unterscheiden und ist zuverlässiger als diese [34].

Falls die TNM-Klassifikation erst während oder nach multimodaler Therapie erfolgt, wird die TNM- bzw. pTNM-Kategorie zusätzlich mit dem Buchstaben **y** gekennzeichnet.

Die Zuverlässigkeit der Diagnose kann zusätzlich durch den Diagnosesicherungsgrad (C-Faktor, certainty factor, Sicherheitsfaktor) angegeben werden. Dieser gibt an, mit welchen diagnostischen Methoden Befunde erhoben wurden und wird hinter der TNM-Kategorie mit einem **c** gekennzeichnet.

C1	Evidenz aufgrund allgemeiner Untersuchungsmethoden (z.B. klinischer Befund, Standard-Röntgenaufnahme etc.)
C2	Evidenz aufgrund spezieller Untersuchungsmethoden (z.B. CT, Szintigraphie etc.)
C3	Evidenz aufgrund chirurgischer Exploration unter Einbeziehung von Zytologie und Biopsie
C4	Evidenz nach erfolgter chirurgischer Exploration und histopathologischer Untersuchung des Resektionspräparates
C5	Evidenz nach Autopsie und histopathologischer Untersuchung

Tabelle 2: Diagnosesicherungsgrad (C-Faktor)

Das Vorhandensein oder Fehlen von Tumorresiduen nach erfolgter Therapie wird mit dem Buchstaben **R** (Residualtumor, Resttumor, R-Situation) beschrieben (Tabelle 3). Bei jeder Operation ist eine R0-Resektion anzustreben (optimaler Weise mittels intraoperativer Randschnittkontrolle).

Rx	Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	kein Residualtumor nachweisbar
R1	Residualtumor mikroskopisch nachweisbar
R2	Residualtumor makroskopisch nachweisbar

Tabelle 3: Tumorresiduen (R-Situation)

Die UICC hat auf der Grundlage der TNM-Klassifikation, eine Einteilung in Stadien vorgenommen, damit möglichst auf einen Blick der Stand der Tumorerkrankung erfasst werden kann. Wie in der nachstehenden Tabelle ersichtlich, erfolgt die Klassifikation in vier Stadien, wobei das Stadium 4 noch einmal in die Stadien 4a, 4b und 4c unterteilt wird. Die beiden frühen Stadien sind definiert durch das Fehlen von Lymphknotenmetastasen (N0) und Fernmetastasen (M0). Der Primärtumor misst im größten Durchmesser maximal 2 cm (Stadium 1), bzw. 4 cm (Stadium 2). Beim Stadium 3 können bereits Lymphknotenmetastasen vorhanden sein (N1). Der Primärtumor kann auch einen größeren Durchmesser als 4 cm haben, infiltriert allerdings noch keine Nachbarstrukturen. Bei Patienten im Stadium 4a und b kann nun auch eine Tumordinfiltration in Nachbarstrukturen vorliegen. Fernmetastasen kommen in diesen Stadien noch nicht vor. Diese werden erst im Stadium 4c diagnostiziert.

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium 1	T1	N0	M0
Stadium 2	T2	N0	M0
Stadium 3	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium 4a	T4a	N0, N1	M0
	T1, T2, T3, T4a	N2	M0
Stadium 4b	alle T	N3	M0
	T4b	alle N	M0
Stadium 4c	alle T	alle N	M1

Tabelle 4: Stadieneinteilung auf Grundlage der TNM-Klassifikation [33]

Eine weitere Möglichkeit, maligne Tumoren zu klassifizieren, bietet das histopathologische Grading, welches den Differenzierungsgrad des Tumors bestimmt (Tabelle 5). Es beschreibt die Aggressivität der malignen Neoplasie auf histologischer Ebene und reicht von G1 (gut differenziert) bis G4 (entdifferenziert). Kriterien zur Beurteilung sind Zellreichtum, Mitoseraten, Zell- und Zellkernpolymorphie, Bildung von Keratin, Auftreten von Nekrosen und die Relation von Zellen zu Interzellulärsubstanz [32, 35].

Gx	Differenzierungsgrad nicht beurteilbar
G1	gut differenziert, hoher Grad der Differenzierung
G2	mäßig differenziert, mittlerer Grad der Differenzierung
G3	schlecht differenziert, geringer Grad der Differenzierung
G4	undifferenziert, entdifferenziert

Tabelle 5: Histopathologisches Grading (UICC, 2009) [33]

1.1.4. Symptome

Symptome oder Beschwerden von malignen Tumoren im Kopf-Halsbereich variieren je nach Lokalisation und betroffenen Strukturen. Viele Symptome, die Anzeichen für einen Kopf- oder Halstumor sein können, sind verbreitet und eher unspezifisch. Sie treten auch bei vielen anderen Krankheiten auf. Daher werden sie oft gar nicht oder nur unzureichend früh mit einer malignen Neoplasie in Verbindung gebracht. Bei Karzinomen des Mund- und Rachenraumes werden die Beschwerden, in der Regel, erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Es gibt keine Frühsymptome. Tumore im Kehlkopfbereich verursachen oft frühzeitig eine Heiserkeit, bedingt durch einen häufigen Befall der Stimmlippen. Tumoren im Bereich der Mundhöhle machen sich oftmals als Ulzerationen an der Schleimhaut bemerkbar. Bei Infiltration des Zungenkörpers kann es zu Schluckbeschwerden und kloßiger Sprache kommen. Durch eine Beteiligung der Kaumuskulatur kann eine Kieferklemme ausgelöst werden. Zahnlockerungen und nicht abheilende Extraktionswunden sind typisch für Tumorlokalisationen im Alveolarfortsatz. Desweiteren können Foetor ex ore bei

nekrotischem Tumorzerfall und Gefühlsstörungen durch Nervinvasion auftreten. Symptome, die auf einen Kehlkopftumor hinweisen, sind länger anhaltende Heiserkeit, anhaltendes Kratz- oder Fremdkörpergefühl im Hals (mit ständigem Zwang, sich zu räuspern), Schluckstörungen, chronischer Husten oder Bluthusten, Atembeschwerden unklarer Ursache, hörbare Atemgeräusche (Stridor) und Schmerzen im Hals, die bis zu den Ohren ausstrahlen können [36-38]. Bei Tumoren des Pharynx stehen Schluckbeschwerden im Vordergrund.

Wenn bereits Lymphknotenmetastasen im Kopf-Hals-Bereich vorhanden sind, können diese als derbe, wenig oder nicht schmerzhaft, persistierende Schwellungen auffallen.

In fortgeschrittenen Stadien zeigen sich die Tumoren auch an einem beeinträchtigten körperlichen Allgemeinbefinden. Hier können dann Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit in Kombination mit Gewichtsverlust, Nachtschweiß und unregelmäßiges Fieber auftreten.

Bei allen Personen, die die geschilderten Beschwerden aufweisen, insbesondere bei länger andauernder Heiserkeit über 3 Wochen, sollte möglichst umgehend eine Vorstellung bei einem Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen oder einem HNO-Arzt stattfinden. Da viele Tumoren im Kopf-Hals-Bereich gehäuft bei Rauchern und Alkoholikern auftreten, gilt dieses natürlich besonders für Personen dieser Risikogruppe.

1.1.5. Diagnostik

Die initiale Diagnosestellung erfolgt typischerweise 9 -12 Monate nach Ausbruch der Krankheit und in 84% der Fälle innerhalb der ersten zwei Jahre [6]. 60% der Patienten befinden sich zur Zeit der Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen Stadium, bei 40% ist der Tumor bereits metastasiert. Ursächlich für die späte Diagnosestellung ist u.a., dass unspezifische Symptome wie Schluckbeschwerden, Halsschmerzen, chronischer Husten, Schleimhautläsionen etc. erst spät erkannt werden [36, 38-40].

Zu Beginn jeder Diagnostik steht die Erhebung der Anamnese. Diese liefert Hinweise zur Entstehung des Tumorleidens sowie zur Erörterung der Tumorkalisation. Neben Beschwerden und Symptomen von denen der Patient berichtet, können auch Angaben über tumorspezifische Risikofaktoren wegweisende Informationen geben. Hierzu zählen in erster Linie natürlich die zwei Hauptrisikofaktoren, Tabak und Alkohol.

Anschließend folgt dann die klinische Untersuchung, welche Inspektion, Palpation und Funktionsprüfung beinhaltet. Oftmals kann schon durch die Inspektion bei entsprechender Erfahrung des behandelnden Arztes, eine Verdachtsdiagnose gestellt werden [32]. Auch die Untersuchung der Halslymphknoten durch Inspektion und Palpation ist ein wichtiger Teil der klinischen Untersuchung. Allerdings sind nicht alle Tumoren der Inspektion und Palpation zugänglich oder lassen sich durch Funktionsprüfungen auffinden. Sie sind daher der direkten Beobachtung entzogen. Hier kommen dann Spiegeluntersuchungen und Endoskopien zum Einsatz.

Nach ausführlicher Anamneseerhebung und klinischer Untersuchung folgt die gezielte Untersuchung mittels bildgebender Verfahren. Die bildgebende Diagnostik soll in der Regel unbedingt vor einer ausgedehnten Tumorbiopsie erfolgen, andernfalls können Artefakte durch Gewebeeinblutungen die Ergebnisse der bildgebenden Diagnostik verfälschen. Als bildgebende Verfahren kommen je nach Tumor konventionelle zweidimensionale Röntgenaufnahmen, Sonographie, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und nuklearmedizinische Untersuchungen (PET, Szintigraphie) in Frage. Konventionelle zweidimensionale Röntgenaufnahmen im Bereich des Gesichtsschädels (OPG, Zahnfilme) dienen zur schnellen Darstellung von Hartgewebestrukturen in diesem Bereich (Knochen, Zähne). MRT und CT zeichnen sich durch sehr gutes Auflösungsvermögen und hohe Bildqualität in jeder räumlichen Orientierung aus. Durch diese Merkmale wird ihnen eine äußerst gute Zugänglichkeit zu Kopf- und Halstumoren sowie Lymphknotenmetastasen gegeben. Das CT bietet Vorteile in der Darstellung der knöchernen Strukturen und ebenso eines Einwachsens von Tumoren in diese. Das MRT kann bei tiefliegenden Weichteilpro-

zessen hilfreich sein und ist insbesondere dann indiziert, wenn Tumoren, die keinerlei Beziehung zum Knochen haben, abgebildet werden sollen [32]. Lungenmetastasen können mithilfe von Röntgenthoraxaufnahmen oder einer CT diagnostiziert werden. Die Sonographie findet bevorzugt Einsatz in der Diagnostik von Speicheldrüsen und Lymphknoten des Kopf- und Halsbereiches sowohl als Abdomensonographie. Ein Vorteil von diesem bildgebenden Verfahren liegt in der absoluten Unschädlichkeit von Ultraschallwellen. Als nuklearmedizinische Untersuchungen kommen in der Diagnostik von Kopf- und Halskarzinomen die Skelettszintigraphie und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) in Frage, welche in der Diagnostik von Fernmetastasen eine Rolle spielen.

Nachdem die Diagnostik mit bildgebenden Verfahren abgeschlossen ist, folgt die histologische Untersuchung. Nur auf diesem Weg kann eine sichere Diagnose einer Tumorerkrankung gestellt werden. Prinzipiell kann diese, anhand einer Biopsie (Gewebeprobe) vor der chirurgischen Tumorexzision, im Rahmen einer Schnellschnittuntersuchung, intraoperativ oder nach vollständiger Tumorentfernung erfolgen.

1.1.6. Therapie

Allgemeines Ziel der Behandlung von Karzinomen im Kopf- und Halsbereich ist eine Tumorkontrolle sowie eine Heilung zu erreichen. Gleichzeitig sollen alle Organfunktionen weitgehend erhalten bleiben. Durch nachfolgende Wiederherstellungsmaßnahmen ist ein akzeptables ästhetisches Ergebnis zu schaffen.

Die konventionelle Therapie von Kopf-Halskarzinomen stützt sich auf drei Säulen: die chirurgische Tumoresektion, die Strahlentherapie und die Chemotherapie. Abhängig vom Behandlungskonzept können diese einzeln oder in Kombination Anwendung finden. Neben diesen drei grundlegenden Behandlungsmöglichkeiten kommen neue Therapieoptionen auf molekularer Ebene hinzu.

Ausmaß und Vorgehen der Therapie werden für jeden Patienten individuell bestimmt und richten sich nach der Tumorgröße, der Tumorlokalisation, der Resektabilität des Tumors, dem histologischen Differenzierungsgrad des Tumors, dem Vorkommen von Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie dem Allgemeinzustand und persönlichen Wünschen des Patienten.

Die Therapie wird, je nach Lokalisation des Tumors, von Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen oder HNO-Ärzten vorgenommen.

Je nach Therapieziel spricht man von einer kurativ oder palliativ intendierten Behandlung. Stellt das Therapieziel eine Heilung der Tumorerkrankung dar, spricht man von kurativ intendiert, ist das Ziel der Behandlung nicht die Tumorheilung, sondern lediglich das Tumorleiden für den Patienten erträglicher zu machen, spricht man von palliativ intendiert.

Die chirurgische Tumorentfernung ist nach wie vor der wichtigste Teil der Therapie von resektablen Tumoren, mit dem Ziel einer R0-Resektion (vollständige Tumorentfernung im Gesunden, histologisch kein Tumorgewebe im Resektionsrand nachweisbar). Über die Größe des notwendigen Sicherheitsabstandes besteht nicht immer Einigkeit. Geforderte Sicherheitsabstände bei oralen Plattenepithelkarzinomen liegen bei 1-2 cm [32].

Die Lymphknotenausräumung am Hals (Neck Dissektion) kann aus therapeutischen, aber auch prophylaktischen Gründen, durchgeführt werden. Die prophylaktische (Syn.: elektive) Neck Dissektion kann bei N0-Fällen im Bereich der typischen Lymphabflussgebiete vorgenommen werden, um noch nicht diagnostizierte Mikrometastasen zu entfernen. Die Indikation für eine elektive Neck Dissektion wird kontrovers diskutiert [41-45]. Der elektiven Lymphknotenausräumung wird vorgeworfen, dass bei geringem Risiko des Vorkommens möglicher Metastasen, ein beachtlicher Patientenanteil (70-80%) grundlos operiert wird. Eine therapeutische oder kurative Neck Dissection erfolgt, wenn schon vor der geplanten Operation Gewissheit oder zumindest ein begründeter Hinweis über das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen besteht.

Nach Robbins wird unterschieden zwischen der selektiven Neck Dissektion, der

radikalen Neck Dissektion, der modifizierten radikalen Neck Dissektion und der erweiterten radikalen Neck Dissektion [46-48]. Bei der selektiven Neck Dissektion werden selektiv die Regionen einer Halsseite entfernt, in denen Lymphknotenmetastasen eines Primärtumors nachgewiesen oder vermutet werden. Von einer radikalen Neck Dissektion spricht man, wenn die vollständige Entfernung der Lymphknoten der Level I-V sowie des N. accessorius, der V. jugularis und des M. sternocleidomastoideus vorgenommen wird. Im Rahmen der modifizierten radikalen Neck Dissektion werden ebenfalls die Lymphknoten der Level I-V entfernt, im Gegensatz zur radikalen Neck Dissektion bleiben aber ein oder mehrere der drei nicht lymphatischen Strukturen (N. accessorius, V. jugularis, M. sternocleidomastoideus) erhalten. Bei der erweiterten radikalen Neck Dissektion werden zusätzlich zur radikalen Neck Dissektion noch weitere Lymphknotengruppen und/oder nicht lymphatische Strukturen, wie die A. carotis externa, der N. hypoglossus, der N. vagus oder die paravertebrale Muskulatur reseziert [49]. Für welche Form sich letztlich entschieden wird, ist abhängig von der Größe und Lokalisation des Tumors sowie von seinem Infiltrationsgrad und vom Allgemeinzustand des Patienten.

Die zweite Grundsäule in der Therapie von Kopf- und Hals-Karzinomen stellt die Strahlentherapie dar. Diese wird entweder als Monotherapie, als Radiochemotherapie oder als adjuvante (lat. adjuvare, „unterstützende“) Therapie in Kombination mit chirurgischen Maßnahmen durchgeführt. Die adjuvante Radiotherapie kann prinzipiell prä- oder postoperativ erfolgen. Die postoperative adjuvante Strahlentherapie ist in Abhängigkeit vom Tumorstadium häufig indiziert, wohingegen die neoadjuvante Strahlentherapie nur selten angewandt wird. Sollte eine chirurgische Tumorentfernung ausgeschlossen sein, kann eine abschließliche Radiatio oder Radiochemotherapie mit palliativer Intention erfolgen. Für den Erfolg einer Bestrahlungstherapie ist die Gesamtdosis (maximal ca. 70 Gy) von entscheidender Bedeutung. +Neben dieser spielt die Fraktionierung (Aufteilung der Gesamtdosis in mehrere kleinere Dosen) eine wichtige Rolle. Die tägliche Bestrahlungsdosis beträgt 1,8 bis 2Gy und wird an den fünf Werktagen appliziert. Demnach besteht eine Strahlentherapie-Serie aus durchschnittlich 20-35 Sitzungen.

Die dritte Behandlungssäule der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich ist die medikamentöse Tumortherapie. Allgemeine Voraussetzung für die sinnvolle Behandlung von Karzinomen mittels Chemotherapeutika ist, dass der zu behandelnde Tumor chemotherapiesensibel ist. Dies trifft zwar prinzipiell für Plattenepithelkarzinome zu, jedoch ist die Ansprechbarkeit dieser Tumoren nicht dafür ausreichend, dass bei kurativer Intention die Chemotherapie allein als Einzelbehandlung eingesetzt werden kann. Vielmehr spielt sie als adjuvante Kombinationsbehandlung oder bei palliativen Therapieansätzen eine Rolle [32]. Die Chemotherapie als Einzelbehandlung (palliative Chemotherapie) findet ihren Einsatz bei sehr fortgeschrittenen Befunden ohne weitere Möglichkeiten der heilenden Operation oder Bestrahlung, z.B. wie bei chirurgisch und/oder strahlentherapeutisch ausbehandelten Tumoren [50]. Als Teil einer Kombinationstherapie wird die Chemotherapie mit der Absicht eingesetzt, den bestehenden Tumor vor der weiteren Therapie zu verkleinern und subklinische Fernmetastasen und/oder mikroskopische Ausläufer zu beseitigen. Voraussetzung dieser Kombinationsbehandlung ist ein ausreichender Allgemeinzustand des Patienten. Chemotherapeutika mit guter Wirksamkeit gegen Plattenepithelkarzinome sind z.B. 5-Fluorouracil, Cis-Platin, Carboplatin und Taxane [50]. Die genannten Medikamente können prinzipiell als Einzelsubstanzen Anwendung finden. Öfter wird jedoch eine Chemotherapie im Sinne einer Kombinationstherapie durchgeführt. Bei dieser werden verschiedene Chemotherapeutika miteinander kombiniert, um synergetische Effekte der einzelnen Substanzen zu nutzen [32].

R. Fietkau et al. zeigen in ihrer Studie, dass durch postoperative kombinierte Radio-/Chemotherapie, im Vergleich zu alleiniger Radiotherapie beim Plattenepithelkarzinom des Kopf/Hals-Bereiches eine verbesserte lokoregionäre Kontrolle sowie ein längeres progressionsfreies Überleben erzielt wird. Zusätzlich zeigt sich ein Trend zu einem verlängerten Gesamtüberleben [51].

Ein nicht zu vernachlässigender Teil der chirurgischen Therapie, der Radiatio und der Behandlung mit Chemotherapeutika ist der Umgang mit den Nebenwirkungen sowie deren Prävention.

Die meist unvermeidbaren funktionellen und ästhetischen Beeinträchtigungen

infolge der chirurgischen Tumorresektion, müssen oft durch sehr aufwändige, wiederherstellende Maßnahmen behandelt werden. Chirurgische Möglichkeiten bestehen in dem Einsatz von lokalen Lappenplastiken und Gewebetransplantationen. Neben der Wiederherstellungschirurgie, gibt es auch die Möglichkeit, größere Gesichtsdefekte durch Epithesen zu versorgen.

Als Folge der Radiatio treten akute und chronische Strahlenschäden auf. Akute Strahlenschäden manifestieren sich in einer Schädigung schnell proliferativer Gewebe, d.h. Gewebe mit einer hohen Rate an Zellteilung und raschem Zellwachstum, wie z.B. Haut- und Schleimhautzellen. An dieser Stelle zu nennen sind Mukositis, Dermatitis, Candidiasis, Irritationen bzw. Verlust des Geschmacksinns, lokale Alopezie, Schmerzen, Erytheme und Schluckbeschwerden. Zu den chronischen Strahlenschäden zählen ebenfalls Störungen des Geschmacksinns, Schluckbeschwerden und lokale Alopezie. Desweiteren sind Xerostomie durch Schädigung der Speicheldrüsen, Narbenbildungen, Hyperpigmentierung, Strahlenkaries und Osteoradionekrosen möglich [52-55]. Eine wichtige Bedeutung hat die zahnärztliche Betreuung von Patienten mit Zustand nach einer Kopf-Hals-Bestrahlung. Hierdurch können akute, temporäre sowie chronische Strahlenfolgen im Bereich der Mundhöhle und das Risiko für optionale Komplikationen vermindert werden.

Folgen der Chemotherapie erklären sich dadurch, dass neben den Tumorzellen auch gesunde Zellen, insbesondere solche mit hohen Teilungsraten (z.B. Zellen der Mundschleimhaut, der Darmmukosa, der Haarwurzeln und blutbildenden Zellen des Knochenmarks) in Mitleidenschaft gezogen werden. Die Nebenwirkungen äußern sich dann als schmerzhaftes Mundschleimhautentzündungen, Haarausfall, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö.

Zu den relativ neuen Therapieoptionen zählt die gezielte („targeted“) Therapie, bei der Antikörper eingesetzt werden. Für die Behandlung von Kopf- und Halstumoren ist derzeit der EGFR-Antikörper Cetuximab (Erbix®), ein monoklonaler Antikörper vom IgG1-Typ zugelassen. In Europa ist dieser EGFR-Antikörper seit 2006 in Kombination mit einer Strahlentherapie und seit 2008 zusammen mit einer platinbasierten Chemotherapie (Cis –oder Carboplatin plus 5-

Fluoruracil) für die Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs zugelassen [56]. Cetuximab schwächt die Proliferation von EGFR-exprimierenden Tumorzellen und veranlasst deren Apoptose. Studien belegen, dass die Hinzunahme von Erbitux® zu einer platinbasierten Chemotherapie sowie zu einer Radiotherapie zu Therapieerfolgen führt [57, 58]. Verschiedene andere Antikörper, die in der Therapie von Karzinomen Anwendung finden sollen, sind gegenwärtig Teil der Forschung [59-61]. So, zum Beispiel, liefert der antiangiogenetische Effekt von Bevacizumab (Avastin®), das gezielt den vaskulären endothelialen Growth Faktor (VEGF) angreift, in einigen Studien erfolgsversprechende Ergebnisse. Im Kopf-Hals-Bereich sind VEGF-Inhibitoren derzeit aber noch nicht zugelassen [50, 62].

1.1.7. Prognose

Die Prognose von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich hat sich trotz einer Verbesserung der Diagnostik und trotz der Fortschritte in der Therapie in den letzten 30 Jahren nicht stark verbessert [63]. Immer noch ist das Stadium des Tumors bei der Erstdiagnose maßgeblich für die Prognose verantwortlich. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt je nach Tumorlokalisation bei 33 bis 62% [36]. Innerhalb der ersten zwei Jahre nach Abschluss der Primärbehandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs werden die meisten Rezidivkrankungen beobachtet. Daher sollten in den nachfolgenden Jahren regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen erfolgen, welche zunächst in viertel-, dann in halb- bzw. jährlichen Abständen angesetzt werden. Insgesamt verstirbt annähernd die Hälfte aller Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des oberen Aerodigestivtraktes an ihrer Erkrankung.

Faktoren, von denen die Prognose abhängig ist sind, u.a.: Ausmaß des Lymphknotenbefalls, Vorkommen von Fernmetastasen, Volumen des Primärtumors, Differenzierungsgrad, extrakapsuläres Wachstum und Veneneinbrüche. Außerdem ist die Prognose abhängig von eventuellen externen Risikofaktoren. Für die Chance auf einen Langzeiterfolg ist es von großer Bedeutung,

dass der Alkohol- und Tabakkonsum eingeschränkt bzw. vollständig eingestellt wird.

Da die meisten Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs keine klassischen Frühsymptome aufweisen sowie Hinweise auf eine mögliche Tumorerkrankung (z.B. plötzlich auftretende starke Heiserkeit, Schluckbeschwerden, Lymphknotenschwellungen etc.) meist fehlgedeutet und nicht ernst genommen werden, ist die Tumorerkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist schon in einem fortgeschrittenem Stadium, was die Prognose dieser Tumoren maßgeblich beeinflusst [36, 64]. Nur ca. 33% der Patienten befinden sich zur Zeit der Diagnose noch in einem frühen Stadium (Stadium 1 und 2) und haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von 80%. Ungefähr die Hälfte der Patienten befindet sich im Stadium 3 bis 4b und hat eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur noch ca. 50%. Etwa jeder zehnte Patient befindet sich zur Zeit der Diagnosestellung bereits im Stadium 4c und weist somit schon Fernmetastasen auf. Nur noch ca. 25% dieser Patienten leben nach fünf Jahren noch [65]. Bei etwa 10% der Patienten mit Tumoren im Kopf- und Halsbereich werden synchrone oder metachrone Zweitkarzinome diagnostiziert.

1.2. Tumorantigene

Tumorantigene sind körpereigene oder virale Proteine, die in Tumorzellen exprimiert werden und beim Patienten eine Immunantwort induzieren. Insbesondere Fremdartigene, die durch Infektionen in den Körper gelangen, können eine ausgeprägte Immunreaktion auslösen. Tumorantigene erlangen eine zunehmend wichtigere Bedeutung, da sie als Tumormarker in der Diagnostik, zur Kontrolle des Therapieverlaufs (Monitoring) und als Zielstrukturen in der Immuntherapie immer mehr Anwendung finden. Auch nach erfolgreicher Therapie sind Tumormarker zur Früherkennung von möglichen Rezidiven geeignet. Sie stellen daher eine potentielle Möglichkeit dar, den Behandlungserfolg bei Karzinomen tiefgreifend zu verbessern.

Prinzipiell kann man tumorspezifische und tumorassoziierte Antigene unterscheiden. Tumorspezifische Antigene (TSA) werden nahezu ausschließlich in Tumorzellen produziert. Folglich sind sie ideale Zielstrukturen für eine spezifische Immuntherapie. Tumorassoziierte Antigene (TAA) werden sowohl von Tumorzellen, als auch von normalen Zellen exprimiert. Allerdings werden diese von Krebszellen überexprimiert, während sie sich bei nicht entarteten Zellen nur in geringer Expressionsstärke oder nur in einzelnen Zelltypen finden. Ihre Verwendung als Zielstrukturen in der Therapie kann aufgrund ihres Vorkommens in gesundem Gewebe zu beachtlichen Nebenwirkungen führen.

Abhängig von ihrer Expression im Gewebe, Genfunktion und Genese, lassen sich Tumorantigene in sechs verschiedene Kategorien einteilen: Cancer-Testis-Antigene, überexprimierte Antigene, Differenzierungsantigene, onkofetale Antigene, virale Antigene und mutationsbedingte Antigene [66].

Cancer-Testis-Antigene (CTA, Tumor-Hoden-Antigene) stellen eine Familie der TAA dar. Sie werden neben ihrer Expression in Zellen vieler verschiedener Tumore auch im Hoden und in der Plazenta, bzw. in embryonalen Zellen exprimiert [67]. Zu Beginn der 90er Jahre wurde das erste Cancer-Testis-Antigen, MAGE-1, an einer Melanomzelllinie durch van der Bruggen et al. beschrieben [68]. Weitere Cancer-Testis-Antigene sind z.B. NY-ESO-1 oder Proteine der BAGE- und GAGE-Familie [69]. Cancer-Testis-Antigene werden nach dem Tumorgewebe, auf dem sie identifiziert wurden, benannt (z.B. Melanomassoziierte Antigene, MAGE) oder nach dem Ort, an dem sie das erste Mal beschrieben wurden (z.B. New York esophageal squamous cancer antigen 1, NY-ESO-1).

Tumorassoziierte Antigene, die von Krebszellen sehr viel stärker exprimiert werden als von normalem Gewebe, in denen sie aber auch vorkommen, nennt man überexprimierte Antigene. Vertreter dieser Gene sind zum Beispiel der Epidermal-Growth-Faktor-Rezeptor (EGFR), der humane epidermale Rezeptor 2/neu (HER2/neu), HER 3 und 4, der vaskuläre endotheliale Growth Faktor (VEGF), das carcinoembryonale Antigen (CEA) und das epitheliale Adhäsionsmolekül (Ep-CAM).

Differenzierungsantigene sind spezifisch für einen bestimmten Zelltyp. Sie kommen sowohl im Tumorgewebe als auch in differenziertem, normalem Gewebe vor. So ist zum Beispiel die Tyrosinase in Melanomzellen und gesunden Melanozyten an der Bildung von Melanin beteiligt [70].

Onkofetale Antigene entstehen durch Reaktivierung silenter Gene. Sie werden im Embryo exprimiert, kommen im gesunden adultem Gewebe nicht vor, können jedoch in malignen Zellen reexprimiert werden. Ein bedeutender Vertreter ist das Alpha-Fetoprotein (AFP), welches in der Diagnostik und zum Monitoring von Leberzellkarzinomen und Keimzelltumoren Anwendung findet [71, 72].

Bei einigen Tumorerkrankungen ist eine Assoziation zu viralen Infektionen nachgewiesen. In diesen Fällen spricht man von viralen Antigenen. Beispiele für eine Virusinduzierte Onkogenese sind Humane Papillomaviren (HPV 16 und 18) bei genitalen Karzinomen und bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, das Epstein Barr Virus (EBV) bei Nasopharynxkarzinomen und Hepatitis B und C bei hepatozellulären Karzinomen [22, 23, 73-75]. Da das humane Immunsystem auf virale Erkrankungen mit einer widerstandsfähigen Immunreaktion zu reagieren vermag, stellen virale Antigene interessante Angriffspunkte für tumorspezifische Immuntherapien dar [76].

Erworbene genetische Veränderungen können auch für maligne biologische Eigenschaften von entarteten Zellen verantwortlich sein. Tumorantigene, die durch Mutationen oder Translokation in der Gensequenz entstanden sind, die sogenannten Mutationsantigene, gehören zu den tumorspezifischen Antigenen oder auch „Neoantigenen“. Beispiele hierfür sind Mutationen des Tumorsuppressorgens p53, des Zellzyklusregulators CDK4, des Onkogen ras oder von β -Catenin [76, 77].

Inzwischen sind zahlreiche verschiedene Tumorantigene identifiziert und für einige von ihnen wurden therapeutische Antikörper entwickelt, bzw. werden noch in klinischen Studien erprobt. Ein aus therapeutischer Sicht „ideales“ Tumorantigen, welches es in dieser Form aber nicht gibt, hätte die Eigenschaft, dass es zum einen nur auf Tumorzellen und dort in möglichst großer Anzahl

exprimiert wird, um Nebenwirkungen einer möglichen Therapie gering halten zu können. Zum anderen sollte es nicht nur auf individuelle Tumoren beschränkt sein, sondern zumindest für eine ganze Tumorentität charakteristisch sein, damit ein potentieller Antikörper auch auf breiter Basis therapeutische Anwendung finden könnte. Mutationsbedingte Antigene würden zwar (aufgrund ihres Vorkommens einzig auf Tumorgewebe) einem idealen Tumorantigen sehr nahe kommen, jedoch macht sich ihre individuelle Struktur, durch zufällig entstandene Mutationen, ungeeignet für die standardisierte Anwendung. Dagegen werden beispielsweise Differenzierungsantigene in Tumoren vieler Patienten exprimiert. Der Nachteil bei diesen ist jedoch, dass ihre Verwendung als Zielstrukturen für die Therapie zu erheblichen Nebenwirkungen im gesunden Gewebe führen kann.

1.3. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression zellulärer Marker beim metastasierenden Kopf-Hals-Karzinom untersucht. Da hierfür, sowohl das Gewebe der Primärtumoren als auch das der Lymphknotenmetastasen gefärbt werden sollte, kamen folglich auch nur Patienten mit Lymphknotenmetastasen in Frage. Als zu testende Antikörper wurden zu Beginn der Arbeit sieben verschiedene Antikörper (MAGE-A, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, EGFR, Phospho-Akt und C-src-Tyrosinkinase) ausgewählt.

Zunächst bestand die Aufgabe darin, die verschiedenen Antikörper auszuprobieren, um eine geeignete Verdünnungskonzentration, sowie den richtigen Puffer für die Hitzedemaskierung zu bestimmen. Da bei zwei der sieben Antikörper (VEGF-D und Phospho-Akt) schon hierbei keine positiven Färbungen erzielt wurden, wurden diese aus der Studie herausgenommen. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht mehr möglich, diese Antikörper (z.B. durch Verwendung des gleichen Antikörpers einer anderen Firma) weiter zu testen. Die Ergebnisse der Färbungen mit den fünf verbleibenden Antikörpern wurden

verglichen mit dem pT-Stadium, dem pN-Stadium, dem histologischen Grading, der Tumorverhornung, dem Patientenalter und dem Geschlecht des Patienten. Des Weiteren wurden die Färbungen der verschiedenen Antikörper untereinander verglichen.

Ziel der Arbeit ist es, Erkenntnisse über die Expression der Antikörper im metastasierenden Kopf-Hals-Karzinom zu gewinnen und diese zu dokumentieren als eine zukünftige Hilfe für Fortschritte in Diagnostik und Therapie.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten von 50 Patienten retrospektiv erhoben, bei denen in den Jahren 2001, 2002 oder 2003 ein Plattenepithelkarzinom im Kopf oder Halsbereich diagnostiziert wurde. Voraussetzung für die Patientenauswahl war, dass die Patienten bereits von Lymphknotenmetastasen betroffen waren, also mindestens ein pN1-Stadium vorlag. Die Gewebeproben der Primärtumore und Lymphknotenmetastasen stammen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg.

Das Patientenalter beträgt im Durchschnitt 56,96 Jahre. Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 21 Jahre alt, der älteste Patient war 79 Jahre. 26% der Patienten waren jünger als 50 Jahre, 64% hatten ein Alter zwischen 50 und 70 Jahren und 5 Patienten (10%) waren älter als 70 Jahre.

Das Geschlechterverhältnis lag bei ca. 3:1, wobei die männlichen Patienten dreimal häufiger betroffen waren als die weiblichen Patientinnen. 76% der Patienten (38 von 50) waren Männer und 24% (12 von 50) waren Frauen.

Über 50% der Tumoren (56%) waren in der Mundhöhle lokalisiert, 5 der 50 Tumoren (10%) betrafen den Larynx und bei 17 der 50 (34%) Tumoren handelt es sich um Pharynxkarzinome.

Bei 11 der 50 Tumoren wurde postoperativ ein T1-Tumor diagnostiziert, bei 30 Fällen ein T2-Tumor, bei 6 Fällen ein T3-Tumor und bei 3 Fällen ein T4-Tumor. Die Lymphknotenausräumung ergab bei 20 von 50 Patienten (40%) ein pN1-Stadium, bei 2 Patienten (4%) ein pN2a-Stadium, bei 19 Patienten (38%) ein pN2b-Stadium und bei 9 Patienten (18%) ein pN2c-Stadium. Tumoren mit einem pN3-Stadium kamen nicht vor.

Bei der histopathologischen Untersuchung wurden gut die Hälfte der Tumoren

(58%) als mäßig differenziert (G 2) bewertet und knapp die Hälfte (42%) als schlecht differenziert (G 3) eingestuft. Bei 90% der Patienten wurde ein verhornter Tumor diagnostiziert, bei 10% handelte es sich um einen nicht verhornten Tumor..

2.2. Antikörper

2.2.1. MAGE-A Antikörper 57B

MAGE-Gene (melanoma antigen-encoding genes) wurden erstmals im Zusammenhang mit dem malignen Melanom beschrieben. MAGE-1 war das erste identifizierte menschliche Tumorantigen. Nach ihm wurde auch die Familie der MAGE-Antigene benannt. 1991 entdeckten van der Bruggen et al. dieses Antigen auf Melanomzelllinien durch T-Zellrezeptorklonierung [68, 78, 79].

Die MAGE-Genfamilie besteht aus über 20 verwandten Genen, die sich auf vier Gengruppen (MAGE-A, -B, -C und -D) aufteilen. Alle von ihnen sind auf dem X-Chromosom kodiert [80]. MAGE-A Gene sind in der Region q28, MAGE-B Gene in der Region p21.3, MAGE-C Gene in der Region q26-27 und MAGE-D Gene in der Region p11 des X-Chromosoms lokalisiert [81].

Anhand ihres Expressionsmusters kann man eine Unterteilung in die zwei Subgruppen MAGE I (MAGE-A, -B und -C) und MAGE II (MAGE-D) vornehmen.[82] Bei MAGE I-Antigenen (MAGE-A, -B und -C) handelt es sich um Cancer-Testis-Antigene, die zur Familie der tumorassoziierten Antigene gehören. Sie werden von vielen verschiedenen Tumoren exprimiert, wie z.B. von Melanomen, Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen, Blasenkarzinomen, Magenkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen, multiplen Myelomen und auch von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich [83-93]. Im normalen Gewebe kommen sie nur im Hoden und der Plazenta sowie im fetalen Gewebe vor [94-96]. Die Expression

von MAGE II-Antigenen (MAGE-D Gene) ist nicht nur in der Embryonalentwicklung, sondern auch in vielen gesunden Geweben des adulten Organismus zu finden [97-99].

Die MAGE-A-Familie setzt sich wiederum aus insgesamt 12 Subtypen zusammen, MAGE-A1 bis MAGE-A12, die sich in ihrer Proteinstruktur unterscheiden. Zwischen diesen verschiedenen Mitgliedern der MAGE-A Familie finden sich 7 MAGE-A Gene (A1, A2, A3, A4, A6, A10 und A12), die von vielen malignen Tumoren reichlich exprimiert werden, nicht aber vom gesunden, adulten Gewebe (Ausnahme Hoden und Plazentagewebe). Die individuelle MAGE-A Expression variiert zwischen den unterschiedlichen Tumorentitäten. Allumfassend, exprimiert aber die große Mehrheit der malignen Tumoren zumindest ein MAGE-A Antigen [100, 101]. Die übrigen fünf MAGE-A Gene werden in Tumoren entweder gar nicht (so wie das MAGE-A7 Pseudogen) oder nur in sehr geringen Mengen exprimiert. Viele Antigene, die über HLA-I-Moleküle an CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden, wurden in den Genprodukten von MAGE-A1, A2, A3, A4, A6, A10 und A12 identifiziert. Für MAGE-A1 und -A3 wurden auch Antigene beschrieben, die über HLA-II-Moleküle von CD-4⁺ T-Helferzellen erkannt werden [80, 102-104]. Die Expression von MAGE-A Antigenen in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs wurde von verschiedenen Autoren beschrieben [95, 96, 101, 105-108]. Ries et al. berichten über die Expression der MAGE-A Antigene A1-A6 und A12 in oralen Plattenepithelkarzinomen [94].

MAGE-A Antigene sind von besonderem Interesse für die Immunkrebstherapie, da sie von vielen Tumoren exprimiert werden und neben ihrer Expression auf Tumorgewebe nur im Keimzellgewebe vorkommen. Da HLA-Moleküle auf der Oberfläche von Keimbahnzellen nicht vorkommen, sind Nebenwirkungen auf diese Zellen nicht zu befürchten [80].

Für die immunhistochemischen Färbungen im Rahmen dieser Arbeit wurde der monoklonale globale MAGE-A Antikörper 57B verwendet. Dieser monoklonale Antikörper bindet an ein gemeinsames Epitop von MAGE-A-Antigenen und ermöglicht so die Erkennung der meisten MAGE-A-Subtypen [109].

Landry et al. zeigen in einer Studie, dass mit dem MAGE-A Antikörper 57B der Nachweis von MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6 und -A12 möglich ist. Dahingegen werden die Subtypen MAGE-A8, -A9, -A10 und -A11 nicht erkannt [110].

2.2.2. VEGF

Der vaskuläre endotheliale Gefäßwachstumsfaktor (engl.: Vascular Endothelial Growth Factor) ist am besten bekannt als ein Signalmolekül, das eine zentrale Rolle in der Angiogenese (Wachstum neuer Blutgefäße aus einem bereits bestehenden Gefäßsystem) und in der Vaskulogenese (Gefäßneubildung aus endothelialen Vorläuferzellen) spielt. Allerdings dient VEGF auch einigen weiteren Funktionen, die weniger allgemein anerkannt sind [111].

Durch Senger et al. wurde VEGF, 1983 erstmals als ein in Tumoren produzierter Faktor, der die Permeabilität von Gefäßen erhöht, beschrieben. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde er zunächst als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (vascular permeability factor, VPF) bezeichnet [112]. Sechs Jahre später wurde ein Protein entdeckt, welches die Gefäßneubildung positiv beeinflusst. Man bezeichnete es dementsprechend als vaskulären endothelialen Gefäßwachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es sich bei VEGF und VPF um dasselbe Protein handelt [113].

VEGF ist ein homodimerisches Glykoprotein, das aus zwei gleichartigen, durch Disulfid-Brücken verbundenen Untereinheiten besteht [114]. Strukturell gehört VEGF zur VEGF-Superfamilie, von der derzeit sieben verschiedene Mitglieder beschrieben sind, VEGF-A bis F, sowie PlGF (placenta growth factor). Durch alternatives Splicen entstehen weitere VEGF bzw. PlGF Isoformen. Diese unterscheiden sich lediglich in der Länge ihrer Polypeptidketten [115-117]. Die einzelnen VEGF-Isotypen können sich zu verschiedenen Homodimeren und Heterodimeren zusammenlagern, z.B. zu VEGF-A Homodimeren oder Heterodimeren mit PlGF oder VEGF-B [118].

VEGF-A oder häufig auch nur als VEGF bezeichnet, wurde als erstes der

VEGF-Mitglieder entdeckt und ist der am besten untersuchte Faktor aus der VEGF-Familie. Es ist ein 34-42 kDa schweres, dimeres, über Disulfidbrücken gebundenes Glykoprotein [119]. Beim Menschen befindet sich das VEGF-A-Gen auf dem Chromosom 6p21.3 [120]. Es besteht aus acht Exons, die durch sieben Introns getrennt sind [121]. VEGF-A besitzt insgesamt mindestens 9 Subtypen, die durch alternatives Splicen der Exons entstehen und entsprechend der Anzahl ihrer Aminosäuren (AS) bezeichnet werden [117]. Die bekanntesten Isoformen sind VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉ und VEGF-A₂₀₆. Von denen ist VEGF-A₁₆₅ die Form mit der stärksten Wirksamkeit. Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich in ihrer Heparin und Heparansulfat Bindungseigenschaft sowie in ihrer Rezeptoraffinität, wobei die kurzen Splicevarianten, bestehend aus 121, 145 und 165 Aminosäuren Heparansulfate weniger fest binden, während die längeren Formen (VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) eine sehr hohe Affinität zu Heparin haben und nahezu vollständig an Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) gebunden sind [122]. Im gesunden Gewebe kommt VEGF-A hauptsächlich in der Lunge, der Niere, dem Herzen und der Adrenaldrüse vor. In geringeren, aber dennoch beachtlichen Maßen, taucht VEGF-A auch in der Leber, der Milz und in der Magenschleimhaut auf [119].

Der Placenta Growth Faktor (PIGF) wurde erstmals 1991 entdeckt, als er aus humaner Plazenta isoliert wurde [123]. Wie der Name des Moleküls vermuten lässt, wird PIGF besonders stark in der Plazenta während der Schwangerschaft exprimiert. Das Protein wird aber nicht nur ausschließlich in der Plazenta synthetisiert, sondern kommt auch in anderen Geweben vor. Vom PIGF sind insgesamt vier verschiedene Isoformen beschrieben: PIGF-1 (PIGF₁₃₁), PIGF-2 (PIGF₁₅₂), PIGF-3 (PIGF₂₀₃) und PIGF-4 (PIGF₂₂₄).

VEGF-B wurde erstmals 1995 entdeckt [119]. Das Gen liegt auf dem Chromosom 11q13, in Nachbarschaft zu dem Gen von Cyclin D1, welches bei einer Reihe von Karzinomen verstärkt exprimiert wird [124]. Bei VEGF-B handelt es sich um einen stark basischen Heparin bindenden Wachstumsfaktor, dessen Struktur Ähnlichkeiten zu VEGF-A und PIGF hat [125]. Wie auch für VEGF-A

und PlGF, bestehen auch für VEGF-B unterschiedliche Isoformen, die durch alternatives Splicen entstehen. Momentan sind zwei Splicevarianten vom VEGF-B bekannt: VEGF-B₁₆₇ (21 kDa) und VEGF-B₁₈₆ (32kDa) [125-127]. Beide Isoformen sind vor allem für die kardiale Angiogenese von Bedeutung [118]. VEGF-B kommt in reichlichen Mengen im Myokard, Skelettmuskel und Pankreas vor [119].

VEGF-C und VEGF-D haben starke Ähnlichkeiten [128]. Das VEGF-C-Gen befindet sich auf dem Chromosom 4q34, neben dem Gen von Aspartylglycosaminidase [124]. Das Gen von VEGF-D liegt auf dem Chromosom Xp22.31 [129]. Über die biologische Bedeutung von VEGF-C und VEGF-D ist bisher nur wenig bekannt. Beide Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Neubildung von Lymphgefäßen [118]. Im erwachsenen Organismus ist VEGF-C am stärksten exprimiert in Geweben, wie dem Herzen, dem Dünndarm, der Plazenta, den Eierstöcken und der Schilddrüse. VEGF-D wird besonders in der Lunge, dem Herzen, der Skelettmuskulatur, dem Dickdarm und dem Dünndarm gefunden [119].

Bei VEGF-E, handelt es sich um ein virales Homolog, das durch den Parapoxvirus ovis NZ-7 (Orf-Virus, Schafpockenvirus) kodiert wird [130]. Dieser Virus gehört zur Gruppe der Pockenviren und ist weit verbreitet unter Schafen und Ziegen, kann aber auch auf den Menschen übertragen werden. Bei dem Befall der Epithelien dieser Lebewesen mit diesem Virus, kommt es zu einer massiven Kapillarproliferation und Kapillardilatation. Die Aktivität von VEGF-E zeigt Ähnlichkeiten mit der von VEGF-A₁₆₅ [131].

Ein relativ neues Mitglied der VEGF Familie ist VEGF-F, welches im Schlangengift gefunden wurde [115, 117, 119, 130, 132].

Die Mitglieder der VEGF-Familie leiten extrazelluläre Signale ins Zellinnere weiter, indem sie an einen VEGF-Rezeptor (VEGFR) binden. Bei den VEGF-Rezeptoren (VEGFR) handelt es sich um Tyrosinkinaserzeptoren, von denen drei verschiedene Typen bekannt sind: VEGFR-1 (Flt-1/ fms-like tyrosinekinase 1), VEGFR-2 (Flk-1/foetal liver kinase-1, KDR/kinase-insert domain receptor) und

VEGFR-3 (Flt-4/ fms-like tyrosinekinase 4) [133-135]. Allen drei Rezeptortyrosinkinassen ist ihr Aufbau aus einer extrazellulären Immunglobulin-Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer Tyrosinkinase-Domäne mit Kinase-Insert gemeinsam [134, 136]. Durch extrazelluläre Bindung der VEGF-Liganden an ihre Rezeptoren, wird eine Rezeptordimerisierung (homotypisch oder heterotypisch) ausgelöst, die dann über eine Kaskade von Phosphorylierungsreaktionen in der Zelle Signale weiterleitet. Die drei verschiedenen Rezeptortypen binden die einzelnen VEGF Formen mit unterschiedlicher Affinität. Die Interaktion der einzelnen VEGF Mitglieder, mit den unterschiedlichen Rezeptortypen, ist in der folgenden Abbildung kurz zusammengefasst.

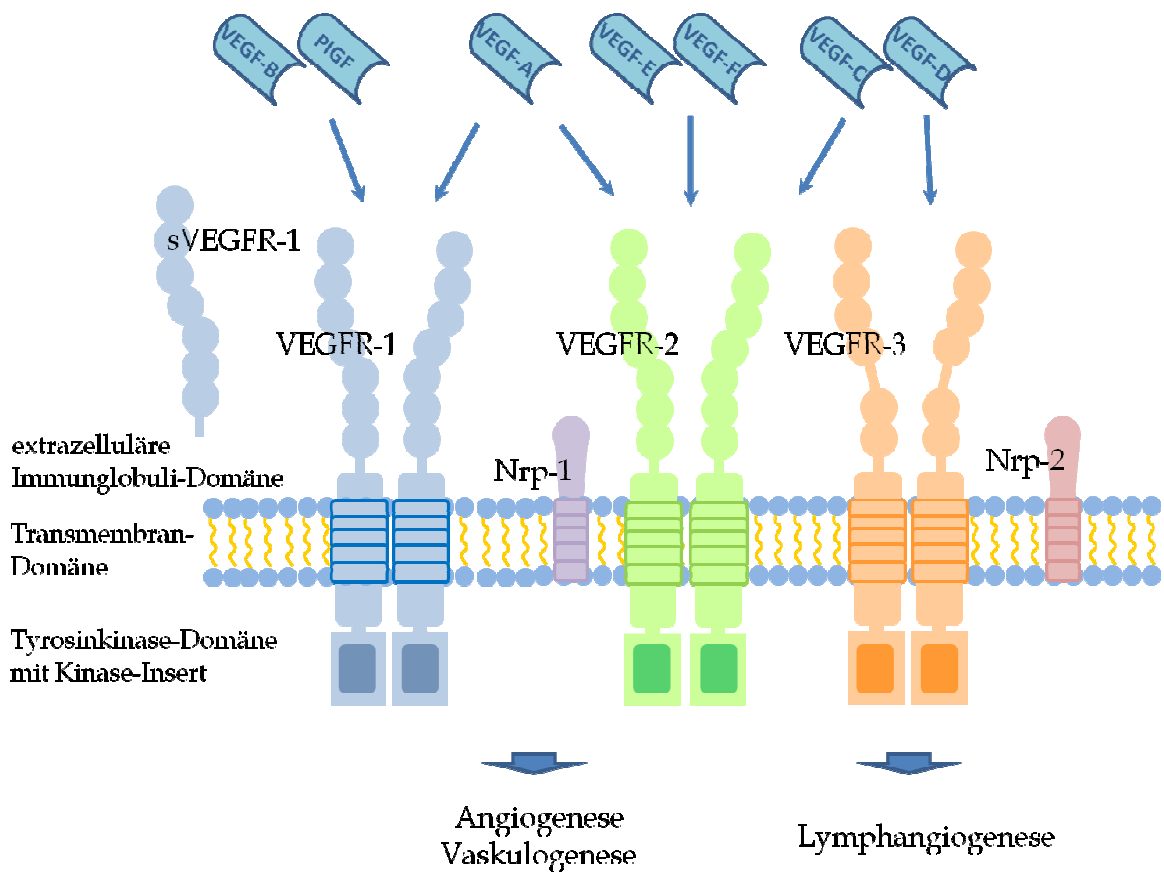


Abbildung 1: Mitglieder der VEGF-Familie und die verschiedenen Rezeptortypen. Eigene Darstellung in Anlehnung an Cebe-Suarez et al. [137].

Der VEGF Rezeptor vom Typ 1 bindet mit hoher Affinität VEGF-A, VEGF-B und PlGF. Der Rezeptor ist ein 180 kDa schweres Transmembranprotein und besteht aus sieben extrazellulären Immunglobulin(Ig)-ähnlichen Domänen, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase. Vom VEGFR-1 existiert desweiteren auch eine nicht membrangebundene lösliche Form, der sVEGFR-1 (soluble VEGFR-1, sFlt-1). Dieser ist lediglich aus der extrazellulären Immunglobulin-Domäne aufgebaut. Die Funktion des sVEGFR-1 besteht in der Bindung von VEGF, ohne jedoch eine Signalkaskade in Gang zu setzen. Dadurch wird, bei starker VEGF-Expression eine überschießende Wirkung des Wachstumsfaktors verhindert [138, 139]. VEGFR-1 wird hauptsächlich auf Gefäßendothelzellen exprimiert, wo er eine Rolle für das Leben und die Wanderung der Zelle spielt. Er befindet sich aber auch auf anderen Zellen, wie z. B. Monozyten, Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen, dendritischen Zellen, Perizyten und hämapoetischen Stammzellen [140-143].

VEGFR-2 bindet die Liganden VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und VEGF-F. Dieser Rezeptor hat strukturell große Ähnlichkeiten mit dem VEGFR-1. Er besitzt ebenfalls einen extrazellulären Anteil aus sieben Domänen. VEGFR-2 wird genauso wie VEGFR-1 auf vaskulären Endothelzellen exprimiert [143, 144]. Seine Funktionen bestehen in der Endothelzellproliferation und -migration sowie in der Erhöhung der Gefäßpermeabilität [143].

VEGFR-3 bindet VEGF-C und VEGF-D. Dieser Rezeptor weist eine, dem Rezeptor Typ 1 und 2 weniger ähnliche Struktur auf. Er besteht, im Unterschied zu VEGFR-1 und 2, nicht aus sieben extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen, sondern aus lediglich sechs Domänen, da eine seiner Domänen kurz nach der Proteinbiosynthese proteolytisch abgespalten wurde. Es sind zwei Isoformen des Rezeptors vom Typ 3 bekannt, eine kurze Form, VEGFR-3s (short) und eine lange Form, VEGFR-3l (long). Beide Formen entstehen durch alternatives mRNA-Splicing [145]. Während VEGFR-1 und VEGFR-2 hauptsächlich auf vaskulären Endothelzellen vorkommen, ist VEGFR-3 vor allem auf lymphatischen Endothelzellen zu finden [143]. Seine Aktivierung induziert Zellwachstum und Lymphgefäßentwicklung [146, 147].

Desweiteren existieren neben den drei VEGF Rezeptoren, die Neuropilinrezeptoren, von denen man zwei verschiedene Typen unterscheidet: Nrp-1 und Nrp-2. Bei diesen handelt es sich um Zelloberflächen-Glykoproteine ohne intrazelluläre Enzymaktivität. Neuropilinrezeptoren waren zunächst nur bekannt als Semaphorin-Rezeptoren, wo sie an der Axon- und Neuronalentwicklung beteiligt sind. Später wurde dann herausgefunden, dass sie auch als Co-Rezeptoren für VEGF dienen und somit am Prozess der Angiogenese beteiligt sind [133].

Die Expression der VEGF sowie der VEGF Rezeptoren wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Unter anderem spielt das Sauerstoffangebot im Gewebe eine entscheidende Rolle, so zählt Hypoxie zu den wichtigsten Faktoren einer Hochregulation [148]. Beispiele für weitere Faktoren sind eine Reihe von Zytokinen (z.B. TGF-alpha, TGF-beta, bFGF, TNF-alpha, EGF, KGF, PDGF) [122, 149]. Teilweise ist die Hochregulation von VEGF auch hormonabhängig (z.B. durch Geschlechtshormone in Mamma- und Prostatakarzinomen) [150, 151]. Im gesunden, adulten Organismus ist die Angiogenese in der Regel auf ein Minimum an Endothelzellumsatz reduziert. Angiogenesefördernde und angiogenesehemmende Faktoren befinden sich im Gleichgewicht („angiogene Balance“). In nur wenigen Fällen ist das Wachstum neuer Blutgefäße physiologischerweise hochreguliert, wie z.B. bei der Wundheilung, oder im Rahmen des weiblichen Menstruationszyklus. Bei einigen Situationen läuft die Angiogenese aber aus pathologischen Gründen unkontrolliert ab. So wird eine verstärkte VEGF-Expression bei einer Reihe von Tumoren vorgefunden. Aber auch bei einigen nicht malignen Erkrankungen, wie Rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis, kardiovaskuläre Ischämie, periphere vaskuläre Erkrankungen, diabetische Retinopathie, Endometriose, Präeklampsie, ovariell Hyperstimulationssyndrom und Psoriasis spielen eine veränderte Expression des VEGF eine Rolle [119, 152-158].

Auf die Rolle einer veränderten VEGF-Expression in Tumoren soll im Folgenden näher eingegangen werden.

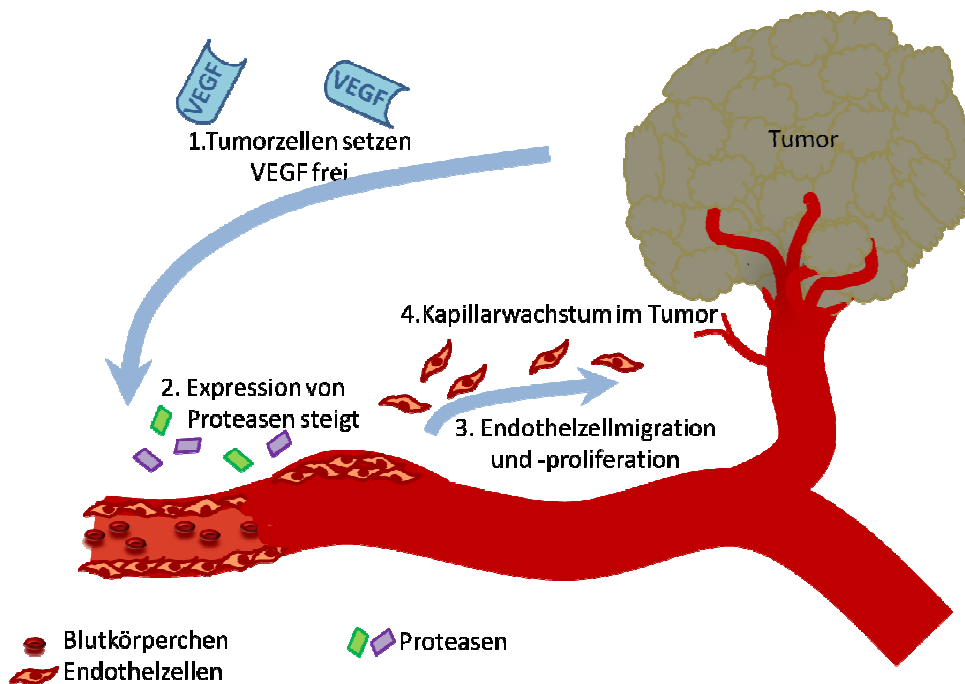


Abbildung 2: Bedeutung von VEGF in der Tumorangiogenese
Eigene Darstellung in Anlehnung an Carmeliet [159].

1. VEGF wird von den Tumorzellen freigesetzt.
2. Durch VEGF wird die Expression von Proteasen verstärkt, welche Umbauvorgänge an den Gefäßen in Gang setzen.
3. Endothelzellen wandern in Richtung des angiogenen Stimulus aus und proliferieren.
4. Neue Kapillaren wachsen in den Tumor ein.

Der Zusammenhang zwischen Tumoren und Angiogenese wird schon seit mehr als 100 Jahren diskutiert. Bereits 1907 beschrieb Goldman die hohe Gefäßdichte in und um Tumoren [160]. Eine intensive Forschung im Bereich der Tumorangiogenese ging von dem amerikanischen Wissenschaftler, Judah Folkman, aus. Er stellte 1971 die Hypothese auf, dass ohne die Neubildung von Gefäßen in und um Tumoren, deren Wachstum nicht möglich ist [161]. Abbildung 2 gibt einen groben Überblick über die Bedeutung des vaskulären endothelialen Gefäßwachstumsfaktors in der Tumorangiogenese. Wächst ein maligner Tumor über eine Größe von 1-3 mm³ hinaus, kann die Versorgung der bösartigen Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusion alleine nicht mehr aufrecht erhalten werden. Für das Wachstum und die Proliferation des Tumors ist dann die Formation und Entwicklung neuer Blutgefäße essentielle Voraussetzung. Zudem stellt die Angiogenese eine der notwendigen Grundlagen für die Tumormetastasierung und das Wachstum von Metastasen dar [162, 163]. Um An-

schluss an das Blutgefäßsystem zu bekommen und somit eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu gewährleisten, werden von den Tumorzellen Angiogenese-Stimulatoren hoch und Angiogenese-Inhibitoren herunterreguliert. Diese Störung des Gleichgewichts zwischen den angiogenen Faktoren („angiogenic switch“) führt zur Angiogenese und zum Wachstum des Primärtumors sowie seiner Metastasen [164]. Die einzelnen Schritte der Tumorangiogenese laufen, wie aus der oben stehenden Abbildung hervorgeht, in einer bestimmten Abfolge ab. Schlüsselfaktor der Angiogenese ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor, der von den Tumorzellen sezerniert wird [165]. Viele Tumoren, darunter auch Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs, schütten hohe Konzentrationen von VEGF aus. VEGF bindet dann an VEGF-Rezeptoren auf Endothelzellen benachbarter Blutgefäße. Hierdurch wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, wodurch schließlich die Expression verschiedener Proteasen (z.B. Metalloproteasen) verursacht wird. Diese Proteasen führen zu folgenden Umbauvorgängen an den vorhandenen Gefäßen: Es kommt zur Lyse der extrazellulären Matrix und der vaskulären Basalmembran mit folgender erhöhter Permeabilität der Kapillaren. Hierdurch wird der Austritt von Plasmaproteinen und die Bildung einer gelartigen Matrix außerhalb der Kapillaren ermöglicht und es entsteht ein ideales Substrat für das Wachstum neuer Gefäße. Durch die stellenweise aufgelöste Basalmembran können Endothelzellen letztlich in Richtung des angiogenen Stimulus auswandern und proliferieren, sodass neue Kapillaren in den Tumor einwachsen. Die im Tumor neu entstandenen Kapillaren zeigen, im Vergleich zu normalen Gefäßen, verschiedene, morphologische Veränderungen, die zu einer ungleichmäßigen Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen führen. Dadurch finden sich bei einigen soliden Tumoren hypoxische und anoxische Areale innerhalb eines Tumors, die ursächlich für eine verminderte Sensitivität gegenüber einer Radio- oder Chemotherapie sind und weiterhin die Expression angiogener Faktoren stimulieren [166, 167]. In vielen Tumoren sind eine gesteigerte Tumolvaskularisation und die Expression von proangiogenetischen Faktoren durch den Tumor assoziiert mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium und einer schlechten Prognose [133, 168-172].

Die gute Kenntnis über die Bedeutung von VEGF in der Tumorangiogenese führte zur Entwicklung von Substanzen, die das Ziel haben, durch Hemmung der Angiogenese den Tumor „auszuhungern“, seine Rückbildung zu erreichen und das Risiko einer Metastasierung zu senken. Eine Hemmung von VEGF und VEGF-Rezeptoren zeigt in verschiedenen präklinischen Studien eine starke Abnahme der Tumorangiogenese und des Tumorwachstums [76, 173]. Wesentliche Angriffspunkte der Angiogenese-Inhibition sind die proliferierenden Endothelzellen im Tumorbereich. Nach heutigem Stand der Wissenschaft sind drei verschiedene anti-angiogene Strategien möglich [174]:

1. Neutralisation bzw. Inhibition angiogener Mediatoren und/oder Stimulation bzw. Zufuhr von natürlichen Inhibitoren der Angiogenese.
2. Inhibition von Synthese und Umbau der Gefäßmembran sowie des Abbaus der extrazellulären Matrix.
3. Inhibition der endothelialen Zellproliferation, Migration und Formation neuer Blutgefäße.

Erstmals wurde 2005 mit Bevacizumab (Avastin®) ein Hemmstoff der Angiogenese zugelassen. Bevacizumab ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper, der mit hoher Affinität VEGF bindet, so dass dieser nicht mehr an dem VEGF-Rezeptor andocken kann und folglich der Angiogenese-Prozess und damit die Vaskularisation des Tumors unterbunden werden. Bisher ist der monoklonale Antikörper für die Behandlung von insgesamt fünf Tumorentitäten anerkannt [175]. 2005 wurde Bevacizumab zur First-Line-Therapie des metastasierten, kolorektalen Karzinoms, als erster reiner Angiogenese-Hemmer, in Europa zugelassen [176]. Der beachtliche Erfolg des Antikörpers führte zu Indikationserweiterungen. 2007 wurde Bevacizumab zur Behandlung von Patienten mit Brustkrebs und beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zugelassen. Die Erlaubnis für die Behandlung des Nierenzellkarzinoms wurde dann im darauffolgendem Jahr erteilt [177]. Für die Therapie des rezidierten Glioblastoms erfolgte die Zulassung im Jahr 2009 in den USA [178]. Derzeit laufen zahlreiche Studien, die die Wirksamkeit von Bevacizumab bei weiteren Tumoren untersuchen [179].

Der antiangiogenetische Effekt von VEGF-Hemmern, wie z.B. Bevacizumab in der Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereich, liefert in einigen Studien erfolgsversprechende Ergebnisse. Zugelassen sind VEGF-Inhibitoren im Kopf-Hals-Bereich aber noch nicht [50, 62, 180, 181].

In der vorliegenden Arbeit wurden für die immunhistochemischen Färbungen ein VEGF-A und ein VEGF-C Antikörper benutzt.

Der VEGF (A-20) sc-152 Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology ist ein polyklonale Kaninchen-Antikörper, der zum Nachweis der Splicevarianten VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅ und VEGF-A₁₈₉ Anwendung findet. Er wurde mit dem Medium Antibody Diluent in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt (empfohlene Hersteller-Verdünnung: 1:50 bis 1:500).

Bei VEGF (C-1) sc-7269, der Firma Santa Cruz Biotechnology, handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper, der die Aminosäuren 1 bis 140 von VEGF hervorhebt. VEGF (C-1) wurde in einer Verdünnung von 1:200 mit Antibody Diluent angewendet (empfohlene Hersteller-Verdünnung: 1:50 bis 1:500).

Der VEGF Antikörper weist ein überwiegend cytoplasmatisches Färbemuster auf.

2.2.3. EGFR

Der Epidermal Growth Faktor Rezeptor (EGFR, erbB-1, HER-1) ist ein Mitglied der EGFR/ErbB-Familie, eine Unterfamilie, die vier eng verwandte Rezeptortyrosinkinasen (EGFR/HER-1/ErbB-1, HER-2/neu/ErbB-2, HER-3/ErbB-3 und HER-4/ErbB-4) der Klasse 1 umfasst. Allen vier Rezeptoren der ErbB-Familie gemeinsam ist ihre Struktur, die sich aus drei Anteilen zusammensetzt: die extrazelluläre Domäne (N-Terminus), an der spezifische Liganden binden, die transmembrane α -Helix und die intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität im Zytoplasma (C-Terminus). Der ErbB-3-Rezeptor besitzt allerdings keine intakte Tyrosinkinaseaktivität und ist nur als Heterodimer aktiv. Das heißt, um ein Signal in das Zellinnere weiterzuleiten, ist eine Dimerisierung mit einem ande-

ren Mitglied der ErbB-Familie erforderlich.

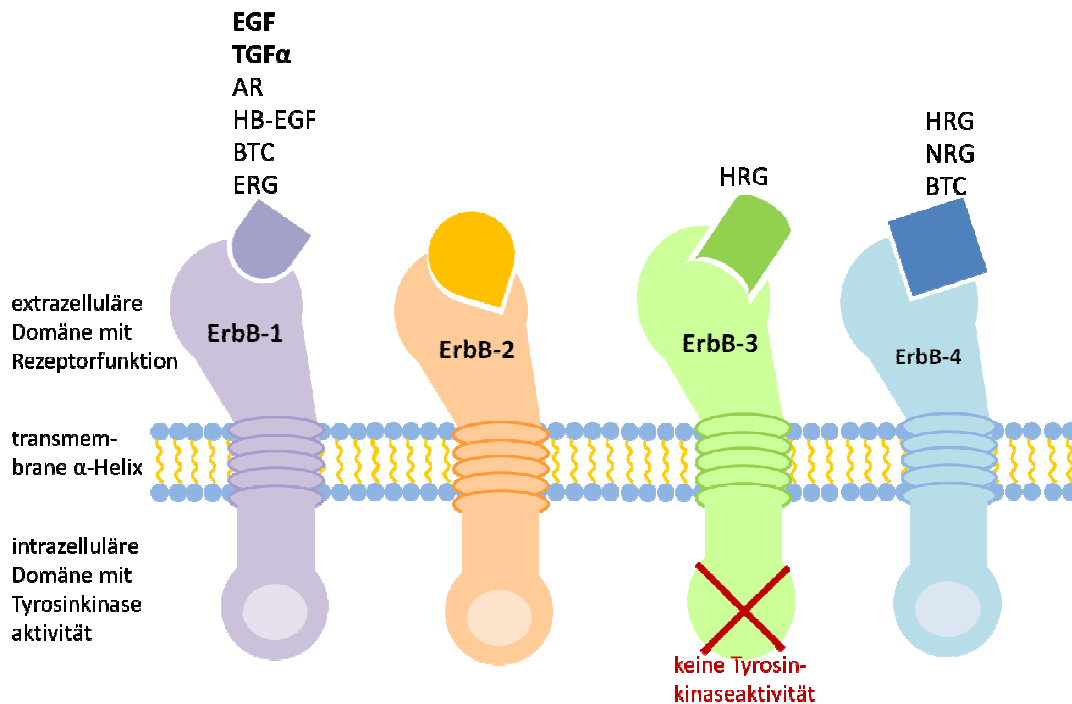


Abbildung 3: EGFR/ErbB-Familie
Eigene Darstellung in Anlehnung an Roskoski [182].

Die Aktivierung des EGFR erfolgt maßgeblich durch den Epidermal Growth Faktor (EGF) und den Transforming Growth Faktor-alpha (TGF- α). Neben EGF und TGF sind Amphiregulin (AR), Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), Bettacellulin (BTC), Epiregulin (ERG) und Neureguline (NRG), auch bekannt als Hereguline (HRG) weitere Liganden, die an die Rezeptoren der EGFR-Familie binden [183-185]. Diese Liganden weisen unterschiedliche Affinitäten für die Bindung an die verschiedenen Rezeptoren auf, wobei für den ErbB-2-Rezeptor bisher noch kein spezifischer Ligand identifiziert werden konnte [186].

Durch die extrazelluläre Ligandenbindung wird eine Konformationsänderung der Rezeptoren ausgelöst (Dimerisierung von Rezeptormonomeren zu Rezeptordimeren). Hierbei können sowohl Homodimere (z.B. EGFR+EGFR) als auch Heterodimere (z.B. EGFR+ErbB2) entstehen. Als Folge dieser Konformationsänderung wird die intrinsische Tyrosinkinase durch Autophosphorylierung aktiviert.

Die phosphorylierten Tyrosinkinasen dienen als Andockstellen für zytoplasmatische Botenproteine (wie z. B. MAPK/Mitogen-Aktivierte-Proteinkinase oder PI3K/Phosphatidylinositol-3-Kinase), welche eine Reihe von Signalkaskaden einleiten [184, 186, 187]. Diese Signaltransduktion führt letztlich zu Änderungen im Expressionsmuster von Genen, die u.a. die Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung steuern. Somit wird der EGF-Rezeptor zu den Rezeptoren für die Wachstumsfaktoren gezählt. Die Überexpression des epidermalen Growth Faktor Rezeptor und das Vorkommen mutierter Formen wird in einer Anzahl von malignen Tumoren gefunden [188-190]. Die Hochregulation führt zu einem unkontrollierten Wachstum der Tumorzellen. Eine gesteigerte EGFR-Aktivität geht somit mit vermehrtem Wachstum, Invasion und Metastasierung des Tumors einher. Außerdem wird die Angiogenese gefördert und der natürliche Zelltod durch Apoptose gehemmt.

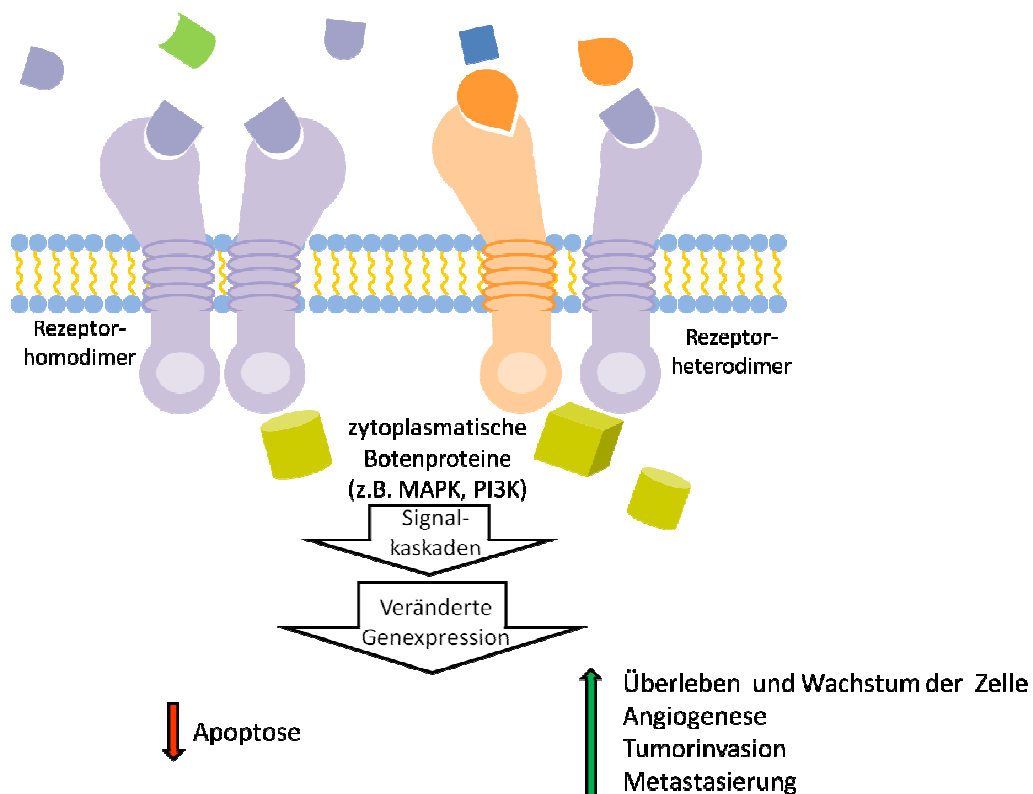


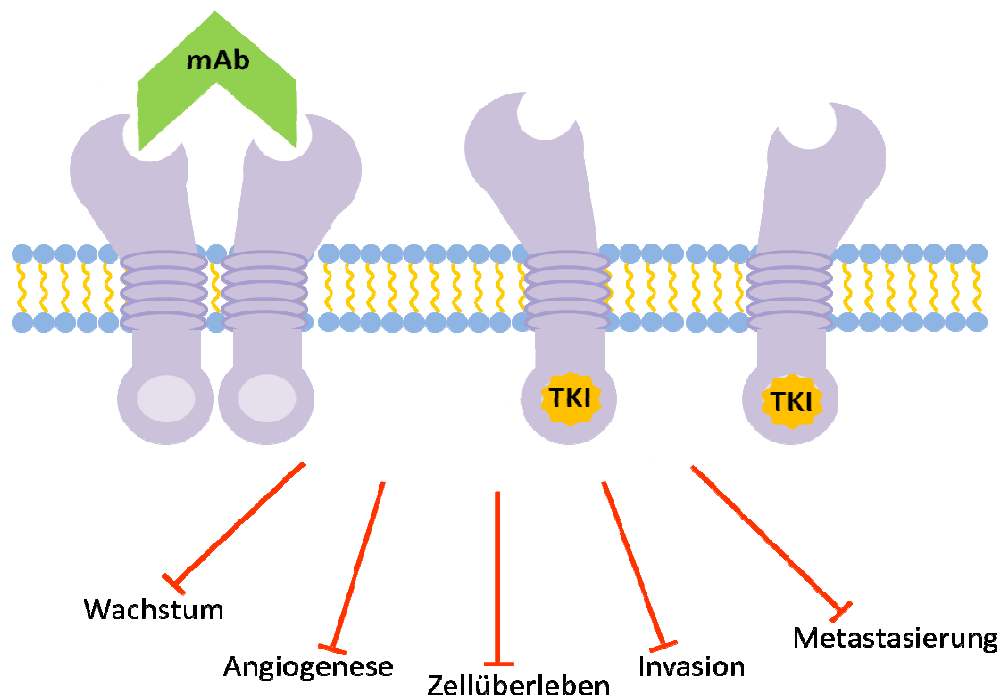
Abbildung 4: Folgen einer erhöhten EGFR-Expression
Eigene Darstellung in Anlehnung an Roskoski [182].

Eine starke Überexpression des Epidermal Growth Faktor Rezeptor korreliert mit einer schlechteren Prognose und einer geringeren Sensitivität gegenüber Radiotherapie in einer Vielzahl von Tumoren, wie auch in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs [184, 191-195]. Die EGFR-Überexpression auf Zelllinien des Plattenepithelkarzinoms des Kopf- und Halsbereiches wurde zum ersten Mal von Cohen et al. in den 80er Jahren beschrieben [196].

In normalen Zellen variiert die Expression des EGFR-Rezeptors zwischen 40.000 und 100.000 Rezeptoren pro Zelle [197]. Laut Grandis et al. und Angaben anderer Autoren sind der EGF-Rezeptor und sein Ligand, TGF- α , in bis zu 90% der Fälle bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches hochreguliert [198-200].

Die Überexpression des EGFR ist ein früher Prozess in der Kanzerogenese von HNSCC, die bereits in der „gesunden“ Mukosa von Tumorpatienten nachgewiesen wird und parallel zu den beobachteten histologischen Veränderungen der Schleimhaut stetig ansteigt [201-203].

Die Hochregulation des EGFR in HNSCC, sowie die Korrelation dieser mit einer schlechteren Prognose, ließ das Interesse an der Rolle des EGF-Rezeptor als Zielstruktur in der Therapie von Karzinomen wachsen. So zielen relativ neue Strategien in der Therapie von malignen Erkrankungen darauf ab, das Tumorstadium durch Inhibitoren des EGFR zu unterbinden. Wie in der folgenden Abbildung dargestellt, sind zwei verschiedene Strategien der EGFR-Inhibition beschrieben. Die eine Möglichkeit beruht auf der direkten Hemmung der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne durch monoklonale Antikörper (mAb), wie Cetuximab (Erbix®), Panitumumab (Vectibix®) und Zalutumumab. Die andere besteht in der Antagonisierung der intrazellulären Domäne durch niedermolekulare Tyrosinkinaseinhibitoren (TK-Inhibitoren/TKI), wie Gefitinib (Iressa®) und Erlotinib (Tarceva®) [184, 190, 204-209]. Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist für die Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches bisher nur der EGFR-Antikörper Cetuximab (Erbix®, C225) zugelassen. Dieser ist gegen die Ligandenbindungsstelle von EGFR gerichtet und blockiert die Aktivierung der Tyrosinkinase durch EGF oder TGF α [210].



mAb: monoklonale Antikörper

TKI: Tyrosinkinaseinhibitoren

Abbildung 5: Strategien zur EGFR-Inhibition.
Eigene Darstellung in Anlehnung an Roskoski [182].

Für die immunhistochemischen Färbungen im Rahmen dieser Arbeit wurde der monoklonale Kaninchen-Antikörper (pY1068), der Firma Epitomics benutzt. Dieser soll laut Herstellerangaben in der Immunhistochemie, in einer Verdünnung von 1:250 bis 1:500 Anwendung finden, in den folgenden Versuchen wurde er in einem Verhältnis von 1:300 mit dem Medium Antibody Diluent verdünnt.

Das Färbemuster des EGFR-Antikörpers ist membranständig, nukleär sowie cytoplasmatisch.

2.2.4. C-Src

C-Src ist ein Protein aus der Familie der Src-Kinase, mit einer Größe von 536 Aminosäuren und einem Molekular-Gewicht von 60 kDa. Das Protein wurde in

den 1970er Jahren durch Bishop und Varmus et al. als zelluläres Homolog von v-Src (virales Src, Onkogen im Rous-Sarkom-Virus, welches bei Hühnern einen Bindegewebstumor, das Rous-Sarkom, hervorruft) identifiziert [211-215]. Seit der Entdeckung von c-Src, wurden neun weitere, mit c-Src eng verwandte Varianten, im menschlichen Genom identifiziert (Yes, Fyn, Yrk, Blk, Lck, Hck, Lyn, Fgr und Frk) und zusammen als Familie der Src-Kinasen (SFKs, Src family kinases) benannt [216, 217]. SFKs sind die größte Familie von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen [218]. Als Tyrosinkinasen katalysieren sie die Übertragung von ATP (Adenosin-Tri-Phosphat) auf Zielproteine und sind damit grundlegend an verschiedenen intrazellulären Signalwegen beteiligt. Sie sind fundamentaler Baustein einer großen Anzahl verschiedener biologischer Funktionen, zu denen Zellwachstum, Zellproliferation, Zellmigration, Überleben der Zelle und Angiogenese gehören [218, 219].

Im Allgemeinen können die Familienmitglieder der Src-Kinasen, bezogen auf ihr Vorkommen in den verschiedenen Geweben, in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Zu der ersten Gruppe zählen die Src-Kinasen Src, Fyn und Yes, die ubiquitär in allen Geweben nachgewiesen werden. Die anderen Kinasen kommen nur in ausgewählten Geweben vor. Wobei Hck, Lck, Lyn, Blk, Yrk und Fgr wesentlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, wohingegen Frk-verwandte Kinasen vorherrschend in epitheliale Gewebe zu finden sind [220-223].

Strukturell sind die Mitglieder der Src-Familie eng miteinander verwandt. Abbildung 6 gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau von Src-Kinasen am Beispiel der humanen c-Src-Kinase.

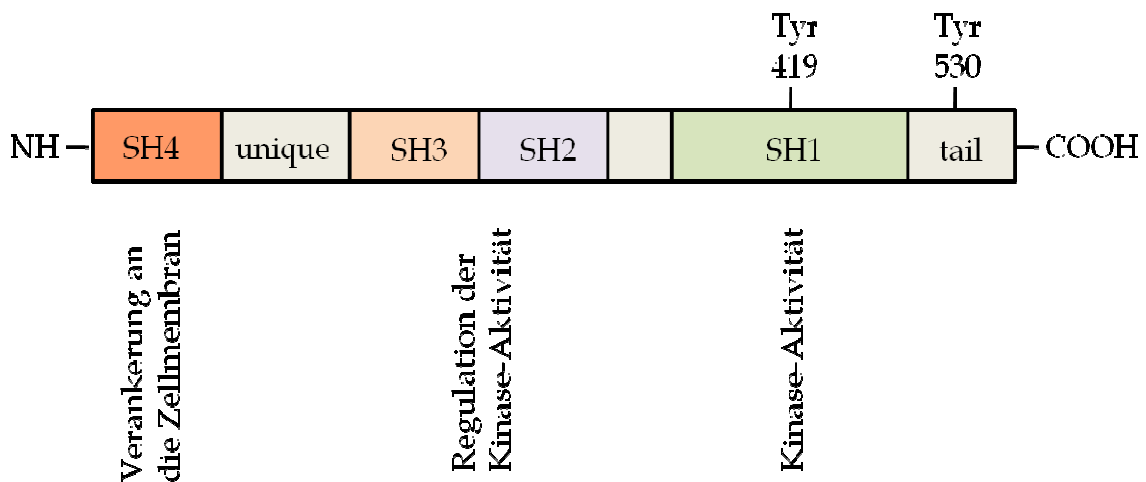


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur der c-Src-Kinase. Eigene Darstellung in Anlehnung an Yeatman [224].

Alle Mitglieder der Familie der Src-Kinasen lassen sich in vier funktionelle Abschnitte, die sogenannten vier Src-Homologiedomänen (SH1-4), gliedern. Die N-terminale SH4-Domäne beinhaltet eine Myristoylierungsstelle und ist verantwortlich für die Verankerung der Src-Kinase an der zytosolischen Seite der Zellmembran. Hierbei wird Myristinsäure über eine Amidbindung an ein konserviertes Glycin gebunden. Die SH3 und SH2-Domäne spielen eine wichtige Rolle in der negativen Regulation der enzymatischen Funktion der Src-Kinase. Die SH3-Domäne bindet bevorzugt prolinreiche Liganden, während die SH2-Domäne mit hoher Affinität als Erkennungsregion für phosphorylierte Tyrosinreste fungiert. Die SH1-Domäne ist die Domäne mit der höchsten Sequenzhomologie innerhalb der Src-Kinasen Familie und stellt die eigentliche Kinase-Domäne dar. Sie beinhaltet eine Autophosphorylierungsstelle, die ATP-Bindungsstelle, an welcher sich die Kinase selbst phosphorylieren und somit aktivieren kann. Zwischen der SH4-Domäne und der SH3-Domäne findet sich eine Region, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäuresequenz innerhalb der verschiedenen Mitgliedern der Src-Familie als sogenannte inhomologe „unique“-Domäne bezeichnet wird. Diese dient vermutlich zur spezifischen Wechselwirkung der Mitglieder mit anderen Proteinen und bestimmt somit die Spezifität der Kinasen. Im Anschluss an die katalytische SH1-Domäne findet

sich ein am C-Terminus gelegener Tyrosinrest, die sog. „Tail-Region“, welche ebenfalls wie die SH2 und 3-Domäne wichtig für die negative Regulation der Kinase-Aktivität ist [218, 225].

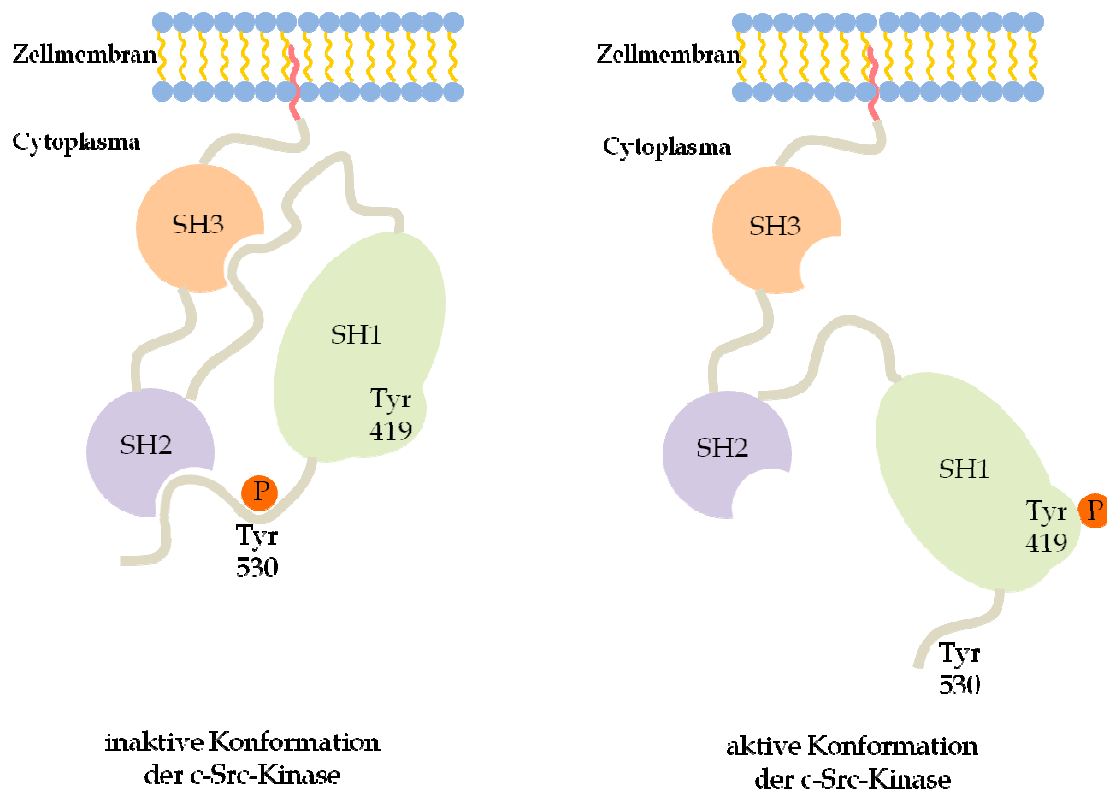


Abbildung 7: Inaktive und aktive Konformation von c-Src. Eigene Darstellung in Anlehnung an Yeatman [224].

Da Src-Kinasen entscheidende Aufgaben für das Überleben und die Funktion der Zelle haben, ist ihre Regulation vielen Mechanismen unterlegen. Abbildung 7 zeigt, dass die Aktivität der Src-Kinasen vom Phosphorylierungszustand von zwei Tyrosinresten, Tyr 419 und Tyr 530 abhängig ist. Tyr 419 ist ein autoregulatorisches Tyrosin, welches nach Phosphorylierung zu einer Stimulation der Kinase-Aktivität führt, dagegen handelt es sich bei Tyr 530 um einen negativ-regulatorischen Tyrosinrest, der im phosphorylierten Zustand eine Hemmung der Kinase-Aktivität verursacht. Tyr 530 ist also eine inhibierende und Tyr 419 eine aktivierende Phosphorylierungsstelle. Der linke Teil der Abbildung 7 zeigt die inaktive, bzw. geschlossene, Konformation der humanen c-Src-Kinase. Der

negativ-regulatorische Tyrosinrest im C-Terminus (Tyr 530) ist phosphoryliert und interagiert mit der SH2-Domäne, die SH3-Domäne bindet an die Kinase-tragende SH1-Domäne. Somit entsteht eine geschlossene Konformation, welche die Bindung von ATP an das katalytische Zentrum blockiert und somit die Aktivierung der Kinase verhindert. Im rechten Bereich der Abbildung sieht man die aktive bzw. offene Konformation der Kinase. Tyr 530 ist dephosphoryliert, während das autoregulative Tyrosin an Position 419 (Tyr 419) phosphoryliert ist [218, 224]. Eine Phosphorylierung des Tyrosins 530 im C-terminalen Schwanz der c-Src-Kinase kann z.B. von der Tyrosinkinase Csk oder Chk (Csk-homologous kinase, Csk-homologe Kinase) ausgelöst werden (vgl. Abbildung 8).

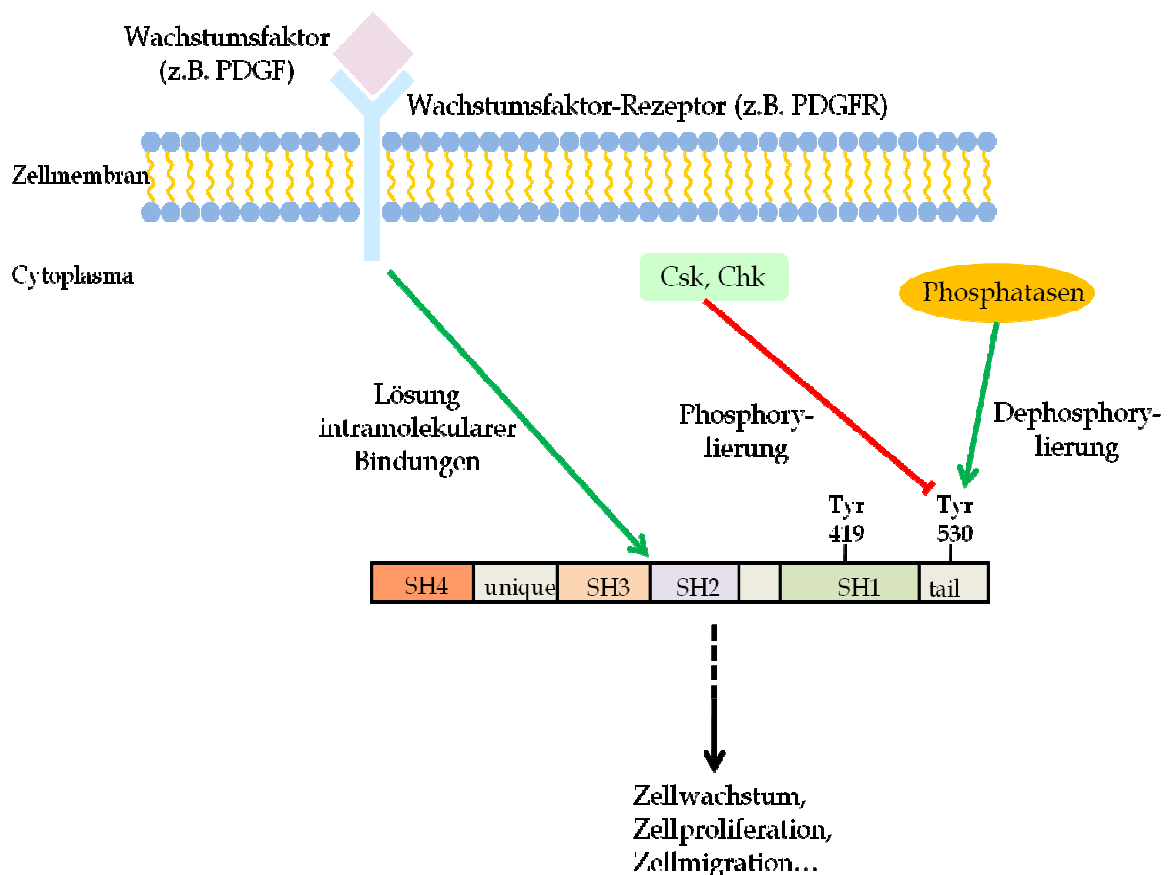


Abbildung 8: Regulation der Aktivität von c-Src.
Eigene Darstellung in Anlehnung an Yeatman [224].

Csk hat einen ähnlichen Aufbau wie Src, jedoch ohne den N-terminalen Membrananker (SH4-Domäne) und ohne die C-terminale Schwanzregion („Tail-Region“). Genauso wie c-Src ist Csk in Säugerzellen ubiquitär exprimiert. Csk phosphoryliert den negativ-regulierenden Tyrosinrest im C-Terminus (Tyr 530) von aktivem c-Src, wodurch diese Region von der Src-SH2-Domäne gebunden wird und Src in den inaktiven Zustand zurück kehrt [224, 226].

Es bestehen mehrere Mechanismen, Kinasen der Src-Familie zu aktivieren (vgl. Abbildung 8). Eine bedeutende Möglichkeit ist die Verdrängung der SH2 bzw. SH3-Domäne von ihren intramolekularen Interaktionspartnern. Fremde Proteine, die prolinreiche Aminosäuresequenzen oder phosphorylierte Tyrosinreste enthalten, können die SH2- bzw. SH3-Domänen mit höherer Affinität binden und diese so aus ihren intramolekularen Bindungen lösen. Ein Beispiel für diese Proteine sind Wachstumsfaktoren-Rezeptoren, wie der PDGF-Rezeptor (PDGFR). Sind die SH2- bzw. SH3-Domänen erst einmal aus ihren intramolekularen Bindungen gelöst und die geschlossene Konformation der Src-Kinase aufgebrochen, folgt eine rasche Autophosphorylierung von Tyr 419, die zu einer Aktivierung der Kinase führt. Eine weitere Möglichkeit, die Src-Kinase zu aktivieren, besteht in der Dephosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrestes Tyr 530 durch Phosphatasen.

In gesunden Zellen sind die Src-Kinasen streng reguliert und liegen nur vorübergehend im aktiven Zustand vor. Die meiste Zeit sind sie inaktiviert und üben keine katalytische Funktion aus. Sie werden lediglich dann kurzzeitig aktiviert, wenn sie im Rahmen der Signaltransduktion gebraucht werden. So lässt sich annehmen, dass Störungen in den verschiedenen Bereichen, die für eine positive oder negative Regulation der Src-Kinasen verantwortlich sind, zu einer anhaltenden Aktivierung der Src-Kinasen führen und folglich ihr onkogenes Potential freisetzen können. Tatsächlich ist durch viele Studien belegt, dass Kinasen der Src-Familie eine entscheidende Rolle in der Entstehung und dem Wachstum von malignen Erkrankungen spielen [216, 218, 224, 227-248]. Sowohl eine Überexpression der Src-Proteine und, von noch größerer Bedeutung, eine gesteigerte Enzymaktivität, sind in neoplastischem Gewebe im Vergleich zu ge-

sundem Gewebe, feststellbar [218, 234, 249]. So ist bei einigen Karzinomen die Src-Kinase-Aktivität oft um ein Vielfaches erhöht. Zu diesen Tumoren gehören unter anderem Mammakarzinome, Pankreaskarzinome, Prostatakarzinome, Kolonkarzinome, Lungenkarzinome und auch Karzinome des Kopf- und Halsbereichs [230, 242, 249]. Weiterhin wurde beschrieben, dass das Ausmaß der gesteigerten Kinase-Aktivität in Korrelation mit dem Tumorstadium, der Progression der Erkrankung, dem Metastasierungsgrad und der Prognose steht [224, 229, 249, 250].

Src-Kinasen stellen attraktive Zielmoleküle für eine molekulare Therapie von vielen malignen Erkrankungen dar. Eine Reihe von Src-Kinase-Inhibitoren wurde bereits in präklinischen Studien getestet [229, 251].

Für die, im Folgenden beschriebenen, immunhistochemischen Färbungen wurde der monoklonale Maus-Antikörper CSK (C-Src Tyrosinkinase) Klon 3A3 der Firma Abnova verwendet. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:1000 mit dem Medium Antibody Diluent angewandt.

2.3. Immunhistochemische Färbung

Der erste Schritt bestand darin, das in Paraffin eingebettete Gewebe mit dem Schlittenmikrotom zu schneiden (ca. 1 µm dünn). Die Schnitte wurden dann auf mit Silan beschichteten Objektträgern aufgezogen. Anschließend ließ man die Schnitte bei Raumtemperatur trocknen. Hierfür war eine ausreichend lange Zeit (mind. 12 Stunden) erforderlich, um einen guten Halt auf den Objektträgern zu gewährleisten. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte für mindestens 25 Minuten in Xylol überführt, um das Paraffin vollständig aus dem Gewebe herauszulösen. Bei ungenügender Entparaffinierung können Paraffinreste im Gewebe verbleiben, welche verhindern, dass der Primärantikörper an diesen Stellen das Antigen erkennt. Unmittelbar nach dem Entparaffinieren wurde das Gewebe in der absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70% Ethanol) rehydriert. Danach wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült. Es

folgte die hitzeinduzierte Antigendemaskierung im Dampfdrucktopf. Abhängig vom Antikörper wurde entweder mit Target (VEGF-C, EGFR, C-Src), Citronensäure pH6 (VEGF-A) oder Tris-EDTA-Puffer (MAGE) gekocht. Die Kochzeiten variierten je nach verwendetem Puffer und nach der Menge der zu kochenden Schnitte zwischen 15 und 19 Minuten. Nach dem Kochen wurden die Schnitte wiederum mit destilliertem Wasser gespült und daraufhin auf Coverplates (Shandon Coverplate™) fixiert. Die folgenden Färbeschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Bei allen Färbeschritten wurden jeweils 100 µl Flüssigkeit verwendet. Zunächst wurde der jeweilige Antikörper mit dem Antikörperverdünnungsmedium (Antibody Diluent, DAKO) in entsprechender Verdünnung (vgl. Tabelle 6) angewendet. Die Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper erfolgte für 60 Minuten. Anschließend wurde dreimal mit PBS gespült. PBS ist eine Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, die in diesem Fall mit pH 7,4 hergestellt wurde. Mit dieser Pufferlösung wird zwischen den einzelnen Arbeitsschritten eines immunhistochemischen Prozesses gewaschen, d.h. man wäscht nicht gebundene bzw. unspezifisch gebundene Antikörper vom Schnitt herunter, um eine nachfolgende spezifische Antikörper-Bindung zu gewährleisten. Danach wurden die Schnitte mit dem Advance™ HRP Detektionssystem behandelt. Hierbei handelt es sich um ein System zur Identifizierung von Antigenen unter Verwendung von primären Maus- oder Kaninchen-Antikörpern. Dabei wurde als erster Schritt Advance™ HRP Link für 20 Minuten angewendet. Nachdem dreimalig mit PBS gespült wurde, folgte der zweite Schritt des HRP Detektionssystem. Advance™ HRP Enzym wurde ebenfalls für 20 Minuten inkubiert, woraufhin wiederum dreimal mit PBS gespült wurde. Anschließend erfolgte die Behandlung der Schnitte mit DAB+ (3,3 Diaminobenzidin) für 10 Minuten. DAB ist ein Peroxidasesubstrat, das, ein in Alkohol, unlösliches braunes Endprodukt bildet. Jetzt wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen und für drei Minuten mit Hämalaun gegengefärbt. Schließlich wurden die Schnitte noch 10 Minuten lang in Leitungswasser gewässert. Vor dem Eindecken der Schnitte mit Folien am Automat von Sakura mussten die Schnitte noch in Ethanol und Xylol behandelt werden.

Antikörper	Verdünnung
MAGE-A	1:100
VEGF-A	1:100
VEFF-C	1:200
EGFR	1:300
C-src	1:1000

Tabelle 6: Verwendete Antikörper mit jeweiliger Verdünnung

Sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen wurden zur Qualitätssicherung der immunhistochemischen Untersuchungen durchgeführt. Bei den Positivkontrollen wurde, mithilfe verschiedener Referenzgewebe die Reaktivität der eingesetzten Antikörper getestet. Voraussetzung für dieses Kontrollgewebe ist, dass das gesuchte Antigen nachweislich in diesem vorkommt. Das Referenzgewebe muss nicht unbedingt pathologischer Herkunft sein, sondern kann ebenso physiologisch sein. Als Referenzgewebe in dieser Arbeit diente nicht-neoplastisches humanes Nierengewebe (VEGF-A), nicht-neoplastisches humanes Kolongewebe (c-Src), Gewebe eines humanen Mammakarzinoms (VEGF-C, EGFR) und Gewebe eines humanen Hodenkarzinoms (MAGE-A). Die Negativkontrollen wurden durchgeführt, um unspezifische Reaktionen des Primärantikörpers oder des Detektionssystems mit dem Gewebe aufzuweisen. Hierbei wurde der Primärantikörper oder der Sekundärantikörper weggelassen.

2.4. Auszählung der gefärbten Zellen

Bei der Auszählung der gefärbten Zellen wurde unter dem Mikroskop bestimmt, wie viel Prozent der Tumorzellen gefärbt sind. Um hierbei ein möglichst sicheres Ergebnis zu erzielen, wurde die Auszählung zweimal durchgeführt, wobei zwischen der ersten und der zweiten Auszählung ein Abstand von zwei Wochen bestand. Für eine bessere Übersicht und im Hinblick auf die statistische Aus-

wertung wurde ein Score von 0 bis 4 festgelegt. Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht die Einteilung der Scores.

Score	Anzahl gefärbter Tumorzellen
0	0
1	≤ 25
2	$> 25, \leq 50$
3	$> 50, \leq 75$
4	> 75

Tabelle 7: Einteilung der Anzahl der gefärbten Zellen in Scores

2.5. Statistische Analyse

Die klinischen Daten, sowie die Ergebnisse der Auszählung der gefärbten Zellen wurden mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms EXCEL von Microsoft® katalogisiert. Um Beziehungen zwischen Immunfärbungen und klinisch-pathologischen Parametern aufzudecken, erfolgte dann die statistische Auswertung der Ergebnisse unter Verwendung des Statistikprogramms STATISTICA Version 8. Da es sich bei den betrachteten Stichproben um keine Normalverteilung handelt, wurden nichtparametrische Tests zum Probenvergleich herangezogen. Um einen Zusammenhang zwischen zwei verschiedenen Variablen feststellen zu können, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt.

Zur Untersuchung von ordinal skalierten Variablen, empfahl sich, aufgrund der Abweichung von der Normalverteilung, die Verwendung des Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten r_s . Der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient nimmt Werte zwischen -1 und +1 an, wobei Werte nahe 0 signalisieren, dass es keinen Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen gibt. Werte nahe -1 zeigen an, dass ein negativer Zusammenhang vorhanden ist (kleine Werte des einen Merkmals korrelieren mit großen Werten des anderen Merkmals) und Werte nahe +1 deuten auf einen positiven Zusammenhang hin (kleine Werte des einen Merkmals korrelieren mit kleinen Werten, große Werte mit

großen Werten des anderen Merkmals). Je stärker der Zusammenhang zwischen den betrachteten Werten, desto näher liegt r_s bei ± 1 . Auf diese Weise wurde berechnet, ob zwischen den einzelnen Scores und den Variablen Alter, pT-Stadium, pN-Stadium und histologischem Grading ein Zusammenhang zu erkennen ist. Ebenso wurde getestet, ob zwischen den Scores der Primärtumore und den Scores der Lymphknotenmetastasen eine Korrelation besteht und auch ob zwischen den Scores der verschiedenen Antikörper ebenfalls eine Korrelation besteht.

Der Zusammenhang zwischen den Scores und dem Geschlecht der Patienten (nominalskalierte Variable) wurde mithilfe des Fisher-Exakt-Tests untersucht. Im Anwendungsgebiet entspricht er dem Chi-Quadrat-Test. Im Gegensatz zu diesem, liefert der Fisher-Exakt-Test, auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen, zuverlässige Resultate. Der Chi-Quadrat-Test ist erst ab einer bestimmten Stichprobengröße zuverlässig. Im Falle der Kontingenztafeln gilt, dass pro Feld einer Kontingenztafel mindestens fünf Beobachtungen erwartet werden. Da diese Voraussetzung nicht erfüllt werden konnte, wurde der Fisher-Exakt-Test dem Chi-Quadrat-Test vorgezogen. Die Berechnung erfolgte mittels einer Kontingenztafel (Kreuztafel), in der die jeweiligen Merkmale, anhand ihrer Merkmalsausprägungen, gegenübergestellt wurden. Da beim Fisher-Exakt-Test, eine 2x2 Kreuztafel vorliegt, wurden die Scores in zwei Gruppen zusammengefasst, Gruppe 1 (negative Färbung, bzw. Score 0) und Gruppe 2 (positive Färbung, bzw. Score 1-4). Mit Hilfe des Fisher-Exakt-Tests können zwei p-Werte errechnet werden (einseitiger und zweiseitiger p-Wert). Da bei dieser Arbeit eine allgemeine Abhängigkeit untersucht werden soll, ist der zweiseitige anzuwenden. Ob eine signifikante Korrelation zwischen den Scores und der Verhornung der Tumoren besteht, konnte aufgrund der sehr geringen Anzahl an nicht verhornten Tumoren (5 Patientenfälle), mit einem statistischen Test nicht überprüft werden. An dieser Stelle werden lediglich die durchschnittlichen Scores für die verhornten und nicht verhornten Tumoren angegeben.

Für die statistische Analyse wurde ein Signifikanzniveau mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 % ($p \leq 0,05$) zu Grunde gelegt (das heißt: Die Wahrschein-

lichkeit, einen nicht vorhandenen Unterschied irrtümlich als vorhanden zu erkennen, beträgt 5 %).

Dezimalzahlen mit mehr als drei Nachkommastellen wurden auf- bzw. abgerundet.

Um die erhobenen Daten in anschaulicher Weise zusammenzufassen und zu beschreiben, wurden Tabellen und Grafiken erstellt, die über Häufigkeitsverteilungen und Mittelwerte detaillierte Auskunft geben.

3. Ergebnisse

3.1. MAGE-A Antikörper 57B

3.1.1. Expressionsmuster

Primärtumore:

Bei 74% (37 von 50) der Schnitte der Primärtumore konnte eine positive Färbung durch den MAGE-A Antikörper 57 B nachgewiesen werden. 26% der Schnitte wurden hingegen nicht angefärbt. Die genaue Verteilung der Scores ist in der folgenden Häufigkeitstabelle dargestellt. Der durchschnittliche Score liegt bei 1,380.

Score	Häufigkeit	Prozent
0	13	26 %
1	18	36 %
2	10	20 %
3	5	10 %
4	4	8 %

Tabelle 8: Score Primärtumore (MAGE)

Lymphknotenmetastasen:

68% der Schnitte der Lymphknotenmetastasen wurden durch den MAGE-A Antikörper gefärbt. Tabelle 2 zeigt, dass die Verteilung der Scores bei den Lymphknotenmetastasen ähnlich ist, wie bei den Primärtumoren. Der Score ist im Durchschnitt nur unwesentlich niedriger (Mittelwert 1,286).

Score	Häufigkeit	Prozent
0	16	32 %
1	14	28 %
2	11	22 %
3	5	10 %
4	3	6 %

Tabelle 9: Score Lymphknotenmetastasen (MAGE)

3.1.2. Korrelation der Scores der Primärtumore mit den Scores der Lymphknotenmetastasen

Beim Vergleich des Scores des Primärtumors mit dem Score der Lymphknotenmetastase eines Patienten stellte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen den Scores dar. Bei 38 von 50 Patienten stimmte der Score des Primärtumors mit dem Score der Metastase überein. Durch den Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten errechnete sich ein p-Wert von gerundet 0,000 und ein positiver r_s -Wert (0,836). Folglich liegt ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen den Scores der Primärtumore und den Scores der Lymphknotenmetastasen vor.

3.1.3. Korrelation der Scores mit der pT-Klassifikation

Sowohl bei den Primärtumoren, als auch bei den Lymphknotenmetastasen konnte kein Zusammenhang zwischen dem pT-Stadium und dem Score festgestellt werden. Bei den Primärtumoren beträgt der p-Wert 0,916; r_s liegt mit -0,015 nahe null. Zu ähnlichen Ergebnissen führten die Berechnungen bei den Lymphknotenmetastasen ($p = 0,990$ und $r_s = 0,002$). Der durchschnittliche Score bei den Primärtumoren beträgt bei pT1-Tumoren 1,455, bei pT2-Tumoren 1,333, bei pT3-Tumoren 1,333 und bei pT4-Tumoren 1,666. Somit ist zwar der Mittelwert bei den pT4-Tumoren am größten, aber der Mittelwert, der pT2- und pT3-Tumoren unterscheidet sich nicht und bei den pT-1 Tumoren ist er sogar

wieder größer. Folglich lässt sich keine auf- oder absteigende Reihe erkennen. Bei den Lymphknotenmetastasen liegt der durchschnittliche Score bei pT1- und pT2-Tumoren bei 1,300, bei pT3-Tumoren bei 1,333 und bei pT4-Tumoren bei 1,000. Auch hier lassen die Mittelwerte keinen Zusammenhang der Scores mit dem pT-Stadium erkennen.

3.1.4. Korrelation der Scores mit der pN-Klassifikation

Primärtumore:

Die Häufigkeiten der einzelnen Scores, bei den jeweiligen pN-Klassifikationen sind in den folgenden Histogrammen dargestellt. Diese Diagramme und die durchschnittlichen Scores der einzelnen pN-Stadien (pN1-Tumoren 1,800, pN2a-Tumoren 1,500, pN2b-Tumoren 1,105, pN2c-Tumoren 1,000) deuten auf einen tendenziell negativen Zusammenhang zwischen den pN-Stadien und der Scoregröße hin. Je größer das pN-Stadium, desto höher ist im Durchschnitt der Score. Hierauf weist auch der negative Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman hin ($r_s = -0,240$). Einen statistisch signifikanten Unterschied für die einzelnen pN- Stadien ergaben die Berechnungen aber nicht ($p = 0,094$).

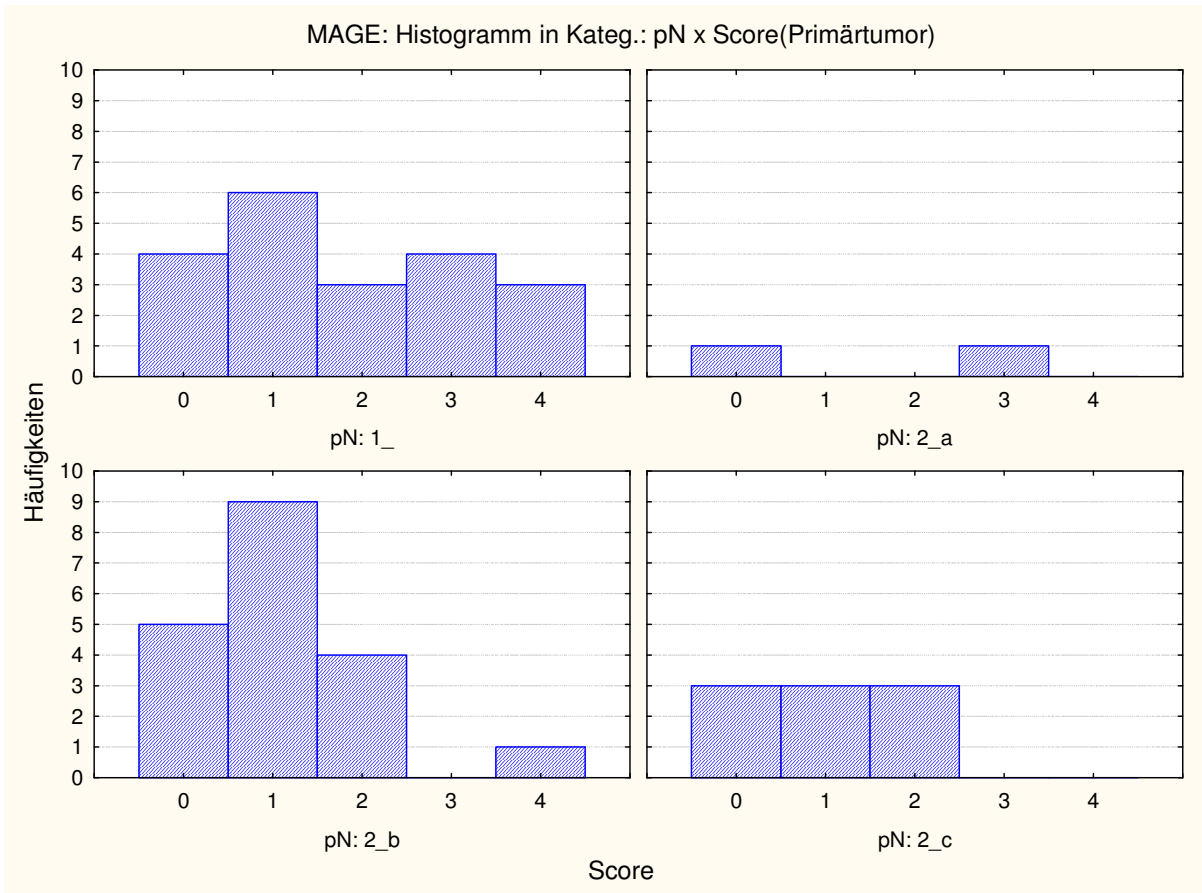


Abbildung 9: Score - pN-Klassifikation (Primärtumore, MAGE)

Lymphknotenmetastasen:

Wie bei den Primärtumoren zeigt sich auch bei den Lymphknotenmetastasen ein negativer Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient. Dieser ist aber mit einem Wert von $-0,166$ nur geringer negativ. Auch die Durchschnittswerte der Scores für die einzelnen pN-Stadien zeigen eine weniger deutlich absteigende Reihe (pN1-Tumoren 1,526, pN2a-Tumoren 1,500, pN2b-Tumoren 1,105, pN2c-Tumoren 1,111), im Vergleich zu den Primärtumoren. Folglich ist auch der p-Wert ($p = 0,255$) weiter von der signifikanten Grenze entfernt.

3.1.5. Korrelation der Scores mit dem histologischen Grading

Bei den Primärtumoren und bei den Lymphknotenmetastasen war der durch-

schnittliche Score, bei den mäßig differenzierten G2-Tumoren (1,483 und 1,321), gering größer als bei den schlecht differenzierten G3-Tumoren (1,238 und 1,238). Da diese Differenz aber nur sehr klein ist und auch die Spearman-schen Rangkorrelationskoeffizienten nahe null sind ($r_s = -0,067$ und $r_s = -0,005$), lässt sich hier kein negativer Zusammenhang nachweisen. Es errechneten sich p-Werte von 0,643 (Primärtumore) und 0,975 (Metastasen).

3.1.6. Korrelation der Scores mit der Tumorverhornung

Primärtumore:

Der durchschnittliche Score bei verhornten Tumoren (1,467) ist auffällig größer als bei nicht verhornten Tumoren (0,600). Aufgrund der geringen Anzahl von Patientenfällen mit nicht verhornten Tumoren ist die Aussagekraft dieser Werte aber mit Vorsicht zu betrachten.

Lymphknotenmetastasen:

Auch bei den Lymphknotenmetastasen ist der durchschnittliche Score bei verhornten Tumoren (1,386) deutlich größer als bei nicht verhornten Tumoren (0,400). Jedoch müssen auch hier, genauso wie bei den Primärtumoren, die Zahlen aufgrund des Patientenkollektivs kritisch gesehen werden.

3.1.7. Korrelation der Scores mit dem Alter des Patienten

Um einen statistischen Zusammenhang zwischen den Scores und dem Alter berechnen zu können, wurde das Patientenkollektiv in drei Altersgruppen eingeteilt:

Altersgruppe	Patientenalter
1	≤50 Jahre
2	>50, ≤70 Jahre
3	>70 Jahre

Tabelle 10: Altersgruppen

Primärtumore:

Bei den Patienten ≤ 50 Jahre (Altersgruppe 1) liegt der durchschnittliche Score bei 1,615, in der Altersgruppe 2 bei 1,188 und bei der Altersgruppe 3 bei 2,000. Ein Zusammenhang zwischen Alter und Score lässt sich aus diesen Zahlen nicht erschließen. Auch die statistische Berechnung zeigte keine Korrelation ($p=0,773$ und $r_s = -0,042$)

Lymphknotenmetastasen:

Ähnlich wie bei den Primärtumoren ist der durchschnittliche Score bei der Altersgruppe 1 (Mittelwert 1,769) und 3 (Mittelwert 1,600) größer als bei der Gruppe 2 (Mittelwert 1,032). Aber auch hier lässt sich bei den Metastasen kein Zusammenhang zwischen den Altersgruppen und dem Score erkennen ($p=0,194$, $r_s = -0,189$).

3.1.8. Korrelation der Scores mit dem Geschlecht des Patienten

Folgende Scores errechneten sich im Durchschnitt für die verschiedenen Geschlechter:

	männlich	weiblich
Primärtumor	1,474	1,083
Lymphknotenmetastase	1,351	1,083

Tabelle 11: Score-Geschlecht (MAGE)

Diese Mittelwerte und die folgenden Grafiken veranschaulichen, dass sowohl bei den Primärtumoren, als auch bei den Lymphknotenmetastasen, die durchschnittlichen Scores bei den Männern höher sind. Durch die statistische Berechnung mit Hilfe des Fisher-Exakt-Test (zweiseitig) stellten sich aber bei den Primärtumoren ($p=0,256$) und bei den Metastasen ($p=0,595$) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern heraus.

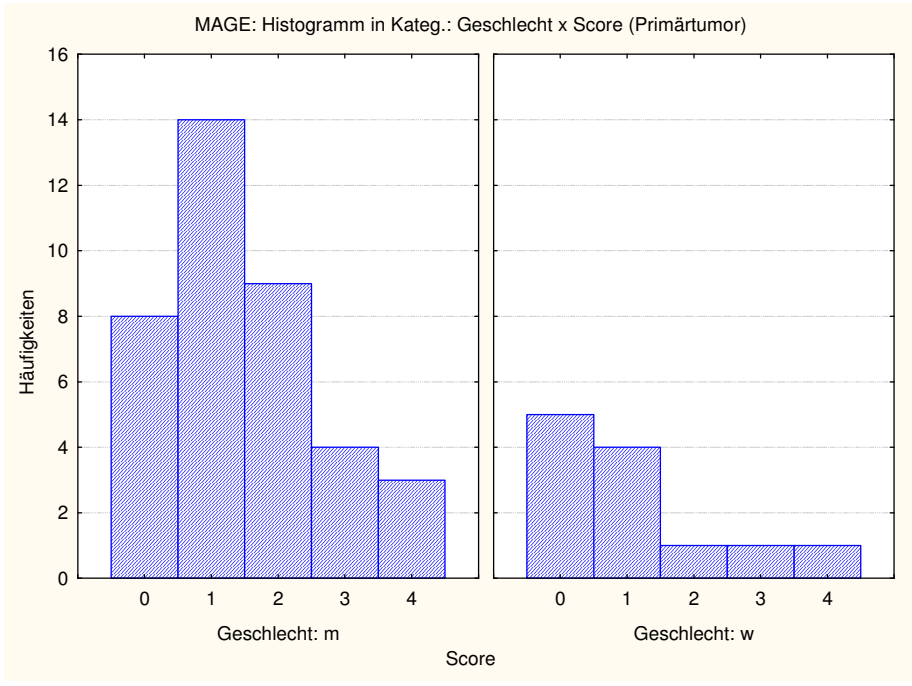


Abbildung 10: Score – Geschlecht (Primärtumore, MAGE)

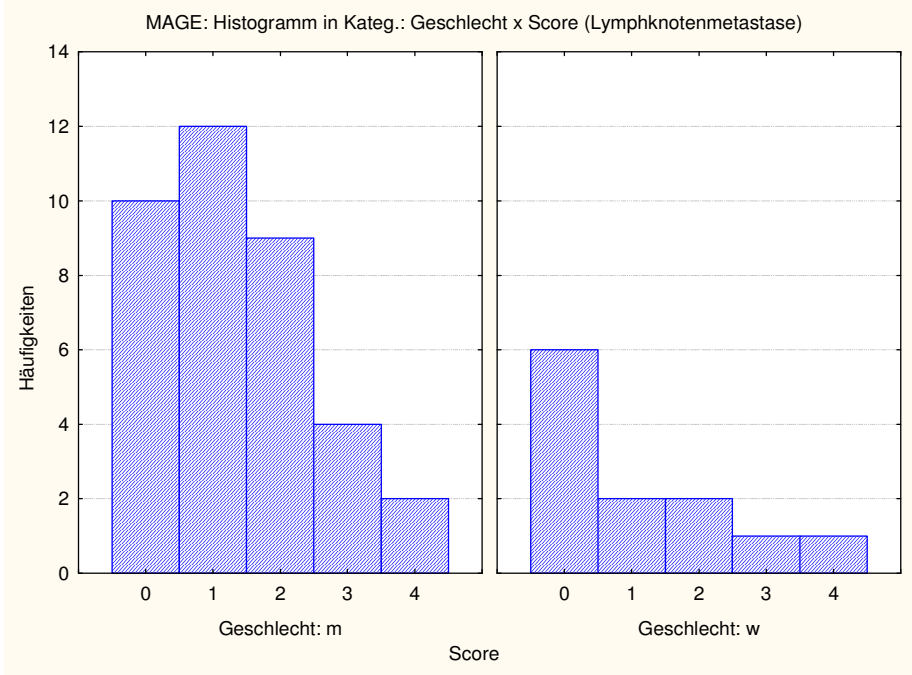


Abbildung 11: Score - Geschlecht (Lymphknotenmetastasen, MAGE)

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Fotos von Färbungen dieser Arbeit mit dem MAGE-A Antikörper 57 B.

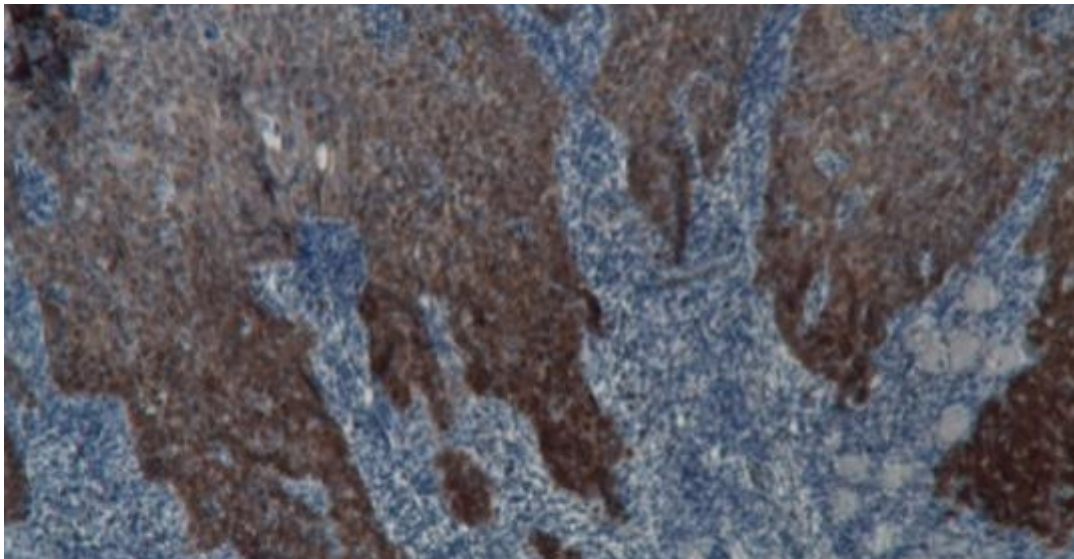


Abbildung 12: Anfärbung eines gering verhornten Plattenepithelkarzinom des Pharynx mit dem MAGE-A Antikörper 57 B, Tumorstadium: pT1N1MX, Tumordifferenzierung: G2 (Vergrößerung: x50). Man erkennt deutlich braun gefärbte Tumorzellinfiltrate, die in das Stroma einwachsen.

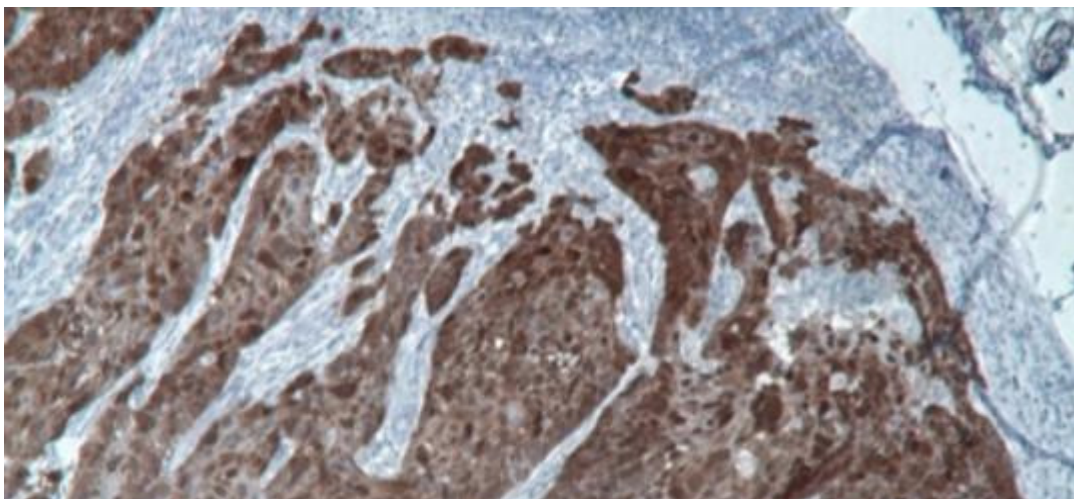


Abbildung 13: Anfärbung einer Lymphknotenmetastase eines gering verhornten Plattenepithelkarzinom des hinteren Gaumenbogens mit dem MAGE-A Antikörper 57 B, Tumorstadium: pT2N1MX, Tumordifferenzierung: G3 (Vergrößerung: x50). Die Tumorzellinfiltrate der Lymphknotenmetastase sind ungleichmäßig stark eingefärbt. Das Färbemuster des MAGE-A Antikörper ist durchgängig cytoplasmatisch, es zeigen sich aber auch anteilig nukleäre Färbungen. Rechts im Bild sieht man die nicht eingefärbte Bindegewebskapsel des Lymphknoten, von der aus ebenfalls nicht eingefärbte Bindegewebsstrabekel ins Organinnere ziehen.

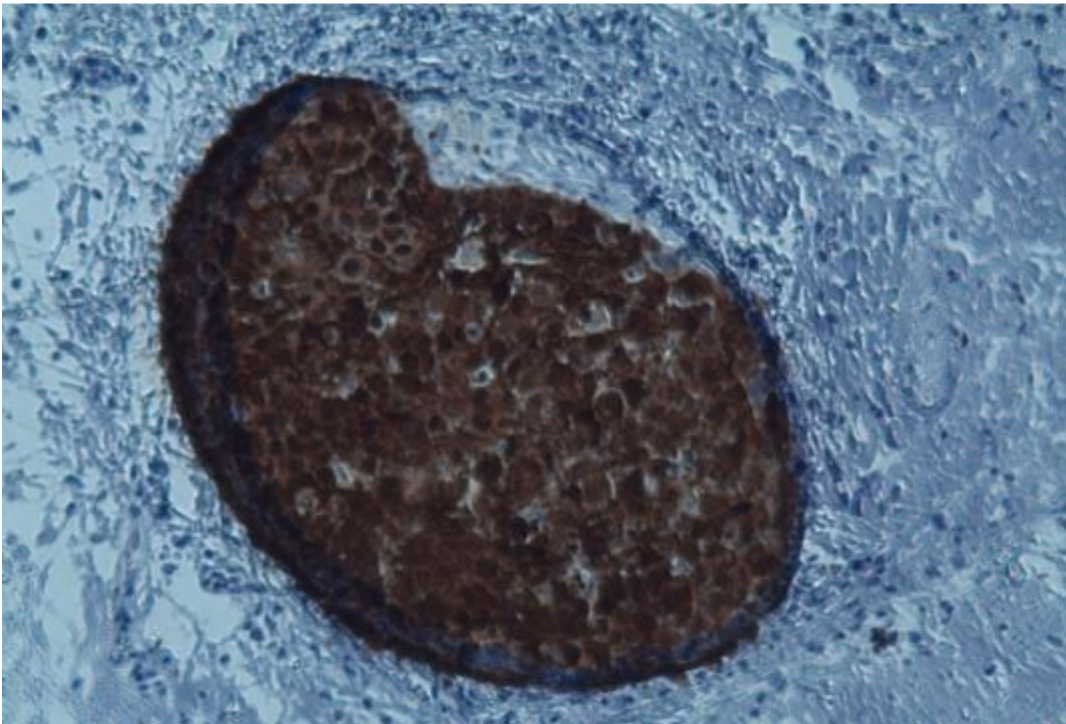
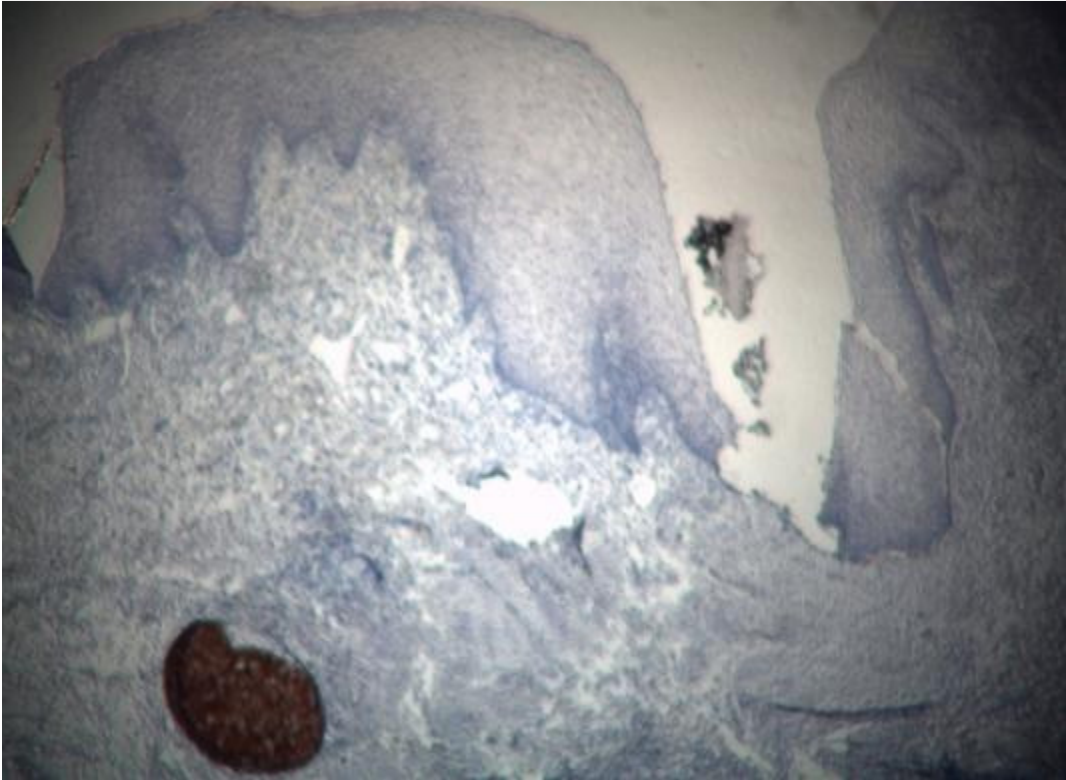


Abbildung 14: Anfärbung von Tumorresiduen eines gering verhornten Plattenepithelkarzinoms des Mundbodens mit dem MAGE-A Antikörper 57 B, Tumorstadium: pT1N1MX, Tumordifferenzierung: G2 (Vergrößerung: x25 und x100). Im oberen Teil der Abbildung erkennt man tumorfreies mehrschichtiges Plattenepithel der Mundschleimhaut. Tiefer im bindegewebigen Stroma liegend, findet sich ein deutlich abgegrenztes, stark gefärbtes Tumorresiduum.

3.2. VEGF A-20

3.2.1. Expressionsmuster

Die folgenden Häufigkeitstabellen zeigen, dass bei den Primärtumoren und den Lymphknotenmetastasen etwa 2/3 der Schnitte durch den VEGF-A Antikörper angefärbt wurden. 16 Schnitte (32%) wurden jeweils nicht markiert. Bei den Primärtumoren trat bei den positiven Färbungen nur der Score 1 auf, es waren also in keinem Fall mehr als 25% der Zellen gefärbt. Bei den Färbungen der Lymphknotenmetastasen war, mit einer Ausnahme ebenfalls nur der niedrigste Score vertreten. Score 2 kam nur in einem einzigen Fall vor. Der Durchschnittscore beträgt 0,680 (Primärtumore), bzw. 0,694 (Lymphknotenmetastasen).

Score	Häufigkeit	Prozent
0	16	32 %
1	34	68 %
2	0	0 %
3	0	0 %
4	0	0 %

Tabelle 12: Score Primärtumore (VEGF A)

Score	Häufigkeit	Prozent
0	16	32 %
1	32	64 %
2	1	2 %
3	0	0 %
4	0	0 %

Tabelle 13: Score Lymphknotenmetastasen (VEGF A)

3.2.2. Korrelation der Scores der Primärtumore mit den Scores der Lymphknotenmetastasen

Im Gegensatz zu allen anderen getesteten Antikörpern, konnte bei VEGF-A keine signifikante Korrelation ($p= 0,699$, $r_s = 0,057$) zwischen den Scores der Primärtumore und den Scores der Lymphknotenmetastasen festgestellt werden.

3.2.3. Korrelation der Scores mit der pT-Klassifikation

Primärtumor:

Wie die folgende Tabelle zeigt, besteht die Tendenz zu einem positiven Zusammenhang zwischen der Scoregröße und der pT-Klassifikation. Der größte durchschnittliche Score ist bei pT4-Tumoren zu finden, gefolgt von dem Score bei pT3-Tumoren. Bei pT1- und 2-Tumoren zeigt sich ein annähernd gleicher Score.

pT-Klassifikation	durchschnittlicher Score
1	0,636
2	0,633
3	0,833
4	1,000

Tabelle 14: Score - pT-Klassifikation (Primärtumore, VEGF A)

Eine signifikante Korrelation besteht laut der statistischen Analyse aber nicht ($p= 0,260$, $r_s= 0,162$).

Lymphknotenmetastase:

Bei den Metastasen passen die Durchschnittsscores der pT1- und pT4-Tumoren auch zu einer aufsteigenden Reihe. Dem widersprechen aber die Scores der pT2- und pT3-Tumoren.

pT-Klassifikation	durchschnittlicher Score
1	0,400
2	0,800
3	0,500
4	1,000

Tabelle 15: Score - pT-Klassifikation (Lymphknotenmetastasen, VEGF A)

Auch hier ergaben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse ($p= 0,173$, $r_s= 0,198$.)

3.2.4. Korrelation der Scores mit der pN-Klassifikation

Primärtumor:

Der Score ist bei den pN1-Tumoren (0,550) und bei den pN2a-Tumoren (0,500) im Durchschnitt etwas kleiner als bei den pN2b- und pN2c-Tumoren (0,789 und 0,778). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen pN-Stadien besteht nicht ($p= 0,110$, $r_s= 0,229$).

Lymphknotenmetastasen:

Bei den Lymphknotenmetastasen sind die durchschnittlichen Scores aller pN-Stadien relativ ähnlich (pN1: 0,632, pN2a: 0,500, pN2b: 0,684, pN2c: 0,667). Folglich scheint es keine Korrelation zwischen pN-Klassifikation und Scoregröße zu geben. Hierzu passen der große p-Wert ($p= 0,899$) und der sehr kleine Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient ($r_s= 0,019$).

3.2.5. Korrelation der Scores mit dem histologischen Grading

Bei den Primärtumoren unterscheiden sich die Scores der mäßig-differenzierten G2-Tumoren (Mittelwert 0,690) kaum von denen, der schlecht differenzierten G3-Tumoren (Mittelwert 0,667). Ein signifikanter Unterschied besteht daher nicht ($p= 0,867$, $r_s= -0,024$). Bei den Lymphknotenmetastasen ist zwar der

Durchschnittsscore bei den mäßig differenzierten Tumoren etwas größer (0,750) als bei den schlecht differenzierten Tumoren (0,620), ein signifikant negativer Zusammenhang liegt aber auch hier nicht vor ($p= 0,406$, $r_s= -0,121$).

3.2.6. Korrelation der Scores mit der Tumorverhornung

Bei den Primärtumoren ist der durchschnittliche Score der nicht verhornten Karzinomen (0,800) etwas größer als bei den verhornten Tumoren (0,667). Bei den Lymphknotenmetastasen ist der Score der verhornten Tumoren (0,795) im Durchschnitt minimal größer als der Score der nicht verhornten Tumoren (0,600). Die Differenzen sind aber nur sehr gering, so dass man von keinem Unterschied der Scoregröße bei nicht verhornten und verhornten Tumoren sprechen kann.

3.2.7. Korrelation der Scores mit dem Alter des Patienten

Bei den Primärtumoren sind die durchschnittlichen Scores in den 3 Altersgruppen ähnlich (Gruppe 1: 0,692, Gruppe 2: 0,656, Gruppe 3: 0,800). Folglich lieferte die statistische Berechnung auch keine signifikanten Werte ($p= 0,856$, $r_s= 0,026$).

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Scores für die verschiedenen Altersgruppen bei den Lymphknotenmetastasen. Auffallend ist der viel kleinere Wert bei der 3. Altersgruppe. Der Durchschnittsscore bei der 2. Gruppe ist nur gering kleiner als bei der 1. Gruppe. Aus diesen Zahlen lässt sich ableiten, dass bei jüngeren Patienten der Score im Durchschnitt größer ist als bei älteren Patienten.

Altersgruppe	durchschnittlicher Score
1	0,769
2	0,742
3	0,200

Tabelle 16: Score - Altersgruppen (Lymphknotenmetastasen, VEGF A)

Aus der statistischen Analyse lässt sich zwar eine Tendenz zu einem negativen Zusammenhang erkennen ($p= 0,107$, $r_s = -0,233$), signifikante Ergebnisse liegen aber nicht vor.

3.2.8. Korrelation der Scores mit dem Geschlecht des Patienten

Bei den Primärtumoren ist der Score bei den weiblichen Patienten (0,750) im Durchschnitt gering höher als bei den männlichen Patienten (0,658). Im Vergleich hierzu ist bei den Lymphknotenmetastasen der mittlere Score in der Gruppe der Männer (0,756) größer als in der Gruppe der Frauen (0,5). Anhand der Berechnung mit dem Fisher-Exakt-Test (zweiseitig) ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern (Primärtumor: $p=0,728$, LK-Metastase: $p=0,169$).

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen Färbungen dieser Arbeit mit dem VEGF A-20 Antikörper.

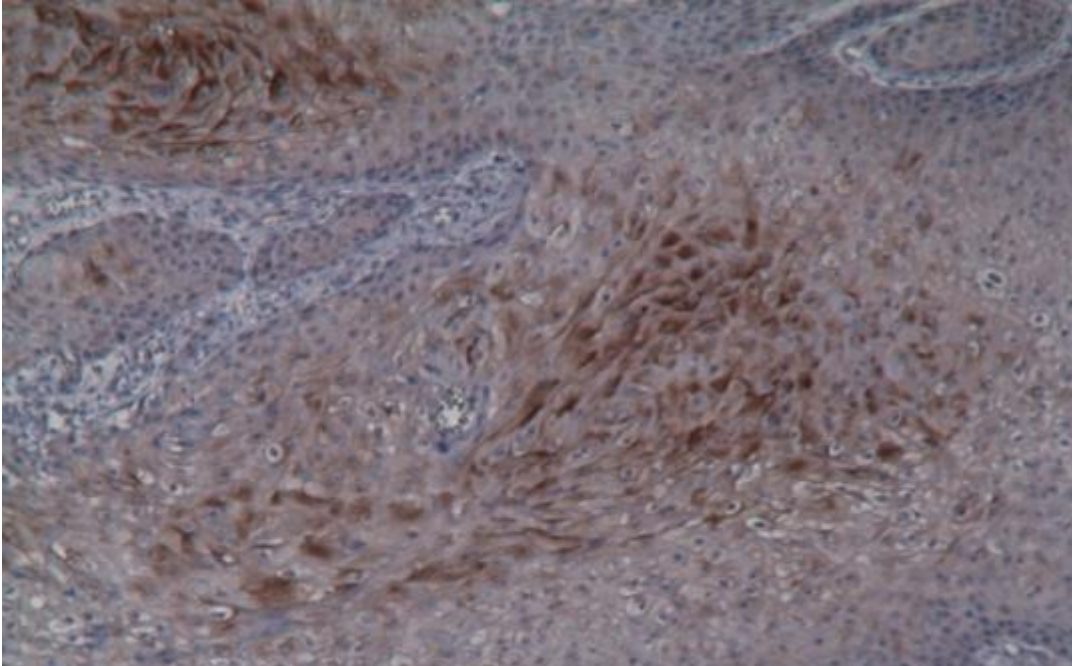


Abbildung 15: Anfärbung eines verhornten Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle mit dem VEGF A Antikörper, Tumorstadium: pT2N2bMX, Tumordifferenzierung: G2 (Vergrößerung: x50). Die Tumorzellinfiltrate zeigen eine ungleichmäßig starke Färbung durch den VEGF A Antikörper, wobei zentrale Tumoranteile intensiver gefärbt scheinen. Es dominiert eine überwiegend cytoplasmatische Färbung, die teils begleitet ist von einer Färbung der Zellmembran.

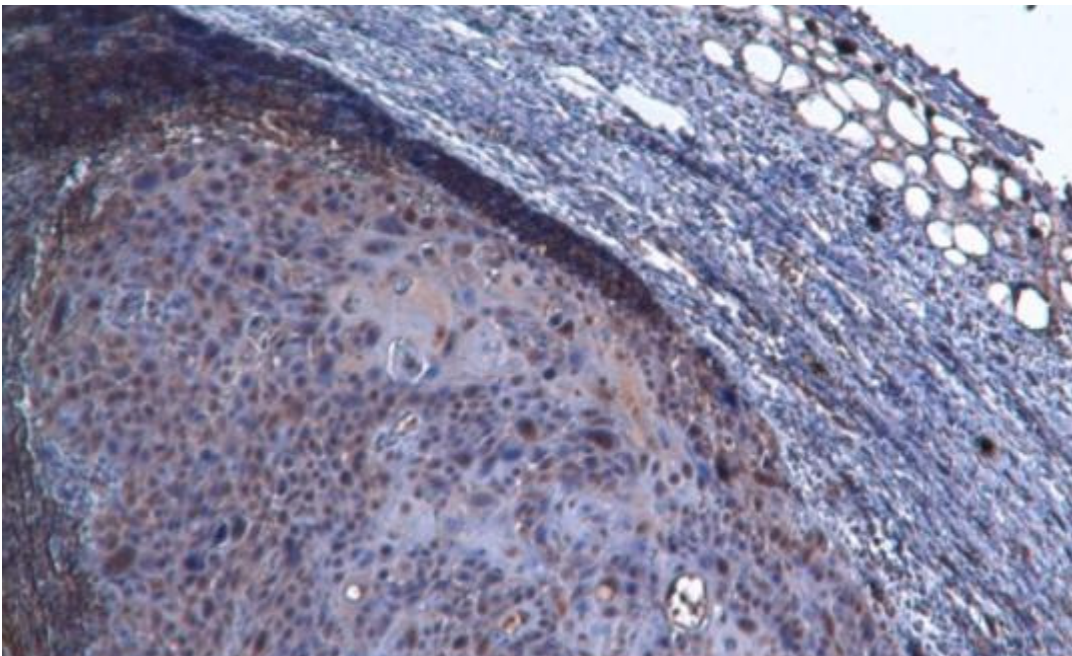


Abbildung 16: Anfärbung einer Lymphknotenmetastase eines gering verhornten Plattenepithelkarzinoms der Tonsille mit dem VEGF A Antikörper, Tumorstadium: pT1N2bMX, Tumordifferenzierung: G2 (Vergrößerung: x50). Zu erkennen ist eine schwache cytoplasmatische Färbung im Bereich der Metastase.

3.3. VEGF C

3.3.1. Expressionsmuster

Nur in einem Lymphknotenmetastasen Fall, bzw. in zwei Primärtumoren Fällen wurde durch den monoklonalen VEGF-C Antikörper keine positive Färbung hervorgerufen. In allen anderen Fällen markierte der Antikörper die Schnitte, wobei die Score 1 bis 3 alle vertreten sind. Score 4 wurde nicht vergeben, d.h., es waren nie über 75% der Zellen gefärbt. In über der Hälfte der Schnitte der Primärtumoren und der Metastasen wurde die Färbung mit Score 2 bewertet. Score 3 kommt bei den Primärtumoren in größerer Anzahl vor, woraus sich dann auch ein etwas höherer durchschnittlicher Score (2,000), im vgl. zu den Metastasen (1,898) ergibt.

Score	Häufigkeit	Prozent
0	2	4 %
1	9	18 %
2	26	52 %
3	13	26 %
4	0	0 %

Tabelle 17: Score (Primärtumore, VEGF C)

Score	Häufigkeit	Prozent
0	1	2 %
1	10	20 %
2	31	62 %
3	7	14 %
4	0	0 %

Tabelle 18: Score (Lymphknotenmetastasen, VEGF C)

3.3.2. Korrelation der Scores der Primärtumore mit den Scores der Lymphknotenmetastasen

Beim Vergleich der Scores des Primärtumors und der Lymphknotenmetastase eines Patienten stellte sich ein positiver Zusammenhang dar ($r_s = 0,315$). In fast der Hälfte der Fälle (24 von 50 Patienten) stimmte der Score des Primärtumors mit dem Score der Lymphknotenmetastase überein. Bei 26 Patienten (52 %) stimmten die Scores nicht überein. Der Score unterscheidet sich aber bei 22 dieser Patienten um nur eine Stufe. Mit Hilfe des Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizient ergibt sich ein p-Wert von 0,025 und somit kann man von einer signifikanten Korrelation ausgehen.

3.3.3. Korrelation der Scores mit der pT-Klassifikation

Primärtumor:

Wie die folgende Tabelle zeigt ist der größte durchschnittliche Score bei pT4-Tumoren zu finden. Insgesamt lässt sich aber kein Zusammenhang zwischen dem Score und der pT-Klassifikation erkennen ($p = 0,903$, $r_s = 0,018$).

pT-Klassifikation	durchschnittlicher Score
1	2,182
2	1,900
3	1,667
4	3,000

Tabelle 19: Score – pT-Klassifikation (Primärtumor, VEGF C)

Lymphknotenmetastasen:

Bei den Lymphknotenmetastasen ist der größte Durchschnittsscore ebenso bei den pT4-Tumoren zu finden. Aber auch hier wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Score und der pT-Klassifikation errechnet ($p = 0,437$, $r_s = 0,114$).

pT-Klassifikation	durchschnittlicher Score
1	1,800
2	1,900
3	1,833
4	2,300

Tabelle 20: Score – pT-Klassifikation (Lymphknotenmetastase, VEGF C)

3.3.4. Korrelation der Scores mit der pN-Klassifikation

Sowohl bei den Primärtumoren als auch bei den Lymphknotenmetastasen kann man keinen Zusammenhang zwischen dem pN-Stadium und dem Score erkennen. Die errechneten Werte sind statistisch nicht signifikant (Primärtumor: $p=0,796$, $r_s=-0,037$, Lymphknotenmetastase: $p=0,299$, $r_s=0,151$).

3.3.5. Korrelation der Scores mit dem histologischen Grading

Bei den Primärtumoren ist der durchschnittliche Score bei den mäßig und schlecht differenzierten Tumoren gleich (beide 2,000). Bei den Lymphknotenmetastasen ist der Score bei den schlechter differenzierten G3-Tumoren etwas höher (2,000) als bei den G2-Tumoren (1,821). Ein signifikanter Unterschied besteht aber nicht ($p=0,402$, $r_s=0,122$).

3.3.6. Korrelation der Scores mit der Tumorverhornung

Die folgende Tabelle zeigt, dass der durchschnittliche Score bei den nicht verhornten Karzinomen gering größer ist als bei den verhornten Tumoren.

	nicht verhorntes Karzinom	verhorntes Karzinom
Primärtumor	2,400	1,956
Lymphknotenmetastase	2,200	1,864

Tabelle 21: Score – Tumorverhornung (VEGF C)

3.3.7. Korrelation der Scores mit dem Alter des Patienten

Primärtumore:

Die errechneten durchschnittlichen Scores unterscheiden sich in den drei Altersgruppen nur gering (Gruppe 1: 2,077, Gruppe 2: 1,938, Gruppe 3: 2,200) und es lässt sich keine auf- oder absteigende Reihe erkennen. Der hohe p-Wert (0,991) und der sehr kleine Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient (-0,002) sprechen auch dafür, dass es keine Unterschiede zwischen den Altersgruppen gibt.

Lymphknotenmetastasen:

Wie die folgende Tabelle zeigt, besteht die Tendenz zu einem negativen Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Scorehöhe und dem Patientenalter. Statistisch signifikante Unterschiede liegen aber nicht vor ($p = 0,324$, $r_s = -0,144$)

Altersgruppe	durchschnittlicher Score
1	2,000
2	1,903
3	1,600

Tabelle 22: Score – Alter (Lymphknotenmetastasen, VEGF C)

3.3.8. Korrelation der Scores mit dem Geschlecht des Patienten

Bei den Primärtumoren und bei den Lymphknotenmetastasen zeigt sich zwischen den Geschlechtern kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der durchschnittlichen Scoregrößen.

	männlich	weiblich
Primärtumor	1,970	2,083
Lymphknotenmetastase	1,892	1,917

Tabelle 23: Score – Geschlecht (VEGF C)

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Fotos von Färbungen dieser Arbeit mit dem VEGF C-1 Antikörper.

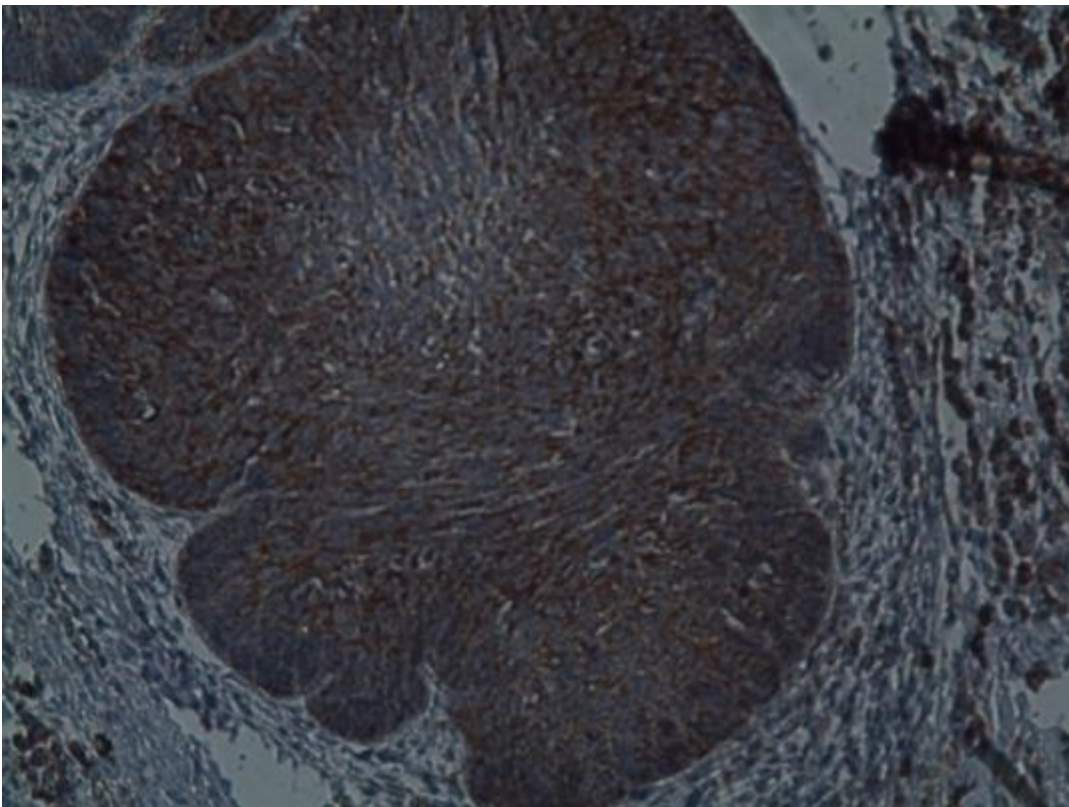
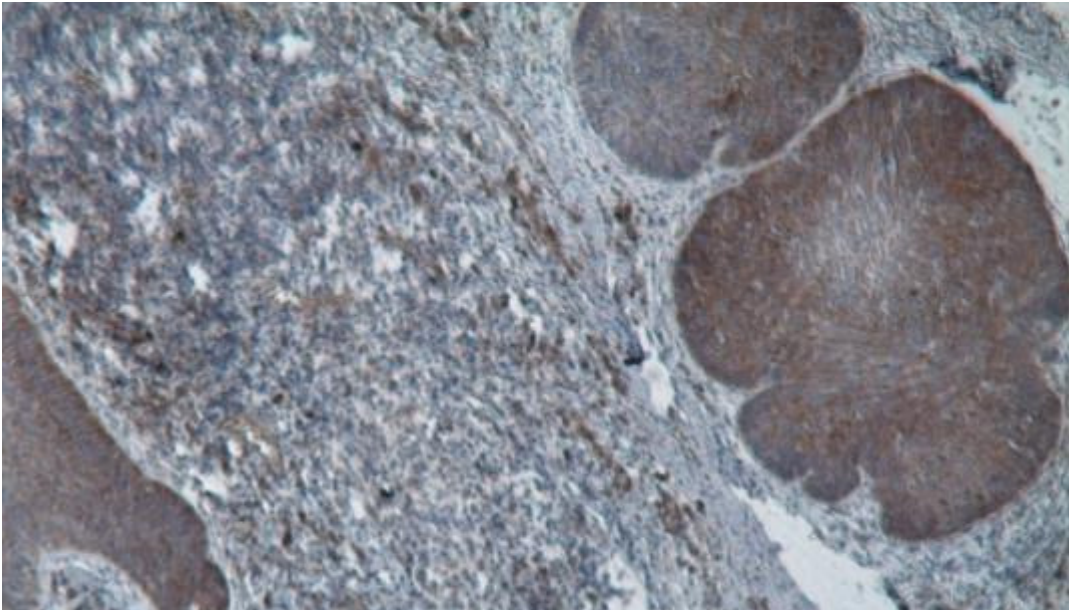


Abbildung 17: Anfärbung eines nicht verhornten Plattenepithelkarzinoms der Zunge mit dem VEGF C Antikörper, Tumorstadium: pT1N2bMX, Tumordifferenzierung: G2 (Vergrößerung: x50 und x100). Es ist eine überwiegend cytoplasmatische Färbung der meisten Zellen innerhalb der Tumorzellinfiltrate zu erkennen.

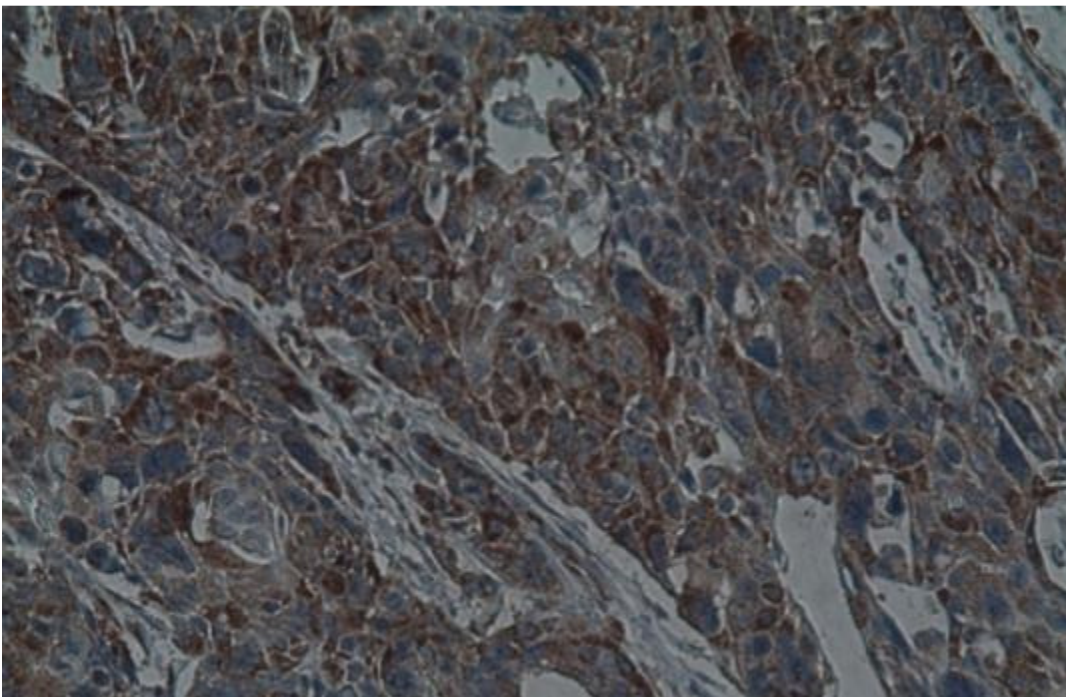
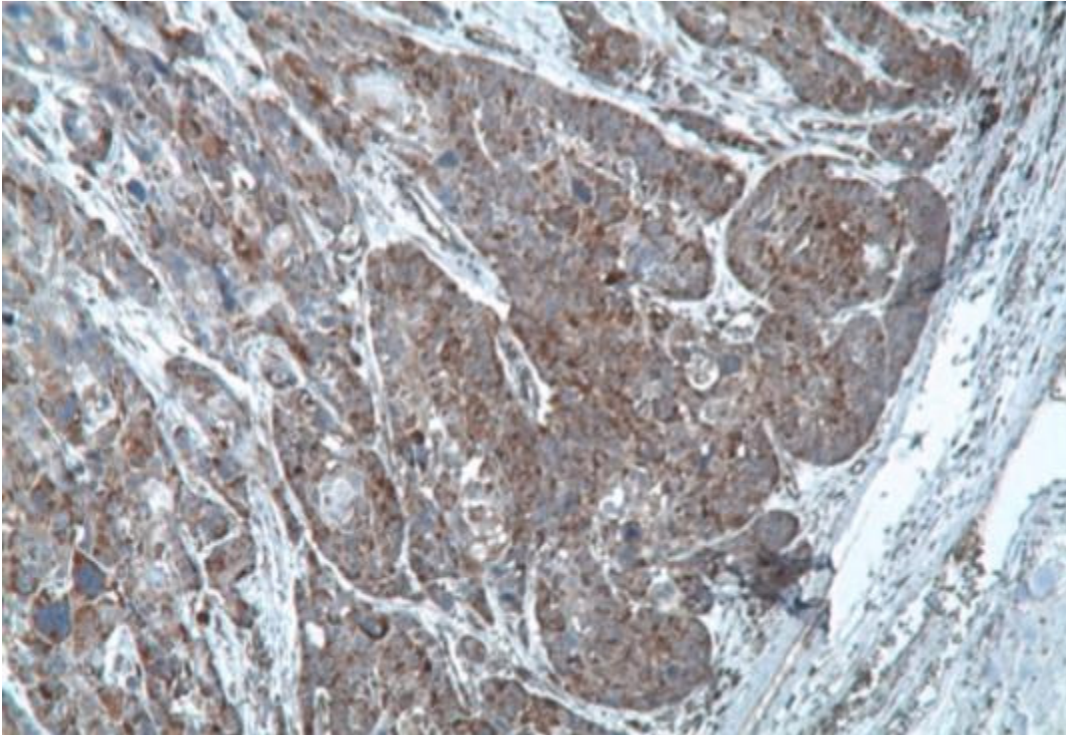


Abbildung 18: Anfärbung einer Lymphknotenmetastase eines gering verhornten Plattenepithelkarzinoms des hinteren Gaumenbogen mit dem VEGF C Antikörper, Tumorstadium: pT2N1MX, Tumordifferenzierung: G3 (Vergrößerung: x50 und x100). Auch hier zeigt sich eine cytoplasmatische Färbung der Tumorzellen durch den VEGF C Antikörper. Im unteren Bild (Vergrößerung x100) sind polymorphe Zellen mit z.T. sehr großen Zellkernen deutlich zu erkennen.

3.4. EGFR

3.4.1. Expressionsmuster

Bei 92% (46 von 50) der Schnitte der Primärtumore konnte eine positive Färbung durch den EGFR Antikörper nachgewiesen werden. Nur eine geringe Anzahl (8%) der Schnitte wurden nicht angefärbt. Folgende Häufigkeitstabelle stellt die genaue Anzahl der einzelnen Scores dar. Am weitaus häufigsten vertreten ist Score 1 mit 64% (32 von 50). Score 4 kommt in keinem Fall vor und Score 3 wurde nur bei einer Färbung vergeben. Folglich ist in der Regel weniger als die Hälfte der Zellen gefärbt. Der durchschnittliche Score liegt bei 1,22.

Score	Häufigkeit	Prozent
0	4	8 %
1	32	64 %
2	13	26 %
3	1	2 %
4	0	0 %

Tabelle 24: Score Primärtumor (EGFR)

18% der Schnitte der Lymphknotenmetastasen wurden durch den EGFR Antikörper nicht gefärbt. Dies ist im Vergleich zu den Primärtumoren ein weitaus größerer Anteil. Die Tabellen zeigen aber, dass die Verteilung der Scores bei den Lymphknotenmetastasen dennoch ähnlich der, der Primärtumoren ist. Score 1 kommt ebenfalls mit Abstand am häufigsten vor (70%). Score 3 und 4 kam nicht vor, womit die Anzahl gefärbter Zellen immer unter 50% liegt. Der Score ist im Durchschnitt etwas niedriger (Mittelwert 0,918).

Score	Häufigkeit	Prozent
0	9	18 %
1	35	70 %
2	5	10 %
3	0	0 %
4	0	0 %

Tabelle 25: Score Lymphknotenmetastasen (EGFR)

3.4.2. Korrelation der Scores der Primärtumore mit den Scores der Lymphknotenmetastasen

Wie schon bei MAGE und VEGF C ergaben die Berechnungen beim EGFR Antikörper ebenfalls einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen den Scores von Primärtumor und Lymphknotenmetastase ($p= 0,002$, $r_s= 0,437$).

3.4.3. Korrelation der Scores mit der pT-Klassifikation

Sowohl bei den Primärtumoren als auch bei den Lymphknotenmetastasen zeigte sich keine Korrelation zwischen der pT-Klassifikation und den Scores.

Primärtumore:

durchschnittlicher Score: pT1:1,273; pT2:1,267; pT3:0,833; pT4:1,333
 $p= 0,352$; $r_s= -0,134$

LK-Metastasen:

durchschnittlicher Score: pT1:1,000; pT2:0,867; pT3:1,000; pT4:1,000
 $p= 0,996$; $r_s= -0,001$

3.4.4. Korrelation der Scores mit der pN-Klassifikation

Bei den Primärtumor errechnete sich durch den Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizient ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen dem Score und

der pN-Klassifikation ($p= 0,013$, $r_s= 0,352$). Je größer das pN-Stadium, desto höher ist im Durchschnitt auch der Score. Der durchschnittliche Score bei pN1- und pN2a-Tumoren beträgt 1, bei pN2b-Tumoren 1,316 und bei pN2c-Tumoren ist er mit 1,556 am größten. Vergleicht man diese Erkenntnis mit den oben aufgeführten Ergebnissen beim MAGE Antikörper (tendenziell negativer Zusammenhang zwischen den pN-Stadien und der Scoregröße), zeigt sich ein gegensätzliches Färbeverhalten. Das folgende Diagramm gibt die Häufigkeitsverteilung der Scores in den einzelnen Stadien wieder.

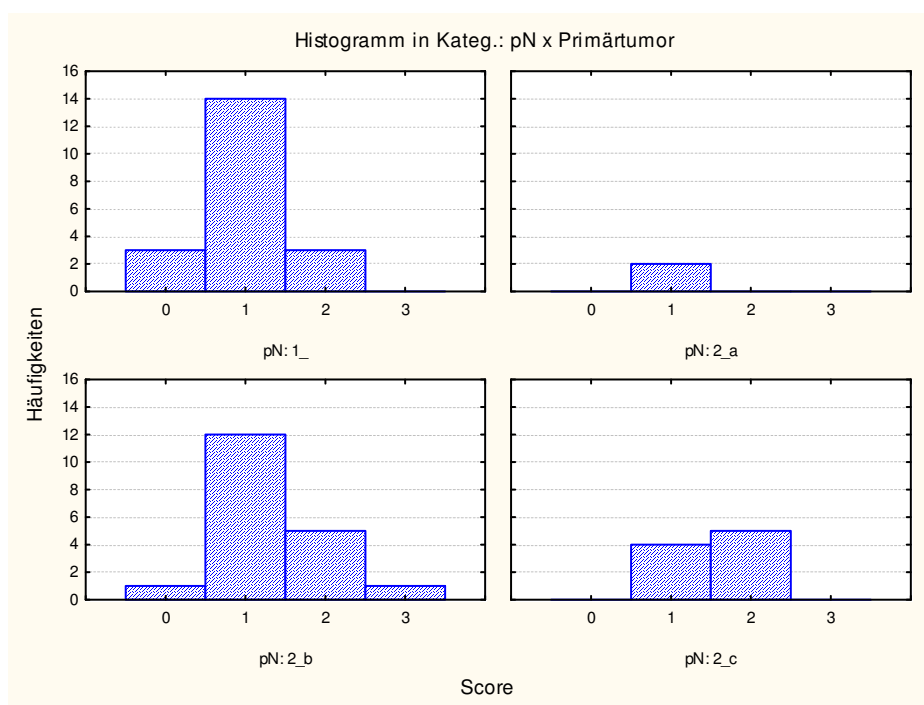


Abbildung 19: Score – pN-Klassifikation (Primärtumore, EGFR)

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den Primärtumoren, konnte bei den Färbungen der Lymphknotenmetastasen kein Zusammenhang zwischen der pN-Klassifikation und dem Score festgestellt werden ($p= 0,859$, $r_s= -0,026$).

3.4.5. Korrelation der Scores mit dem histologischen Grading

Primärtumore:

Der durchschnittliche Score bei mäßig differenzierten Tumoren (G2) beträgt 1,138. Er ist somit etwas kleiner als bei schlecht differenzierten Tumoren (G3), wo er bei 1,333 liegt. Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen G2- und G3-Tumoren ($p= 0,341$, $r_s= 0,137$) nachgewiesen werden.

Lymphknotenmetastasen:

Anders als bei den Primärtumoren, ist bei den Metastasen der Score im Durchschnitt bei den mäßig differenzierten G2-Tumoren (1,036) größer als bei den G3-Tumoren (0,762). Auch hier stellte sich keine statistische Signifikanz heraus ($p= 0,074$, $r_s= -0,257$). Der p-Wert ist aber mit 0,074 nicht sehr weit von der Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (0,050) entfernt.

3.4.6. Korrelation der Scores mit der Tumorverhornung

Bei den nicht verhornten Tumoren ist der Durchschnittswert des Scores (1,600) deutlich größer als bei den verhornten Tumoren (1,178). Aufgrund der geringen Anzahl an nicht verhornten Karzinomen, ist jedoch die Aussagekraft dieser Zahlen fraglich. Bei den Lymphknotenmetastasen unterscheiden sich die durchschnittlichen Scores kaum (verhornter Tumor 0,909, nicht verhornter Tumor 1,000).

3.4.7. Korrelation der Scores mit dem Alter des Patienten

Primärtumore:

Der durchschnittliche Score ist bei Patienten, die älter als 70 Jahre sind (Altersgruppe 3), etwas niedriger (1,000) als bei jüngeren Patienten der Gruppe 1 und 2 (Mittelwert 1,230 und 1,250).

Lymphknotenmetastasen:

Wie bei den Primärtumoren ist auch hier der Score bei der 3. Altersgruppe im

Durchschnitt gering kleiner (0,800) als bei den Gruppen 1 und 2 (0,923 und 0,935).

Die Differenzen der mittleren Scores sind zwischen den 3 Altersgruppen aber nur sehr gering und es ergeben sich sowohl für die Primärtumoren ($p= 0,557$, $r_s= -0,085$), als auch für die Metastasen ($p= 0,789$, $r_s= -0,039$) keine signifikanten Unterschiede.

3.4.8. Korrelation der Scores mit dem Geschlecht des Patienten

Für die verschiedenen Geschlechter ergeben sich folgende durchschnittlichen Scores:

	männlich	weiblich
Primärtumor	1,211	1,250
Lymphknotenmetastase	0,946	0,833

Tabelle 26: Score – Geschlecht (EGFR)

Bei diesen sehr geringen Abweichungen der durchschnittlichen Scores kann man keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern nachweisen.

Die Abbildungen 20 bis 22 zeigen Färbungen dieser Arbeit mit dem EGFR Antikörper.

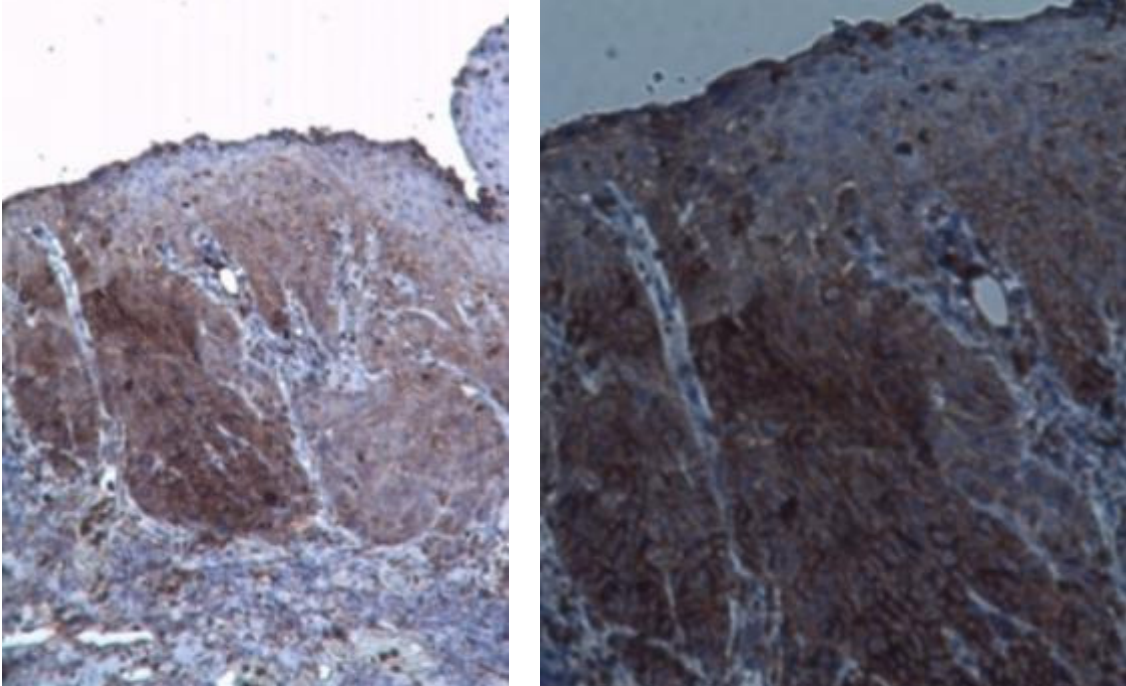


Abbildung 20: Anfärbung eines kleinherdig verhornten Plattenepithelkarzinoms der Uvula mit dem EGFR Antikörper, Tumorstadium: pT1N2cMX, Tumordifferenzierung: G3 (Vergrößerung: x50 und x100). An der Oberfläche sieht man das schichtungsgestörte Plattenepithel, von dem aus Epithelverbände invasiv in das Stroma einwachsen. Die Färbung durch den EGFR Antikörper ist in den einzelnen Tumorfokals von unterschiedlicher Intensität. Das Färbemuster scheint cytoplasmatisch und membranständig zu sein.

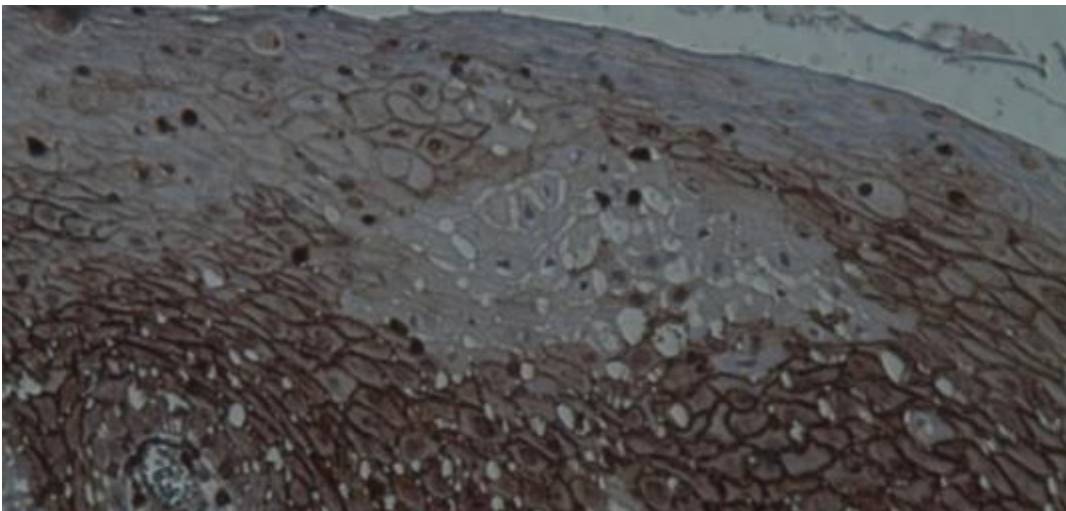


Abbildung 21: Anfärbung eines nicht verhornten Plattenepithelkarzinoms des Mundbodens mit dem EGFR Antikörper, Tumorstadium: pT1N2cMX, Tumordifferenzierung: G3 (Vergrößerung: x100). Auch hier erkennt man das schichtungsgestörte Plattenepithel der Mundschleimhaut. Die entarteten Epithelzellen variieren stark in ihrer Größe und Form. Sehr deutlich zu erkennen ist die membranständige Färbung durch den EGFR-Antikörper. Neben dieser ist auch eine Färbung des Cytoplasma sowie der Zellkerne zu sehen.

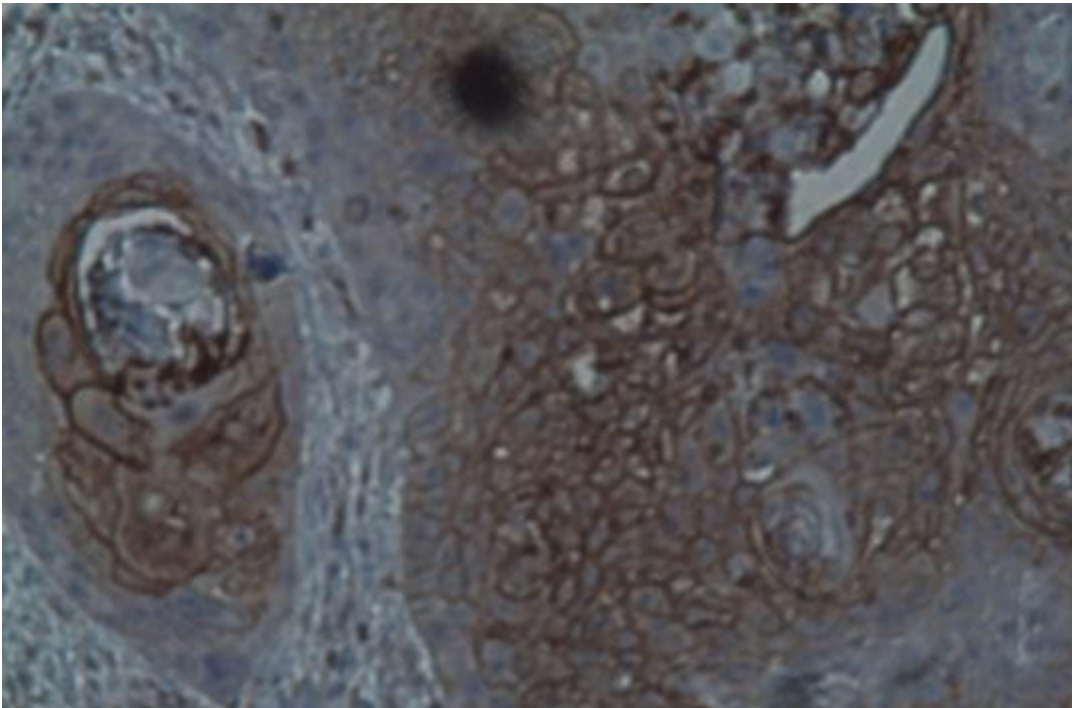
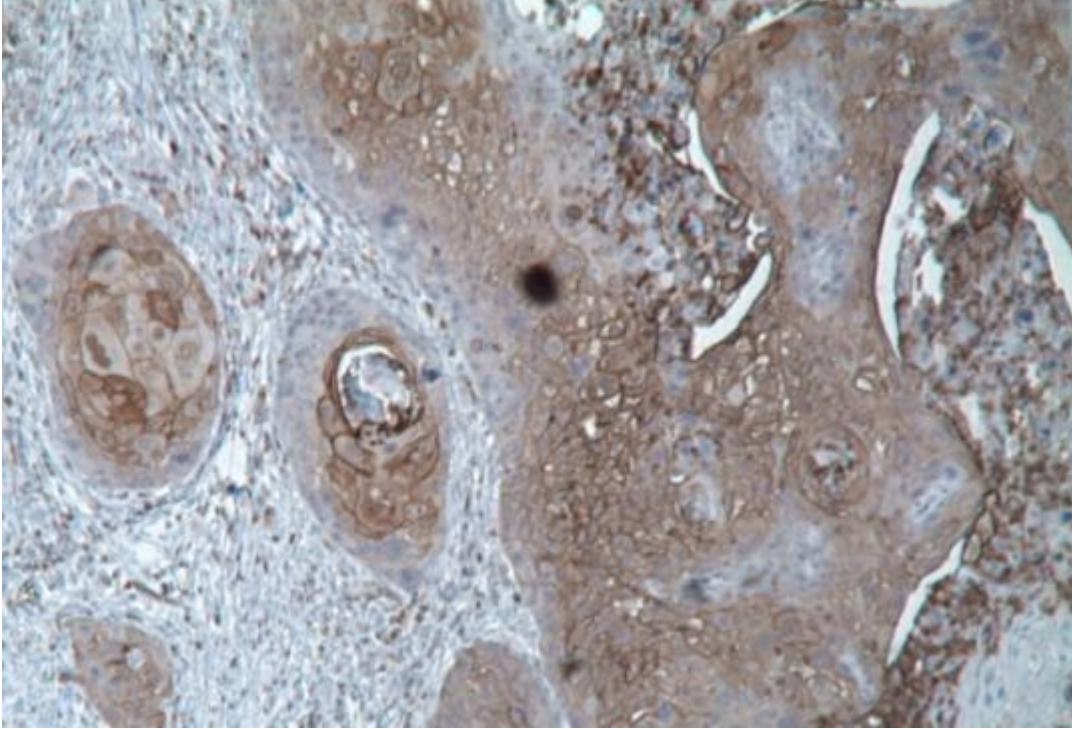


Abbildung 22: Anfärbung einer Lymphknotenmetastase eines verhornten Plattenepithelkarzinoms der Zunge mit dem EGFR Antikörper, Tumorstadium: pT2N2MX, Tumordifferenzierung: G2 (Vergrößerung: x50 und x100). Innerhalb der Tumorzellinfiltrate zeigt sich auch hier eine intensive Färbung der Zellmembran durch den EGFR Antikörper, wodurch ein typisches „netzartiges“ Reaktionsmuster entsteht. Die meisten Zellen zeigen gleichzeitig eine schwache Färbung des Cytoplasmas sowie teils Färbungen der Zellkerne. Die stark pleomorphen Tumorzellen zeigen deutlich vergrößerte Zellkerne mit stellenweise gut erkennbaren Mitosen.

3.5. C-src Tyrosinkinase

3.5.1. Expressionsmuster

Die folgenden Häufigkeitstabellen zeigen, dass bei den Primärtumoren und den Lymphknotenmetastasen etwas über die Hälfte der Schnitte durch den monoklonalen C-src Tyrosinkinase Antikörper angefärbt wurden. Knapp die Hälfte der Schnitte (40% bei den Primärtumoren und 42% bei den Lymphknotenmetastasen) wurden jeweils nicht markiert. In beiden Fällen trat bei den positiven Färbungen nur der Score 1 auf; es waren also in keinem Fall mehr als 25% der Zellen gefärbt. Der Durchschnittsscore beträgt 0,600 (Primärtumore), bzw. 0,571 (Lymphknotenmetastasen).

Score	Häufigkeit	Prozent
0	20	40 %
1	30	60 %
2	0	0 %
3	0	0 %
4	0	0 %

Tabelle 27: Score Primärtumor (C-src)

Score	Häufigkeit	Prozent
0	21	42 %
1	28	56 %
2	0	0 %
3	0	0 %
4	0	0 %

Tabelle 28: Score Lymphknotenmetastasen (C-src)

3.5.2. Korrelation der Scores der Primärtumore mit den Scores der Lymphknotenmetastasen

Genauso wie bei MAGE, VEGF-C und EGFR errechnete sich auch bei diesem Antikörper ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen den Scores der Primärtumore und der Metastasen ($p= 0,0002$, $r_s = 0,496$).

3.5.3. Korrelation der Scores mit der pT-Klassifikation

Bei den Primärtumoren und bei den Lymphknotenmetastasen war das Färbeverhalten in den einzelnen pT-Stadien nicht merklich unterschiedlich. Statistisch ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge.

Primärtumore:

durchschnittlicher Score: pT1:0,636; pT2:0,567; pT3:0,667; pT4:0,667
 $p= 0,938$; $r_s= 0,011$

LK-Metastasen:

durchschnittlicher Score: pT1:0,500; pT2:0,633; pT3:0,500; pT4:0,333
 $p= 0,828$; $r_s= -0,032$

3.5.4. Korrelation der Scores mit der pN-Klassifikation

Wie die folgenden Tabellen zeigen, ist bei den Primärtumoren und bei den Lymphknotenmetastasen der größte durchschnittliche Score bei pN1-Tumoren zu finden. In den folgenden pN-Stadien (2a, 2b, 2c) unterscheiden sich die Mittelwerte nur noch gering. Insgesamt lässt sich aber höchstens eine Tendenz eines negativen Zusammenhangs zwischen der pN-Klassifikation und dem Score feststellen; eine signifikante Korrelation besteht nicht (Primärtumor: $p= 0,330$, $r_s= -0,141$, Lymphknotenmetastase: $p= 0,332$, $r_s= -0,142$).

pN-Klassifikation	durchschnittlicher Score
1	0,700
2a	0,500
2b	0,526
2c	0,556

Tabelle 29: Score – pN-Klassifikation (Primärtumore, C-src)

pN-Klassifikation	durchschnittlicher Score
1	0,684
2a	0,500
2b	0,474
2c	0,556

Tabelle 30: Score – pN-Klassifikation (Lymphknotenmetastasen, C-src)

3.5.5. Korrelation der Scores mit dem histologischen Grading

Bei den Primärtumoren sind die durchschnittlichen Scores der mäßig differenzierten Tumore (0,586) und schlecht differenzierten Tumoren (0,619) annähernd gleich. Dadurch lässt sich auch der hohe p-Wert und r_s -Wert nahe null erklären ($p= 0,812$, $r_s= 0,033$).

Bei den Lymphknotenmetastasen ist der Score bei den G2-Tumoren im Durchschnitt etwas größer (0,643) als bei den schlechter differenzierten G3- Tumoren (0,474). Dies zeigt auch der negative Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient (-0,166). Ein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlich stark differenzierten Tumoren besteht aber nicht ($p= 0,252$).

3.5.6. Korrelation der Scores mit der Tumorverhornung

Bei den Primärtumoren ist der durchschnittliche Score der verhornten und der nicht verhornten Tumoren gleich (beide 0,600). Bei den Lymphknotenmetasta-

sen ist der Score bei den verhornten Tumoren (0,545) kleiner als bei den nicht verhornten Tumoren (0,800). Aber auch hier ist es aufgrund der Datenbeschaffenheit (nur fünf Patienten mit nicht verhorntem Tumor) nicht möglich, eine statistisch belastbare Schlussfolgerung aus diesen Werten zu ziehen.

3.5.7. Korrelation der Scores mit dem Alter des Patienten

Primärtumore:

Bei den Patienten ≤ 50 Jahre (Altersgruppe 1) liegt der durchschnittliche Score bei 0,692, in der Altersgruppe 2 bei 0,531 und bei der Altersgruppe 3 bei 0,800. Ein Zusammenhang zwischen Alter und Score lässt sich aus diesen Zahlen nicht erschließen. Auch die statistische Berechnung zeigt, dass zwischen den Merkmalen keine deutliche Tendenz in Form einer Korrelation besteht ($p=0,845$ und $r_s = -0,028$).

Lymphknotenmetastasen:

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Scores für die verschiedenen Altersgruppen bei den Lymphknotenmetastasen. Auffallend ist der viel kleinere Wert bei der 3. Altersgruppe. Der Durchschnittsscore bei der 2. Gruppe ist gering kleiner als bei der 1. Gruppe. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in diesem Punkt auch bei dem VEGF A Antikörper. Auch hier war der durchschnittliche Score bei den ältesten Patienten deutlich kleiner.

Altersgruppe	durchschnittlicher Score
1	0,692
2	0,580
3	0,200

Tabelle 31: Score – Alter (Lymphknotenmetastasen, C-Src)

Statistisch signifikante Ergebnisse liegen nicht vor ($p=0,108$, $r_s = -0,233$).

3.5.8. Korrelation der Scores mit dem Geschlecht des Patienten

Die folgenden durchschnittlichen Scores zeigen keinen wesentlichen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Patienten.

	männlich	weiblich
Primärtumor	0,605	0,583
Lymphknotenmetastase	0,595	0,500

Tabelle 32: Score – Geschlecht (C-Src)

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Fotos von Färbungen dieser Arbeit mit dem C-Src Tyrosinkinase Antikörper.

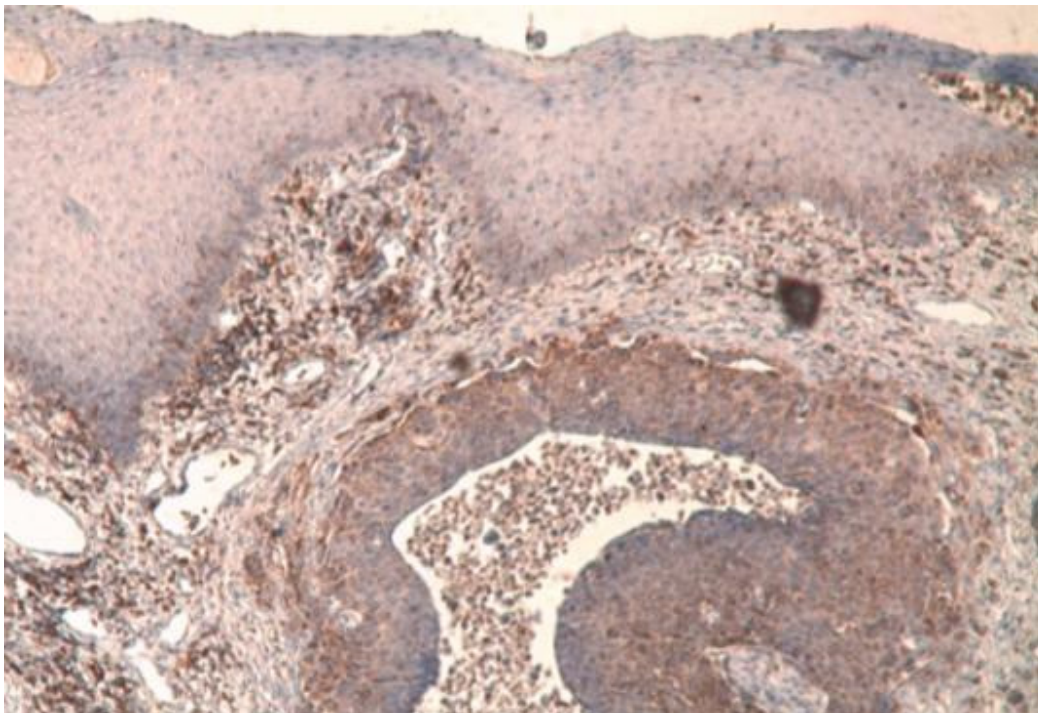


Abbildung 23: Anfärbung eines gering verhornten Plattenepithelkarzinom der Zunge mit dem C-Src Tyrosinkinase Antikörper, Tumorstadium: pT2N2bMX, Tumordifferenzierung: G3 (Vergrößerung: x50). Zu erkennen ist eine diffuse, schwache cytoplasmatische Färbung durch den C-Src Antikörper.

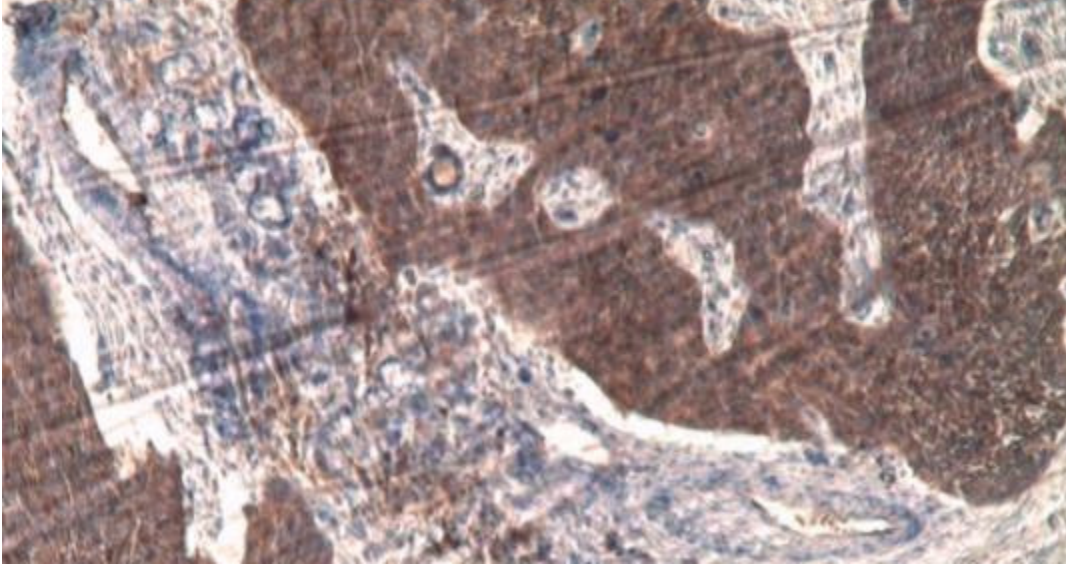


Abbildung 24: Anfärbung eines verhornten Plattenepithelkarzinom des Oropharynx mit dem C-Src Tyrosinkinase Antikörper, Tumorstadium: pT1N2cMX, Tumordifferenzierung: G2 (Vergrößerung: x50). Auffällig ist die cytoplasmatische Färbung innerhalb der Tumorzellinfiltrate.

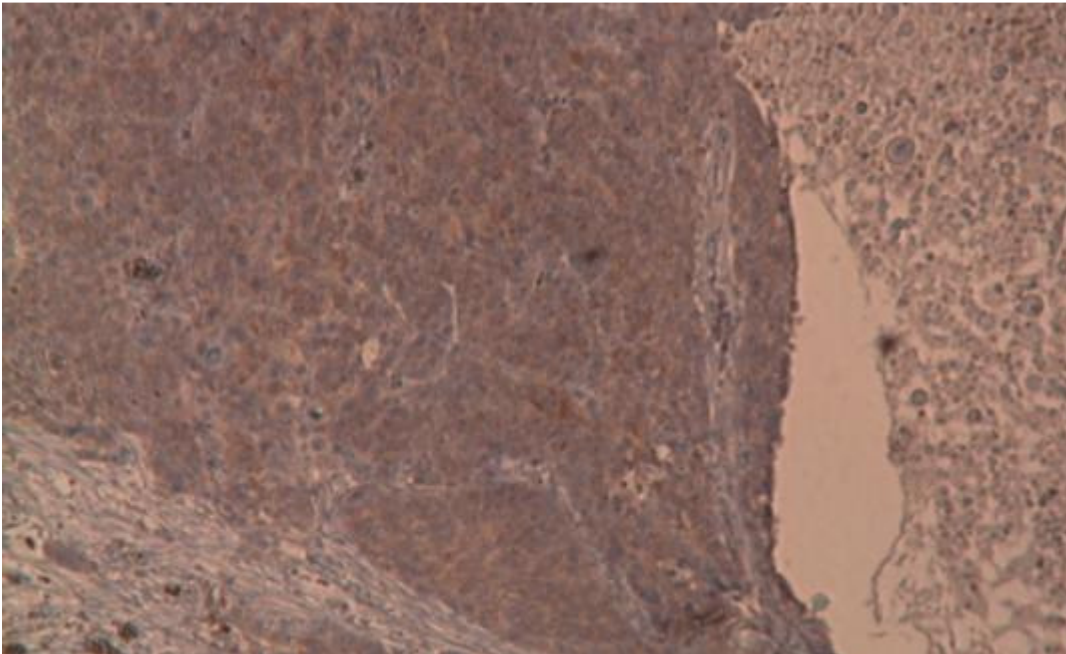


Abbildung 25: Anfärbung einer Lymphknotenmetastase eines gering verhornten Plattenepithelkarzinom des Pharynx mit dem C-Src Tyrosinkinase Antikörper, Tumorstadium: pT2N1MX, Tumordifferenzierung: G2 (Vergrößerung: x50). Die Abbildung zeigt eine diffuse cytoplasmatische Färbung der Lymphknotenmetastase.

3.6. Korrelation der Scores der verschiedenen Antikörper

Eine signifikante Korrelation zeigte sich zwischen den folgenden Scores:

- VEGF-A & VEGF-C
Signifikante Korrelation der Scores (Primärtumor u. Lymphknotenmetastase) bei VEGF-C mit den Scores der Primärtumore bei VEGF-A.
- VEGF-C & EGFR
Signifikante Korrelation der Scores (Primärtumor u. Lymphknotenmetastase) bei EGFR mit den Scores der Lymphknotenmetastasen bei VEGF-C.

Die folgende Tabelle gibt die p-Werte und die Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten dieser signifikanten Ergebnisse wieder.

Variablenpaar	p-Wert	r_s
VEGF A (Primärtumore) & VEGF C (Primärtumore)	0,045	0,284
VEGF A (Primärtumore) & VEGF C (LK-Metastasen)	0,011	0,360
VEGF C (LK-Metastasen) & EGFR (Primärtumore)	0,011	0,360
VEGF C (LK-Metastasen) & EGFR (LK-Metastasen)	0,041	0,293

Tabelle 33: Korrelation der Scores der verschiedenen Antikörper (signifikant)

Zwischen dem Score bei dem MAGE A Antikörper und bei dem C-Src Tyrosinkinase Antikörper zeigt sich ein tendenziell positiver Zusammenhang. Wie in der nachstehenden Tabelle dargestellt, sind die p-Werte nur gering größer als die festgelegte Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 5%.

Variablenpaar	p-Wert	r_s
C-Src (Primärtumore) & MAGE (Primärtumore)	0,0698	0,259
C-Src (Primärtumore) & MAGE (LK-Metastasen)	0,0588	0,272

Tabelle 34: Korrelation der Scores der verschiedenen Antikörper

4. Diskussion

Maligne Tumoren im Kopf- und Halsbereich stellen weltweit einen erheblichen Teil der Krebserkrankungen dar. Trotz großen Bemühens in den letzten Dekaden das diagnostische und therapeutische Spektrum zu erweitern und zu verbessern, sind die Überlebensraten nach erfolgter Therapie nicht zufriedenstellend und nahezu unverändert ungünstig geblieben. Nach wie vor ist die Prognose von Kopf- und Halskarzinomen maßgeblich geprägt durch eine schlechte 5-Jahres-Überlebensrate und eine hohe Rezidivrate [36]. Die genaue Betrachtung statistischer Daten zeigt, dass eine späte Diagnose mit einem dementsprechend fortgeschrittenen Krankheitsstadium eine wesentlich schlechtere Prognose zur Folge hat als es bei einem früheren Diagnosezeitpunkt der Fall wäre [36, 64]. Dies zeigt sich insbesondere bei Tumoren, die aufgrund ihrer topographischen Lage nur schlecht oder gar nicht einsehbar sind, wie z.B. Hypopharynxkarzinome.

Der medizinische Bedarf an neuen, verbesserten Behandlungsoptionen ist hoch. Und gleichzeitig ist die Erforschung diagnostischer Möglichkeiten, die es erlauben würden, Tumoren im Kopf- und Halsbereich durch Screening frühzeitig zu entdecken, von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang nehmen Tumormarker in Zukunft möglicherweise eine immer bedeutendere Rolle ein. Ihr tumorspezifisches oder tumorassoziiertes Vorkommen macht sie zu potentiellen molekularen Markern, die zur frühen und verbesserten Diagnostik und zum gezielten Bekämpfen von Tumorzellen eingesetzt werden können.

Der wissenschaftliche Ansatz der vorliegenden Dissertation ist die Untersuchung des Expressionsverhalten zellulärer Marker beim metastasierenden Kopf- und Halskarzinom. Bei den hier untersuchten Tumorgeweben wurde die Expression der Marker sowohl in den Primärtumoren als auch in den Lymphknotenmetastasen ermittelt. Im Weiteren erfolgte die Gegenüberstellung der Ergebnisse des Expressionsverhalten mit den klinischen und histopathologischen Tumorbefunden. Es wurde analysiert, ob Zusammenhänge zum dem pT-Stadium, dem pN-Stadium, dem histologischen Grading, der Tumorverhornung,

dem Patientenalter und dem Geschlecht des Patienten bestehen. In der statistischen Analyse wurden mittels des Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten und des Fisher-Exakt-Tests die Berechnungen durchgeführt und signifikante Ergebnisse aufgedeckt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst und werden mit den Erkenntnissen aus bisherigen Untersuchungen verglichen.

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich dieser mit bisherigen Studien

MAGE-A-Tumorantigene

In der vorliegenden Arbeit zeigen 74% der Proben der Primärtumore und 68% der Proben der Lymphknotenmetastasen eine positive Färbung für den MAGE A 57B Antikörper. Die Färbungen fielen hierbei überwiegend schwach bis moderat (Score1 und 2) aus.

Eine signifikante Korrelation ist beim Vergleich der Färbung des Primärtumors mit der Färbung der Lymphknotenmetastase eines Patienten zu erkennen. Hieraus lässt sich möglicherweise schließen, dass die Expression des Antikörpers vom individuellen Erkrankungsfall eines Patienten abhängig ist. Das heißt, falls bei einem Patienten im Primärtumor eine Überexpression des MAGE-A-Antigens nachzuweisen ist, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass dieses auch für die Metastasen zutrifft.

Hinsichtlich der Zusammenhänge des Expressionsverhaltens mit den klinischen und histopathologischen Merkmalen konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Korrelationen ermittelt werden. Es wurden lediglich die folgenden Tendenzen beobachtet:

- ein tendenziell negativer Zusammenhang zwischen den Färbungen und der pN-Klassifikation (durchschnittliche Expressionsrate bei pN1-

Tumoren am größten)

- ein tendenziell negativer Zusammenhang zwischen den Färbungen und dem histologischen Grading (stärkere Genexpression bei den mäßig differenzierten G2-Tumoren als bei den schlechter differenzierten G3-Tumoren)
- ein tendenzieller Zusammenhang zwischen den Färbungen und der Tumorverhornung (stärkere Expression bei den verhornten Tumoren)
- ein tendenzieller Zusammenhang zwischen den Färbungen und dem Patientengeschlecht (stärkere Expression bei den männlichen Probanden).

Zwischen dem Expressionsverhalten des MAGE 57 B Antikörpers und dem pT-Stadium, sowie dem Alter des Patienten konnten aus den vorliegenden Ergebnissen keinerlei Hinweise auf eventuell mögliche Zusammenhänge erkannt werden.

Ähnliche Ergebnisse gehen aus zwei Studien von Ries et al. hervor. In einer Studie aus dem Jahr 2005, untersuchten sie die Expression der MAGE-Antigene A1 bis A6 in 21 oralen Plattenepithelkarzinomen und in 10 Geweben von gesunden Probanden. In 15 der 21 Tumoren (71%) wurde zumindest einer der sechs MAGE-Antigene exprimiert. Dahingegen fand im gesunden Kontrollgewebe keine MAGE-Expression statt [108]. Drei Jahre später veröffentlichte die Forschungsgruppe von Ries et al. eine weitere Studie zur MAGE-A-Expression in oralen Plattenepithelkarzinomen, in der sie das Expressionsverhalten der MAGE Antigene A1 bis A6 und A12 in 55 Tumoren und in 20 nicht pathologischen Geweben analysierten. Wie in der Studie zuvor, waren die gesunden Gewebe nicht positiv für MAGE-A. In 85,45% der Tumoren wurde mindestens eines der sieben MAGE-A-Antigene exprimiert. Des Weiteren wurde in dieser Studie das Expressionsverhalten mit klinischen und histopathologischen Tumormerkmalen, wie TNM-Klassifikation, Tumorstadium und histologischem Grading verglichen. Genauso, wie in der vorliegenden Arbeit, konnten auch hier keine signifikanten Zusammenhänge zu diesen Parametern festgestellt werden [96].

Auch die Forschungsergebnisse von Eura M. et al., aus einer Studie aus 1995,

zeigen eine vergleichbare Expressionsrate der MAGE-Genfamilie im Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halbereichs. In 71% der getesteten Tumorproben konnte das MAGE-Gen nachgewiesen werden. Auch in dieser Arbeit fiel eine Expression des Gens im gesunden Patientengewebe negativ aus. Bezüglich des Zusammenhangs zu den Tumorparametern, berichten Eura M. et al. von einer positiven Korrelation zum Differenzierungsgrad des Tumors. MAGE-1 wurde öfters in schlecht differenzierten Tumoren, weniger häufig in moderat differenzierten Tumoren und nur selten in gut differenzierten Tumoren beobachtet. Diese Ergebnisse widersprechen den Zahlen aus der vorliegenden Dissertation, bei der MAGE in schlechter differenzierten Tumoren tendenziell weniger exprimiert war als in moderat differenzierten Tumoren. Ferner beobachteten Eura M. et al., dass die MAGE-Expression mit der anatomischen Lage des Tumors variiert. So wurde das MAGE-1-Gen relativ häufig in Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx, des Hypopharynx und des Sinus maxillaris, und dagegen weniger in den Karzinomen des Larynx, der Zunge und der Mundhöhle exprimiert [252].

Lee K. D. et al. untersuchten 2006 in einer Studie die Expression von MAGE A 1 bis 6 mRNA im Sputum von Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen und erhielten eine Expressionsrate von 76,47 % [253].

VEGF

VEGF-A:

68% der Proben der Primärtumore und 64% der Proben der Lymphknotenmetastasen zeigen in der vorliegenden Arbeit eine positive Färbung für den VEGF-A-Antikörper. Die Färbungen wurden, abgesehen von einer Ausnahme, als ausschließlich schwach (Score1) bewertet.

Beim Vergleich der Färbung des Primärtumors mit der Färbung der Lymphknotenmetastase eines Patienten, konnte im Unterschied zu den anderen vier getesteten Antikörpern, bei VEGF-A keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Tendenziell bestand aber auch der Trend zu einem positiven Zusammenhang.

Bezüglich der Zusammenhänge zwischen dem Expressionsverhalten und den klinischen und histopathologischen Parametern, konnten auch hier keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden. Beim Vergleich der Färbungen mit der pT-Klassifikation ist sowohl bei den Primärtumoren als auch bei den Lymphknotenmetastasen die Tendenz zu einem positiven Zusammenhang erkennbar (stärkste Expression bei pT4-Tumoren, geringste Expression bei pT1-Tumoren). Beim Vergleich mit der pN-Klassifikation bestehen diese Parallelen nur für die Primärtumoren. Des Weiteren konnte bei den Lymphknoten beobachtet werden, dass bei jüngeren Patienten die Expression im Durchschnitt tendenziell höher war. Weitere Tendenzen zu Zusammenhängen konnten für diesen Antikörper nicht erkannt werden.

VEGF-C:

Bei dem VEGF-C-Antikörper liegt die Expressionsrate in der vorliegenden Arbeit bei nahezu 100% (96% bei den Primärtumoren und 98% bei den Lymphknotenmetastasen). Die Färbungen fielen überwiegend moderat (Score 2) aus.

Der Vergleich der VEGF-C-Expression in den Primärtumoren und in den Metastasen deckte eine signifikant positive Korrelation auf.

Die Auswertungen der Färbungen bezüglich der Tumorverhornung ergaben, dass bei nicht verhornten Tumoren der Antikörper etwas stärker exprimiert ist. Um ein signifikantes Ergebnis handelt es sich hier aber nicht. Außerdem konnte bei den Lymphknotenmetastasen ein tendenziell negativer Zusammenhang der Expressionsrate zum Alter beobachtet werden (stärkere Expression bei jüngeren Patienten). Diese Beobachtung zwischen der VEGF-Expression und dem Patientenalter wurde in der vorliegenden Arbeit bereits bei dem VEGF-A Antikörper festgestellt. Weitere Zusammenhänge zwischen den Färbungen und den klinischen und histopathologischen Tumormerkmalen sind für VEGF-C nicht eindeutig erkennbar.

Auch Do N.Y. et al. konnten in ihren Untersuchungen zur VEGF-Expression in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs keine signifikante Asso-

ziation zwischen dem VEGF Level und klinischen oder histopathologischen Parametern feststellen [254].

Onesto C. et al. untersuchten in einer 2006 veröffentlichten Studie das Expressionsverhalten von VEGF-A in Kopf- und Halskarzinomen. Sie beobachteten, dass der Antikörper in fast allen Tumoren (98,3%) exprimiert wurde. Diese Werte sind deutlich höher als die Zahlen in der vorliegenden Arbeit. Ferner verglichen Onesto C. et al. das Expressionsverhalten mit klinischen und histopathologischen Parametern, wie Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Differenzierungsgrad. Sie berichten davon, dass die VEGF-A-Expression signifikant mit dem Differenzierungsgrad des Tumors korreliert, wobei die Expressionsraten bei den schlechter differenzierten Tumoren größer als bei den besser differenzierten Tumoren waren. Einen signifikanten Zusammenhang zum Tumorstadium oder zum Lymphknotenstatus konnten sie nicht nachweisen [255].

Gegensätzlich zu diesen Erkenntnissen von Onesto C. et al. sind die Studienergebnisse von Margaritescu et al.. Die Forschungsgruppe zeigte 2010 in einer Studie, in der sie die VEGF-Expression und Angiogenese in oralen Plattenepithelkarzinomen untersuchten, dass die VEGF-Expression abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors ist. Hierbei war die VEGF-Expression in schlecht differenzierten Karzinomen aber geringer als die in moderat und gut differenzierten Tumoren. Eine Korrelation zwischen der VEGF-Expression und dem klinischen Tumorstadium oder dem Lymphknotenstatus konnten auch sie nicht aufdecken [256].

Die Forschungsgruppe von Pornchai et al. untersuchte in einer Studie die Expression der VEGF-Mitglieder, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D in Plattenepithelkarzinomen des Kopf und Halsbereichs. Sie fanden eine Hochregulation von VEGF-A und VEGF-C. Gegensätzlich hierzu verhielt sich die VEGF-D-Expression, welche in den Karzinomen im Vergleich zu normalen Gewebe vermindert war. Obwohl VEGF-C und VEGF-D sehr große strukturelle Ähnlichkeiten haben und die gleichen Rezeptoren binden, zeigte die Studie sehr unterschiedliche Expressionsverhalten in Kopf und Hals-Plattenepithelkarzinomen. Die Expression von VEGF-B zeigte keine Unter-

schiede zwischen der Expression in den Tumoren und der im gesunden Gewebe. Weiterhin zeigten Pornchai et al., dass bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen, VEGF-A und VEGF-C stärker exprimiert werden als bei Patienten ohne LK-Metastasen [257].

Li C. et al. beschrieben 2005 in einer Studie eine Korrelation zwischen der VEGF-Expression in oralen Plattenepithelkarzinomen und dem Differenzierungsgrad sowie der Tumorinvasion [258].

EGFR

92% der Proben der Primärtumore und 82% der Proben der Lymphknotenmetastasen zeigen in der vorliegenden Arbeit eine positive Färbung für den EGFR-Antikörper. Hierbei fielen die Färbungen überwiegend schwach bis moderat (Score1 und 2) aus.

Ein signifikantes Ergebnis ergibt sich bei der Gegenüberstellung der Färbung des Primärtumors mit der Färbung der Lymphknotenmetastase eines Patienten.

Bezüglich der Zusammenhänge des Expressionsverhaltens mit den klinischen und histopathologischen Merkmalen konnte in dieser Arbeit für den EGFR-Antikörper eine signifikante Erkenntnis gemacht werden. Es besteht eine signifikant positive Korrelation zwischen der EGFR-Expression in den Primärtumoren und der pN-Klassifikation. Je größer das pN-Stadium, desto stärker wird der Antikörper im Primärtumor exprimiert. Weitere eindeutige Zusammenhänge zu den anderen Tumorparametern können nicht behauptet werden. Lediglich beim Vergleich der Tumorverhornung mit dem Expressionsverhalten in den Primärtumoren war auffällig, dass bei den nicht verhornten Tumoren der durchschnittliche Score deutlich größer war als bei den verhornten Tumoren. Dieses Ergebnis ist aber aufgrund des Probandenkollektivs (nur fünf Patienten mit nicht verhorntem Tumor) mit großer Vorsicht zu sehen und liefert keine Grundlage, um Behauptungen aufzustellen.

Hinsichtlich der Expressionsraten des EGFR-Antikörpers zeigen Angaben aus anderen Studien ähnliche Ergebnisse. Carlsson et al. untersuchten in einer

Studie an Larynxkarzinomen die EGFR-Expression in den Primärtumoren und den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen. 87,5% der Primärtumore und 82,5% der Lymphknotenmetastasen zeigten eine EGFR-Überexpression. Vergleichbar mit der Erkenntnis der vorliegenden Arbeit konnten auch Carlsson et al. eine positive Korrelation zwischen der EGFR-Expression im Primärtumor und den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen feststellen. Sie schlussfolgerten aus ihren Untersuchungsergebnissen, dass die hohe Dichte und Stabilität der EGFR-Expression ermutigend ist für die Durchführung EGFR-gerichteter Therapien [259].

Laut Seta A. Sarkis et al. (Studie über das Expressionsverhalten von EGFR in oralen Plattenepithelkarzinomen, 2010) liegt die positive EGFR Expression bei 87,5%, wobei auch hier die Färbungen überwiegend schwach bis moderat bewertet wurden. Ein signifikanter Zusammenhang der EGFR Expression zu klinischen und histopathologischen Parametern (Tumorstadium, Tumorgröße, Status der Lymphknotenmetastasen, histologisches Grading) ging aus den Forschungsergebnissen von Seta A. Sarkis et al. nicht hervor [200].

Auch andere Autoren weisen Werte von bis zu über 90% positive EGFR Expression in Hals- und Kopfkarzinomen an und liegen damit im vergleichbaren Bereich mit den Werten dieser Dissertation [198, 199, 260, 261].

Dassonville O. et al. berichten in den Ergebnissen ihrer Studie über das Expressionsverhalten von EGFR, im oberen Aerodigestivtrakt sogar von einer EGFR-Expression von 100%. Auch sie konnten keine eindeutige Korrelation zwischen der EGFR Expression und dem Differenzierungsgrad des Tumors feststellen. Einen signifikanten Unterschied in der Expression von EGFR bei den vier verschiedenen Tumorstadien konnten sie in Ihrer Studie jedoch aufdecken. Wobei die Expressionsrate mit höherem Tumorstadium ansteigt [262].

Ähnlich der Erkenntnis von Dassonville O. et al. und der Beobachtung einer signifikant positiven Korrelation zwischen der EGFR Expression in den Primärtumoren und der pN-Klassifikation in der vorliegenden Arbeit ist das Ergebnis von Kusakawa et al. aus einer Studie über das Expressionsverhalten von

EGFR in oralen Plattenepithelkarzinomen. Die Forschungsgruppe von Kusakawa et al. berichtet, dass die Expression von EGFR in oralen Plattenepithelkarzinomen mit einem fortgeschrittenen T-Stadium des Primärtumors und dem Auftreten von Metastasen assoziiert ist [263].

Auch Do N. Y. et al. schreiben von einem Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression und dem Tumorstadium sowie dem Auftreten an Lymphknotenmetastasen [254].

Laut den Angaben aus einer Studie von Santini J. et al. besteht eine signifikante Korrelation zwischen der EGFR-Expression und der Tumorgröße sowie dem Tumorstadium in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs [264].

C-Src

60% der Proben der Primärtumoren und 56% der Proben der Lymphknotenmetastasen zeigen in der vorliegenden Arbeit eine positive Färbung für den CSK-Antikörper, wobei alle Färbungen sehr schwach ausfielen und ausschließlich mit dem Score 1 bewertet wurden.

Wie bei den Markern MAGE, VEGF-C und EGFR konnte auch für C-Src eine positive Korrelation zwischen der Antikörper-Expression in den Primärtumoren und der Expression in den Lymphknotenmetastasen beobachtet werden.

Weitere signifikante Ergebnisse ergaben sich in den Berechnungen der statistischen Analyse für den Tyrosinkinase Antikörper nicht. Hinsichtlich der Zusammenhänge des Expressionsverhaltens mit den klinischen und histopathologischen Merkmalen, konnten in dieser Arbeit lediglich die folgenden Tendenzen beobachtet werden:

- Die Neigungen zu einem negativen Zusammenhang zwischen den Färbungen der Lymphknotenmetastasen und dem histologischen Grading (stärkere Genexpression bei den mäßig differenzierten G2-Tumoren als bei den schlechter differenzierten G3-Tumoren).
- Ein Zusammenhang zwischen den Färbungen der Lymphknotenmetastasen und der Tumorverhornung (stärkere Expression bei den nicht ver-

hornten Tumoren).

- Ein Zusammenhang zwischen den Färbungen der Lymphknotenmetastasen und dem Patientenalter (kleinerer durchschnittlicher Score bei älteren Patienten).

Interessanterweise fiel dieser tendenziell negative Zusammenhang zwischen der Antikörper-Expression in den Lymphknotenmetastasen und dem Patientenalter schon bei den beiden VEGF-Antikörpern auf.

Ein Zusammenhang zwischen den drei Parametern (Grading, Alter und Tumorerhornung) und den Färbungen der Primärtumore besteht nicht. Erkennbare Abweichungen in den Expressionsraten bei den einzelnen Stadien der pT und pN-Klassifikation wurden weder für die Primärtumoren noch für die Lymphknotenmetastasen beobachtet.

Einige Ergebnisse aus Studien anderer Autoren berichten über erhöhte Level an Src-Kinasen in Kopf- und Halskarzinomen. Genaue Angaben zur Expressionsrate und zum Vergleich mit klinischen oder histopathologischen Tumormerkmalen gingen aus diesen Veröffentlichungen aber nicht hervor, womit ein direkter Vergleich der Zahlen dieser Dissertation, mit denen anderer Autoren, leider nicht möglich ist. Dennoch liefern die Forschungsergebnisse der gelesenen Literatur viele andere interessante Informationen zur Src-Expression in Karzinomen des Kopf- und Halsbereichs, sowie in anderen Tumoren.

Wheeler D. L. et al. schreiben von einem Zusammenhang zwischen der c-Src Aktivität sowie der Expression und der Prognose bei verschiedenen Karzinomen, wobei eine höhere c-Src Expression bzw. Aktivität mit einer schlechteren Prognose korreliert [218].

Laut Dempke W. et al. korreliert die Expression von Src-Kinase mit der Prognose, der Malignität des Tumors und dem Vorkommen von Metastasen [229].

Egloff A. M. et al. und Irby R. B. et al. berichten davon, dass eine unangemessene Funktion von Src-Kinasen zur Tumorgenese, Tumorerprogression und Metastasierung beiträgt [249, 265].

Van Oijen M. G. et al. haben in einer Studie zur c-Src-Überexpression gezeigt, dass c-Src in Bereichen der Hyperproliferation von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs, in dysplastischem Epithel, in benignen epithelialen Tumoren, sowie in entzündetem normalen Gewebe überexprimiert ist [266].

Beim Vergleich der Expressionsraten, der in dieser Arbeit getesteten Antikörper untereinander, konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der VEGF-C und VEGF-A Expression sowie zwischen der VEGF-C und EGFR Expression festgestellt werden.

P. H. Rhys-Evans et al. untersuchten in einer Studie die Korrelation zwischen dem Vorkommen von C-erbB Rezeptoren und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sowie VEGF in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs. Korrespondierend zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, berichten auch sie über einen signifikanten Zusammenhang zwischen der EGFR und VEGF-C Expression. Darüberhinaus konnten sie auch eine signifikante Korrelation zwischen der EGFR und VEGF-A Expression zeigen [267]. Diese liegt in der vorliegenden Arbeit nicht vor.

Anders als die Erkenntnisse von Rhys-Evans et al., verhalten sich die Angaben von N. Y. Do et al, die ebenfalls die Expression von C-erbB Rezeptoren, MMPs und VEGF in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs untersuchten. Entsprechend ihrer Studienergebnisse liegt keine Korrelation zwischen der EGFR und VEGF-Expression vor [254].

4.2. Klinische Relevanz:

Die Bedeutung der Expression zellulärer Marker in der Diagnostik, Prognostik und Therapie von Kopf- und Halskarzinomen

Die prognostische Einschätzung und die Festlegung der therapeutischen Vorgehensweise bei der Therapie von Kopf- und Halskarzinomen richten sich ge-

genwertig nach gewöhnlichen Parametern, wie TNM-Klassifikation, Tumorstadium und histologischem Grading. Auf der Grundlage dieser Tumormerkmale kann nur eine grobe Abschätzung des klinischen Verlaufs gegeben werden. Die genaue Voraussage der Prognose ist jedoch schwierig, da Karzinome, trotz übereinstimmender klinischer und histopathologischer Parameter, durchaus Unterschiede in ihrem biologischen Verhalten zeigen. Somit stellt die Beurteilung des individuellen Verlaufs der Tumorerkrankung derzeit noch ein ungelöstes Problem dar. Tumorantikörper stellen mögliche Marker dar, die helfen könnten, die individuelle Prognose zuverlässiger einzuschätzen. In vielen Studien wurden bereits Zusammenhänge zwischen der Expression zellulärer Marker und der Patientenprognose beschrieben. Auch für die, in dieser Dissertation untersuchten Antikörper, liegen bereits Ergebnisse aus einigen Studien vor.

In einer Studie von Cuffel C. et al. wurden das Vorkommen und die klinische Signifikanz von Cancer-testis Antigenen, unter diesen auch eine Reihe verschiedener MAGE-A Antigene, in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs evaluiert. Cuffel C. et al. analysierten den Zusammenhang zwischen der Antigenexpression und den klinischen Tumormerkmalen einerseits, sowie dem klinischen Krankheitsverlauf andererseits. Ihre Ergebnisse zeigen, dass die Expression von CT Antigenen mit einem schlechteren Gesamtüberleben korreliert. Darüberhinaus stellten sie fest, dass die Expression von MAGE-A4, sogar unabhängig von den klinischen Parametern, mit einer schlechteren Prognose zusammenhängt. Diese Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von Cancer-testis Antigenen mit einem stärker malignen Phänotyp assoziiert ist und weisen auf deren Nutzen als prognostische Marker bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs hin [268].

Dassonville O. et al. untersuchten in einer Studie die Expression des Epidermal Growth Factor Receptors im Vergleich mit dem Überleben von Patienten mit Karzinomen des oberen Aerodigestivtrakt. Sie berichten, dass eine EGFR Überexpression mit kürzeren, rezidivfreien Intervallen und einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit assoziiert ist [262].

Zahlreiche weitere Autoren, wie Cojocariu O.M. et al. und Chang S. et al., konn-

ten zeigen, dass es eine Korrelation zwischen einer EGFR-Überexpression und einer schlechteren Prognose gibt [269, 270].

In verschiedenen Studien wurde ebenso beschrieben, dass eine Assoziation zwischen der Expression des vaskulären endothelialen Growth Faktor (VEGF) sowie seinem Rezeptor (VEGFR) und der Prognose von Kopf- und Halskarzinomen vorliegt. Erhöhte VEGF-Level im Serum von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs induzieren scheinbar Tumorwachstum, Metastasierung und Behandlungsmisserfolge [181].

Auch für Kinasen der Src-Familie liegen Daten vor, dass deren Expressionslevel mit einem schlechteren Verlauf der Tumorerkrankung korreliert [218, 246, 249, 265, 271, 272].

Für die Therapie von Kopf- und Halskarzinomen nehmen molekulare Marker einen immer größeren Stellenwert ein. Die molekularbiologische Forschung der letzten Jahre führte zu einer beachtlichen Wissensanreicherung über genetische und zellbiologische Veränderungen von malignen Erkrankungen. Die Hoffnung der Forschung besteht nun darin, anhand dieser Erkenntnisse neue, zukunftsweisende Therapeutika zu entwickeln, die effektiver als konventionelle Chemotherapeutika sind und gleichzeitig weniger Nebenwirkungen versprechen [273]. Die herkömmlichen Chemotherapeutika richten sich relativ unspezifisch gegen sich schnell vermehrende oder sich in Zellteilung befindliche Zellen. Zielgerichtete („targeted“) molekulare Therapeutika sollen dagegen direkt in die Mechanismen der Tumorgenese eingreifen [274].

Erste zielgerichtete molekulare Therapiestrategien haben sich während der letzten Dekade in der klinischen Anwendung durchgesetzt. Sie haben einen bedeutenden Einfluss auf das Überleben von Krebspatienten in vielen verschiedenen Bereichen der klinischen Onkologie verursacht. Bei der Behandlung verschiedener maligner Tumoren, wie z.B. Karzinome des Kolon, der Lunge und der Niere, sind molekulare Pharmaka, die an EGF- und VEGF-Rezeptoren angreifen, im klinischen Alltag bereits zugelassen [275-277].

In jüngster Zeit werden immer wieder neue Daten veröffentlicht, die zeigen,

dass sich, auch für die Therapie von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs, zelluläre Marker als wirksam erweisen. In der Behandlung von Kopf- und Halskarzinomen ist der EGFR-Antikörper Cetuximab (Erbix[®]) die bisher einzig zugelassene Therapieoption. Auch in dem antiangiogenetischen Effekt von Bevacizumab, das gezielt den vaskulären endothelialen Growth Factor (VEGF) angreift, wird große Hoffnung gesetzt. Im Kopf-Hals-Bereich sind VEGF-Inhibitoren derzeit aber noch nicht zugelassen.

Die momentan aussichtsreichsten, meist entwickelten Therapiestrategien, sind die Blockade zellulärer Signalwege, die auf Wachstumsfaktoren basieren, und die Störung der Angiogenese (EGFR und VEGFR-assoziierte Strategien). Aber auch Inhibitoren alternativer Angriffsziele, wie z.B. Src-Kinasen, sind bereits Teil klinischer Studien an Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen und zeigen zukunftsweisende Ergebnisse.

Unter den EGFR-assoziierten Möglichkeiten der molekularen Therapie differenziert man zwischen zwei großen Kategorien: Die direkte Hemmung der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne durch monoklonale Antikörper (mAb), wie Cetuximab, Panitumumab und Zalutumumab und die Antagonisierung der intrazellulären Domäne durch niedrigmolekulare Tyrosinkinaseinhibitoren (TK-Inhibitoren/TKI), wie Gefitinib und Erlotinib [184, 190, 204-209].

Cetuximab ist ein monoklonaler IgG1-Antikörper, der gezielt am epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ansetzt und diesen mit höherer Affinität bindet, als seine endogenen Liganden es tun. Für die Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs ist dieser Antikörper seit 2006 in Kombination mit einer Strahlentherapie und seit 2008 zusammen mit einer platinbasierten Chemotherapie (Cis –oder Carboplatin plus 5-Fluoruracil) zugelassen. Ausschlaggebend für diese Zulassung waren die große, randomisierte Phase-III-Studie von Bonner J. et al. und die randomisierte Phase-III-Zulassungsstudie EXTREME (Erbix in First-line Treatment of Recurrent or Metastatic Head and Neck Cancer) von Vermorken J. B. et al.

Bonner et al. veröffentlichten 2006 Ergebnisse aus einer Phase-III-Studie, in

der, bei Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen, die alleinige Radiotherapie mit der Radiotherapie in Kombination mit Cetuximab verglichen wurde. Die Kombination einer Radiotherapie mit Cetuximab, im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie, steigert die Dauer des progressionsfreien Überlebens, verlängert das durchschnittliche Gesamtüberleben und verbessert die Zeit der lokoregionalen Kontrolle. Nebenwirkungen dahingegen fielen unter der Hinzunahme von Cetuximab im Wesentlichen nicht stärker aus (Ausnahmen bildeten Hautausschläge und Infusionsreaktionen) [278]. Ein Update der Phase-III-Studie von Bonner et al. wurde 2010 veröffentlicht und präsentiert die 5-Jahresauswertung der Studie. Die Ergebnisse dieser Langzeitanalyse bestätigen den effektiven Einsatz von Cetuximab in Kombination mit einer Strahlentherapie bei der Behandlung fortgeschrittener Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs [57].

Bei nicht vorbehandelten Patienten mit metastasiertem Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs wurde lange Zeit eine Cisplatin-basierte Chemotherapie als gewöhnlicher Standard betrachtet. Dieser Ansatz wurde durch die 2008 veröffentlichten Erkenntnisse der EXTREME-Studie angefochten. Vermorken J. B. et al. erforschten, in dieser randomisierten Phase-III-Studie, an 442 Patienten die Wirksamkeit von Cetuximab zusätzlich zur platinbasierten Chemotherapie zur Erstlinientherapie rezidivierender oder metastasierter Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs. Sie kamen zu folgenden Forschungsergebnissen. Durch die Zugabe von Cetuximab zu Carboplatin/Cisplatin plus 5-Fluoruracil (5-FU):

- verlängerte sich das mediane Gesamtüberleben um fast drei Monate (10,1 Monate in der Probandengruppe, die Cetuximab zusätzlich zur platinbasierten Chemotherapie erhielten versus 7,4 Monate in der Probandengruppe mit alleiniger Chemotherapie),
- stieg die Dauer des progressionsfreien Überlebens von 3,3 Monate auf 5,6 Monate (relative Risikoreduktion von 46%),
- erhöhte sich die Ansprechrquote um 80% (36% versus 20%) im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie ohne den monoklonalen IgG1-Antikörper.

Zu den am häufigsten auftretenden Nebenwirkungen Grad 3 oder 4 zählten Anämien, Neutropenien und Thrombozytopenien. Die Häufigkeiten dieser Nebenwirkungen unterschieden sich in der Cetuximab-Gruppe und der Gruppe mit alleiniger Chemotherapie nur unwesentlich. Unerwünschte Reaktionen, die in der Cetuximab-Gruppe deutlich öfters beobachtet wurden waren Sepsis, Hautreaktionen 3. Grades und infusionsbedingte Nebenwirkungen [279].

Zwei weitere, monoklonale Antikörper, die gegen den EGF-Rezeptor gerichtet sind, Panitumumab und Zalutumumab sind gegenwertig Teil großer klinischer Untersuchungen.

Panitumumab (Vectibix[®]) ist ein zu 100% humaner IgG2-Antikörper, der zurzeit für die Behandlung von metastasierenden kolorektalen Karzinomen zugelassen ist. Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses stellen eine weitere Tumorentität dar, bei der ein Vorteil durch die Therapie mit Panitumumab zu erwarten ist. Kruser T.J. et al. untersuchten 2008 die Steigerung des Ansprechverhaltens auf die Strahlentherapie durch Panitumumab bei Karzinomen des oberen Aerodigestivtrakt. Die Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Kombination einer Strahlentherapie mit dem monoklonalen Antikörper Panitumumab günstige Auswirkungen hat [280].

Zalutumumab ist ein ebenfalls zu 100% humaner IgG1-Antikörper, der sich gegenwertig noch in der klinischen Entwicklung befindet. Hier ist er hauptsächlich von Interesse für die Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs, spielt aber ebenfalls eine Rolle in laufenden Studien mit nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen und kolorektalen Karzinomen [281, 282]. In einer kürzlich veröffentlichten, randomisierte Phase-III-Studie von Machiels J. P. et al., wurde die Anwendung von Zalutumumab zur Therapie von Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen, bei denen eine platinbasierte Chemotherapie versagt hat, untersucht. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die Kombination von Zalutumumab mit der gewöhnlichen Therapie zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens bei Patienten mit refraktärem Kopf- und Halskarzinom, bei denen die platinbasierte Chemotherapie versagt hat, führt [283].

Die Antagonisierung der intrazellulären Domäne des EGFR durch niedrigmolekulare Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Gefitinib und Erlotinib, ist die zweite Möglichkeit, den EGF-Rezeptor zu blockieren. Gefitinib (Iressa®) und Erlotinib (Tarceva®) sind bisher zugelassen für die Behandlung von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Der Stellenwert dieser beiden Tyrosinkinaseinhibitoren in der Therapie von Kopf- und Halskarzinomen wird derzeit noch in verschiedenen klinischen Studien untersucht [284-288].

Neben der Hemmung des EGF-Rezeptors ist die VEGF-Inhibition die zweite, vielfach untersuchte, zielgerichtete molekulare Therapiestrategie.

Der wohl bekannteste und erste zugelassene Hemmstoff der Angiogenese ist Bevacizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der mit hoher Affinität VEGF bindet. Bevacizumab (Avastin®) ist bisher für die Behandlung von kolorektalen Karzinomen, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Mammakarzinomen, Nierenzellkarzinomen und Glioblastomen zugelassen. Die Rolle von antiangiogenetischen Strategien in der Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs wird in vielen laufenden klinischen Studien genauer untersucht und liefert bereits vielversprechende Erkenntnisse. Eine Zulassung von VEGF-Inhibitoren für die Behandlung von Kopf-Hals-Karzinomen liegt derzeit aber noch nicht vor. Argiris A. et al. veröffentlichten 2011 Ergebnisse einer Phase-II-Studie, in der die Wirksamkeit von dem Zytostatikum Pemetrexed in Kombination mit Bevacizumab bei Patienten mit rezidiviertem oder metastasiertem Karzinom des Kopf- und Halsbereiches untersucht wurde. Der Zusatz von Bevacizumab zu Pemetrexed führte zu erfolgsversprechenden Ergebnissen [289]. In verschiedenen weiteren aktuellen Studien wird die Bedeutung von Bevacizumab, in Kombination mit Chemotherapie, Strahlentherapie oder EGFR-Inhibitoren getestet [290-292].

Sorafenib (Nexavar®) und Sunitinib (Sutent®) sind antiangiogenetische Pharmaka aus der Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren, die bereits für die Behandlung verschiedener Karzinome zugelassen sind. Sorafenib findet Anwendung in der Therapie des fortgeschrittenen Nierenkarzinoms und hepatozellulären Karzinoms. Sunitinib wird, wie Sorafenib, ebenfalls für die Behandlung von Nieren-

zellkarzinomen eingesetzt und ist daneben auch in der Zweitlinientherapie maligner, gastrointestinaler Stromakarzinome zugelassen [293-296]. Der Stellenwert von Sorafenib und Sunitinib in der Therapie von Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen wird gegenwertig noch in klinischen Studien erforscht. Es liegen bereits Daten verschiedener Phase-II-Studien vor, in denen die Wirksamkeit und Toxizität von Sunitinib als Monotherapie bei der Behandlung von Patienten mit rezidivierenden oder metastasierenden Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs untersucht wurden. Allerdings liefern diese Untersuchungen noch keine vielversprechenden Ergebnisse über den Nutzen von Sunitinib als Monotherapie bei Kopf- und Halskarzinomen [297-299]. Bozec A. et al. beurteilten in einer Studie die Wirksamkeit der Behandlungskombination aus Sunitinib, Cetuximab und Strahlentherapie. Laut ihren Angaben ist diese Therapiekombination möglicherweise für die Zukunft von Interesse und soll in weiteren Studien erforscht werden [300]. Die Anwendung von Sorafenib in der Therapie von malignen Erkrankungen des Kopf- und Halsbereichs ist ebenfalls Teil klinischer Untersuchungen. Aussagekräftige Ergebnisse aus Phase-II-Studien liegen aber auch hier noch nicht vor [301, 302].

Neben den EGFR und VEGFR-assoziierten Behandlungsstrategien, stellen Inhibitoren alternativer Angriffsziele, wie z.B. Src-Kinasen, eine weitere, möglicherweise zukunftsnahe Option der molekularen Therapie bei Kopf- und Halskarzinomen dar. Src-Kinasen sind in einer Vielzahl zellulärer Signalwege involviert und beeinflussen die Angiogenese sowie die Proliferation, Migration und Adhäsion von Zellen. Eine erhöhte Src-Expression korreliert in einigen Tumoren mit einer schlechteren Krankheitsprognose. Interessant ist auch, dass eine erhöhte Aktivität der Src-Tyrosinkinase das Wachstum EGFR-exprimierender Tumoren verstärkt [251, 265, 303]. Die Daten einer Studie von Wheeler D. L. et al. zeigen auf, dass Tyrosinkinasen der Src-Familie in Cetuximab-resistenten Zellen in hohem Maße aktiviert sind. Darüberhinaus konnten Cetuximab-resistente Zellen durch die Behandlung mit dem Src-Inhibitor, Dasatinib für Cetuximab, resensibilisiert werden. Diese Untersuchungsergebnisse deuten daraufhin, dass Src-Kinasen und EGFR bei Resistenzen gegen Cetuximab kooperieren. Dual gerichtete Therapien, die gleichzeitig am EGF-Rezeptor und an

Src-Kinasen ansetzen, werden daher als mögliche Strategie angesehen, eine Resistenz gegenüber Cetuximab zu umgehen [304]. Dasatinib ist ein wirksamer Hemmstoff gegen Tyrosinkinase wie Src. Derzeit wird die Bedeutung von Dasatinib allein, oder als Kombinationstherapie mit Cetuximab, für die klinische Anwendung bei verschiedenen malignen Erkrankungen, unter denen sich auch Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs befinden, in Studien getestet [229, 265, 305, 306].

Auch MAGE-A Antigene gelten als geeignete Ziele für die molekulare Krebstherapie, da sie von vielen Tumoren exprimiert werden, und neben ihrer Expression auf Tumorgewebe nur im Keimzellgewebe vorkommen.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass zielgerichtete molekulare Therapien mögliche neue Optionen in der Therapie von Kopf- und Halskarzinomen, selbst bei schwerkranken oder vorbehandelten Patienten, bei denen eine gewöhnlich Chemotherapie oder Radiatio nicht toleriert würde, darstellen. Während der monoklonale IgG1-Antikörper Cetuximab für den klinischen Gebrauch bei der Behandlung von Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereich schon zugelassen ist, sind weitere Hemmstoffe des EGF-Rezeptors, sowie molekulare Therapiestrategien, die gegen VEGFR oder Src-Kinasen gerichtet sind, gegenwertig noch Teil klinischer Studien.

5. Zusammenfassung

Kopf- und Halskarzinome sind maligne Tumoren, die von verschiedenen Regionen des oberen Aerodigestivtraktes hervorgehen. Der weitaus häufigste histologische Typ ist das Plattenepithelkarzinom. Die allgemein am meisten betroffenen Regionen sind die Mundhöhle, der Oropharynx, der Hypopharynx und der Larynx. Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs sind weltweit die sechst häufigste Malignomkrankung [307]. Trotz Fortschritte in der Therapie, bleibt das Langzeitüberleben von Patienten mit einem Kopf- oder Halskarzinom schlecht. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate von oralen Karzinomen ist weltweit kleiner als 50%. Das heißt, mehr als die Hälfte der Patienten verstirbt innerhalb der ersten fünf Jahre an dem Tumorleiden. Diese schlechte 5-Jahres-Überlebensrate blieb die letzten drei Jahrzehnte leider unverändert [308]. Die hohe Rezidivrate stellt weiterhin ein großes Problem bei Patienten mit fortgeschrittenem Karzinom dar. Selbst bei histopathologisch tumorfreien Resektatändern nach vollständiger Karzinomentfernung treten lokale Rezidive in 10 bis 30% der Fälle bei fortgeschrittenen Tumoren auf [309]. Vor diesem Hintergrund ist die Früherkennung von Tumorrezidiven und Fernmetastasen ein wichtiges Ziel bei der Bemühung um eine Verbesserung der Überlebensrate. Durch den Einsatz von diagnostischen Verfahren wie Tumormarkern können hier möglicherweise erfolgsversprechende Fortschritte in der Zukunft gemacht werden.

Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie sind derzeit die drei Säulen der Standardtherapie von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom des Kopfes oder Halses. Der Einsatz von molekularen, zielgerichteten Therapieoptionen gewinnt aber zunehmend an Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsverhalten fünf zellulärer Marker beim metastasierenden Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches untersucht. Bei den getesteten Markern handelte es sich um einen MAGE-A, zwei verschiedenen VEGF, einen EGFR und einen C-Src-Tyrosinkinase Antikörper. Im Einzelnen sollte hinterfragt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Antikörperexpression und verschiedenen, klinischen und histopatho-

logischen Parametern (pT-Stadium, pN-Stadium, histologisches Grading, Tumorerhornung, Patientenalter, Geschlecht des Patienten) besteht. Weiterhin war von Interesse, ob Parallelen zwischen dem Expressionsverhalten der verschiedenen Antikörper untereinander zu erkennen sind. Die Ergebnisse wurden anschließend mit Erkenntnissen aus anderen Studien und Literaturangaben verglichen.

Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen der Antikörperexpression im Primärtumor und in den Lymphknotenmetastasen bei einem Patienten wurde bei vier von fünf Antikörpern (MAGE-A, VEGF-C, EGFR und C-Src) eine signifikant positive Korrelation festgestellt. Bei einem der fünf Markern (VEGF-A) konnte diesbezüglich kein Zusammenhang aufgezeigt werden. Bezogen auf die Identifizierung von Parallelen zwischen dem Expressionsverhalten und den klinischen bzw. histopathologischen Parametern konnten, abgesehen von einer Ausnahme, im Allgemeinen keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden. Lediglich Tendenzen zu eventuellen Zusammenhängen waren erkennbar. Bei der Ausnahme handelt es sich um die signifikant positive Korrelation zwischen der EGFR-Expression im Primärtumor und der pN-Klassifikation.

Soweit gibt es zahlreiche Erkenntnisse aus verschiedenen Studien über das Expressionsverhalten zellulärer Marker beim Kopf-Hals-Karzinom. Diese Arbeiten konzentrierten sich seither vor allem auf Zusammenhänge zwischen der Antikörperexpression und klinischen sowie histopathologischen Parametern. Korrelationen zwischen der Expression zellulärer Marker im Primärtumor und den zugehörigen Lymphknotenmetastasen scheint bei Kopf- und Hals-Karzinomen bisher weitgehend unerforscht zu sein. Trotz ausführlicher Literaturrecherche konnte lediglich eine Studie von Carlsson et al., in welcher die EGFR-Expression beim Larynxkarzinom untersucht wurde, gefunden werden. Auch hier konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression im Primärtumor und den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen festgestellt werden [259]. Bei einigen anderen Tumorentitäten, z.B. Mammakarzinom, Zervixkarzinom und Ösophaguskarzinom scheint dieser Zusammenhang bereits etwas besser untersucht zu sein [310-313].

Abschließend lässt sich sagen, dass zelluläre Marker zukünftig eine immer größer werdende Bedeutung bei der Diagnostik, Prognostik und Therapie von Kopf- Hals-Karzinomen bekommen. Hierfür bedarf es weiteren Untersuchungen zum Expressionsverhalten zellulärer Marker beim Kopf-Hals-Karzinom. Hierbei sind insbesondere Studien zum Vergleich der Expression im Primärtumor und den Metastasen, bzw. Lymphknotenmetastasen zu erwähnen.

6. Literaturverzeichnis

1. Leon Barnes, J.W.E., Peter Reichart, David Sidransky, *Pathologie and Genetics of Head and Neck Tumours*. 2005.
2. Licitra, L. and E. Felip, *Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2009. **20 Suppl 4**: p. 121-2.
3. Kademani, D., *Oral cancer*. Mayo Clin Proc, 2007. **82**(7): p. 878-87.
4. *Krebs in Deutschland*, Robert Koch Institut.
5. Curado, M.P. and M. Hashibe, *Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer*. Curr Opin Oncol, 2009. **21**(3): p. 194-200.
6. Werner, J.A., *Lymphknotenerkrankungen im Kopf-hals-bereich: Onkologie und Differentialdiagnosen*. 2002.
7. Andre, K., et al., *Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1995. **31B**(5): p. 301-9.
8. Viswanathan, H. and J.A. Wilson, *Alcohol--the neglected risk factor in head and neck cancer*. Clin Otolaryngol Allied Sci, 2004. **29**(4): p. 295-300.
9. Dietz, A., W.D. Heller, and H. Maier, *[Epidemiologic aspects of cancers of the head-neck area]*. Offentl Gesundheitswes, 1991. **53**(10): p. 674-80.
10. Ho, T., Q. Wei, and E.M. Sturgis, *Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head Neck, 2007. **29**(7): p. 682-99.
11. Rusin, P., L. Markiewicz, and I. Majsterek, *[Genetic predeterminations of head and neck cancer]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2008. **62**: p. 490-501.
12. Matthias, C., et al., *[Influence of genetic variation in the major histocompatibility complex on head and neck cancer susceptibility]*. Laryngorhinootologie, 2001. **80**(10): p. 595-600.
13. Jahnke, V., et al., *[Genetic predisposition for the development of head and neck carcinomas]*. Laryngorhinootologie, 1999. **78**(1): p. 24-7.
14. Tryggvason, G., et al., *[Head and neck squamous cell cancer]*. Laeknabladid, 2009. **95**(10): p. 671-80.
15. Li, G. and E.M. Sturgis, *The role of human papillomavirus in squamous carcinoma of the head and neck*. Curr Oncol Rep, 2006. **8**(2): p. 130-9.
16. Lajer, C.B. and C. von Buchwald, *The role of human papillomavirus in head and neck cancer*. APMIS, 2010. **118**(6-7): p. 510-9.
17. Marur, S., et al., *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic*. Lancet Oncol, 2010. **11**(8): p. 781-9.
18. Marur, S. and A.A. Forastiere, *Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment*. Mayo Clin Proc, 2008. **83**(4): p. 489-501.
19. Ang, K.K., et al., *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(1): p. 24-35.

20. Nichols, A.C., et al., *HPV-16 infection predicts treatment outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2009. **140**(2): p. 228-34.
21. Fakhry, C., et al., *Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(4): p. 261-9.
22. Pearson, G.R., *Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma*. J Cell Biochem Suppl, 1993. **17F**: p. 150-4.
23. Raab-Traub, N., *Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(6): p. 431-41.
24. Freedman, N.D., et al., *Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study*. Int J Cancer, 2008. **122**(10): p. 2330-6.
25. Riboli, E. and T. Norat, *Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk*. Am J Clin Nutr, 2003. **78**(3 Suppl): p. 559S-569S.
26. La Vecchia, C., A. Altieri, and A. Tavani, *Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies*. Eur J Nutr, 2001. **40**(6): p. 261-7.
27. Negri, E., et al., *Vegetable and fruit consumption and cancer risk*. Int J Cancer, 1991. **48**(3): p. 350-4.
28. Suzuki, T., et al., *Effect of dietary antioxidants and risk of oral, pharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma according to smoking and drinking habits*. Cancer Sci, 2006. **97**(8): p. 760-7.
29. Taghavi, N. and I. Yazdi, *Type of food and risk of oral cancer*. Arch Iran Med, 2007. **10**(2): p. 227-32.
30. Notani, P.N. and K. Jayant, *Role of diet in upper aerodigestive tract cancers*. Nutr Cancer, 1987. **10**(1-2): p. 103-13.
31. Petridou, E., et al., *The role of diet and specific micronutrients in the etiology of oral carcinoma*. Cancer, 2002. **94**(11): p. 2981-8.
32. Norbert Schwenzler, M.E., *Spezielle Chirurgie*. 3 ed. Vol. 2. 2002.
33. L.H. Sobin, M.K.G., Ch. Wittekind, *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7 ed. 2009.
34. Koch, W.M., et al., *Comparison of clinical and pathological staging in head and neck squamous cell carcinoma: results from Intergroup Study ECOG 4393/RTOG 9614*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2009. **135**(9): p. 851-8.
35. A. Roessner, U.P., H.K. Müller-Hermelink, *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. 2008.
36. Alho, O.P., et al., *Head and neck cancer in primary care: presenting symptoms and the effect of delayed diagnosis of cancer cases*. CMAJ, 2006. **174**(6): p. 779-84.
37. H. Ehardt, P.A.R., *Curriculum: spezielle Pathologie für Zahnmediziner*. 2009.
38. Robertson, M.S. and J. Hornibrook, *The presenting symptoms of head and neck cancer*. N Z Med J, 1982. **95**(708): p. 337-41.
39. McGurk, M., et al., *Delay in diagnosis and its effect on outcome in head and neck cancer*. Br J Oral Maxillofac Surg, 2005. **43**(4): p. 281-4.
40. Tromp, D.M., et al., *Patient factors associated with delay in primary care*

- among patients with head and neck carcinoma: a case-series analysis.* Fam Pract, 2005. **22**(5): p. 554-9.
41. Song, T., et al., *Elective neck dissection or "watchful waiting": optimal management strategy for early stage N0 tongue carcinoma using decision analysis techniques.* Chin Med J (Engl), 2008. **121**(17): p. 1646-50.
 42. Lim, Y.C., et al., *Treatment of contralateral N0 neck in early squamous cell carcinoma of the oral tongue: elective neck dissection versus observation.* Laryngoscope, 2006. **116**(3): p. 461-5.
 43. Kowalski, L.P. and A. Sanabria, *Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence.* Acta Otorhinolaryngol Ital, 2007. **27**(3): p. 113-7.
 44. Ferlito, A., C.E. Silver, and A. Rinaldo, *Elective management of the neck in oral cavity squamous carcinoma: current concepts supported by prospective studies.* Br J Oral Maxillofac Surg, 2009. **47**(1): p. 5-9.
 45. Ferlito, A., et al., *Surgical treatment of the neck in cancer of the larynx.* ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2000. **62**(4): p. 217-25.
 46. Ferlito, A., et al., *Classification of neck dissections: an evolving system.* Auris Nasus Larynx, 2009. **36**(2): p. 127-34.
 47. Robbins, K.T., et al., *Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2002. **128**(7): p. 751-8.
 48. Robbins, K.T., et al., *Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2008. **134**(5): p. 536-8.
 49. J.Theissing, G.R., J. A. Werner, *HNO-Operationslehre.* Vol. 4. 2006.
 50. J.Beck-Mannagetta, M.B., K.Vinzenz, *Kopf/Hals-Malignome.* 2010, ACO-ASSO.
 51. R. Fietkau, C.L., R. Sauer, J. Dunst, A. Becker, M. Baumann, T. Wendt, K: Grünschow, C. Hess, V. Budach, H. Iro, *Postoperative kombinierte Radiochemotherapie im Vergleich zu Strahlentherapie alleine bei Hochrisiko-Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Kopf/Hals-Bereiches: Ergebnisse der Deutschen Phase-III-Studie ARO 96-3.* 2006, Univeristy of Rostock, Germany, University of Halle , Germany, University of Erlangen- Nürnberg, Germany, University of Derseden, Dresden, Germany, University of Jena, Jena, Germany, University of Göttingen , Germany, Charite Berlin, Berlin, Germany.
 52. de Castro, G., Jr. and M.H. Federico, *Evaluation, prevention and management of radiotherapy-induced xerostomia in head and neck cancer patients.* Curr Opin Oncol, 2006. **18**(3): p. 266-70.
 53. Blanco, A.I. and C. Chao, *Management of radiation-induced head and neck injury.* Cancer Treat Res, 2006. **128**: p. 23-41.
 54. Aguiar, G.P., et al., *A review of the biological and clinical aspects of radiation caries.* J Contemp Dent Pract, 2009. **10**(4): p. 83-9.
 55. Madrid, C., M. Abarca, and K. Bouferrache, *Osteoradionecrosis: an update.* Oral Oncol, 2010. **46**(6): p. 471-4.
 56. Magis Mandapathil, S.D.P., Julia Isselstein, Christoph Pöttgen, Thomas

- K. Hoffmann, Konrad Sommer, Reinhard Zeidler, Theresa Whiteside, Stephan Lang, *Innovative Therapiestrategien bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.*
57. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival.* Lancet Oncol, 2010. **11**(1): p. 21-8.
 58. Harrington, K.J., et al., *Novel therapeutic approaches to squamous cell carcinoma of the head and neck using biologically targeted agents.* Indian J Cancer, 2010. **47**(3): p. 248-59.
 59. Gold, K.A., H.Y. Lee, and E.S. Kim, *Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck.* Cancer, 2009. **115**(5): p. 922-35.
 60. Goerner, M., T.Y. Seiwert, and H. Sudhoff, *Molecular targeted therapies in head and neck cancer - An update of recent developments.* Head Neck Oncol, 2010. **2**(1): p. 8.
 61. Williams, M.D., *Integration of biomarkers including molecular targeted therapies in head and neck cancer.* Head Neck Pathol, 2010. **4**(1): p. 62-9.
 62. Matta, A. and R. Ralhan, *Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma.* Head Neck Oncol, 2009. **1**(1): p. 6.
 63. Chin, D., et al., *Head and neck cancer: past, present and future.* Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(7): p. 1111-8.
 64. Gallegos-Hernandez, J.F., *[Head and neck cancer. Risk factors and prevention].* Cir Cir, 2006. **74**(4): p. 287-93.
 65. Jemal A, S.R., Ward E, et al., *Cancer statistics, 2008.* CancerJournal for Clinicians, 2008. **58**(2): p. 71-96.
 66. W. Hiddemann, C.R.B., *Die Onkologie Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien Der Therapie.* 2 ed. 2009.
 67. van den Broek, M., L. von Boehmer, and A. Knuth, *Developments in cancer immunotherapy.* Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 51-6.
 68. van der Bruggen, P., et al., *Autologous cytolytic T lymphocytes recognize a MAGE-1 nonapeptide on melanomas expressing HLA-Cw*1601.* Eur J Immunol, 1994. **24**(9): p. 2134-40.
 69. Bodey, B., *Cancer-testis antigens: promising targets for antigen directed antineoplastic immunotherapy.* Expert Opin Biol Ther, 2002. **2**(6): p. 577-84.
 70. Stoitchkov, K. and T. Le Bricon, *[Current biological markers of cutaneous melanoma progression].* Ann Biol Clin (Paris), 2000. **58**(2): p. 157-65.
 71. Seregni, E., C. Botti, and E. Bombardieri, *Biochemical characteristics and clinical applications of alpha-fetoprotein isoforms.* Anticancer Res, 1995. **15**(4): p. 1491-9.
 72. Saraswathi, A. and T. Malati, *Clinical relevance of alphafetoprotein microheterogeneity in alphafetoprotein-secreting tumors.* Cancer Detect Prev, 1994. **18**(6): p. 447-54.
 73. Par, A., *[Hepatitis B virus (HBV) infection and hepatocarcinogenesis].* Orv Hetil, 2010. **151**(26): p. 1045-53.
 74. Tokunaga, M. and C.E. Land, *Epstein-Barr virus involvement in gastric*

- cancer: biomarker for lymph node metastasis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1998. 7(5): p. 449-50.*
75. Allen, C.T., et al., *Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. Laryngoscope, 2010. 120(9): p. 1756-72.*
 76. J. R. Siewert, M.R., V. Schumpelick, *Praxis der Viszeralchirurgie: Onkologische Chirurgie. Vol. 3. 2010.*
 77. Donald W Kufe, R.E.P., Ralph R Weichselbaum, Robert C Bast, Ted S Gansler, James F Holland, Emil Frei, *Holland-Frei Cancer Medicine Vol. 6. 2003.*
 78. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science, 1991. 254(5038): p. 1643-7.*
 79. Coulie, P.G., et al., *Genes coding for tumor antigens recognized by human cytolytic T lymphocytes. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1993. 14(2): p. 104-9.*
 80. Zammateo, N., et al., *DNA microarray to monitor the expression of MAGE-A genes. Clin Chem, 2002. 48(1): p. 25-34.*
 81. Chomez, P., et al., *An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. Cancer Res, 2001. 61(14): p. 5544-51.*
 82. Xiao, J. and H.S. Chen, *Biological functions of melanoma-associated antigens. World J Gastroenterol, 2004. 10(13): p. 1849-53.*
 83. Peikert, T., et al., *Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. Cancer Res, 2006. 66(9): p. 4693-700.*
 84. Chen, Z., J.B. Shao, and W. Wu, *Expression of A, G and B melanoma antigen genes in human hepatocellular carcinoma. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2002. 1(4): p. 570-3.*
 85. Atanackovic, D., et al., *Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells. Haematologica, 2010. 95(5): p. 785-93.*
 86. Figueiredo, D.L., et al., *High expression of cancer testis antigens MAGE-A, MAGE-C1/CT7, MAGE-C2/CT10, NY-ESO-1, and gage in advanced squamous cell carcinoma of the larynx. Head Neck, 2010.*
 87. Zhang, S., et al., *Expression of tumor-specific antigen MAGE, GAGE and BAGE in ovarian cancer tissues and cell lines. BMC Cancer, 2010. 10: p. 163.*
 88. Zhao, L., et al., *Expression of cancer-testis antigens in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol, 2004. 10(14): p. 2034-8.*
 89. Ma, M., et al., *[Expression of MAGE genes and MAGE gene products in human renal and urinary bladder tumor]. Beijing Da Xue Xue Bao, 2004. 36(2): p. 159-63.*
 90. Cheng, S., et al., *Expression of the melanoma-associated antigen is associated with progression of human thyroid cancer. Endocr Relat Cancer, 2009. 16(2): p. 455-66.*
 91. Yue, J.Q., et al., *[Relationship of MAGE-A1 expression with Ki-67 and tumor-infiltrating lymphocyte response in non-small cell lung carcinoma].*

- Ai Zheng, 2004. **23**(2): p. 219-22.
92. Bar-Haim, E., et al., *MAGE-A8 overexpression in transitional cell carcinoma of the bladder: identification of two tumour-associated antigen peptides*. Br J Cancer, 2004. **91**(2): p. 398-407.
 93. Suzuki, S., et al., *MAGE-A protein and MAGE-A10 gene expressions in liver metastasis in patients with stomach cancer*. Br J Cancer, 2008. **99**(2): p. 350-6.
 94. Metzler, P., et al., *MAGE-A as a novel approach in the diagnostic accuracy of oral squamous cell cancer: a case report*. Head Neck Oncol, 2009. **1**: p. 39.
 95. Song, D.W., et al., *Detection of MAGE and SSX Gene Expressions by RT-nested PCR Using Common Primers in Head and Neck Cancer*. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2008. **1**(2): p. 97-102.
 96. Ries, J., et al., *Expression of melanoma-associated antigens in oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2008. **37**(2): p. 88-93.
 97. Lucas, S., F. Brasseur, and T. Boon, *A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T cells*. Cancer Res, 1999. **59**(16): p. 4100-3.
 98. Zhang, C.G., et al., *[A new melanoma antigen-encoding gene subfamily in human chromosome X]*. Yi Chuan Xue Bao, 2001. **28**(3): p. 197-203.
 99. Pold, M., et al., *Identification of a new, unorthodox member of the MAGE gene family*. Genomics, 1999. **59**(2): p. 161-7.
 100. Graff-Dubois, S., et al., *Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy*. J Immunol, 2002. **169**(1): p. 575-80.
 101. Mollaoglu, N., et al., *Expression of MAGE-A12 in oral squamous cell carcinoma*. Dis Markers, 2008. **24**(1): p. 27-32.
 102. Chaux, P., et al., *Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes*. J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 767-78.
 103. Chaux, P., et al., *A MAGE-1 peptide recognized on HLA-DR15 by CD4(+) T cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(6): p. 1910-6.
 104. Schultz, E.S., et al., *A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4+ cytolytic T lymphocytes*. Cancer Res, 2000. **60**(22): p. 6272-5.
 105. Lee, K.D., et al., *Expression of the MAGE 3 gene product in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Anticancer Res, 1999. **19**(6B): p. 5037-42.
 106. Muller-Richter, U.D., et al., *MAGE-A antigens in patients with primary oral squamous cell carcinoma*. Clin Oral Investig, 2010. **14**(3): p. 291-6.
 107. Muller-Richter, U.D., et al., *Analysis of expression profiles of MAGE-A antigens in oral squamous cell carcinoma cell lines*. Head Face Med, 2009. **5**: p. 10.
 108. Ries, J., et al., *Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy*. Int J Oncol, 2005. **26**(3): p. 817-24.

109. Krauss, E., et al., *MAGE-A antigens in lesions of the oral mucosa*. Clin Oral Investig, 2010.
110. Landry, C., et al., *Monoclonal antibody 57B stains tumor tissues that express gene MAGE-A4*. Int J Cancer, 2000. **86**(6): p. 835-41.
111. Senger, D.R., *Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(3): p. 377-9.
112. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
113. Senger, D.R., et al., *Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor*. Cancer Res, 1990. **50**(6): p. 1774-8.
114. A.Pühler, R.S., M. Regitz, *Römpp Kompaktlexikon: Biochemie und Molekularbiologie*. 1999.
115. Yamazaki, Y. and T. Morita, *Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors*. Mol Divers, 2006. **10**(4): p. 515-27.
116. Yamazaki, Y., et al., *Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 9885-91.
117. Takahashi, H. and M. Shibuya, *The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions*. Clin Sci (Lond), 2005. **109**(3): p. 227-41.
118. Schmoll, H.-J., *Kompodium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie*
Vol. 4. 2005.
119. Hoeben, A., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(4): p. 549-80.
120. Vincenti, V., et al., *Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3*. Circulation, 1996. **93**(8): p. 1493-5.
121. Tischer, E., et al., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*. J Biol Chem, 1991. **266**(18): p. 11947-54.
122. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB J, 1999. **13**(1): p. 9-22.
123. Maglione, D., et al., *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9267-71.
124. Paavonen, K., et al., *Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively*. Circulation, 1996. **93**(6): p. 1079-82.
125. Olofsson, B., et al., *Current biology of VEGF-B and VEGF-C*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(6): p. 528-35.
126. Makinen, T., et al., *Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21217-22.
127. de Paulis, A., et al., *Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils*. J Immunol, 2006.

- 177(10): p. 7322-31.
128. Achen, M.G., et al., *Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 548-53.
 129. Yamada, Y., et al., *Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D*. Genomics, 1997. **42**(3): p. 483-8.
 130. Meyer, M., et al., *A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases*. EMBO J, 1999. **18**(2): p. 363-74.
 131. Pieren, M., et al., *Crystal structure of the Orf virus NZ2 variant of vascular endothelial growth factor-E. Implications for receptor specificity*. J Biol Chem, 2006. **281**(28): p. 19578-87.
 132. Roy, H., S. Bhardwaj, and S. Yla-Herttuala, *Biology of vascular endothelial growth factors*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2879-87.
 133. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 1011-27.
 134. Alison, M.R., *The Cancer Handbook*. 2 ed. Vol. 1. 2007.
 135. Leung, K., [123]*Vascular endothelial growth factor*. 2004.
 136. Liu, L., B.C. Hu, and Y.J. Zhang, [*Vascular endothelial growth factor receptor--structure and function*]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 2000. **31**(3): p. 269-72.
 137. Cebe-Suarez, S., A. Zehnder-Fjallman, and K. Ballmer-Hofer, *The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(5): p. 601-15.
 138. Shibuya, M., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis*. Angiogenesis, 2006. **9**(4): p. 225-30; discussion 231.
 139. Tanaka, K., et al., *Characterization of the extracellular domain in vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1 tyrosine kinase)*. Jpn J Cancer Res, 1997. **88**(9): p. 867-76.
 140. Sawano, A., et al., *Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans*. Blood, 2001. **97**(3): p. 785-91.
 141. Ishida, A., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells*. J Cell Physiol, 2001. **188**(3): p. 359-68.
 142. Dikov, M.M., et al., *Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 215-22.
 143. Holmes, K., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition*. Cell Signal, 2007. **19**(10): p. 2003-12.
 144. Rahimi, N., *Vascular endothelial growth factor receptors: molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials*. Exp Eye Res, 2006. **83**(5): p. 1005-16.
 145. Karkkainen, M.J. and T.V. Petrova, *Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*.

- Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5598-605.
146. Lohela, M., et al., *Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies*. Thromb Haemost, 2003. **90**(2): p. 167-84.
 147. Makinen, T., et al., *Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3*. EMBO J, 2001. **20**(17): p. 4762-73.
 148. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*. Endocr Rev, 2004. **25**(4): p. 581-611.
 149. Brown, L.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine*. EXS, 1997. **79**: p. 233-69.
 150. Hyder, S.M., *Sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(3): p. 667-87.
 151. Hyder, S.M. and G.M. Stancel, *Regulation of VEGF in the reproductive tract by sex-steroid hormones*. Histol Histopathol, 2000. **15**(1): p. 325-34.
 152. Szekanecz, Z., et al., *Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2010. **22**(3): p. 299-306.
 153. Chua, R.A. and J.L. Arbiser, *The role of angiogenesis in the pathogenesis of psoriasis*. Autoimmunity, 2009. **42**(7): p. 574-9.
 154. Raica, M., A.M. Cimpan, and D. Ribatti, *Angiogenesis in pre-malignant conditions*. Eur J Cancer, 2009. **45**(11): p. 1924-34.
 155. Murata, M., K. Yudoh, and K. Masuko, *The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis?* Osteoarthritis Cartilage, 2008. **16**(3): p. 279-86.
 156. Sarygina, O.I., V.V. Neroev, and O.A. Levkina, *[Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of diabetic retinopathy]*. Vestn Oftalmol, 2009. **125**(2): p. 58-60.
 157. Cheng, Z. and Q. Lin, *[Relation between vascular endothelial factor and etiology of pre-eclampsia]*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 1999. **34**(7): p. 432-5.
 158. Attar, R., et al., *Genetic variants of vascular endothelial growth factor and risk for the development of endometriosis*. In Vivo, 2010. **24**(3): p. 297-301.
 159. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
 160. Goldman, E., *The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system*. 1907.
 161. Folkman, J., et al., *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis*. J Exp Med, 1971. **133**(2): p. 275-88.
 162. Schimming, R., *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Tumorangiogenese - Stellenwert und Bedeutung beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle* Vol. 6. 2002.
 163. Manfred G. Krukemeyer, I.A., *Chirurgische Forschung*. 2005. 547.
 164. Baeriswyl, V. and G. Christofori, *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(5): p. 329-37.
 165. Detmar, M., *Tumor angiogenesis*. J Investig Dermatol Symp Proc, 2000. **5**(1): p. 20-3.

166. Gupta, V.K., et al., *Vascular endothelial growth factor enhances endothelial cell survival and tumor radioresistance*. *Cancer J*, 2002. **8**(1): p. 47-54.
167. Shinohara, E.T. and A. Maity, *Increasing sensitivity to radiotherapy and chemotherapy by using novel biological agents that alter the tumor microenvironment*. *Curr Mol Med*, 2009. **9**(9): p. 1034-45.
168. Lalla, R.V., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003. **129**(8): p. 882-8.
169. Pradeep, C.R., E.S. Sunila, and G. Kuttan, *Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies*. *Integr Cancer Ther*, 2005. **4**(4): p. 315-21.
170. Jain, R.K., *Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor*. *Semin Oncol*, 2002. **29**(6 Suppl 16): p. 3-9.
171. Petruzzelli, G.J., *Tumor angiogenesis*. *Head Neck*, 1996. **18**(3): p. 283-91.
172. Hasan, J., R. Byers, and G.C. Jayson, *Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours*. *Br J Cancer*, 2002. **86**(10): p. 1566-77.
173. Niu, G. and X. Chen, *Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy*. *Curr Drug Targets*, 2010. **11**(8): p. 1000-17.
174. A. Harstrick, A.P., *Der Onkologe, Tumorangiogenese – Therapiekonzepte, Inhibition mit Integrin-Antagonisten – ein neuer therapeutischer Ansatz*. Vol. 6.
175. Van Meter, M.E. and E.S. Kim, *Bevacizumab: current updates in treatment*. *Curr Opin Oncol*, 2010. **22**(6): p. 586-91.
176. Diaz-Rubio, E. and H.J. Schmoll, *The future development of bevacizumab in colorectal cancer*. *Oncology*, 2005. **69** Suppl 3: p. 34-45.
177. Escudier, B., J. Cosaert, and P. Pisa, *Bevacizumab: direct anti-VEGF therapy in renal cell carcinoma*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008. **8**(10): p. 1545-57.
178. Moustakas, A. and T.N. Kreisl, *New treatment options in the management of glioblastoma multiforme: a focus on bevacizumab*. *Onco Targets Ther*, 2010. **3**: p. 27-38.
179. Matulonis, U.A., *Bevacizumab and its use in epithelial ovarian cancer*. *Future Oncol*, 2011. **7**(3): p. 365-79.
180. Rapidis, A.D., J.B. Vermorcken, and J. Bourhis, *Targeted therapies in head and neck cancer: past, present and future*. *Rev Recent Clin Trials*, 2008. **3**(3): p. 156-66.
181. Seiwert, T.Y. and E.E. Cohen, *Targeting angiogenesis in head and neck cancer*. *Semin Oncol*, 2008. **35**(3): p. 274-85.
182. Roskoski, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004;319:1, Rowinsky, *Annu RevMed*. 2004; 55;433.
183. Hatakeyama, H., et al., *Regulation of Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor by miR-212 and Acquired Cetuximab-Resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. *PLoS One*, 2010. **5**(9).
184. Zimmermann, M., et al., *The epidermal growth factor receptor (EGFR) in*

- head and neck cancer: its role and treatment implications*. Radiat Oncol, 2006. **1**: p. 11.
185. Roepstorff, K., et al., *Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor*. Traffic, 2009. **10**(8): p. 1115-27.
 186. Marmor, M.D., K.B. Skaria, and Y. Yarden, *Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(3): p. 903-13.
 187. Roskoski, R., Jr., *The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**(1): p. 1-11.
 188. Uberall, I., et al., *The status and role of ErbB receptors in human cancer*. Exp Mol Pathol, 2008. **84**(2): p. 79-89.
 189. Atkins, D., et al., *Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(7): p. 893-901.
 190. Herbst, R.S., *Review of epidermal growth factor receptor biology*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **59**(2 Suppl): p. 21-6.
 191. P, O.c., et al., *The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2002. **38**(7): p. 627-40.
 192. Maurizi, M., et al., *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma*. Br J Cancer, 1996. **74**(8): p. 1253-7.
 193. Hama, T., et al., *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma*. Oncologist, 2009. **14**(9): p. 900-8.
 194. Chung, C.H., et al., *Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas*. J Clin Oncol, 2006. **24**(25): p. 4170-6.
 195. Koppikar, P., et al., *Combined inhibition of c-Src and epidermal growth factor receptor abrogates growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(13): p. 4284-91.
 196. Cohen, S., G. Carpenter, and L. King, Jr., *Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity*. J Biol Chem, 1980. **255**(10): p. 4834-42.
 197. Carpenter, G. and S. Cohen, *Epidermal growth factor*. Annu Rev Biochem, 1979. **48**: p. 193-216.
 198. Grandis, J.R. and D.J. Tweardy, *Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer*. Cancer Res, 1993. **53**(15): p. 3579-84.
 199. Kalyankrishna, S. and J.R. Grandis, *Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(17): p. 2666-72.
 200. Sarkis, S.A., et al., *Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma in relation to proliferation, apoptosis, angiogenesis and lymphangiogenesis*. Head Neck Oncol, 2010. **2**: p. 13.
 201. Rubin Grandis, J., et al., *Quantitative immunohistochemical analysis of*

- transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer, 1996. 78(6): p. 1284-92.*
202. Rubin Grandis, J., D.J. Tweardy, and M.F. Melhem, *Asynchronous modulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor protein expression in progression of premalignant lesions to head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, 1998. 4(1): p. 13-20.*
 203. Grandis, J.R. and D.J. Tweardy, *TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer. J Cell Biochem Suppl, 1993. 17F: p. 188-91.*
 204. Janmaat, M.L. and G. Giaccone, *The epidermal growth factor receptor pathway and its inhibition as anticancer therapy. Drugs Today (Barc), 2003. 39 Suppl C: p. 61-80.*
 205. Harding, J. and B. Burtness, *Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chemeric human-murine monoclonal antibody. Drugs Today (Barc), 2005. 41(2): p. 107-27.*
 206. Burtness, B., *The role of cetuximab in the treatment of squamous cell cancer of the head and neck. Expert Opin Biol Ther, 2005. 5(8): p. 1085-93.*
 207. Herbst, R.S. and W.K. Hong, *IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for treatment of head and neck cancer. Semin Oncol, 2002. 29(5 Suppl 14): p. 18-30.*
 208. Huang, S., et al., *Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. Cancer Res, 2004. 64(15): p. 5355-62.*
 209. Van den Eynde, M., et al., *Epidermal growth factor receptor targeted therapies for solid tumours. Acta Clin Belg, 2011. 66(1): p. 10-7.*
 210. Antonio Pezzutto, T.U., Gerd-Rüdiger Burmester, *Taschenatlas der Immunologie Vol. 7. 2007.*
 211. Czernilofsky, A.P., et al., *Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed amino acid sequence for gene product. Nature, 1980. 287(5779): p. 198-203.*
 212. Oppermann, H., et al., *Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(4): p. 1804-8.*
 213. Parker, R.C., H.E. Varmus, and J.M. Bishop, *Cellular homologue (c-src) of the transforming gene of Rous sarcoma virus: isolation, mapping, and transcriptional analysis of c-src and flanking regions. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(9): p. 5842-6.*
 214. Stehelin, D., et al., *DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature, 1976. 260(5547): p. 170-3.*
 215. Varmus, H., et al., *Function, location, and regulation of the src protein-tyrosine kinase. Princess Takamatsu Symp, 1989. 20: p. 63-70.*
 216. Parsons, S.J. and J.T. Parsons, *Src family kinases, key regulators of signal transduction. Oncogene, 2004. 23(48): p. 7906-9.*
 217. Gu, J. and X. Gu, *Natural history and functional divergence of protein tyrosine kinases. Gene, 2003. 317(1-2): p. 49-57.*

218. Wheeler, D.L., M. Iida, and E.F. Dunn, *The role of Src in solid tumors*. *Oncologist*, 2009. **14**(7): p. 667-78.
219. Thomas, S.M. and J.S. Brugge, *Cellular functions regulated by Src family kinases*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997. **13**: p. 513-609.
220. Cance, W.G., et al., *Rak, a novel nuclear tyrosine kinase expressed in epithelial cells*. *Cell Growth Differ*, 1994. **5**(12): p. 1347-55.
221. Lee, J., et al., *Cloning of FRK, a novel human intracellular SRC-like tyrosine kinase-encoding gene*. *Gene*, 1994. **138**(1-2): p. 247-51.
222. Oberg-Welsh, C. and M. Welsh, *Cloning of BSK, a murine FRK homologue with a specific pattern of tissue distribution*. *Gene*, 1995. **152**(2): p. 239-42.
223. Thuveson, M., et al., *iyk, a novel intracellular protein tyrosine kinase differentially expressed in the mouse mammary gland and intestine*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **209**(2): p. 582-9.
224. Yeatman, T.J., *A renaissance for SRC*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(6): p. 470-80.
225. Roskoski, R., Jr., *Src protein-tyrosine kinase structure and regulation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **324**(4): p. 1155-64.
226. Chong, Y.P., T.D. Mulhern, and H.C. Cheng, *C-terminal Src kinase (CSK) and CSK-homologous kinase (CHK)--endogenous negative regulators of Src-family protein kinases*. *Growth Factors*, 2005. **23**(3): p. 233-44.
227. Lee, J.H., et al., *Elevated c-Src and c-Yes expression in malignant skin cancers*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010. **29**: p. 116.
228. Bjorge, J.D., A. Jakymiw, and D.J. Fujita, *Selected glimpses into the activation and function of Src kinase*. *Oncogene*, 2000. **19**(49): p. 5620-35.
229. Dempke, W. and R. Zippel, *[SRC kinases in tumor therapy]*. *Med Klin (Munich)*, 2010. **105**(10): p. 711-5.
230. Lutz, M.P., et al., *Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **243**(2): p. 503-8.
231. Roginskaya, V., et al., *Therapeutic targeting of Src-kinase Lyn in myeloid leukemic cell growth*. *Leukemia*, 1999. **13**(6): p. 855-61.
232. Tatosyan, A.G. and O.A. Mizenina, *Kinases of the Src family: structure and functions*. *Biochemistry (Mosc)*, 2000. **65**(1): p. 49-58.
233. Yagi, R., et al., *C-terminal Src kinase controls development and maintenance of mouse squamous epithelia*. *EMBO J*, 2007. **26**(5): p. 1234-44.
234. Yezhelyev, M.V., et al., *Inhibition of SRC tyrosine kinase as treatment for human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(23): p. 8028-36.
235. Alper, O. and E.T. Bowden, *Novel insights into c-Src*. *Curr Pharm Des*, 2005. **11**(9): p. 1119-30.
236. Alvarez, R.H., H.M. Kantarjian, and J.E. Cortes, *The role of Src in solid and hematologic malignancies: development of new-generation Src inhibitors*. *Cancer*, 2006. **107**(8): p. 1918-29.
237. Biscardi, J.S., D.A. Tice, and S.J. Parsons, *c-Src, receptor tyrosine*

- kinases, and human cancer*. Adv Cancer Res, 1999. **76**: p. 61-119.
238. Dehm, S.M. and K. Bonham, *SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation*. Biochem Cell Biol, 2004. **82**(2): p. 263-74.
 239. Frame, M.C., *Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1602**(2): p. 114-30.
 240. Hilbig, A., *Src kinase and pancreatic cancer*. Recent Results Cancer Res, 2008. **177**: p. 179-85.
 241. Ishizawar, R. and S.J. Parsons, *c-Src and cooperating partners in human cancer*. Cancer Cell, 2004. **6**(3): p. 209-14.
 242. Johnson, F.M. and G.E. Gallick, *SRC family nonreceptor tyrosine kinases as molecular targets for cancer therapy*. Anticancer Agents Med Chem, 2007. **7**(6): p. 651-9.
 243. Liu, Z., et al., *Antiproliferative effects of Src inhibition on medullary thyroid cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(7): p. 3503-9.
 244. Rucci, N., M. Susa, and A. Teti, *Inhibition of protein kinase c-Src as a therapeutic approach for cancer and bone metastases*. Anticancer Agents Med Chem, 2008. **8**(3): p. 342-9.
 245. Russello, S.V. and S.K. Shore, *SRC in human carcinogenesis*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 139-44.
 246. Summy, J.M. and G.E. Gallick, *Src family kinases in tumor progression and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(4): p. 337-58.
 247. Tsatsanis, C. and D.A. Spandidos, *The role of oncogenic kinases in human cancer (Review)*. Int J Mol Med, 2000. **5**(6): p. 583-90.
 248. Warmuth, M., et al., *SRC family kinases: potential targets for the treatment of human cancer and leukemia*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(25): p. 2043-59.
 249. Irby, R.B. and T.J. Yeatman, *Role of Src expression and activation in human cancer*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5636-42.
 250. Boyer, B., Y. Bourgeois, and M.F. Poupon, *Src kinase contributes to the metastatic spread of carcinoma cells*. Oncogene, 2002. **21**(15): p. 2347-56.
 251. Kim, L.C., L. Song, and E.B. Haura, *Src kinases as therapeutic targets for cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(10): p. 587-95.
 252. Eura, M., et al., *Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas*. Int J Cancer, 1995. **64**(5): p. 304-8.
 253. Lee, K.D., et al., *Expression of MAGE A 1-6 mRNA in sputa of head and neck cancer patients--a preliminary report*. Anticancer Res, 2006. **26**(2B): p. 1513-8.
 254. Lim, S.C., *Expression of c-erbB receptors, MMPs and VEGF in head and neck squamous cell carcinoma*. Biomed Pharmacother, 2005. **59 Suppl 2**: p. S366-9.
 255. Onesto, C., et al., *Vascular endothelial growth factor-A and Poly(A) binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas: correlation and prognostic significance*. Br J Cancer, 2006. **94**(10): p. 1516-23.
 256. Margaritescu, C., et al., *VEGF expression and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical and morphometric*

- study. Clin Exp Med, 2010.
257. P, O.c., P. Rhys-Evans, and S.A. Eccles, *Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis*. Cancer, 2001. **92**(3): p. 556-68.
 258. Li, C., et al., *Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2005. **34**(5): p. 559-65.
 259. Wei, Q., et al., *EGFR, HER2, and HER3 expression in laryngeal primary tumors and corresponding metastases*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(4): p. 1193-201.
 260. Licitra, L., et al., *Role of EGFR family receptors in proliferation of squamous carcinoma cells induced by wound healing fluids of head and neck cancer patients*. Ann Oncol, 2011.
 261. Ang, K.K., et al., *Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma*. Cancer Res, 2002. **62**(24): p. 7350-6.
 262. Dassonville, O., et al., *Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer*. J Clin Oncol, 1993. **11**(10): p. 1873-8.
 263. Kusakawa, J., et al., *The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1996. **32B**(4): p. 217-21.
 264. Santini, J., et al., *Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas*. Head Neck, 1991. **13**(2): p. 132-9.
 265. Egloff, A.M. and J.R. Grandis, *Targeting epidermal growth factor receptor and SRC pathways in head and neck cancer*. Semin Oncol, 2008. **35**(3): p. 286-97.
 266. van Oijen, M.G., et al., *Overexpression of c-Src in areas of hyperproliferation in head and neck cancer, premalignant lesions and benign mucosal disorders*. J Oral Pathol Med, 1998. **27**(4): p. 147-52.
 267. P, O.c., et al., *C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors*. Oral Oncol, 2002. **38**(1): p. 73-80.
 268. Cuffel, C., et al., *Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2011. **128**(11): p. 2625-34.
 269. Cojocariu, O.M., et al., *[Prognosis and predictive factors in head-and-neck cancers]*. Bull Cancer, 2009. **96**(4): p. 369-78.
 270. Chang, S.S. and J. Califano, *Current status of biomarkers in head and neck cancer*. J Surg Oncol, 2008. **97**(8): p. 640-3.
 271. Chen, J.Y., et al., *Src family kinases mediate betel quid-induced oral cancer cell motility and could be a biomarker for early invasion in oral squamous cell carcinoma*. Neoplasia, 2008. **10**(12): p. 1393-401.
 272. Mandal, M., et al., *Epithelial to mesenchymal transition in head and neck*

- squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features.* Cancer, 2008. **112**(9): p. 2088-100.
273. Stratton, M.R., *Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise.* Science, 2011. **331**(6024): p. 1553-8.
274. *Medizinische Therapie 2007/ 2008.* Vol. 3: J. Schölmerich, Stefan E G Burdach, Klaus Mann, Wolff H Schmiegel, Werner Seeger, Wolfgang Stremmel, Norbert Suttorp, L Sacha Weilemann, Walter H.
275. Chee, C.E. and F.A. Sinicrope, *Targeted therapeutic agents for colorectal cancer.* Gastroenterol Clin North Am, 2010. **39**(3): p. 601-13.
276. Eng, C., *The evolving role of monoclonal antibodies in colorectal cancer: early presumptions and impact on clinical trial development.* Oncologist, 2010. **15**(1): p. 73-84.
277. Powles, T., et al., *Sunitinib and other targeted therapies for renal cell carcinoma.* Br J Cancer, 2011. **104**(5): p. 741-5.
278. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck.* N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 567-78.
279. Vermorken, J.B., et al., *Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer.* N Engl J Med, 2008. **359**(11): p. 1116-27.
280. Kruser, T.J., et al., *Augmentation of radiation response by panitumumab in models of upper aerodigestive tract cancer.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **72**(2): p. 534-42.
281. Rivera, F., et al., *Current situation of zalutumumab.* Expert Opin Biol Ther, 2009. **9**(5): p. 667-74.
282. Ura, T., *[The current status of development of anti-EGFR antibodies].* Gan To Kagaku Ryoho, 2010. **37**(5): p. 777-81.
283. Machiels, J.P., et al., *Zalutumumab plus best supportive care versus best supportive care alone in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck after failure of platinum-based chemotherapy: an open-label, randomised phase 3 trial.* Lancet Oncol, 2011. **12**(4): p. 333-43.
284. Burgos-Tiburcio, A., et al., *Development of targeted therapy for squamous cell carcinomas of the head and neck.* Expert Rev Anticancer Ther, 2011. **11**(3): p. 373-86.
285. Cripps, C., et al., *Epidermal growth factor receptor targeted therapy in stages III and IV head and neck cancer.* Curr Oncol, 2010. **17**(3): p. 37-48.
286. Cohen, E.E., et al., *Epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib added to chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer.* J Clin Oncol, 2010. **28**(20): p. 3336-43.
287. Van Waes, C., et al., *Molecular and clinical responses in a pilot study of gefitinib with paclitaxel and radiation in locally advanced head-and-neck cancer.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010. **77**(2): p. 447-54.
288. Saarilahti, K., et al., *Phase II prospective trial of gefitinib given concurrently with cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced head and neck cancer.* J Otolaryngol Head Neck Surg, 2010. **39**(3): p. 269-76.
289. Argiris, A., et al., *Phase II Trial of Pemetrexed and Bevacizumab in*

- Patients With Recurrent or Metastatic Head and Neck Cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(9): p. 1140-5.
290. Wang, Y., et al., *Investigation of the efficacy of a bevacizumab-cetuximab-cisplatin regimen in treating head and neck squamous cell carcinoma in mice*. Target Oncol, 2010. **5**(4): p. 237-43.
 291. Salama, J.K., et al., *A randomized phase II study of 5-fluorouracil, hydroxyurea, and twice-daily radiotherapy compared with bevacizumab plus 5-fluorouracil, hydroxyurea, and twice-daily radiotherapy for intermediate-stage and T4N0-1 head and neck cancers*. Ann Oncol, 2011.
 292. Cao, S., et al., *Bevacizumab enhances the therapeutic efficacy of Irinotecan against human head and neck squamous cell carcinoma xenografts*. Oral Oncol, 2011.
 293. Thuret, R., et al., *[Treatment of metastatic renal cell carcinoma.]*. Prog Urol, 2011. **21**(4): p. 233-244.
 294. Herrmann, E., et al., *Sequential therapies with sorafenib and sunitinib in advanced or metastatic renal cell carcinoma*. World J Urol, 2011.
 295. Demetri, G.D., *Differential properties of current tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors*. Semin Oncol, 2011. **38 Suppl 1**: p. S10-9.
 296. Keating, G.M. and A. Santoro, *Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma*. Drugs, 2009. **69**(2): p. 223-40.
 297. Choong, N.W., et al., *Phase II study of sunitinib malate in head and neck squamous cell carcinoma*. Invest New Drugs, 2010. **28**(5): p. 677-83.
 298. Fountzilias, G., et al., *A phase II study of sunitinib in patients with recurrent and/or metastatic non-nasopharyngeal head and neck cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2010. **65**(4): p. 649-60.
 299. Machiels, J.P., et al., *Phase II study of sunitinib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: GORTEC 2006-01*. J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 21-8.
 300. Bozec, A., et al., *Combination of sunitinib, cetuximab and irradiation in an orthotopic head and neck cancer model*. Ann Oncol, 2009. **20**(10): p. 1703-7.
 301. Elser, C., et al., *Phase II trial of sorafenib in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or nasopharyngeal carcinoma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(24): p. 3766-73.
 302. Williamson, S.K., et al., *Phase II evaluation of sorafenib in advanced and metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: Southwest Oncology Group Study S0420*. J Clin Oncol, 2010. **28**(20): p. 3330-5.
 303. Zhang, Q., et al., *Src family kinases mediate epidermal growth factor receptor ligand cleavage, proliferation, and invasion of head and neck cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6166-73.
 304. Wheeler, D.L., et al., *Epidermal growth factor receptor cooperates with Src family kinases in acquired resistance to cetuximab*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(8): p. 696-703.
 305. Johnson, F.M., et al., *Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells*.

- Clin Cancer Res, 2005. **11**(19 Pt 1): p. 6924-32.
306. Brooks, H.D., et al., *Phase 2 study of dasatinib in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer, 2011. **117**(10): p. 2112-9.
 307. Sundvall, M., et al., *EGFR targeting drugs in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma*. Expert Opin Emerg Drugs, 2010. **15**(2): p. 185-201.
 308. Ragin, C.C., F. Modugno, and S.M. Gollin, *The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus*. J Dent Res, 2007. **86**(2): p. 104-14.
 309. Tabor, M.P., et al., *Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(6): p. 1523-32.
 310. Wei, Q., et al., *EGFR, HER2 and HER3 expression in esophageal primary tumours and corresponding metastases*. Int J Oncol, 2007. **31**(3): p. 493-9.
 311. Shen, L., et al., *EGFR and HER2 expression in primary cervical cancers and corresponding lymph node metastases: implications for targeted radiotherapy*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 232.
 312. Tsutsui, S., et al., *EGFR, c-erbB2 and p53 protein in the primary lesions and paired metastatic regional lymph nodes in breast cancer*. Eur J Surg Oncol, 2002. **28**(4): p. 383-7.
 313. Cho, E.Y., et al., *Comparison of Her-2, EGFR and cyclin D1 in primary breast cancer and paired metastatic lymph nodes: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study*. J Korean Med Sci, 2008. **23**(6): p. 1053-61.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.	Arteria
AFP	Alpha-Fetoprotein
AR	Amphiregulin
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BTC	Bettacellulin
BAGE	B melanoma antigen
CDK4	Cyclin-dependet kinase-4
CEA	Carcinoembryonic Antigen
Csk	C-terminale Src Kinase
Chk	Csk homologe kinase
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
CTA	Cancer-Testis-Antigen
DAB	Diaminobenzidine
dest.	Destiliert
d.h.	das heißt
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
engl.	englisch
Ep-CAM	Epithelial cellular adhesion molecule
ERG	Epiregulin
et al.	et alia (und andere)
EXTREME	Erbix in First-line Treatment of Recurrent or Metastatic Head and Neck Cancer
Fik-1	fetal liver kinase-1

Flt	fms-like tyrosinekinase
G	Grading
GAGE	G melanoma antigen
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HER	Human epidermal growth factor receptor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HNO-Arzt	Hals-Nasen -Ohren-Arzt
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HPV	humane Papillomaviren
HRG	Heregulin
HRP	Horse radish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
Kateg.	Kategorien
kDa	Kilodalton
KDR	kinase-insert domain receptor
KGF	Keratinocyte Growth Factor
l	long
lat.	lateinisch
m	männlich
M.	Musculus
mAb	monoclonal antibodies (monoklonale Antikörper)
MAGE	Melanoma associated antigen
MAPK	Mitogen-Aktivierte-Proteinkinase
mind.	Mindestens
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
N.	Nervus
NRG	Neuregulin
NRP	Neurophilin
NY-ESO	New York esophageal squamous cancer antigen
OPG	Orthopantomogramm

Orf-Virus	Parapoxvirus ovis
p	pathologisch
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	pondus Hydrogenii
PIGF	Placenta growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
p-Wert	Signifikanzwert (engl. p-value von probability)
r_s	Spearman's Rank Correlation Coefficient
s	short
s	soluble (löslich)
SFKs	Src family kinases (Familie der Src-Kinasen)
Syn.	Synonym
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TGF- α	Transforming Growth Factor-alpha
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitoren
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor Nodes Metastasen
TSA	Tumorspezifische Antigene
u.a.	unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
vgl.	vergleiche
VPF	vascular permeability factor
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mir bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Urs Müller-Richter für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für seine freundliche Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Prof. Alfred Renk für die Übernahme des Koreferats.

Weiterhin danke ich einigen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts für Ihre Hilfe während meiner Laborarbeiten. Insbesondere möchte ich hier die engagierte Hilfe der technischen Assistentinnen der Immunhistochemie bei der Durchführung meiner Laborversuche erwähnen. Einen ebenso großen Dank möchte ich an Dr. Stephan Rauthe für seine hilfreiche Unterstützung bei der Auswertung meiner Färbungen sowie für seine Hilfe bei histopathologischen Fragestellungen richten.

Bei Kristina Lurz möchte ich mich recht herzlich für die statistische Beratung bedanken.

Bei meinen lieben Eltern, Elisabeth und Friedrich-Wilhelm Stratmann, möchte ich mich von ganzem Herzen für Ihre immer uneingeschränkte Unterstützung und Ihren Rückhalt bedanken.

Nicht zuletzt gebührt der größte Dank meinem lieben Ehemann, André Stratmann, für seine tatkräftige Hilfe und seine moralische und liebende Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Geburtstag: 15. August 1983
Geburtsort: Essen
Familienstand: verheiratet mit André Stratmann
1 Kind (Noah-Philipp, 3. Juni 2011)
Eltern: Elisabeth Stratmann u. Friedrich-Wilhelm Stratmann
Geschwister: 3 Brüder

Ausbildung, beruflicher Werdegang:

1990 – 1994 Grundschole, Gevelsberg
1994 – 2003 Gymnasium, Gevelsberg
2004 – 2009 Studium der Zahnmedizin, Universität Würzburg
2009 Staatsexamen Zahnmedizin
2009 - heute Promotion an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Würzburg
2010 – 2011 Assistenz Zahnärztin (Dr. Lenz, München)
2011 – heute Assistenz Zahnärztin (Dr. Bieber-Michler, Heimstetten)

Praktika, Weiterbildungen, Auslandsaufenthalte:

Jul. 03 - Sep. 03 Praktikum, Marienkrankenhaus, Schwelm
Okt. 03 - Jan. 04 Praktikum, Denver Health Hospital, Colorado, USA
Mär. 06 - Apr. 06 Praktikum, Praxis für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, Radolfzell
Mär. 08 – Apr. 08 Praktikum, Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, Helios-Klinikum Erfurt
Aug. 08 - Sept. 08 Famulatur am Padhar Hospital, Madhya Pradesh, Indien

Unterhaching, September 2012