

Technische Universität München  
Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik  
Klinikum rechts der Isar

**Angiogenesemarker als prognostische Faktoren sowie  
Unterschiede in der Ausprägung verschiedener  
Angiogenesemarker zwischen HPV-positiven und HPV-  
negativen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-  
Bereichs**

Anna-Katharina Haug

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier
	2. Priv.-Doz. Dr. M. Bas

Die Dissertation wurde am 12.07.2012 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2013 angenommen.



# Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Problemstellung</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Klinik der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich</b>	<b>1</b>
1.2.1 Anatomische Zuordnung, Klassifizierung und Stadieneinteilung	1
1.2.2 Molekularpathologie der Tumorentstehung bei Plattenepithelkarzinomen	6
1.2.3 Epidemiologie und Risikofaktoren	7
1.2.4 Diagnostik	9
1.2.5 Therapie	10
1.2.6 Prognosefaktoren	12
<b>1.3 Tumorangiogenese</b>	<b>13</b>
1.3.1 VEGF und VEGF-Rezeptoren	15
1.3.2 Sphingosinkinase und Sphingosin-1-Phosphat	17
1.3.3 Bradykinin und Bradykinin-Rezeptoren	19
<b>1.4 Faktoren der Tumorgenese: HPV16 und p16</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Zielsetzung der Studie</b>	<b>24</b>
<b>2 Material</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Lösungen, Gebrauchsgegenstände und Geräte</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Patientenkollektiv</b>	<b>27</b>
<b>3 Methoden</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Immunhistochemie</b>	<b>28</b>
3.1.1 Vorbereitung der Präparate	29
3.1.2 Prinzip und Ablauf der immunhistochemischen Färbung	30
<b>3.2 In-situ-Hybridisierung</b>	<b>33</b>
3.2.1 Vorbereitung der Präparate	33
3.2.2 Prinzip und Ablauf der immunhistochemischen Färbung	33
<b>3.3 Auswertung der Gewebefärbungen</b>	<b>34</b>
<b>3.4 Statistische Analyse</b>	<b>35</b>
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Allgemeine Statistik</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Spezielle Statistik der einzelnen Parameter</b>	<b>44</b>
4.2.1 HPV16	44
4.2.2 p16	46
4.2.3 BKB1R	48
4.2.4 BKB2R	50

4.2.5 VEGFR2 .....	52
4.2.6 SphK1.....	54
<b>4.3 Zusammenhänge zwischen den einzelnen Tumorparametern .....</b>	<b>55</b>
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>59</b>
<b>5.1 Diskussion der Methodik.....</b>	<b>59</b>
<b>5.2 Allgemeine Beobachtungen .....</b>	<b>60</b>
<b>5.3 Prognostische Aussagekraft und Angiogeneseverhalten verschiedener Tumorparameter.....</b>	<b>61</b>
5.2.1 HPV16 und p16 .....	61
5.2.2 BKB1R.....	63
5.2.3 BKB2R.....	64
5.2.4 VEGFR2 .....	65
5.2.5 SphK1.....	66
<b>5.4 HPV16-induzierte Karzinome als eigene Tumorentität.....</b>	<b>67</b>
<b>5.5 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>68</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>9 Danksagung .....</b>	<b>87</b>
<b>10 Lebenslauf.....</b>	<b>88</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Anders als bei anderen Tumorentitäten, wie zum Beispiel bei Lymphomen oder dem Mammakarzinom, gibt es bei den Kopf-Hals-Tumoren bis jetzt noch keine aussagekräftigen prognostischen Marker bzw. Marker, die standardmäßig zur Therapieentscheidung herangezogen werden können.

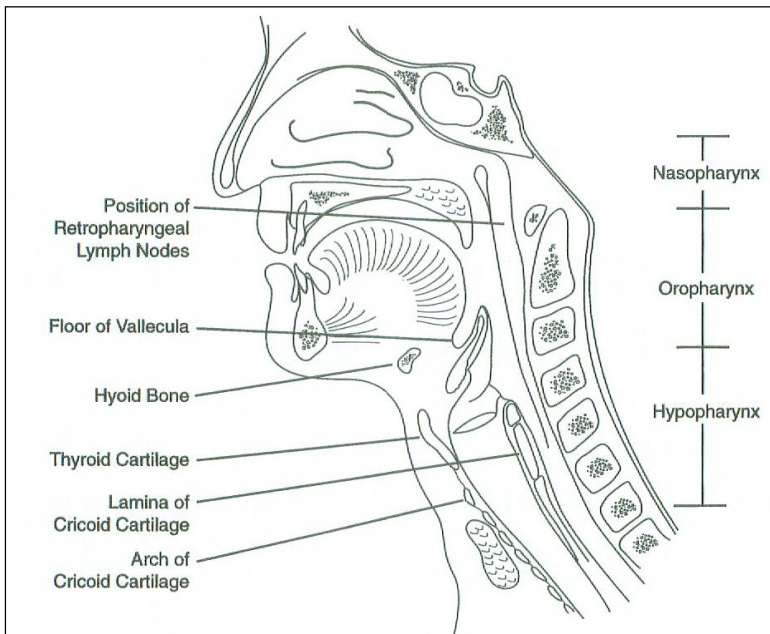
Dass Faktoren wie der vasendotheliale Wachstumsfaktor VEGF, das Bradykinin, die Sphingosinkinase oder auch das Humane Papillomavirus eine Rolle in der Angiogenese bzw. in der Tumorgenese spielen, wurde in zahlreichen Studien gezeigt. Es scheint jedoch noch nicht vollständig geklärt zu sein, wie diese Faktoren zusammenspielen, bei welcher Tumorlokalisation sie eine besonders große Rolle spielen, was sie prognostisch aussagen und ob bzw. wie man das Wissen um diese Faktoren in die Therapieentscheidung mit einbeziehen sollte, um ein signifikant besseres Gesamtüberleben zu gewährleisten. Außerdem stellt sich die Frage, ob durch Viren ausgelöste Tumoren eher als Untergruppe der Kopf-Hals-Tumoren anzusehen sind oder ob sie eine eigene Tumorentität darstellen. In diesem Zusammenhang wäre interessant aufzudecken, ob sich diese beiden durch verschiedene Mechanismen ausgelösten Karzinomtypen hinsichtlich der Angiogenese ähnlich verhalten, oder sich auch hierin unterscheiden.

## 1.2 Klinik der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

### 1.2.1 Anatomische Zuordnung, Klassifizierung und Stadieneinteilung

Zu den Kopf-Hals-Malignomen zählen definitionsgemäß Tumoren von Lippe, Speicheldrüse, Mundhöhle, Larynx, Oropharynx, Nasopharynx, Hypopharynx, Nase und Nasennebenhöhlen und äußerem Ohr. In dieser Arbeit werden lediglich Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, des Oro- und Hypopharynx sowie des Larynx erfasst.

Zu den Plattenepithelkarzinomen der **Mundhöhle** gehören Tumoren der Zunge bis zu den Papillae vallatae, des Mundbodens, der Wangenschleimhaut, der Retromolargegend, des harten Gaumens und der Schleimhaut des Alveolarfortsatzes.



**Abb.1:** Einteilung des Pharynx in Naso-, Oro- und Hypopharynx (modifiziert nach Geene FL et al., 2002)

Die Begrenzungen des **Nasopharynx** werden definitionsgemäß nach kranial durch die Choanen und nach kaudal zum Oropharynx hin durch die freie Hinterwand des Gaumensegels gebildet. In diesem Abschnitt findet sich meist respiratorisches Epithel und viel lymphatisches Gewebe, weshalb auch so genannte lymphoepitheliale Karzinome den Großteil (ca. 70%) der Tumoren im Nasopharynx ausmachen (Strutz et al., 2001). Aus diesem Grund wurden Nasopharynxtumore aus unserer Studie ausgeschlossen.

Die Nasopharynx-Karzinome werden unter anderem mittels der WHO-Klassifikation histologisch eingeteilt.

	WHO-Klassifikation	Ehem. Terminologie
Typ 1	Plattenepithel-Karzinom	Plattenepithel-Karzinom
Typ 2	Nicht verhornendes Karzinom <i>nicht lymphatisch</i> <i>lymphatisch</i>	Karzinom in Transition  Lymphoepitheliales Karzinom (Regaud)
Typ 3	Undifferenziertes Karzinom <i>nicht lymphatisch</i> <i>lymphatisch</i>	Anaplastisches Karzinom  Lymphoepitheliales Karzinom (Schmincke)

**Tab.1:** Klassifikation der Nasopharynx-Karzinome (Geene et al., 2002)

Der **Oropharynx** schließt nach allgemeiner Definition den Zungengrund, die Tonsillen und den Gaumenbogen einschließlich der Uvula und der Rachenwände ein. Er schließt sich nach kaudal an den Nasopharynx an und reicht bis zur Epiglottisspitze und den Valleculae. An erster Stelle

stehen hier Malignome, die vom lymphatischen Gewebe der Tonsillen ausgehen (Strutz et al., 2001).

Der **Hypopharynxschlauch** schließt sich nach kaudal an den Oropharynx an und reicht von der Oberseite des Zungenbeins bzw. den Valleculae bis zur Unterseite der Cartilago cricoidea und endet am Ösophaguseingang. Tumoren der folgenden Strukturen sind dem Hypopharynx zugeordnet: Malignome der Fossae piriformes, der lateralen oder posterioren Pharynxwand sowie der Postcricoidregion (Strutz et al., 2001).

Der **Larynx** wird in einen glottischen, einen supra- und einen infraglottischen Raum unterteilt, wobei der glottische Raum von der Rima vestibuli bis zur Rima glottidis reicht, der supraglottische Raum vom Aditus laryngis bis zu den Taschenfalten und der infraglottische Raum von der Rima glottidis bis zum inferioren Rand des Ringknorpels reicht (Strutz et al., 2001).

Alle Plattenepithelkarzinome des HNO-Bereiches werden mittels der TNM-Klassifikation eingeteilt, die durch die International Union Against Cancer UICC etabliert und immer wieder revidiert und aktualisiert wurde. „T“ steht für Primärtumor, „N“ für Lymphknotenmetastase, „M“ für Fernmetastase. Die T- und N-Einteilungen unterscheiden sich je nach Lokalisation des Primärtumors, die M-Einteilung gilt gleichermaßen für alle Kopf-Hals-Tumore (Gospodarowicz et al., 2004).

TX	Der Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumordurchmesser <2cm
T2	Tumordurchmesser >2cm, aber <4cm
T3	Tumordurchmesser >4cm
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, beispielsweise durch den Knochen, in die extrinsische Zungenmuskulatur, den Sinus maxillaris und/oder in die Haut

**Tab.2:** Primärtumor (T) der Mundhöhle  
(Sobin und Wittekind, 2010)

TX	Der Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor bleibt auf Nasopharynx begrenzt
T2	Tumor infiltriert das Oropharynxgewebe und/oder die Fossa nasalis
T2a	...mit parapharyngealer Infiltration
T2b	...ohne parapharyngeale Infiltration
T3	Tumor infiltriert benachbarten Knochen und/oder die Nasennebenhöhlen
T4	Tumor mit intrakranieller Extension und/oder Beteiligung von Hirnnerven, der Fossa infratemporalis, des Hypopharynx oder der Orbita

**Tab.2:** Primärtumor (T) des Nasopharynx  
(Sobin und Wittekind, 2010)



TX	Der Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumordurchmesser ≤ 2cm
T2	Tumordurchmesser > 2cm, aber ≤ 4cm
T3	Tumordurchmesser > 4cm
T4	Tumorausbreitung in benachbarte Strukturen, beispielsweise in die Mandibula, die Mm pterygoidei, den harten Gaumen, die tiefe Zungenmuskulatur, den Larynx

**Tab.4:** Primärtumor (T) des Oropharynx  
(Sobin und Wittekind, 2010)

TX	Der Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf eine Struktur begrenzt, Durchmesser ≤ 2cm
T2	Tumor infiltriert mehr als eine Hypopharynxstruktur oder überschreitet die Mittellinie oder misst im Durchmesser > 2cm, aber ≤ 4cm; Keine Fixation des Hemilarynx;
T3	Tumordurchmesser > 4cm oder Fixation des Hemilarynx
T4	Tumorausbreitung in benachbarte Strukturen, beispielsweise in die Cartilago thyroidea oder cricoidea, die Arteria carotis, die Halsweichteile, die prävertebrale Faszie, die Mm prävertebrales, die Glandula thyroidea oder den Ösophagus

**Tab.5:** Primärtumor (T) des Hypopharynx  
(Sobin und Wittekind, 2010)

NX	Regionale Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen LK-Metastasen nachweisbar
N1	Solitäre LK-Metastase, Durchmesser ≤ 3cm
N2a	Solitäre LK-Metastase, Durchmesser > 3cm, aber ≤ 6cm
N2b	Multiple ipsilaterale LK-Metastasen, Durchmesser < 6cm
N2c	Multiple bilaterale oder kontralaterale LK-Metastasen, Durchmesser ≤ 6cm
N3	LK-Metastase in mindestens einem LK, Durchmesser >6cm

**Tab.6:** Lymphknotenmetastasen (N) mit Primärtumor in der Mundhöhle  
(Sobin und Wittekind, 2010)

NX	Regionale Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen LK-Metastasen nachweisbar
N1	Unilaterale LK-Metastase(n) oberhalb der Fossa supraclavicularis, Durchmesser ≤ 6cm
N2	Multiple bilaterale oder kontralaterale LK-Metastase(n) oberhalb der Fossa supraclavicularis, Durchmesser ≤ 6cm
N3a	LK-Metastase(n), Durchmesser > 6cm
N3b	Ausbreitung bis in die Fossa supraclavicularis

**Tab.7:** Lymphknotenmetastasen (N) mit Primärtumor in der Mundhöhle  
(Sobin und Wittekind, 2010)

NX	Regionale Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen LK-Metastasen nachweisbar
N1	Unilaterale ipsilaterale LK-Metastase, Durchmesser ≤ 3cm
N2a	Unilaterale ipsilaterale LK-Metastase, Durchmesser > 3cm aber ≤ 6cm
N2b	Mehrere ipsilaterale LK-Metastasen, Durchmesser > 3cm aber ≤ 6cm
N2c	Bilaterale oder kontralaterale LK-Metastasen, Durchmesser > 3cm aber ≤ 6cm
N3	LN-Metastase(n), Durchmesser > 6cm

**Tab.8:** Lymphknotenmetastasen (N) mit Primärtumor im Oropharynx  
(Sobin und Wittekind, 2010)

NX	Regionale Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen LK-Metastasen nachweisbar
N1	Unilaterale ipsilaterale LK-Metastase, Durchmesser ≤ 3cm
N2a	Unilaterale ipsilaterale LK-Metastase, Durchmesser > 3cm aber ≤ 6cm
N2b	Mehrere ipsilaterale LK-Metastasen, Durchmesser > 3cm aber ≤ 6cm
N2c	Bilaterale oder kontralaterale LK-Metastasen, Durchmesser > 3cm aber ≤ 6cm
N3	LN-Metastase(n), Durchmesser > 6cm

**Tab.9:** Lymphknotenmetastasen (N) mit Primärtumor im Hypopharynx (Sobin und Wittekind, 2010)

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Fernmetastasen nachweisbar

**Tab.10:** Fernmetastasen (M) mit Primärtumor im Kopf-Hals-Bereich (Sobin und Wittekind, 2010)

Für alle Pharynx Tumore existiert neben der TNM-Klassifikation auch eine Stadieneinteilung, die sich jedoch an der TNM-Klassifikation orientiert (s. Tab.11).

<b>Stadien Nasopharynx</b>				<b>Stadien Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx</b>			
Stadium 0	Tis	N0	M0	Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0	Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T2a	N0	M0	Stadium II	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2b	N0-1	M0	Stadium III	T1-2	N0-1	M0
Stadium III	T1	N2	M0		T3	N1	M0
	T2a	N2	M0	Stadium IVA	T1-3	N2	M0
	T2b	N2	M0		T4a	N0-2	M0
	T3	N0-2	M0	Stadium IVB	T1-4	N3	M0
Stadium IVA	T1-4	N0-3	M0		T4b	N0-3	M0
Stadium IVB	T1-4	N3	M0	Stadium IVC	T1-4	N0-3	M1
Stadium IVC	T1-4	N1-3	M1				

**Tab.11:** Stadieneinteilung der Pharynx Tumoren (nach Sobin und Wittekind, 2010)

Die histomorphologische Malignitätsgraduierung gilt für alle Lokalisationen von Plattenepithel-Malignomen im Kopf-Hals-Bereich:

Grad 1/hoch differenziert

Das Karzinomgewebe zeigt Ähnlichkeiten zu ausdifferenziertem Plattenepithel mit häufiger Verhornung und gut identifizierbaren Interzellularbrücken. Die zelluläre Pleomorphologie ist gering, Mitosen sind selten, atypische Mitosen fehlen.

Grad 2/mäßig differenziert	Die Hornbildung ist geringer ausgebildet, Interzellularbrücken sind kaum nachweisbar, es liegt eine höhere Kernpleomorphologie und eine höhere Mitoserate vor.
Grad 3/niedrig differenziert	Zeichen einer plattenepithelialen Differenzierung liegen nur spärlich vor. Die Kernpleomorphologie ist hochgradig, die mitotische Aktivität sowie die Anzahl atypischer Mitosen sind hoch. (Mast G et al., 2009)

### 1.2.2 Molekularpathologie der Tumorentstehung bei Plattenepithelkarzinomen

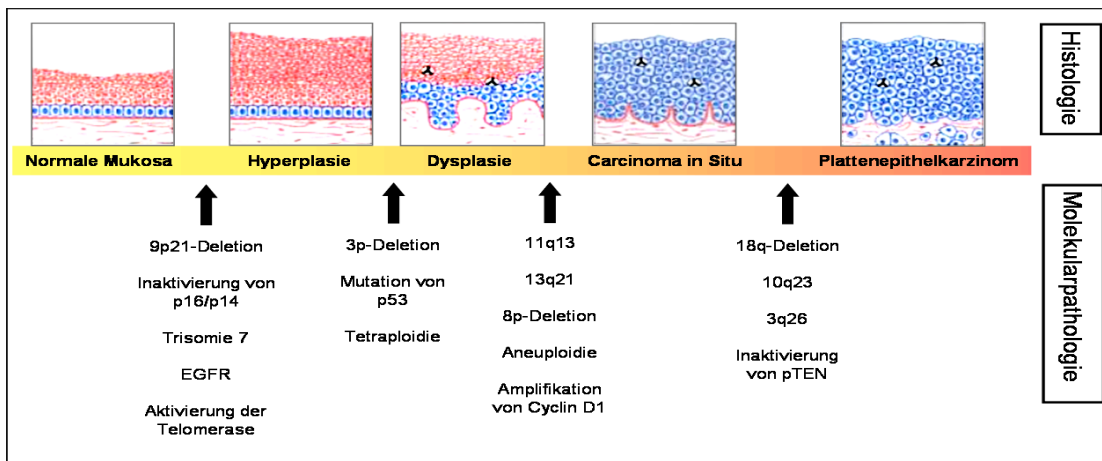
Die molekulare Grundlage für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen besteht in der Mutation verschiedener Tumorgene, wobei mutagene Agenzien Veränderungen an Onkogenen und Tumorsuppressorgenen hervorrufen.

Der Verlust der Chromosomenregion 9p21 mit nachfolgender Inaktivierung des p16-Gens lässt sich schon sehr früh im Verlauf der Tumorgenese nachweisen und stellt die häufigste genetische Veränderung bei der Karzinogenese von Kopf-Hals-Tumoren dar (Jares et al. 1997; Jares et al., 1999). Die Amplifikation anderer Onkogene wie beispielsweise des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR wurde bei 6-25% der Kopf-Hals-Tumoren beschrieben (Fracchiolla et al., 1995; Freier et al., 2003; van Oijen et al., 1998).

Ein häufiges Ereignis ist auch die Mutation von Tumorsuppressorgenen, wie beispielsweise dem p53-Gen, welches auf Chromosom 17p13 lokalisiert ist. Diese Mutation konnte bei etwa 50% der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region nachgewiesen werden (Nadal et al., 1995; Nadal et al., 2003; Oijen et al., 2000). Daraus resultiert eine genetische Instabilität und man geht davon aus, dass die Mutation relativ früh in der Genese von Plattenepithelkarzinomen passiert (Caamano et al. 1993; Nagpal et al., 2003).

Auch eine Aktivierung von Onkogenen findet statt, so etwa die Amplifikation von Cyclin D1, die bei einem Drittel der Tumorpatienten mit einem Plattenepithelkarzinom beobachtet wurde und mit einer eher fortgeschrittenen Erkrankung assoziiert ist (Jares et al., 1994; van Oijen et al., 1998).

Histologisch bestehen die Schleimhäute aus einem mehrschichtigen Epithel, das teilweise auch verhornt sein kann. Erste makroskopische Veränderungen können nicht wegwischbare, weiße und fleckige Schleimhautläsionen (Leukoplakien) sein, die keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden können. Einfache Leukoplakien können dysplastische Veränderungen zeigen, wenn Schichtungsanomalien und Zell- oder Kernatypien auftreten. Sie sind dann als Präkanzerosen einzuordnen, auf deren Basis häufig Plattenepithelkarzinome entstehen (Forastière et al., 2001).



**Abbildung 2:** Entstehung von Plattenepithelkarzinomen (modifiziert nach Califano et al., 1996 und Forasière et al., 2001)

### 1.2.3 Epidemiologie und Risikofaktoren

Weltweit stellen Kopf-Hals-Malignome die fünfthäufigste Tumorerkrankung dar (Sturgis et al., 2004). In der Bundesrepublik Deutschland standen sie im Jahr 2002 sogar an vierter Stelle der Tumor-Neuerkrankungsraten, wobei der relative Anteil an allen Krebsleiden bei 4,8% lag. Bei Männern lag der Anteil der HNO-Tumore dabei mit 7,3% insgesamt weit höher als bei Frauen (2,1%) (Statistisches Bundesamt, 2003).

Für die Entität der Mundhöhlen- und Rachenmalignome wurde in der BRD im Jahr 2003 eine rohe Inzidenz von 19,5/100.000 bei Männern und 6,6/100.000 bei Frauen berechnet. Bei Larynxtumoren haben Männer (Inzidenz 7,6/100.000) in Relation zu Frauen (Inzidenz 0,9/100.000) sogar ein gut 7-fach höheres Risiko zu erkranken. Dementsprechend differieren auch die Mortalitätsraten zwischen Männern und Frauen erheblich. Während im Jahr 2003 durchschnittlich 9,3 von 100.000 Männern an Mundhöhlen- und Rachentumoren verstarben, waren es bei Frauen nur etwa 2,5. Auch an Larynxtumoren verstarben deutlich mehr Männer (3,4/100.000) als Frauen (0,4/100.000) (Robert-Koch-Institut, 2003). Relativ zu der Neuerkrankungsrates lag die Gesamtmortalität (Sterbefälle pro Neuerkrankungen) der Männer mit HNO-Tumoren im Jahr 1998 bei 51%, bei Frauen bei 39%. Der Grund für diese relativ hohe Mortalität mag daran liegen, dass mehr als zwei Drittel der Patienten mit HNSCC bei Erstdiagnose bereits an einem fortgeschrittenen Tumorstadium leiden (Lang et al., 2002).

Betrachtet man die verschiedenen Lokalisationen der Kopf-Hals-Tumoren, stellen die Larynxtumoren in Deutschland insgesamt den größten relativen Anteil dar, gefolgt von Malignomen des Oropharynx, der Zunge und der Mundhöhle. Auch hier unterscheiden sich die Häufigkeiten je nach Geschlecht. Während bei Männern die relative Anzahl an Larynxtumoren hervorsteht, liegen bei Frauen Zungen- und Oropharynxmalignome vorne (Tumorzentrum München, 2009).

Lokalisation	Männer (%)	Frauen (%)	Durchschnitt (%)
Larynx	26,1	13,2	19,65
Oropharynx	16,4	19,2	17,8
Zunge	12,9	19,3	16,1
Mundhöhle	14,3	15,7	15,0
Hypopharynx	17,7	10,2	13,95
Speicheldrüse	2,4	7,3	4,85
Nase und NNH	2,2	4,9	3,55
Nasopharynx	2,2	3,7	2,95
Äußeres Ohr	0,6	1,6	1,1
Lippe	0,6	1,2	0,9
Sonstiges	4,6	3,7	4,15
Gesamt	100	100	100

**Tab.12:** Prozentualer Anteil der einzelnen Tumorentitäten an allen Kopf-Hals-Malignomen in der Bundesrepublik Deutschland 1998 (die in dieser Arbeit untersuchten Malignome sind farblich markiert) (Tumorzentrum München, 2009)

Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich sind der Tabak- und Alkoholkonsum. Dabei haben sowohl Raucher, die nicht gleichzeitig Alkohol konsumieren, als auch Alkoholiker (bei mehr als drei alkoholischen Getränken pro Tag), die keine Raucher sind, ein erhöhtes Risiko, an Oro- und Hypopharynxkarzinomen sowie Larynxkarzinomen zu erkranken (Hashibe et al., 2007). Bei dem gleichzeitigen Konsum von Tabak und Alkohol, potenziert sich das Risiko sogar. So haben Blot et al. bei Patienten, die gleichzeitig Raucher und Alkoholiker waren, ein 35-fach erhöhtes Risiko festgestellt, an Mundhöhlen- und Pharynx Tumoren zu erkranken (Blot et al., 1988).

Maura Gillison hat mit ihrem Forschungsteam im Jahr 2000 einen weiteren bedeutenden ätiologischen Faktor, vor allem für die Entstehung von Mundhöhlen- und Oropharynx Tumoren, entdeckt: Das Humane Papillomavirus 16 (HPV16), das über den oralen Geschlechtsverkehr übertragen werden kann. Seitdem gilt die Infektion mit dem HPV16 - und damit auch diese Sexualpraktik - als Risikofaktor bei HNO-Tumoren und ist vor allem verantwortlich für Karzinome der Tonsillen und des Zungengrundes bei Patienten, die weder rauchen noch Alkohol trinken (Gillison et al., 2000). Die Inzidenz HPV-assoziiierter Tumoren im Kopf-Hals-Bereich nahmen in den letzten Jahrzehnten stark zu, was wahrscheinlich an dem sich verändernden Sexualverhalten liegt (Chaturvedi et al., 2008). Des Weiteren fand Gillison einen Zusammenhang zwischen dem Marihuana-Konsum und der HPV-Infektion (Gillison et al., 2008).

Daneben gelten die Exposition gegenüber Metallstäuben, Farben, Diesel und Benzin als Risikofaktoren für Larynxkarzinome (Brown et al., 1988). Auch Menschen mit schlechter Mundhygiene scheinen ein erhöhtes Risiko für HNO-Tumoren zu haben (Elwood et al., 1984).

Dieses Risikoprofil gilt jedoch nicht für die Nasopharynxkarzinome. Hier scheinen Tabak und Alkohol keine Rolle zu spielen. Vielmehr gelten die Infektion mit EBV, verschiedene Umweltfaktoren wie zum Beispiel der Verzehr von gesalzenem Trockenfisch und die genetische

Prädisposition also erhöhtes Risiko, an einem Nasopharynxkarzinom zu erkranken (Chan et al., 2004).

#### **1.2.4 Diagnostik**

Für die Diagnostik eines Tumors im Hals-Nasen-Ohren-Bereich sind eine ausführliche Anamnese und körperliche Untersuchung unerlässlich.

Es sollte eine gezielte Risikoanamnese bezüglich des Alkohol- und Tabakkonsums erfolgen, sowie nach tumorbedingten klinischen Symptomen gefragt werden. Normalerweise besteht bei der Arztkonsultation bereits mindestens ein Symptom, was bedeutet, dass sich der Tumor bei Erstdiagnose meist bereits in Stadium II befindet (Mashberg A et al., 1995).

Die körperliche Untersuchung umfasst die Inspektion, Palpation und flexible oder starre Endoskopie mit Biopsieentnahme. Neben dem Primärbefund wird ein besonderes Augenmerk auf den Lymphknotenstatus und den Ausschluss von Zweittumoren gerichtet, denn mindestens 50% der symptomatischen Patienten haben bereits eine Lymphadenopathie (Mashberg et al., 1981), was die Therapie und Prognose entscheidend beeinflusst. Alvarez et al. fanden zudem bei ca. 11% der Patienten mit HNO-Tumoren ein Zweitkarzinom, davon befanden sich die meisten Zweitumore entweder ebenfalls im HNO-Bereich (47%), in der Lunge (32%) oder im Ösophagus (11%) (Alvarez et al., 2006).

Bei bestehendem Verdacht auf ein malignes Geschehen liefern die bildgebenden Verfahren wie Sonographie, Röntgen, CT, MRT und PET-CT weitere Informationen zum Primärtumor, sowie zu Lymphknoten- und Fernmetastasen.

Die Sonographie wird mit einem 5-13 MHz Schallkopf durchgeführt und eignet sich gut zur Beurteilung von Zunge, Mundboden und möglicher Gefäßinfiltration sowie zur Beurteilung der zervikalen Lymphknoten. Die Sonographie kann auch – neben dem Röntgen Thorax – bei der Suche nach Fernmetastasen hilfreich sein, wobei bei ausgedehnten Tumoren (T3,T4) das CT des Thorax und des Abdomens den Standard darstellt (Lutz et al., 2009).

Mit Hilfe der Spiral-CT mit Kontrastmittelinjektion lassen sich der Primärtumor sowie die Lymphknoten artefaktarm und suffizient darstellen. Es sollte somit jeweils vor Therapiebeginn im Rahmen der Diagnostik und nach Abschluss der Wundheilung bzw. drei Monate nach Abschluss einer konservativen Therapie zur Kontrolle des Therapieerfolgs eine CT durchgeführt werden (Lutz et al., 2009).

Die MRT ist zwar aufgrund der längeren Untersuchungszeit Artefakt-anfällig, bietet jedoch einen besseren Weichteilkontrast und erlaubt eine Differenzierung zwischen Narbe, Tumor und Ödem sowie zwischen nekrotischem und vitalem Gewebe (Lutz et al., 2009).

Seit dem Jahr 2001 steht auch die Kombination der Positronenemissionstomographie mit der Computertomographie, kurz PET-CT, für das Staging sowie die Kontrolle des Therapieerfolgs

zur Verfügung. Vor allem posttherapeutisch macht die PET-CT eine Differenzierung zwischen Narbengewebe und Rezidiv einfacher und auch LK-Metastasen, die morphologisch unauffällig sind, werden bei dieser Untersuchung erkannt. Eine Schwäche dieser Methode liegt in falsch-positiven Ergebnissen bei Entzündung, sowie einer schlechten Beurteilbarkeit bei Diabetikern (Lutz et al., 2009).

Natürlich spielt auch die Histologie eine entscheidende Rolle. Präoperativ soll der Tumorverdacht bestätigt werden, postoperativ können genauere Angaben zum Tumor bezüglich seiner Ausdehnung, Infiltrationstiefe, Differenzierungsgrad, regionalen Metastasen und Infiltration von Lymph- und Blutgefäßen sowie einer möglichen Kapselüberschreitung gemacht werden.

### **1.2.5 Therapie**

Die Therapie der Kopf-Hals-Tumore wird je nach Tumorstadium und Einschätzung der Gesamtsituation des Patienten mit kurativer oder palliativer Zielsetzung geplant. Hierbei gilt es, sich für einen primär operativen oder konservativen Therapieansatz zu entscheiden, wobei in der heutigen Zeit meist ein multimodales Vorgehen bevorzugt wird. Dabei richtet sich das Augenmerk nicht nur auf den Primärtumor, sondern ebenfalls auf eventuelle Lymphknoten- oder in selteneren Fällen Fernmetastasen. Neben dem Ziel, das Überleben und die Symptome des Patienten zu verbessern, spielt vor allem die Erhaltung der Lebensqualität, die aus der weitgehenden Wiederherstellung der Funktionalität und Ästhetik resultiert, eine große Rolle in der Therapieplanung (Pouget-Schors et al., 2009).

Entscheidet man sich für ein primär operatives Vorgehen, so stehen hier die offene OP und die Operation mit Hilfe des CO<sub>2</sub>-Lasers zur Verfügung.

Bei der offenen, operativen Versorgung wird bei der vollständigen Resektion eines Plattenepithelkarzinoms derzeit ein Sicherheitsabstand von ca. 1cm empfohlen, bei Resektion kleiner, auf die Stimmlippen begrenzter Tumoren werden 1-3mm als ausreichend betrachtet. Die Tumorfreiheit der Resektionsränder kann mittels intraoperativer Schnellschnittdiagnostik überprüft werden, so dass gegebenenfalls nachresiziert werden kann (Schuler et al., 2009). Vorteile der offenen Chirurgie gegenüber der Laserchirurgie sind vor allem die bessere Übersicht und die kürzere Operationsdauer (Dellian, 2009).

Die Laserchirurgie mit dem CO<sub>2</sub>-Laser wurde in den 1970er Jahren das erste Mal von Jako und Strong in der Mikrochirurgie des Larynx eingesetzt (Strong et al., 1972). Es wurde gezeigt, dass die Ergebnisse bei geeigneten Fällen, wie zum Beispiel bei frühen supraglottischen Larynxkarzinomen oder Karzinomen der Stimmlippen, mit denen der offenen Chirurgie vergleichbar sind (Ambrosch, 1998; Steiner, 1993). Entscheidender Vorteil des Lasers im Vergleich zu offenen Operation ist das geringere Trauma und damit die bessere allgemeine Verträglichkeit (Dellian, 2009).

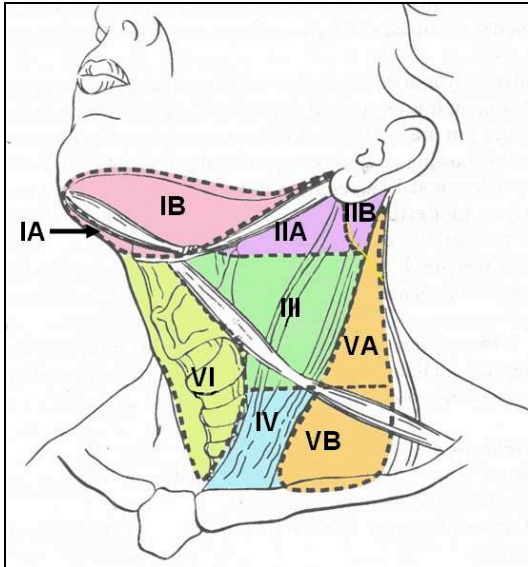
Plattenepithelkarzinome des Pharynx und Larynx sind zudem prinzipiell als strahlensensible Tumoren anzusehen und in frühen Tumorstadien (T1-2, N0) gelten die Operation und die fraktionierte Strahlentherapie als gleichwertig (Emami et al., 1998; Mendenhall et al., 1998).

Bei Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen wird die Radiotherapie aber vor allem für Hochrisikopatienten (extranodal spread, multiple Lymphknotenmetastasen, positive Resektionsränder) postoperativ zur Bestrahlung des ehemaligen Tumor- sowie des Lymphabflussgebietes eingesetzt, was die lokoregionale Tumorkontrolle und die Gesamtüberlebenszeit signifikant zu verbessern scheint (Lundahl et al., 1998). Dabei ist die kombinierte Radiochemotherapie der alleinigen Strahlentherapie überlegen: Es konnte eine längere Rezidivfreiheit, eine bessere lokoregionale Kontrolle und ein längeres Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Cooper et al., 2004).

Neben dem Primärtumor können auch die eventuellen Lymphknotenmetastasen chirurgisch exzidiert werden. Die radikale Neck Dissection (ND), zu welcher neben der Lymphknotenausräumung auch die Entfernung der V. jugularis int., des M. sternocleidomastoideus und des N. accessorius gehört, wurde von Crile das erste Mal vor gut 100 Jahren beschrieben (Crile, 1906). Inzwischen wird in den meisten Fällen die weniger radikale „funktionelle Neck Dissection“ bevorzugt, bei der die Muskeln, der N. accessorius und die V. jugularis geschont werden. Beim N+-Hals wird auch vermehrt die „selektive Neck Dissection“ durchgeführt, bei der nur einzelne Lymphknotengruppen entfernt werden, um ein Übertherapieren zu vermeiden und das Funktionsdefizit sowie die Komplikationsraten so weit wie möglich zu vermindern (Harish, 2005).

Die Neck dissection wird bei klinisch oder bildgebend nachweisbaren Lymphknoten in therapeutischer Absicht, bei diagnostisch inapparenten Lymphknoten im Rahmen des operativen Stagings als diagnostische bzw. auch als prophylaktische Maßnahme durchgeführt, da das Risiko einer subklinischen oder okkulten LK-Beteiligung besteht. Hierbei orientiert man sich an einem visuell-schematischen Einteilungssystem in Levels, das ursprünglich auf den Vorschlägen des Head and Neck Service at Sloan Kettering Memorial Cancer Center's beruht. Das aktuell meist verwendete System wurde von der *American Head and Neck Society / American Academy of Otolaryngo- Head and Neck Surgery* erarbeitet und beinhaltet 6 Level (Cornelius et al., 2009).





**Abb.3:** Level der Halslymphknoten  
(Harish, 2005)

### 1.2.6 Prognosefaktoren

Der Lymphknotenstatus stellt einen der wichtigsten prognostischen Parameter für die Überlebenszeit nach Diagnosestellung dar (Zätterström et al., 1991). Sowohl die Anzahl der positiven Lymphknoten als auch die Lokalisation beeinflussen die Prognose. Je mehr Lymphknoten befallen sind, je weiter kaudal die Lymphknotenmetastasen angesiedelt sind, bzw. je weiter die Entfernung der Metastasen vom Sentinel-Lymphknoten ist, desto schlechter ist die Prognose (Mamelle et al., 1994). Außerdem verschlechtert der „extranodal spread“ (ENS), eine Überschreitung der LK-Kapsel, sowie der Nachweis einer perineuralen Infiltration die Prognose signifikant (Shingaki et al., 2003; Woolgar, 2005).

Des Weiteren gilt die Lokalisation des Primärtumors als prognostischer Faktor. Tumoren der Mundhöhle und des Larynx scheinen allgemein besser differenziert als Tumoren des Pharynx. Das unterschiedliche Grading wiederum korreliert mit dem Lymphknotenbefall und hat folglich Einfluss auf die Prognose (Roland et al., 1992).

Auch die Tumordicke bzw. die Invasionstiefe wurde in mehreren Studien als prognostischer Parameter bestätigt. Anhand von frühen Zungenkarzinomen wurde gezeigt, dass sich mit zunehmender Tumordicke die Wahrscheinlichkeit auf Lymphknotenmetastasen erhöht, was wiederum die Prognose verschlechtert (O-charoenrat et al., 2003; Fukano et al., 1997).

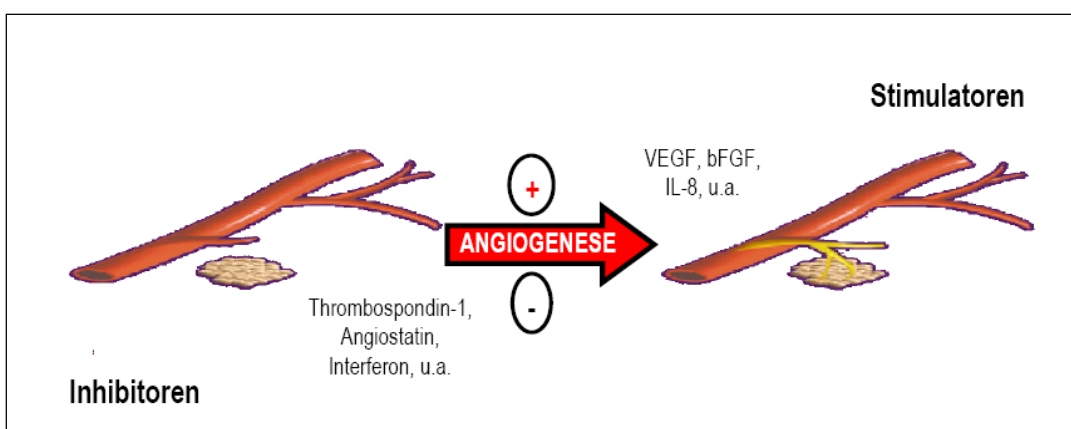
Im Moment sind zusätzlich prognostische Marker wie EGFR, Cox-2, VEGF, Cyclin D, p53 etc. von wissenschaftlichem Interesse. Die Bedeutung ist jedoch bis jetzt aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse und immer neuen Erkenntnissen noch weitgehend unklar (Röper et al., 2009).

### 1.3 Tumorangiogenese

Der Begriff „Angiogenese“ bzw. „Neovaskularisation“ ist definiert als das Wachstum und die Entwicklung neuer Kapillargefäße. Angiogenese spielt eine zentrale Rolle im Wachstum und der Entwicklung von normalem Gewebe, aber natürlich auch bei pathologischen Prozessen wie der Tumorentwicklung (Folkman, 1971).

Im Normalgewebe wird der Ruhezustand durch eine präzise Kontrolle des Gleichgewichts von Angiogeneseinhibitoren und -aktivatoren sichergestellt. Dabei stabilisieren Perizyten die Gefäße und vermitteln die Inhibition der Endothelproliferation. Im Tumor allerdings ist die Regulation beeinträchtigt und die Angiogeneseprozesse können nicht mehr abgeschaltet werden. Infolgedessen werden kontinuierlich neue Gefäße (Neogefäße) gebildet (Bergers et al., 2003).

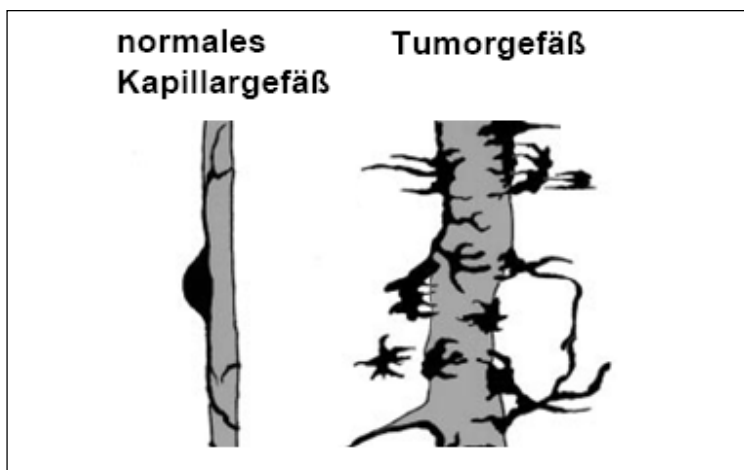
Die Entwicklung der meisten Tumoren erfolgt zunächst ohne die Bildung von neuen Blutgefäßen. Mit der Zunahme der Tumormasse steigen jedoch Nährstoff und O<sub>2</sub>-Bedarf an, so dass eine Gefäßneubildung erforderlich wird. Der Übergang in die Angiogenese phase (sog. „Angiogenic Switch“) stellt einen wesentlichen Schritt in der Karzinogenese dar und findet normalerweise statt, wenn der Tumordurchmesser 0,5-2mm überschreitet (Folkman, 1990). Den entsprechenden Stimulus zur Einleitung der Angiogenese phase stellt der durch die sinkende O<sub>2</sub>-Konzentration im Tumor induzierte Hypoxie-empfindliche Faktor (HIF; hypoxia-inducible factor) dar. Dieser löst die Expression einer Reihe von Genen, wie der NO-Synthase und VEGF-A, aus (Pugh et al., 2003).



**Abb.4:** „Angiogenic Switch“: Überwiegen die Angiogenesestimulatoren gegenüber den Angiogeneseinhibitoren, kommt es zum „Angiogenic Switch“ und somit zur Angiogenese. (modifiziert nach Bergers et al., 2003)

Solide Tumoren sind auf eine Gefäßversorgung angewiesen, um einen Durchmesser von 0,5-2mm überschreiten zu können (Folkman, 1990). Dafür werden entweder präexistente Gefäße verändert („Ko-option“) (Holash et al., 1999) oder das Wachstum von neuen Gefäßen induziert („Angiogenese“) (Carmeliet, 2000). Dies umfasst das endotheliale Zellwachstum, die Migration und die kapilläre Morphogenese und wird von zahlreichen Wachstumsfaktoren reguliert, die von den Tumorzellen in die lokale Umgebung abgegeben werden.

Die Morphologie von Tumor- und Normalgefäßen unterscheidet sich gravierend. Tumorgefäße sind unregelmäßig geformt, chaotisch und sind nicht in arterielle oder venöse Gefäße untergliedert, sondern besitzen Eigenschaften von beiden Gefäßtypen. Außerdem sind die Gefäße porös, so dass Hämorrhagien und ein erhöhter interstitieller Druck resultieren. Auch der normale Blutfluss im Tumor ist gestört (Ryschich et al., 2002; Bergers et al., 2003; Jain, 2003). Der normalerweise enge Kontakt von Endothelien und Perizyten ist in Tumoren gelöst (Benjamin et al., 1999; Morikawa et al., 2002; Jain, 2003). Die Ursache der Gefäßanomalien scheint in einem Ungleichgewicht der Angiogenesefaktoren zu liegen (Bergers et al., 2003; Jain et al., 2000).



**Abb.5:** Aufbau von Normalgefäßen und Tumorgefäßen:  
In normalen Kapillaren ziehen Perizyten entlang der Gefäße und bilden Fortsätze aus, die mit dem Gefäßendothel in engem Kontakt stehen. In Tumorgefäßen sind Perizyten dagegen nur locker mit den Endothelzellen assoziiert, ihre Fortsätze weisen vom Gefäß weg.  
(modifiziert nach Morikawa et al., 2002)

Im Verlauf der Tumorgenese kommt es durch genetische Veränderungen in Tumorzellen zu einer Aktivierung von Onkogenen und zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Diese Mutationen führen dann zur gesteigerten Expression und Freisetzung von Angiogenese stimulierenden Faktoren, v.a. von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), und somit zur Initiierung der Gefäßbildung (Kerbel et al., 2002).

Neben dem Tumorwachstum stellen Blutgefäße auch einen Weg für eine mögliche Metastasierung dar, denn durch eine hohe Kapillardichte wird die hämatogene Aussaat erleichtert (Weidner et al., 1991).

Da die Tumorangio-genese eine so große Rolle in der Tumorproliferation darstellt, gehen die Forschungsbestrebungen dahin, geeignete Substanzen zur deren Hemmung zu entwickeln. Es existieren bereits zahlreiche Untersuchungen über antiangiogene Substanzen. Nach intensiver Forschung und Weiterentwicklung wurde im Laufe der letzten 20 Jahre ein humanisierter Antikörper gegen VEGF, das Bevacizumab, entwickelt. In mehreren klinischen Studien (Miller et al., 2007; Hurwitz et al., 2004; Sandler, 2007) konnte die Wirksamkeit von Bevacizumab nachgewiesen werden, so dass diese Substanz inzwischen in Kombination mit einer Chemotherapie zur Therapie unter anderem des Kolon- und des Mammakarzinoms zugelassen ist.

### **1.3.1 VEGF und VEGF-Rezeptoren**

#### Vasculo-Endothelial-Growth-Factor (VEGF)

Einer der wichtigsten Überlebens- und Wachstumsfaktoren des Gefäßendothels ist VEGF, der Vasculo-Endothelial-Growth-Factor, der 1989 isoliert und charakterisiert wurde (Ferrara et al., 1989; Tischer et al., 1989).

VEGF ist ein Heparin-bindendes Glykoprotein, das von verschiedenen Zellarten sezerniert wird. Es ist ein über eine Disulfidbrücke verbundenes Dimer mit einer Größe von 36-46 kDa (Plate et al., 1997). Beim Menschen gibt es fünf Isoformen des VEGF, die durch alternatives Splicen der mRNA aus demselben Gen entstehen: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und den Placenta-Growth-Factor PlGF (Tischer et al., 1989; Houck et al., 1991).

VEGF führt zu einer Induktion der Gefäß-Neubildung, der Endothelzell-Proliferation und Migration und zu einer Inhibition der Apoptose. Dadurch spielt VEGF eine wichtige Rolle bei der Regulation und Koordinierung der Angiogenese (Ferrara et al., 1997). Außerdem führt VEGF auch zu einer Vasodilatation, z.B. durch die Stimulation der NO-Synthase in Endothelzellen (Kato et al., 1995). Schließlich konnte gezeigt werden, dass der bereits 1983 durch Senger et al. entdeckte vaskuläre Permeabilitätsfaktor (VPF), der zu einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit führt, identisch mit dem Vasculo-Endothelialen Wachstumsfaktor ist (van der Flier et al., 2000).

Die Expression von VEGF wird durch sehr viele verschiedene externe Faktoren beeinflusst. Die wichtigsten Einflussfaktoren auf die VEGF-Expression sind Hypoxie, Hypoglykämie und verschiedene Zytokine oder aktivierte Onkogene, wobei Hypoxie und Hypoglykämie die stärksten Stimulatoren der VEGF-Expression sind (Shweiki et al., 1992). Zu den Zytokinen, die die VEGF-Produktion stimulieren, gehören z.B. der Fibroblast-Growth-Factor-4 (FGF-4), der Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF), und der Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Deroanne et al.,

1997; Finkenzeller et al., 1997; Ryoto et al., 1996). Die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen, wie z.B. p53, ist ein weiterer Mechanismus, der zu einer Überexpression von VEGF führt (Vanmeir et al., 1994).

Eine irreguläre VEGF-Expression selbst kann durch die vermehrte Gefäßbildung und damit eine verbesserte Durchblutung zur Entwicklung von Tumoren beitragen. VEGF beeinflusst in markanter Weise jedoch nicht nur das primäre Tumorstadium, sondern auch dessen Metastasierung (Asano et al., 1995). Wird eine Amplifizierung von VEGF in Karzinomzellen nachgewiesen, erhöht sich die Streuungswahrscheinlichkeit signifikant (Claffey et al., 1996; Glade-Bender et al., 2003).

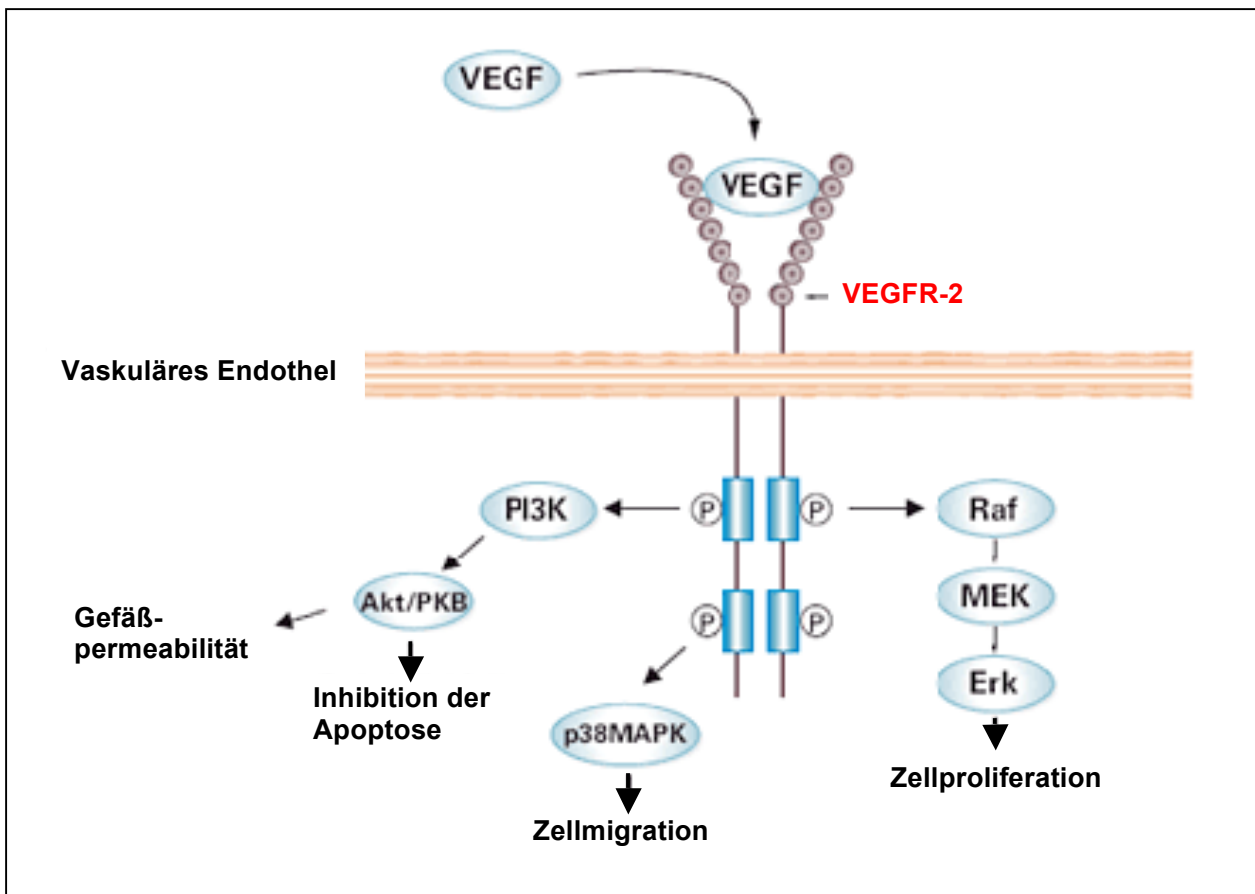
### VEGF-Rezeptoren

Kurz nach der Entdeckung des vasculo-endothelialen Wachstumsfaktors wurden auch dessen Rezeptoren identifiziert (Viasman et al., 1990). Diese Rezeptoren sind durch sieben Immunglobulin-artige Domänen in ihrem extrazellulären Anteil und einer Tyrosinkinase spaltenden Domäne im intrazellulären Anteil charakterisiert und können deshalb als Untergruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren angesehen werden (De Vries et al., 1992; Terman et al., 1992; Fournier et al., 1997).

Beim Menschen finden sich drei Rezeptoren, die zur Familie der VEGF-Rezeptoren gehören:

- VEGFR1, auch Flt-1 (De Vries et al., 1992),
- VEGFR2, auch KDR oder Flk-1 (Terman et al., 1992) und
- VEGFR3, auch Flt-4. Der letzte wird nur in Lymphgefäßen exprimiert und bindet VEGF-C und -D (Jussila et al., 1998).

VEGFR1 und VEGFR2 werden vorwiegend auf Endothelzellen exprimiert. Besonders der VEGF-Rezeptor-2 scheint wichtig für die Induktion der Endothelzellproliferation zu sein, wie durch die Herstellung von VEGF-Mutanten, die entweder an VEGFR1 oder -2 binden können, gezeigt wurde (Keyt et al., 1996). Zu den Liganden des in dieser Arbeit untersuchten VEGFR2 gehören vor allem VEGF-A, aber auch die prozessierten reifen Formen von VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E. VEGFR2 wird sowohl von vaskulären als auch von lymphatischen Endothelzellen exprimiert (s. Abbildung 6).

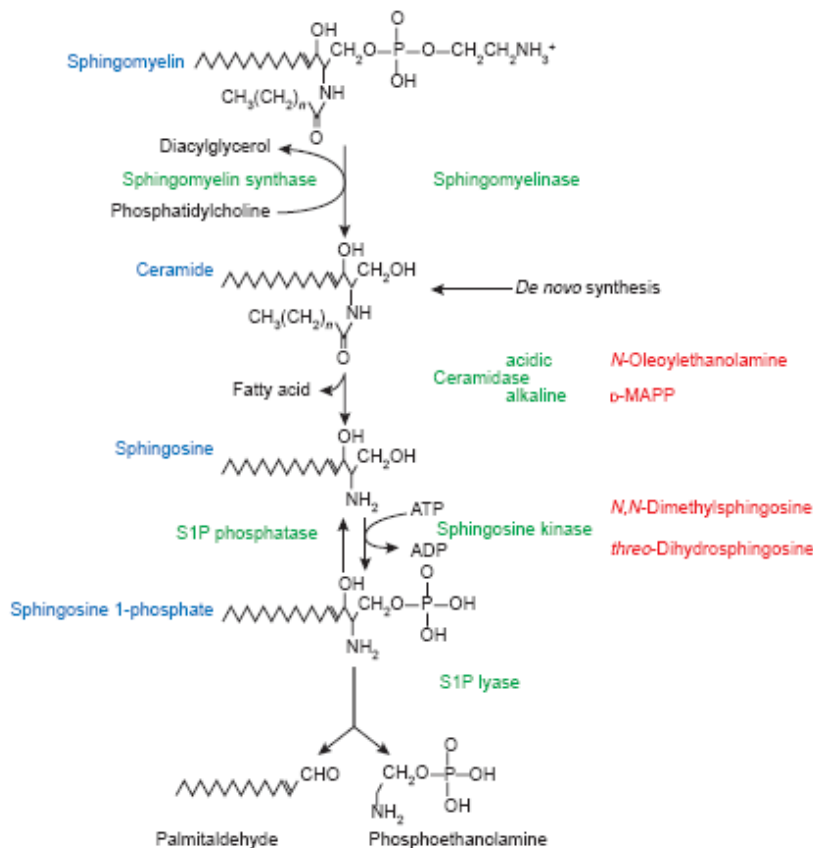


**Abb.6:** Effekte am VEGFR-2-Rezeptor (Flk-1/KDR)  
 Dargestellt sind die wichtigsten Effekte des VEGF, die durch den VEGFR-2 vermittelt werden  
 (modifiziert nach Hicklin et al., 2005)

### 1.3.2 Sphingosinkinase und Sphingosin-1-Phosphat

#### Sphingosinkinase (SphK)

Die Sphingosinkinase katalysiert die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf (Dihydro-) Sphingosin, wodurch (Dihydro-)Sphingosin-1-Phosphat gebildet wird, was den ersten Schritt im Katabolismus der Sphingolipide darstellt. Im Menschen wurden zwei verschiedene Isoformen der Sphingosin-Kinase (SphK) identifiziert, SphK1 und SphK2 (Kohama et al., 1998). Beide generieren Sphingosin-1-Phosphat (S1P) aus Sphingosin, wobei die in dieser Arbeit untersuchte SphK1 eine etwa 10-fach größere spezifische Aktivität aufweist (Liu et al., 2000). In der Zelle scheinen beide Isoformen jedoch gegensätzliche Rollen zu spielen: Der SphK1 wurde eine überlebens- und (Endothel-)proliferationsfördernde Wirkung nachgewiesen, die SphK2 scheint die Apoptose zu verstärken (Maceyka et al., 2002).



**Abb.7:** S1P-Biosynthese und Abbau

Die Sphingosinkinase überführt Sphingosin in Sphingosin-1-Phosphat. Dieses wird entweder durch die S1P-Phosphatase dephosphoryliert oder durch die S1P-Lyase gespalten und so abgebaut und inaktiviert. (Aus: Pyne et al., 2000)

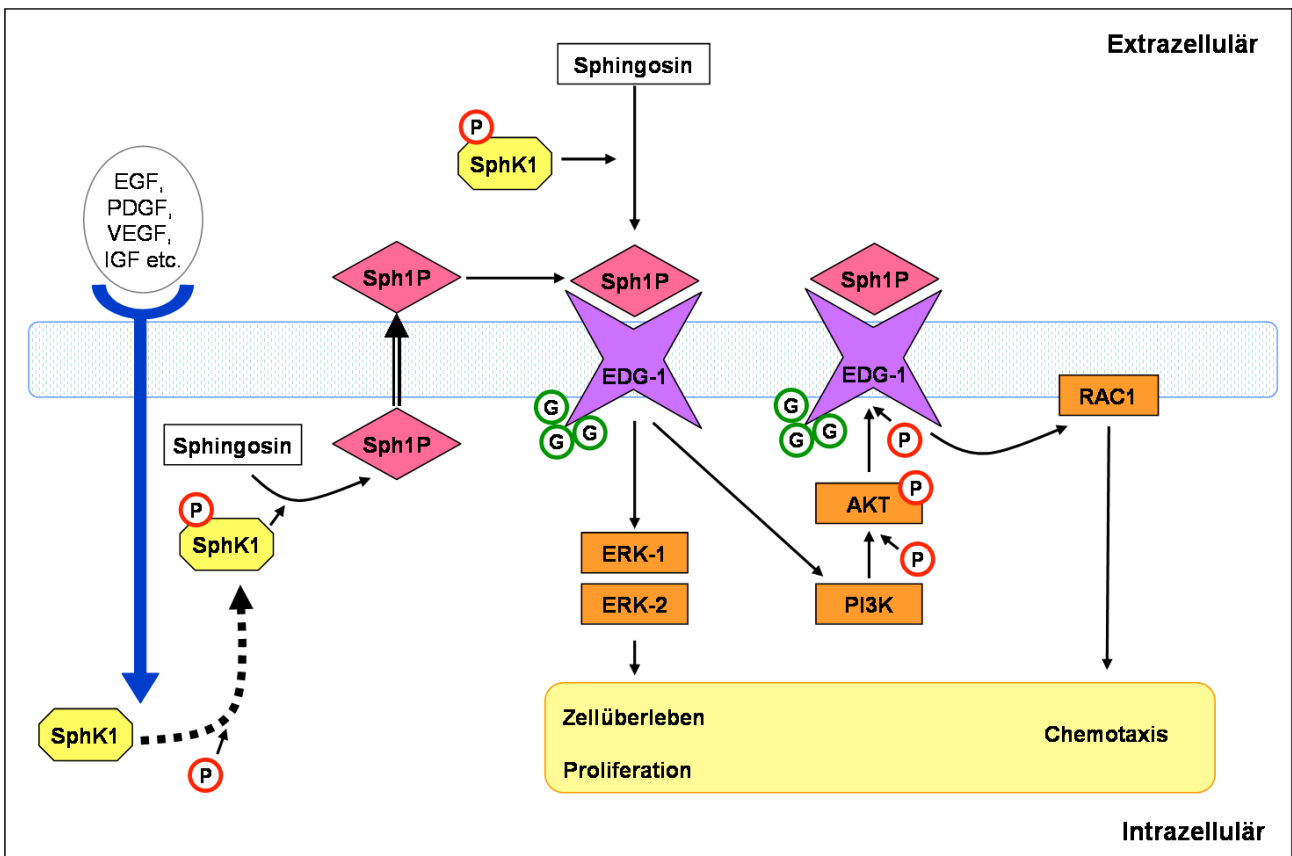
Die SphK1 ist im inaktiven Zustand vor allem zytosolisch lokalisiert, wird jedoch bei Aktivierung durch Phosphorylierung zur Plasmamembran transloziert. Demnach geht die Lokalisation der SphK1 an der Plasmamembran einher mit ihren überlebens- und proliferationsfördernden Wirkungen, die bei nicht phosphorylierter SphK1 nicht besteht (Pitson et al., 2005).

Die Aktivierung der Sphingosinkinase erfolgt durch verschiedene Wachstums-Faktoren, Überlebens-Faktoren und Zytokine, wie beispielsweise

- Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF) (Olivera et al., 1993),
- Epidermal Growth Factor (EGF) (Meyer zu Heringdorf et al., 1999),
- Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Xia et al., 1998) und
- Adenosintriphosphat (ATP) (Alemany et al., 1999)

### Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Rezeptoren

Die S1P-vermittelte Zellmigration, Proliferation, Morphogenese und das Zellüberleben beruhen auf der Interaktion von S1P mit den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) EDG-1 (Endothelial Differentiation Gene 1), EDG-3, EDG-5, EDG-6 und EDG-8 (siehe Abbildung 6) (Pyne et al., 2002).



**Abb.8:** Verschiedene Wirkungsweisen von S1P (Sphingosin-1-Phosphat) am Beispiel des EDG1-Rezeptors (Endothel-Differenzierungs-Gen-Rezeptor 1) (modifiziert nach BioCarta: [http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h\\_edg1Pathway](http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_edg1Pathway))

Untersuchungen an S1P-Rezeptoren offenbarten, dass die Bindung von S1P an EDG-1 die Migration und Chemotaxis der Zelle stimuliert und die Angiogenese reguliert (English et al., 1999; Wang et al., 1999). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass über S1P-Rezeptoren (hier: EDG-5) die GTPasen Rac (Ras-related C3-botulinum toxin substrate) und Rho (Ras homology) aktiviert oder gehemmt werden können (Lee et al., 1999; Okamoto et al., 2000). Diese vermitteln in Zielzellen eine chemotaktische Antwort, was erklärt, dass S1P auf viele Zelltypen migratorisch wirkt.

Im Zusammenhang mit der Rac-gekoppelten Zellmigration weist der EDG-1-Rezeptor einige Besonderheiten auf. So stimuliert er unter anderem die Proteinkinase B (= Akt), welche wiederum den EDG-1-Rezeptor phosphoryliert. Die Phosphorylierung ist letztendlich für die Rac-Aktivierung erforderlich (Lee et al., 2001).

Für alle Rezeptorsubtypen ist eine Signaltransduktion über das inhibitorische Gai/o-Protein beschrieben worden, welche eine proliferative Wirkung auf Zielzellen vermitteln, indem sie die MAPK (=ERK 1/2) stimulieren (Pebay et al., 2001).

Über eine Aktivierung des PI3K/Akt/Proteinkinase B-Weg zeigte S1P seine antiapoptotische Wirkung in endothelialen Zellen (Limaye et al., 2005). Außerdem wird die Aktivität des



Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B durch erhöhtes S1P stimuliert, welcher ebenfalls die Apoptose hemmt (Malinin et al., 1997; Wang et al., 1998) (s. Abbildung 8).

### **1.3.3 Bradykinin und Bradykinin-Rezeptoren**

#### Bradykinin

Das Nonapeptid Bradykinin (BK) (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) entsteht unter anderem bei Gewebeverletzung durch im Körper ubiquitär vorhandene proteolytische Enzyme (Kallikreine) aus Plasma- und Gewebsskinogenen. Durch das freigesetzte BK werden verschiedene physiologische wie pathogene Reaktionen ausgelöst: Nach lokaler subkutaner Injektion von Bradykinin lassen sich beispielsweise sämtliche Reaktionen einer lokalen Entzündung beobachten, nämlich Erwärmung, Rötung, Hitze, Schmerz und Schwellung (Ueno et al., 1998). Neben der Entzündungssymptomatik zeigt BK auch stärkste vasodilatatorische und bronchokonstriktorische Eigenschaften (Antonio et al., 1962; Simke et al., 1967). Dies lässt sich wohl damit erklären, dass Endothelzellen nach Inkubation mit Bradykinin vermehrt Prostaglandin I<sub>2</sub> und Stickstoffmonoxid (NO) produzieren (Wachtfogel YT et al., 1993). Beide Substanzen verstärken den vasodilatatorischen Effekt von Bradykinin und sind gleichzeitig starke Inhibitoren der Plättchenaggregation, so dass Bradykinin – freigesetzt aus Kallikrein - einen indirekt hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaggregation hat. Bradykinin wird durch endothelständige Peptidasen und Plasmapeptidasen wie Carboxypeptidase N und Angiotensin Converting Enzym (ACE) abgebaut (Taylor-McCabe et al., 2001).

#### Bradykinin-Rezeptoren

Regoli und Mitarbeiter fanden und charakterisierten zwei BK-Rezeptoren, BKB1R und BKB2R, die beide G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind und zunächst über ihre Struktur-Funktionsbeziehung ihrer Agonisten und Antagonisten charakterisiert wurden (Blaukat et al., 1999). Die beiden Rezeptor-Subtypen bestehen jeweils aus sieben transmembranösen Helices (Menke et al., 1994). Nach ihrer Aktivierung wird durch die Phospholipase C, gekoppelt an G-Protein, Inositol-3-Phosphat (IP<sub>3</sub>) hydrolysiert oder Arachidonsäure durch die Phospholipase A<sub>2</sub> freigesetzt (Bascands et al., 1993).

Der BKB1-Rezeptor reagiert stärker auf die Bradykinin- und Kallidin-Metabolite des Arg<sup>9</sup>-BK und Lys-desArg<sup>10</sup>-Kallidin, die proteolytisch durch die Arginin-Carboxypeptidase entstehen, während der BKB2-Rezeptor stärker auf die Kinine selbst reagiert (Regoli et al., 1993; Rizzi et al., 1997; Faussner et al., 1999) (s. Abb.9).

B1: desArg10-Kallidin > desArg9-Bradykinin > Kallidin > Bradykinin

B2: Kallidin > Bradykinin > desArg10-Kallidin > desArg9-Bradykinin

**Abb.9:** Wirkstärke der Kinine und ihrer Metabolite an den unterschiedlichen Bradykininrezeptorsubtypen

Während der BKB2-Rezeptor nahezu ubiquitär vorkommt, wird der Kinin BKB1-Rezeptor unter natürlichen Bedingungen nur in einer sehr geringen Anzahl exprimiert und wird erst nach Gewebeverletzung hochreguliert. Schanstra konnte zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) eine Schlüsselrolle in der inflammatorischen Antwort des Immunsystems darstellt, der durch BKB1-Agonisten wie desArg10-Kallidin aktiviert wird und gleichzeitig an der Regulation des Kinin BKB1-Rezeptors beteiligt ist (Schanstra et al., 1998).

Zum einen führt also die Gewebsverletzung direkt, zum anderen führt aber auch die Inkubation von Gewebe *in vitro* oder *in vivo* mit proinflammatorischen Mediatoren wie LPS oder Zytokinen (IL1 $\beta$ , IL2, IL8, TNF- $\alpha$ ) zu einer vermehrten Kinin BKB1-mRNA-Expression (Ni et al., 1998).

Die BKB2-Rezeptor-Stimulation hat neueren Forschungen zufolge auch einen Einfluss auf die beiden anderen hier beschriebenen (Tumor-) Angiogenese-Faktoren.

So scheint durch eine Stimulierung des BKB2-Rezeptors das S1P-Level intrazellulär zu steigen. Dies ließ sich mit einem SphK-Inhibitor blocken, so dass der Schluss naheliegt, dass durch Agonisierung des BKB2-Rezeptors die Sphingosinkinase-Aktivität steigt (Blaukat et al., 2001).

Auch gibt es Hinweise darauf, dass S1P selbst eine Rolle bei der BKB2-vermittelten MAPK-Aktivierung spielt (Drube et al., 2000).

Daneben scheint durch die BK-vermittelte Aktivierung des BKB2-Rezeptors die Produktion von VEGF zu steigen. So zeigten Ikeda et al., dass in Kinin-defizienten Ratten der VEGF-Spiegel deutlich geringer war als in Ratten mit normalem Kinin-Anteil. Durch BKB2-Antagonisierung konnte der Anteil an VEGF in zweiteren gesenkt werden (Ikeda et al., 2004).

#### **1.4 Faktoren der Tumorgenese: HPV-16 und p16**

##### Humanes Papillomavirus 16 (HPV16)

Es ist inzwischen schon länger bekannt, dass das Humane Papillomavirus kausal an der Entstehung von Zervixkarzinomen beteiligt ist, weshalb das Virus auch schwerpunktmäßig für das gynäkologische Fach erforscht wurde und wird. Aus diesem Grund sollen einige Fakten zum Zervixkarzinom bei bestehender HPV-Infektion vorangestellt werden, die auch Rückschlüsse auf HPV-Infektionen im Kopf-Hals-Bereich zulassen können.

In Deutschland erkranken jährlich etwa 6200 Frauen an einem invasiven Karzinom der Zervix uteri. Bei den Krebserkrankungen der Frau steht das Zervixkarzinom damit bundesweit an elfter Stelle, weltweit stellt es sogar das zweithäufigste Malignom der weiblichen Bevölkerung dar (Baseman et al., 2005; Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2008).

Das Virus wird über Geschlechtsverkehr bzw. Oralverkehr übertragen, weshalb es vorwiegend im Genitalbereich, im Oropharynx und in der Mundhöhle zu HPV-assoziierten Karzinomen kommt (Gillison et al., 2000). Die Prävalenz der HPV-Infektion in der weiblichen Bevölkerung variiert international zwischen 2% und 44% (Baseman et al., 2005). Eine genaue Eingrenzung der Prävalenz fällt schwer, da sie abhängig vom Alter der Studienteilnehmer, von der Sensitivität des DNA-Nachweises sowie der soziokultureller Herkunft starken Schwankungen unterworfen ist (Gross et al., 2008; de Sanjosé et al., 2007). Außerdem verlaufen die meisten HPV-Infektionen transient und können nach ca. 4 bis 20 Monaten spontan ausheilen (Trottier et al., 2006). Eine Nachbeobachtungsstudie an 147 HPV-infizierten US-amerikanischen Studentinnen zeigte beispielsweise, dass nur bei 16% der Infizierten drei bis zwölf Jahre später eine persistierende Infektion nachgewiesen werden konnte (Sycuro et al., 2008).

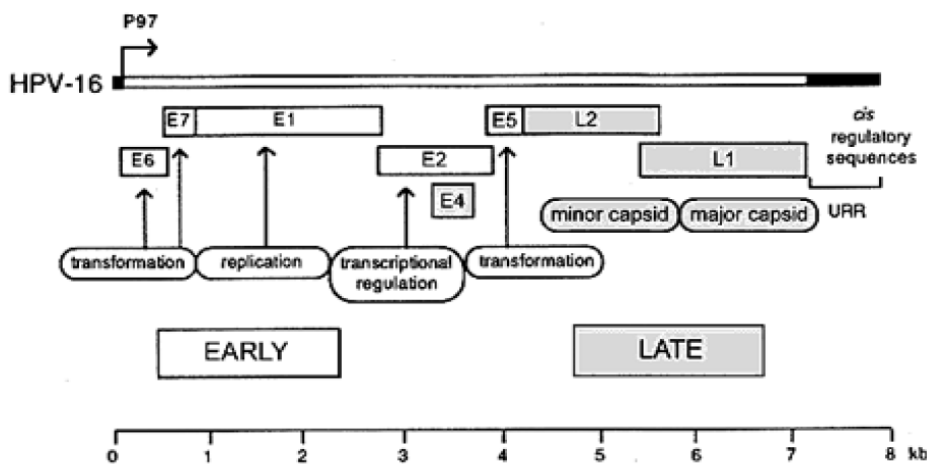
Betrachtet man die Prävalenz typspezifischer HPV-Infektionen, dominiert das in dieser Arbeit untersuchte HPV16, das bis zu 25% aller genitalen Infektionen mit Humanen Papillomviren verursacht (Munoz et al., 2003).

Zusätzlich zu der bereits seit über 30 Jahren etablierten Sekundärprävention durch zytologische Kontrollen wurde vor ca. viereinhalb Jahren mit Einführung der prophylaktischen Vakzine Gardasil® als Primärprävention ein zweites Standbein in der Vorbeugung HPV-induzierter Erkrankungen geschaffen. Der Impfstoff wurde im September 2006 als erster prophylaktischer Impfstoff zur Verhinderung von HPV-Infektionen für die Mitgliedsländer der Europäischen Union (EU) zugelassen und ist seitdem auch auf dem deutschen Arzneimittelmarkt erhältlich (EPARs for authorised medicinal products for human use. Product Overview Gardasil®. London, Great Britain: European Medicines Agency, 2010). Daten zur Dauer des Impfschutzes ergaben sich aus Nachbeobachtungen in verschiedenen Effektivitätsstudien. Derzeit kann für einen Impfschutz mit 100%iger Effektivität eine Dauer von mindestens fünf Jahren angegeben werden (Villa et al., 2006).

Diese Impfung ist bis jetzt aber nur zur Primärprävention von Zervixkarzinomen zugelassen. Im Jahr 2000 entdeckten *Maura Gillison et al.* jedoch schließlich auch den kausalen Zusammenhang zwischen der HPV-Infektion und Kopf-Halstumoren. So wird sich zukünftig natürlich die Frage stellen, ob eine Impfung auch in diesem Falle einen Benefit bringen würde.

Das Humane Papillomvirus ist ein DNA-Virus und gehört zur Familie der Papovaviridae, welche die Genera Papillomavirus und Polyomavirus umfasst. Medizinische Bedeutung haben aus dieser Familie jedoch nur die Papillomviren. Das HPV besteht aus einem 8 Kilobasen großen, 500kD schweren, ringförmigen Genom. Die darauf kodierten Proteine werden nach ihren

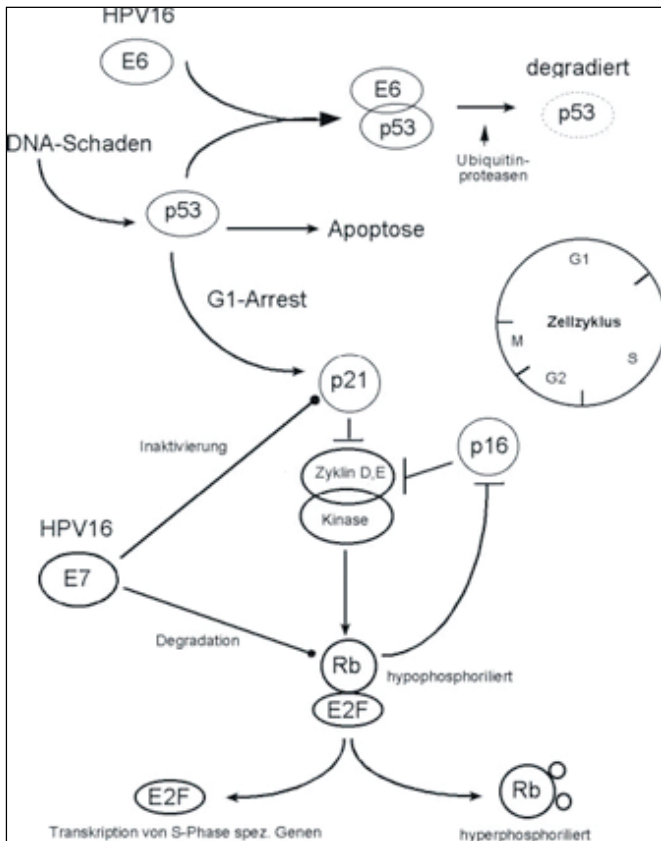
Expressionsphasen in frühe (early genes: E1-E8) und späte (late genes: L1, L2) Gene unterteilt und bewirken die DNA-Replikation, Genexpression und die Virusausreifung. Durch die Wirkung der Proteine E6 und E7 treten die ausgereiften Epithelien aus der G0-Phase wieder in den Zellzyklus ein. Daraus resultieren auch die transformierenden Eigenschaften und die onkogene Potenz, insbesondere der Virustypen 16 und 18. Die Strukturproteine L1 und L2 werden im Rahmen der aktiven Infektion synthetisiert und bilden die eigentliche Virushülle aus. Innerhalb der Proteinsequenzen von L1 existieren Strukturen, die typspezifisch sind, wodurch eine genaue Einteilung und Zuordnung der einzelnen HPV-Typen möglich ist (McMurray et al., 2001).



**Abb.10:** Schematische Organisation (linearisiert) des HPV16-Genoms

E bezeichnet frühe (Early) Genprodukte, L steht für die Produkte der späten (Late) Gene. Die aufgetragene Skala zeigt die Größe der einzelnen Abschnitte in Kilobasen (kb). (nach McMurray et al., 2001)

Viren können sich nur innerhalb von Zellen vermehren, da sie auf den Replikationszyklus der zelleigenen DNA angewiesen sind. Papillomviren dringen durch Mikroläsionen in das Gewebe ein und infizieren dort die Basalzellen. Nach der Erstinfektion verbleibt das Virus zunächst über einen längeren Zeitraum intrazellulär. Die infizierte Zelle enthält zwar die Virusgene, diese werden aber vorerst nicht in die menschliche DNA integriert und somit nicht exprimiert. Diese als "latente Infektion" bezeichnete, klinisch nicht relevante Phase kann Monate bis Jahre andauern. Die Gründe für den Übergang einer latenten in eine aktive, und damit klinisch relevante Infektion, sind noch nicht abschließend geklärt. Der Übergang von episomal gelegener Virus-DNA zur Integration ins menschliche Genom scheint schließlich eine tumoröse Entartung der Zelle zu ermöglichen (zur Hausen et al., 1994).



**Abb.11:** Interaktion der HPV16 und p16 Proteine mit dem Zellzyklus  
 E7 inaktiviert pRb, welches normalerweise die Produktion von p16 inhibiert.  
 Klussmann et al. (Aus: <http://www.uhrmacherinstitut.de/index.php?id=644>)

Vor allem die HPV-Typen 16 und 18 sind mit einem invasiven malignen Wachstum assoziiert (Lorincz et al., 1992). Durch die Infektion mit dem onkogenen Virus werden Expression und Vermehrung viraler Proteine in den Basalzellen initiiert. Das Virusgen E6, welches das gleichnamige Protein E6 kodiert, wird mit Zunahme der Differenzierung der Epithelzellen vermehrt produziert und bindet und inaktiviert das zelluläre Tumorsuppressor-Protein p53 (Hubbert et al., 1992). Das Protein E7 bildet einen Komplex mit dem Rb-Protein, das ebenfalls als Tumorsuppressor-Protein wirkt. Außerdem bindet E7 an Zyklin-Kinase-Inhibitoren (p21) und führt so zur Produktion von inaktivem Rb-Protein. All das führt dazu, dass die Wachstumshemmung in den HPV befallenen Zellen ausbleibt (siehe Abb.11) (Boyer et al., 1996).

### Protein p16

Protein p16, ein Tumorsuppressorprotein aus 156 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 16 kDa, ist ein Zyklin-abhängiger Kinase-4-Inhibitor, der die im G1-Zyklus vorkommenden Zyklin-D abhängigen Kinasen Cdk4 und Cdk6 hemmt. So wird das Retinoblastomprotein (pRB) nicht phosphoryliert, und damit der Übergang in die S-Phase des Zellzyklus verhindert (Serrano et al., 1993; Ruas et al., 1998). Erfährt das INK4a-Gen, das p16 kodiert, eine Mutation oder Deletion

und wird p16 dadurch nicht mehr oder nur fehlerhaft hergestellt, kann dies ein unkontrolliertes Wachstum bedeuten und so zur Tumorentstehung prädestinieren (Herman et al., 1995).

Das in der HPV-16-DNA kodierte Protein E7 führt wie oben beschrieben zu einer Inaktivierung des pRB, welches selbst wiederum ein negativer Regulator der p16-Expression ist. Dies konnte bereits für an HPV-16 infizierte Oropharynx Tumoren nachgewiesen werden. Die Assoziation zwischen einer Infektion mit HPV16 und einer Überexpression von p16 in den Tumoren war sogar so deutlich, dass Klussmann et al. den p16-Status bei oropharyngealen Karzinomen als Surrogatmarker für eine Infektion mit HPV vorschlugen (Li et al., 1994; Klussmann et al., 2003).

## 1.5 Zielsetzung der Studie

Ziel dieser Arbeit soll es sein, drei unterschiedliche Fragestellungen zu beantworten: Zum Einen soll versucht werden, eine Aussage hinsichtlich der prognostischen Aussagefähigkeit der hier untersuchten Faktoren zu treffen. Dies geschieht sowohl durch Identifizierung, Quantifizierung und Korrelation der untersuchten Angiogenese- bzw. Tumorgenese Faktoren untereinander, als auch durch Korrelation der Faktoren im Tumorgewebe mit den klinisch-pathologischen Merkmalen der Patienten.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob HPV-induzierte Plattenepithelkarzinome als eigene Tumorentität gegenüber den durch Noxen wie Zigaretten- und Alkoholkonsum ausgelösten Plattenepithelkarzinomen angesehen werden sollten, oder ob sie eher als Untergruppe derer einzuordnen sind.

Die dritte interessante Frage, der sich diese Arbeit anzunähern versucht, stellt das Angiogeneseverhalten bei HPV-assoziierten im Gegensatz zu Noxen-assoziierten Tumoren dar: Es gilt zu klären, ob es hier einen signifikanten Unterschied gibt oder ob die beiden durch unterschiedliche Mechanismen ausgelösten Karzinome ähnlichen Wachstumsmustern hinsichtlich der Angiogenese folgen.

## 2 Material

### 2.1 Lösungen, Gebrauchsgegenstände und Geräte

#### Gebrauchslösungen

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Antikörper-Verdünnungslösung	Dako
Aqua ad injectabile	Delta Select
Citrat-Monohydrat	Sigma
Natriumchlorid NaCl	Karl Roth GmbH&Co. KG

Natriumhydroxid NaOH  
Normal goat serum 5%  
TRIS-Puffer C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>  
Wässrige Eosinlösung 1%  
Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Karl Roth GmbH&Co. KG  
Dako  
Karl Roth GmbH&Co. KG  
Apotheke des Klinikums MRI  
Karl Roth GmbH&Co. KG

### **Kits**

#### Name

Diaminobenzidin (DAB)-Substratkit,  
bestehend aus Chromogen  
und Substratpuffer „DCS-Chromoline“  
Nachweissystem Polylink, AP  
Peroxidase-Kit  
Polymer-HRC ICH Kit  
DNA Probe Hybridization/  
Detection System in Situ Kit

#### Hersteller

DCS Innovative Diagnostic-Systeme  
  
BioGenex  
DCS Innovative Diagnostic-Systeme  
DCS Innovative Diagnostic-Systeme  
Maxim Biotech

### **Primärantikörper und Proben**

#### Name

Anti-Bradykinin-Rezeptor Typ 1  
Anti-Bradykinin-Rezeptor Typ 2  
Anti-p16  
Anti-SphK1  
Anti-VEGFR-2  
HPV-16 DNA

#### Hersteller

United States Biological  
United States Biological  
United States Biological  
Imgenex  
Cell Signaling Technology  
Maxim Biotech

### **Gebrauchsgegenstände**

#### Name

Marabu-Fixogum Rubber Cement  
Objektträger „SuperFrost® Plus“  
Parafilm M laboratory film  
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. LoRetention  
Serologische Pipetten 10ml  
Standard Reaktionsgefäß 3810

#### Hersteller

Marabu Farben  
R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik  
Pechiney Plastic Packaging (Chicago)  
Eppendorf Deutschland  
Sarstedt Aktiengesellschaft & CO  
Eppendorf Deutschland

### **Geräte**

#### Name

Bildbearbeitungsprogramm AxioVision 4.5  
Kochplatte AFK EKP-1500.1E CC

#### Hersteller

Carl Zeiss  
AFK

Macro, für Pipetten 0,1-100 ml, grün	Labomedic
Magnetrührer RCTbasic	IKA Labortechnik
Mikroskop Axioplan2 Imaging	Carl Zeiss
Mikroskop Video-Kamera MC-3255	Sony AVT Horn
Paraffin Streckbad TFB35	Meditec Medizintechnik
pH-Meter pH323	WTW, Nova Analytics
Pipetten Research (variabel)	Eppendorf Deutschland
Reagenzglasschüttler REAX top	Heidolph
Rotationsmikrotom HM355S	Ingenium AG
Schnellkochtopf Vitavit comfort	Fissler
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA Labortechnik
Trockenschrank Modell 400	Memmert
Waage Sartorius basic	Sartorius Mechatronics
Wasserbad Typ 1003	GFL mbH
Zentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf-Netheler-Hinz GMBH

## 2.2 Patientenkollektiv

Die Gewebeproben von insgesamt 180 Patienten mit primären Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (n=33), des Oropharynx (n=58), des Hypopharynx (n=33) und des Larynx (n=56) wurden im Rahmen des Sander-Projektes und des BMBF-Projektes (Bundesministerium für Bildung und Forschung) im Zeitraum von 1993 bis 1997 aus Operationspräparaten (Exstirpation des Primärtumors, funktionelle oder radikale Neck dissection ein- oder beidseitig und normales Plattenepithel) gewonnen. Alle Patienten wurden entweder im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München oder in der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Universität Regensburg operiert.

Diese beiden Projekte unterschieden sich lediglich in der Standardtherapie: Eine ausschließlich chirurgische Therapie wurde bei überwiegend nicht metastasierten Tumoren gewählt (Sander Projekt), während in 75% der Fälle zusätzlich zur Operation eine postoperative konventionelle Radiatio bei Patienten mit fortgeschritteneren, metastasierten, resektablen Tumoren bevorzugt wurde (BMBF-Projekt).

Zum Vergleich wurde außerdem tumorfreies Normalgewebe der Patienten als Vergleichsgewebe untersucht. Die histologische Aufarbeitung der Operationspräparate (Haupttumor, Normalgewebe, Halslymphknoten) erfolgte durch das Institut für Pathologie des Klinikums rechts der Isar der TU München. Die Nachbeobachtungszeit betrug 13,5 Jahre.



Die Patientendaten beinhalten folgende Informationen:

#### Laborparameter

CRP

#### Risikofaktoren

Alkohol

Nikotin

#### Tumor

Grading

Metastasen

Primärlokalisierung

pN

pM

pT

Resektionsstatus

Rezidive

Tod als Krankheitsfolge

Therapie

Tumorstadium

Zweittumoren

Krankheitsbedingter Tod

#### Patientendaten

Geburtstag

Geschlecht

Zeit bis zum eingetretenen Tod

### **3 Methoden**

#### **3.1 Immunhistochemie**

Die Färbungen wurden an Gewebeproben von 180 Patienten mit HNSCC durchgeführt, die aus zwei Zentren (Universitätskliniken München und Regensburg) gesammelt wurden. Es wurde von jedem Patienten versucht, Gewebe aus Tumor- und Normalgewebe des Kopf-Halsbereiches und – falls vorhanden – aus Lymphknotenmetastasen zu gewinnen. Die Gewebeproben wurden in der so genannten „tissue microarray“-Technik aufgearbeitet, die es erlaubt, pro Paraffinblock deutlich mehr verschiedene Gewebeproben einzubetten (Kononen et al., 1998).

### **3.1.1 Vorbereitung der Präparate**

#### 1. Schneiden der Blöcke

Vor dem Schneiden der Paraffinblöcke werden diese auf einer Kühlplatte heruntergekühlt, um das Paraffin zu härten und dünne Schnitte möglich zu machen. Es werden mit Hilfe des Rotationsmikrotoms 1,5µm dicke Schnitte hergestellt.

Um Faltenbildung zu vermeiden, werden die Schnitte einige Minuten auf die Oberfläche eines 42°C warmen Wasserbades gelegt und anschließend auf einen Objektträger aufgezogen. Zum Trocknen werden die Schnitte zunächst ca. 15 Minuten auf eine Wärmeplatte (40°C) gelegt und anschließend über Nacht bei 56°C im Ofen getrocknet.

#### 2. Entparaffinierung und Rehydrierung

Da sich Antikörper nur im entparaffinierten Gewebe detektieren lassen und eventuelle Paraffinreste unspezifisch angefärbt werden könnten, musste das Paraffin vollständig entfernt werden. Dies geschieht in einem 30-minütigen Xylolbad (1. Xylolbad: 10 Minuten, 2. Xylolbad: 10 Minuten, 3. Xylolbad: 10 Minuten). In einer absteigenden Alkoholreihe werden die Präparate anschließend rehydriert, beginnend bei Isopropanol bis zum 70%igen Ethanol (1. Isopropanolbad: 5 Minuten, 2. Isopropanolbad: 5 Minuten, 96%iges Ethanolbad: 5 Minuten, 70%iges Ethanolbad 5 Minuten) und schließlich in destilliertem Wasser überführt.

#### 3. Antigendemaskierung

Durch hitzeinduzierte Antigendemaskierung können Epitope vom Antikörper erkannt werden. Die durch die Formalinfixierung verursachten Proteinvernetzungen können durch das Kochen der Schnitte in einer Kalzium-präzipitierenden Lösung (Citratpuffer pH 6,0) wieder aufgehoben werden.

Die Schnitte werden im Dampfkochtopf 7 Minuten lang in 2 Litern Citratpuffer pH 6,0 gekocht und im Anschluss 5 Minuten lang in TRIS-Puffer gewaschen.

#### 4. Hemmung der endogenen Peroxidase

Eine hinzugegebene Peroxidase wird an späterer Stelle die Anfärbung des Chromogen-Substratkomplexes katalysieren. Um sicherzustellen, dass nur die berechnete Menge an Peroxidase für die Reaktion verantwortlich ist und um falsch-positive Ergebnisse zu verhindern, muss vorher die endogene Peroxidase gehemmt werden. Diese befindet sich vermehrt in Erythrozyten, Granulozyten und Mastzellen und hat eine wichtige Aufgabe in der Eliminierung von freien Radikalen und Schwefelwasserstoff (Löffler et al., 2007).

Um die endogene Peroxidase zu hemmen, werden die Schnitte 15 Minuten lang in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Dazu wird das ursprünglich 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Verhältnis 1:10 mit TRIS-Puffer verdünnt. Die Mischung wird während der Inkubation mit Aluminium-Folie abgedeckt, um eine Zersetzung

des lichtempfindlichen Schwefelwasserstoffs zu verhindern. Anschließend werden die Schnitte 3x2 Minuten in TRIS-Puffer gewaschen.

#### 5. Blockierung mit Ziegenserum

Da der Sekundärantikörper von der Ziege stammt, werden die Proben vor der Inkubation mit dem Primärantikörper 30 Minuten lang mit 5%igem Ziegenserum blockiert. So lassen sich unspezifische Bindungen vermeiden. Dazu wird das Serum zunächst mit TRIS-Puffer auf 5% verdünnt.

### **3.1.2 Prinzip und Ablauf der histochemischen Färbung**

Die hier verwendete Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) wurde von Hsu et al. als eine Methode beschrieben, deren Vorteil eine außerordentlich hohe Sensitivität ist und mit der die Anwendung von Avidin und Biotin in immunbiologischen Untersuchungen weite Verbreitung und Popularität gewann (Hsu et al., 1981).

#### 1. Primärantikörper

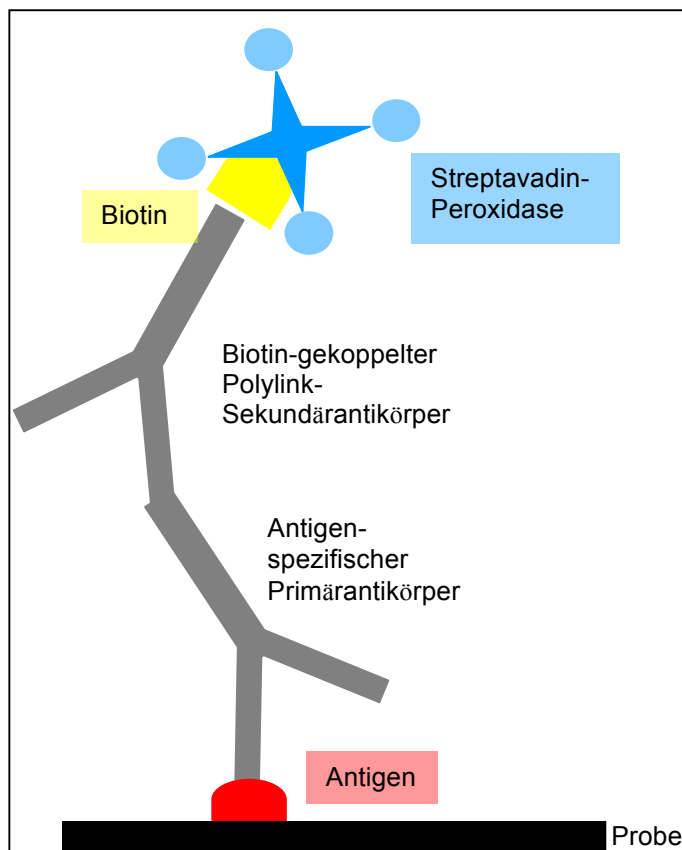
Zunächst werden je ca. 200µl des Primärantikörpers in der jeweils am besten geeigneten Verdünnung (in DAKO Antikörperverdünnungslösung) auf die Proben gegeben und eine Stunde lang bei Raumtemperatur, oder alternativ über Nacht bei 4°C, inkubiert. Dieser Primärantikörper bindet die spezifischen Antigene, die später sichtbar gemacht werden sollen.

#### 2. Sekundärantikörper

Nach anschließendem Waschen in TRIS-Puffer (3x2 Minuten), um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, werden die Proben mit je 2-3 Tropfen eines biotinylierten Sekundärantikörpers 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet an den Fc-Teil des Primärantikörpers und wirkt somit in dem Fall als Antigen. Durch den Sekundärantikörper wird zum Einen eine Verstärkung des Signals erreicht, da mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können. Außerdem kann das daran gekoppelte Biotin im nächsten Schritt vom Streptavidin-Peroxidase-Komplex erkannt werden, welcher schließlich die Farbreaktion auslöst. Biotin selbst ist ein wasserlösliches Vitamin (Vitamin H), welches als Wachstumsfaktor in sehr geringen Mengen in jeder Zelle vorhanden ist. Eine relativ hohe Biotinkonzentration findet man auch in Leber-, Nieren-, Nebennieren und Tumorgewebe (Moss et al., 1971).

### 3. Streptavidin-Peroxidase-Komplex

Nach erneutem Waschen (3x2 Minuten in TRIS-Puffer) werden die Schnitte 30 Minuten lang mit je 2-3 Tropfen Streptavidin-Peroxidase-Komplex bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bindet Biotin mit sehr großer Affinität an (Strept-)Avidin und wird dadurch inaktiviert. Diese nicht kovalente Bindung verläuft sehr schnell und wird als eine der stärksten natürlichen Bindungen betrachtet (s. Abb.12)



**Abb.12:** Darstellung der indirekten immunhistochemischen Antikörperdetektion

### 4. DAB-Chromogen

Nach erneutem Waschen der Proben (3x2 Minuten in TRIS-Puffer) wird ein Tropfen des 3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Chromogens mit 1ml Pufferlösung verdünnt und auf die Proben aufgetragen. Das mit Streptavidin verknüpfte Enzym Meerrettichperoxidase oxidiert das vorher fast farblose DAB (Diaminobenzidin). Das entstehende, unlösliche Indaminpolymer verursacht die Braunfärbung, die eine Aussage über Lokalisation und Dichte der gesuchten Antigene nun möglich wird.

Mittels Blickdiagnostik wird die Länge der Inkubationszeit festgelegt, die hier jeweils 2 Minuten beträgt. Um die Reaktion zu stoppen, werden die Schnitte in TRIS-Puffer ca. 10 Minuten lang gewaschen.

## 5. Gegenfärbung und Entwässerung

Die Gewebeschnitte werden schließlich mit Hämatoxylin gefärbt und unter fließendem Wasser differenziert, wodurch die Zellkerne sichtbar werden.

Anschließend werden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und über Nacht luftgetrocknet.

### Spezielle histochemische Färbungen von p16, VEGFR-2, BKB1R und BKB2R

Für die immunhistochemischen Färbungen aller dieser Faktoren – bis auf die Sphingosinkinase – wird das Standardprotokoll (s.o.) verwendet. Lediglich das Verdünnungsverhältnis der Antikörper variiert.

- Für die Detektion von p16 wird der **p16**-Antikörper im Verhältnis 1:500 verdünnt.
- Auch der **VEGFR-2**-Antikörper wird im Verhältnis 1:500 verdünnt.
- Der **B1-Rezeptor**-Antikörper wird im Verhältnis 1:50 verdünnt.
- Der Antikörper gegen den **B2-Rezeptor**-Antikörper wird im Verhältnis 1:100 verdünnt.

### Spezielle histochemische Färbung der Sphingosinkinase

Auch für die histochemische Färbung der Sphingosinkinase wird zunächst nach Standardprotokoll (s.o.) vorgegangen. Da jedoch die Etablierung des SphK-Antikörpers an Nebennierengewebe vorgenommen wurde, das einen hohen Gehalt an endogenem Biotin aufweist, muss das endogene Biotin zusätzlich geblockt werden. Hierzu wird der Avidin-Biotin-Block verwendet, mit dem nach der Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Gewebeschnitte jeweils 10 Minuten mit zwei verschiedenen Reagenzien bei Raumtemperatur inkubiert werden. Zwischen den beiden Schritten werden die Schnitte gründlich in deionisiertem Wasser gewaschen.

Mit dem im Verhältnis 1:300 verdünnten Antikörper gegen die Sphingosinkinase werden die Gewebeschnitte nach Standardprotokoll inkubiert.

Die Detektion erfolgt mit dem „Super Sensitive™ Polymer-HRP Detection System“ von BioGenex, das mit einer Non-Biotin-Polymer-Technologie arbeitet. Hierbei wird der sekundäre, mit Poly-HRP-Reagenz konjugierte Antikörper, an den primären Antikörper gebunden und dann durch das DAB-Chromogen sichtbar gemacht. Das erste Reagenz dieses Systems („Super Enhancer Reagent“) wird bei Raumtemperatur 20 Minuten auf den Schnitten belassen, diese anschließend gründlich mit TRIS-Puffer gespült, um danach mit dem zweiten Reagenz („Poly-HRP-Reagent“) 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Nach erneutem gründlichem Waschen wird das DAB-Chromogen in der Verdünnung nach Standardprotokoll 3 Minuten lang auf den Gewebeschnitten belassen.

## **3.2 In-situ-Hybridisierung des HPV16**

### **3.2.1 Vorbereitung der Präparate**

#### 1. Vorbereitungen analog zur Immunhistochemie

Genauso wie zur Vorbereitung der Präparate für die immunhistochemische Färbung, werden die zu hybridisierenden Gewebeproben mit einer Dicke von 1,5µm geschnitten, entparaffiniert und rehydriert, sowie 7 Minuten lang im Dampfkochtopf in Citratpuffer gekocht (siehe oben unter 3.2.1 Vorbereitung der Präparate Schritte 1 bis 3). Erst die Hemmung der endogenen Peroxidase unterscheidet sich etwas vom Immunhistochemie-Protokoll:

#### 2. Hemmung der endogenen Peroxidase

Das Prinzip ist dasselbe wie oben beschrieben, jedoch wird in diesem Fall Proteinase K zur Hemmung der endogenen Peroxidase verwendet. Die Gewebeproben werden 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, danach gründlich in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und getrocknet (15 Minuten bei Raumtemperatur).

### **3.2.2 Prinzip und Ablauf der Chromogen-In-Situ-Hybridisierung CISH**

#### 1. Denaturierung der DNA-Sonde

Die Chromogen-In-Situ-Hybridisierung (CISH) erfolgt mittels einer zur HPV-16-DNA komplementären DNA-Sonde (DNA-Probe/Hybridization buffer), welche mit Biotin markiert wurde. Da diese zunächst doppelsträngig vorliegt, wird sie bei 95°C fünf Minuten lang denaturiert und danach sofort auf Eis gelagert.

#### 2. Hybridisierung

Auf einen Objektträger werden je 30µl der DNA-Sonde pipettiert und das Deckglas aufgelegt. Wenn der Schnitt frei von Luftblasen ist, werden die Ränder mit Fixogum luftdicht abgeschlossen. Die Denaturierung der doppelsträngigen HPV-DNA erfolgt bei 95°C für 10 Minuten, die anschließende Hybridisierung bei 37°C über Nacht. Bei der Hybridisierung kann sich nun die komplementäre Sonden-DNA mit der DNA des HPV-16 verbinden.

Die nach diesem Schritt noch ungebundene Sonde durch ein 5-minütiges Bad bei 37°C in 5%igem „Protein block buffer“, sowie mehrmaliges Waschen (2 mal 3 Minuten) ausgeschwemmt.

#### 3. Detektion

Die Detektion erfolgt nach demselben Prinzip wie bei der Immunhistochemie (siehe 3.1.2 Schritte 3-5). Hier werden die Schnitte 20 Minuten lang mit je 2-3 Tropfen Streptavidin-Alkalische

Phosphatase (AP)-Komplex bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bindet das an der DNA-Sonde befindliche Biotin an (Strept-)Avidin. Nach 5-minütigem Waschen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) kann die markierte DNA schließlich durch Zugabe eines Tropfens BCIP/NBT-Chromogen (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) angefärbt werden. Das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) hydrolysiert nun einerseits BCIP unter Abspaltung von Phosphat zu 5-Brom-4-chlor-Indolyl, welches anschließend durch den in der Luft vorhandenen Sauerstoff zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird. Außerdem reduziert Alkalische Phosphatase NBT zum ebenfalls blaufarbigem Di-Formazanfarbstoff (Lewis et al., 1987). Mittels Blickdiagnostik wird die Länge der Inkubationszeit festgelegt, die hier circa 10 Minuten beträgt. Um die Reaktion zu stoppen, werden die Schnitte in destilliertem Wasser 3x2 Minuten lang gewaschen.

Die Durchführung der Chromogen-In-Situ-Hybridisierung wurde durch das Routinelabor des Institutes für Pathologie am Klinikum Rechts der Isar vorgenommen (verwendetes Gerät: Färbeautomat Ventana Benchmark XT, Roche).

### **3.3 Auswertung der Gewebefärbungen**

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde zunächst die Intensität unter dem Mikroskop und durch Vergleich mit der Negativprobe bewertet und jeweils 0 bis 3 Punkte vergeben:

0 Punkte = „keine Anfärbung“

1 Punkt = „leichte Anfärbung“

2 Punkte = „mittelgradige Anfärbung“

3 Punkte = „starke Anfärbung“

Da bei der Chromogen-In-Situ-Hybridisierung von HPV-16 lediglich „HPV-negativ“ und „HPV-positiv“ unterschieden wird, wird hier die Intensität nicht verschlüsselt.

Der Anteil positiv angefärbter Zellen der Gewebeproben wurde sowohl bei den immunhistochemischen Färbungen, wie auch bei der In-Situ-Hybridisierung mit 0 bis 4 Punkten verschlüsselt:

0 Punkte = 0% der Zellen

1 Punkte = <10% der Zellen

2 Punkte = 10%-29% der Zellen

3 Punkte = 30%-59% der Zellen

4 Punkte = 60%-100% der Zellen

Hierbei wurden im Tumorgewebe und Gewebe der Lymphknotenmetastasen lediglich die Tumorzellen berücksichtigt, beim Normalgewebe die Epithelzellen.

Bei der In-Situ-Hybridisierung wurde nur der Anteil der angefärbten Zellen betrachtet (s.o.), so dass hier bei HPV-positiven Gewebeproben der Gesamtscore zwischen 1 und 4 liegt, beziehungsweise als „negativ“ oder „positiv“ gewertet wird. Hierbei wurden nur Hybride als positiv gewertet, bei denen die HPV-DNA im Zellkern enthalten war.

Zur Ermittlung des Gesamtscores für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Punkte von Intensität und Zellzahl der angefärbten Zellen addiert, so dass dieser bei positiver Färbung zwischen 2 und 7 liegt. Zur statistischen Auswertung der Immunhistochemie wurde der so erhaltene Score auf „gering“, „mittelgradig“ und „hochgradig“ minimiert, wobei ein Score von 0-3 als geringgradig, von 4-5 als mittelgradig und von 6-7 als hochgradig zusammengefasst.

Die gefärbten histologischen Schnitte wurden von mir, sowie von zwei Pathologen unabhängig voneinander ausgewertet und der Mittelwert zu weiteren Berechnung herangezogen.

### **3.4 Statistische Analyse**

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach oben erklärtem Prinzip mittels eines Scores klassifiziert, alle anderen Parameter (Grading, Tumorstaging, Alkohol- und Zigarettenkonsum etc.) wurden semiquantitativ nach jeweils definierten Kriterien in Gruppen aufgeteilt.

Alle Tests wurden mit SPSS Statistics (Version 19) explorativ durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde auf 95% festgelegt, so dass Werte mit  $p \leq 0,05$  als signifikant bewertet wurden.

Es wurden insgesamt 180 Fälle in die Tests eingeschlossen, wobei nicht alle Daten bei allen Patienten vorlagen. Analysiert wurde die Frage nach signifikanten Unterschieden in der Expression der Parameter in verschiedenen Gewebearten desselben Patientengutes. Hierzu wurde der T-Test für verbundene Stichproben gewählt.

Außerdem wurden verschiedene Parameter untereinander und mit Patientendaten korreliert, eine eventuelle Signifikanz wurde hierbei mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet. Für die Überlebenszeitanalyse, abhängig von verschiedenen Parametern, wurde eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt. Es wurden hierfür das 95%-Konfidenzintervall, das mediane Überleben sowie die Signifikanz (mit dem Logrank-Test) errechnet.



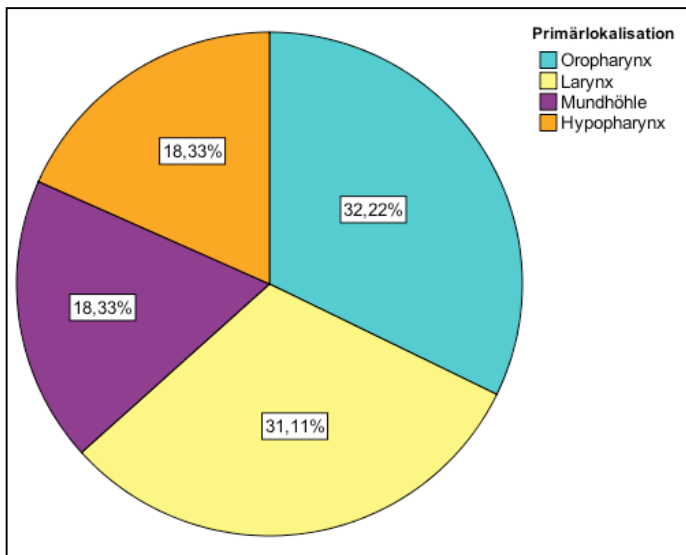
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Allgemeine Statistik

Daten/Tumorbefunde		Anzahl	Anzahl (% der Bekannten)
<b>Geschlecht</b>	gesamt	<b>180</b>	100,00
	männlich	164	91,11
	weiblich	16	8,89
<b>Primärlokalisierung</b>	bekannt	<b>180</b>	100,00
	Mundhöhle	33	18,33
	Oropharynx	58	32,22
	Hypopharynx	33	18,33
	Larynx	56	31,11
<b>TNM-Klassifikation</b>			
<b>pT</b>	bekannt	<b>176</b>	100,00
	pT1	21	11,93
	pT2	66	37,50
	pT3	48	27,27
	pT4	41	23,30
<b>pN</b>	bekannt	<b>180</b>	100,00
	pN0	94	52,22
	pN1	23	12,78
	pN2a	2	1,11
	pN2b	41	22,78
	pN2c	20	11,11
<b>Grading</b>	bekannt	<b>180</b>	100,00
	G1	10	5,56
	G2	110	61,11
	G3	60	33,33
<b>Therapie</b>	bekannt	<b>178</b>	100,00
	Operation	44	24,72
	Operation & Strahlentherapie	134	75,28
<b>Resektionsstatus</b>	bekannt	<b>122</b>	100,00
	R0	118	96,72
	R1	4	3,28
<b>Zweitumor</b>	bekannt	<b>175</b>	100,00
	nein	135	77,14
	ja	40	29,63
<b>Rezidiv</b>	bekannt	<b>175</b>	100,00
	Nein	144	82,29
	Ja	31	17,71

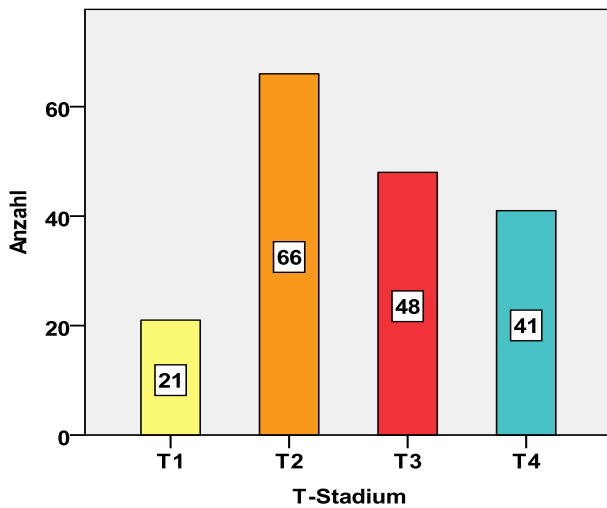
**Tab. 13:** Klinisch-pathologische Daten und Befunde von 180 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren

Das Kollektiv umfasst insgesamt 180 Fälle, von denen der Großteil (91,1%) männlich ist. Das Alter bei Erstdiagnose liegt im Durchschnitt bei 51 Jahren. Es finden sich 32,2% der Primärtumoren im Oropharynx, 31,1% im Larynx, 18,3% im Hypopharynx und 18,3% in der Mundhöhle.

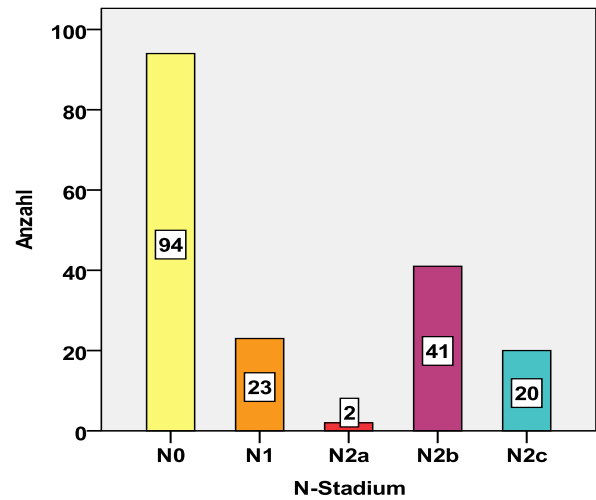


**Abb.13:** Verteilung der Primärlokalisierungen

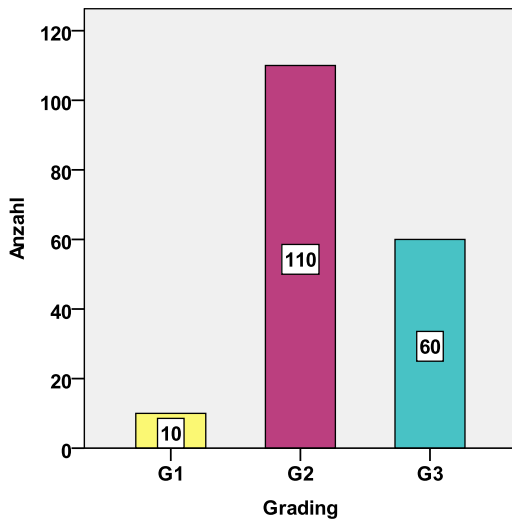
Die meisten Patienten (64,8%) hatten bei Erstdiagnose mäßig fortgeschrittene Primärtumoren (T2 und T3), 48% wiesen Lymphknotenmetastasen auf und Fernmetastasen konnten bei keinem der Patienten gesichert werden. Ein Großteil der Karzinome (61%) waren mit einem Grad 2 mäßig differenziert.



**Abb.14:** Verteilung der T-Stadien

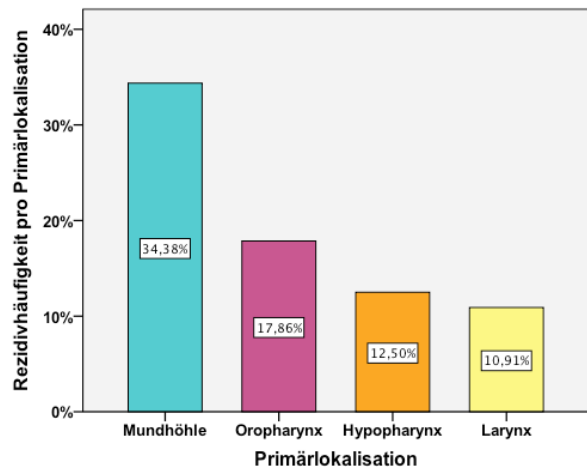
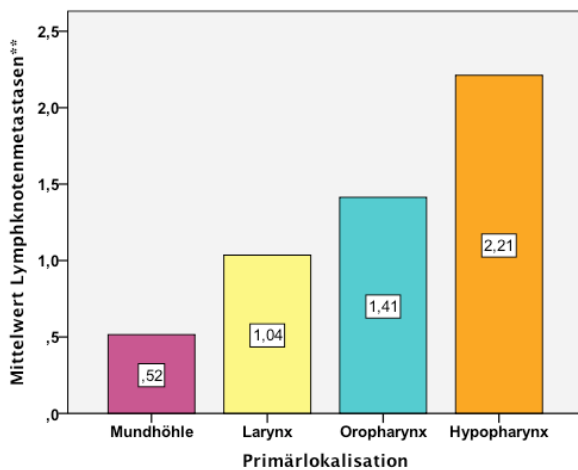
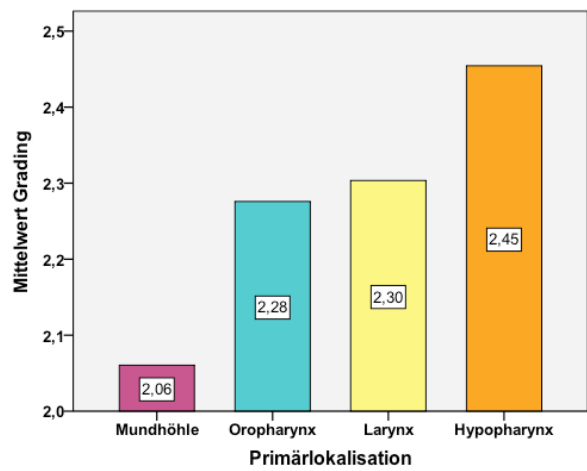
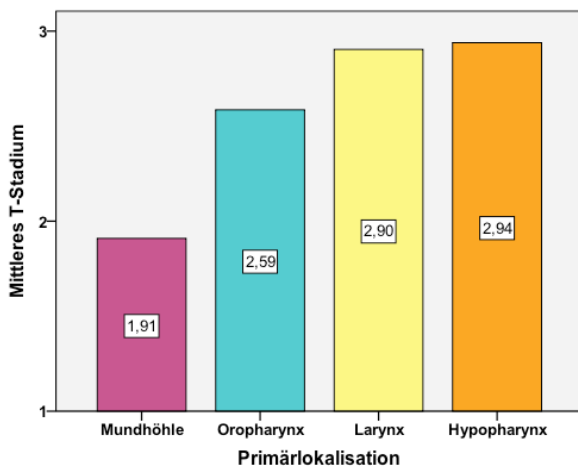


**Abb.15:** Verteilung der N-Stadien



**Abb.16:** Verteilung der G-Stadien

Sowohl die mittlere Tumorgroße, als auch der Differenzierungsgrad und der Lymphknotenstatus variieren mit der Primärlokalisierung. Mundhöhlenkarzinome sind hierbei im Mittel am kleinsten und sind am besten differenziert. Bei Hypopharynxkarzinomen verhält es sich umgekehrt: sie sind im Mittel am größten und am schlechtesten differenziert. Auch weisen Mundhöhlenkarzinome deutlich weniger Lymphknotenmetastasen auf als Hypopharynxkarzinome ( $p < 0,01$ ) (siehe Abb.17). Betrachtet man die Rezidivhäufigkeit von Tumoren verschiedener Primärlokalisationen, so zeigen sich bei Mundhöhlenkarzinomen am häufigsten Rezidive, in absteigender Reihenfolge bei Oropharynx-, Hypopharynx- und Larynx-tumoren seltener.



\*\*N1=1; N2a=2; N2b=3; N2c=4; N3=5

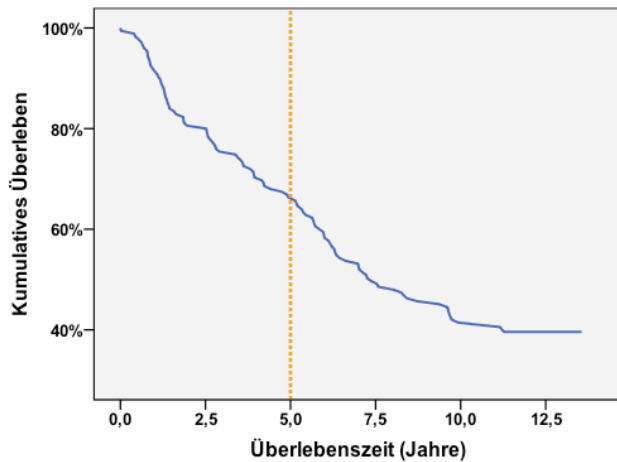
**Abb. 17:** Mittleres T-, G- und N-Stadium bei unterschiedlicher Primärlokalisierung

Die Therapie bestand in 25% der Fälle in der alleinigen Operation, die anderen drei viertel der Patienten erhielten eine zusätzliche Strahlentherapie. Patienten, die eine alleinige Radiatio bekamen, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Der Resektionsstatus lag in 96,7% bei R0. Ca. 30% der Patienten wiesen einen Zweittumor auf, 70,9% erlitten ein Lokalrezidiv. Die Überlebenszeit nach Erstdiagnose lag im Mittel bei 7,3 Jahren.

Drei viertel der Patienten waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose alkoholabhängig, im Mittel wurden 1,64 Liter Bier pro Tag getrunken. 73% der Patienten waren Raucher.

Betrachtet man die Überlebenskurven, so zeigt sich, dass vom Gesamtkollektiv der Patienten knapp 70% nach 5 Jahren noch leben und so per definitionem als „geheilt“ gelten, wobei nur Todesfälle beachtet werden, die durch die Tumorerkrankung bedingt waren. Man sieht jedoch auch, dass gerade nach der definierten „Heilung“ die Überlebenskurve noch einmal steil abfällt und erst ca. 10 Jahre nach Erstdiagnose flach wird. Insgesamt sterben ca. 60% der Patienten an ihrer Tumorerkrankung, wobei die Hälfte in den ersten 5 Jahren und die andere Hälfte in den

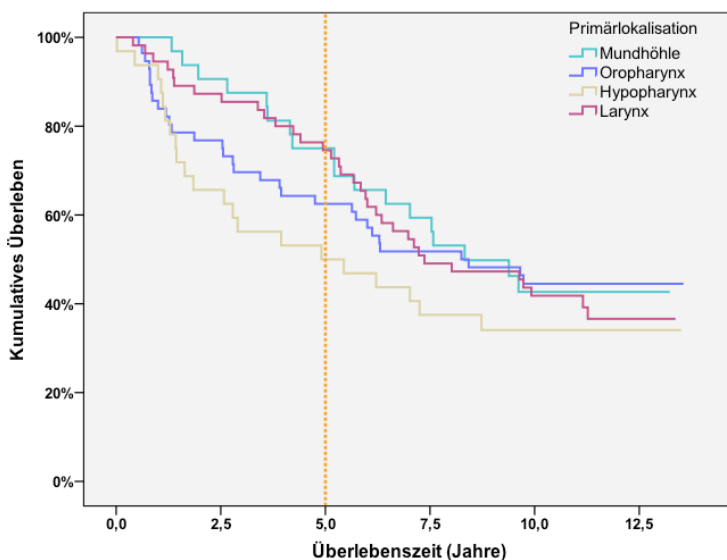
folgenden 5 Jahren versterben. 10 Jahre nach Erstdiagnose leben also nur noch ca. 40% der Patienten.



**Abb. 18:** Gesamtüberlebensfunktion  
(Median: 7,4 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 5,1-9,6)

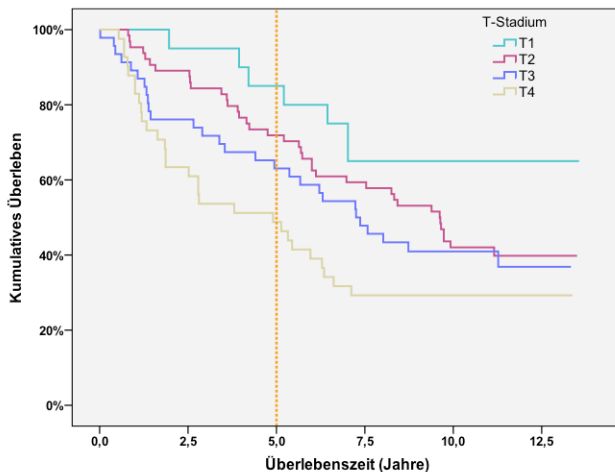
Das Gesamtüberleben ist im untersuchten Kollektiv jedoch von einigen Faktoren mehr oder weniger erheblich abhängig:

Zunächst einmal hat die Primärlokalisierung Einfluss auf das Überleben. Patienten mit einem Hypopharynxkarzinom hatten demnach die schlechteste Prognose, Patienten mit einem Karzinom der Mundhöhle die insgesamt beste (siehe Abb. 19).



**Abb. 19:** Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Primärlokalisierung  
Mundhöhle (Median: 8,3 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 5,7-11,0)  
Oropharynx (Median: 8,3 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 3,9-12,6)  
Hypopharynx: (Median: 4,9 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 0,3-9,5)  
Larynx: (Median: 7,4 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 4,1-10,6)

Außerdem hängt die Prognose signifikant vom T-Stadium - also der Größe des Primärtumors – ab: Je kleiner der Tumor initial war, desto mehr Patienten überlebten ihre Krebskrankheit ( $p=0,014$ ) (s. Abb.20). Allerdings ist die Auswirkung beim multivariaten Testen mit den zusätzlichen Parametern „Lymphknotenstatus“ und „Rezidivrate“ nicht mehr signifikant, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Tumorgöße zunächst diese Faktoren beeinflusst, die jedoch dann einen hochsignifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben zeigen.



**Abb. 20:** Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Tumorgöße (T-Stadium)

T1 – zu wenige Fälle

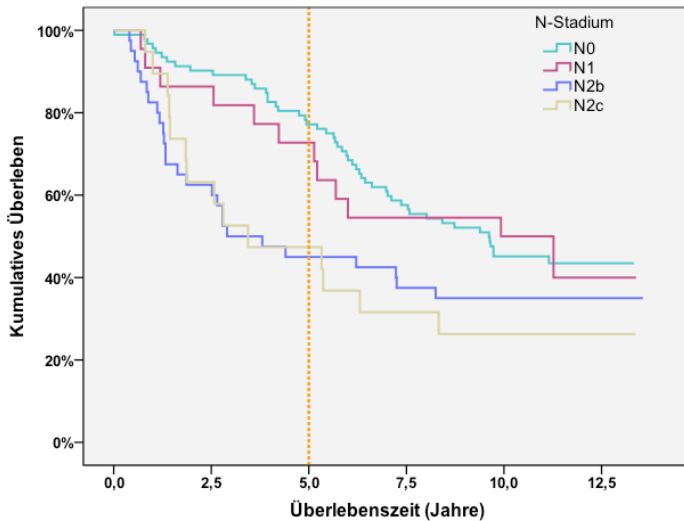
T2 (Median: 9,6 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 8,2-11,0)

T3 (Median: 7,3 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 5,3-9,2)

T4 (Median: 4,9 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 1,7-8,0)

Wie bereits erwähnt, stellt man beim Analysieren des N-Stadiums einen Unterschied im Gesamtüberleben fest: Je niedriger das initiale N-Stadium, desto besser die Prognose, wobei die Unterschiede zwischen N0 und N2b ( $p=0,03$ ) sowie N0 und N2c ( $p=0,01$ ) als statistisch signifikant bis hoch signifikant zu werten sind.

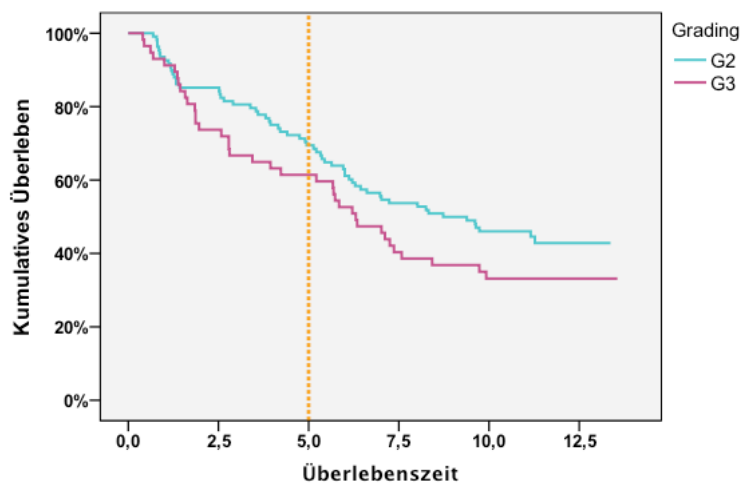
Was besonders auffällt, ist die Form der Kurven (s. Abb.21): Patienten mit Lymphknotenmetastasen sterben vor allem in den ersten 5 Jahren nach Erstdiagnose, bei metastasenfremen Patienten verstirbt der Großteil erst zwischen dem 5. Und 10. Jahr nach Erstdiagnose.



**Abb. 21:** Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Lymphknotenstadium

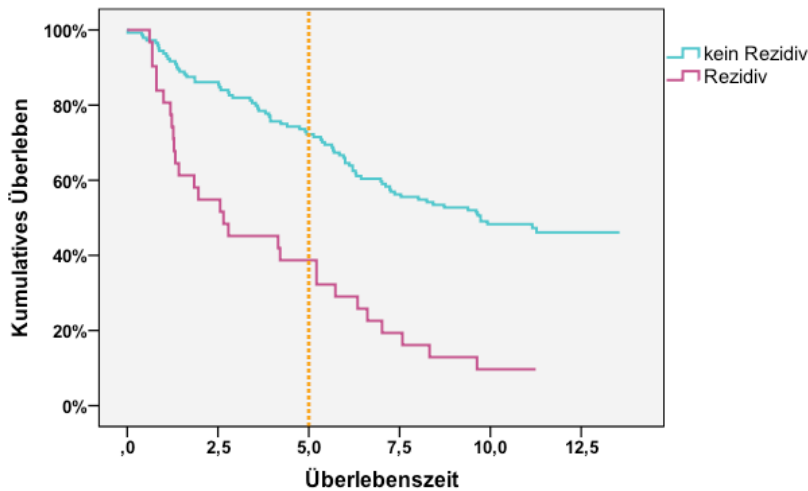
N0 (Median: 9,6 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 6,6-12,7)  
 N1 (Median: 9,9 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 3,8-16,0)  
 N2a – zu wenige Fälle  
 N2b (Median: 2,9 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 0,7-5,0)  
 N2c (Median: 3,5 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 0,0-7,4)

Schließlich spielen noch der Differenzierungsgrad und das Auftreten eines Lokalrezidivs eine Rolle für das Überleben der Patienten (s. Abb.22). Je geringer der Tumor differenziert ist, desto schlechter scheint die Diagnose zu sein ( $p=0,14$ ) (s. Abb.23). Betrachtet man das Vorhandensein eines Lokalrezidivs, so gehen die Überlebenskurven weit auseinander ( $p<0,01$ ). Patienten mit einem Lokalrezidiv haben nur eine ca. 40%ige Chance, die ersten 5 Jahre nach Erstdiagnose zu überleben und somit die definitionsgemäße „Heilung“ zu erreichen.



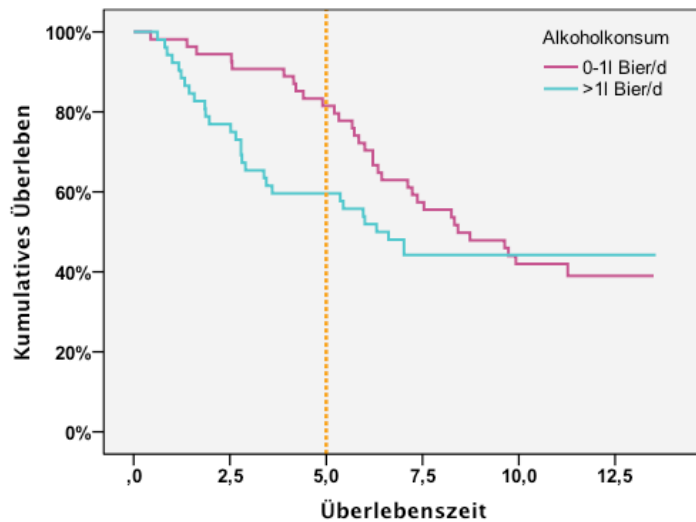
**Abb. 22:** Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Differenzierung

G1 – zu wenige Fälle  
 G2 (Median: 8,7 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 5,1-12,3)  
 G3 (Median: 6,3 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 4,8-7,8)



**Abb. 23:** Überlebenszeit in Abhängigkeit von Rezidiven  
 Kein Rezidiv (Median: 9,7 Jahre)  
 Lokalrezidiv (Median: 1,4 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 0,7-2,2)

Rauchen hat keinen Einfluss auf die Prognose, so dass Raucher und (lebenslange) Nichtraucher eine nahezu identische Kaplan-Mayer-Kurve aufweisen. Allerdings sterben stärkere Alkoholiker früher, als Patienten, die nur wenig Alkohol (0-1Liter Bier/d) tranken, wenn sie auch nicht signifikant kürzer lebten (s. Abb.24). Da nur ein einziger Patient des Kollektives Wein und ein anderer zusätzlich Schnaps trank, wurde die statistische Auswertung anhand des „gängigeren“ Bierkonsums vorgenommen.



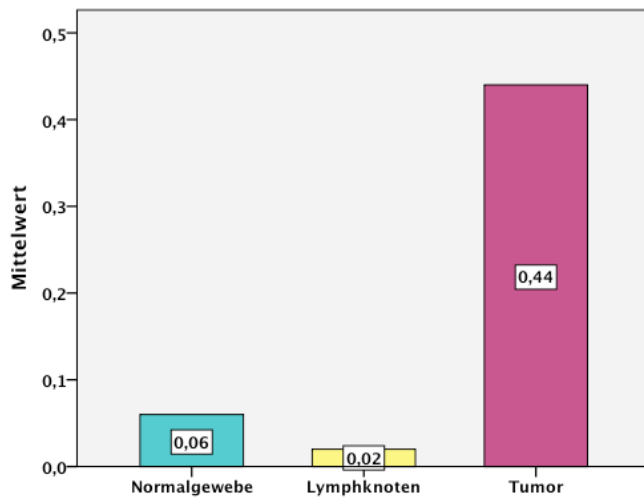
**Abb. 24:** Mittlere Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum  
 0-1l Bier/d (Median: 8,4 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 5,9-11,0)  
 >1l Bier/d (Median: 6,3 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 4,5-8,2)



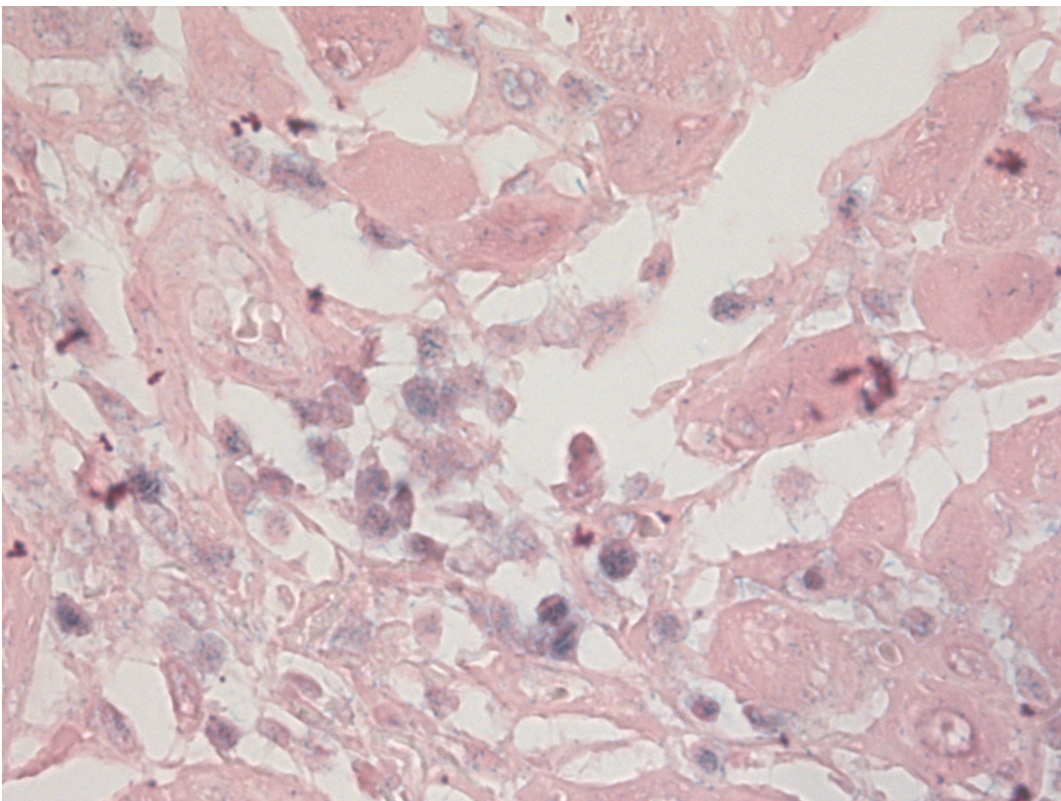
## 4.2 Spezielle Statistik der einzelnen Parameter

### 4.2.1 HPV16

Im Tumorgewebe sind im Durchschnitt deutlich mehr Zellen mit dem HPV16 infiziert als im Normalgewebe. Insgesamt konnte bei 24,2% der HNSCC das Virus nachgewiesen werden. In den Lymphknotenmetastasen wurden weniger infizierte Zellen nachgewiesen als im Normalgewebe ( $p=0,13$ ) (s. Abb. 25).

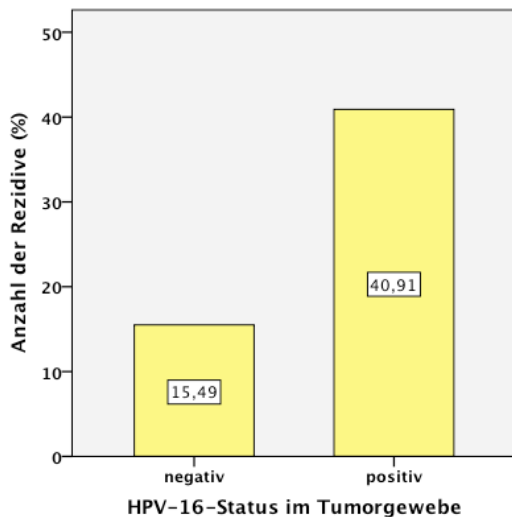


**Abb. 25:** Mittlere HPV16-Infektionsrate in verschiedenen Gewebearten



**Abb. 26:** HPV16-positives Tumorgewebe (63fach vergrößert)

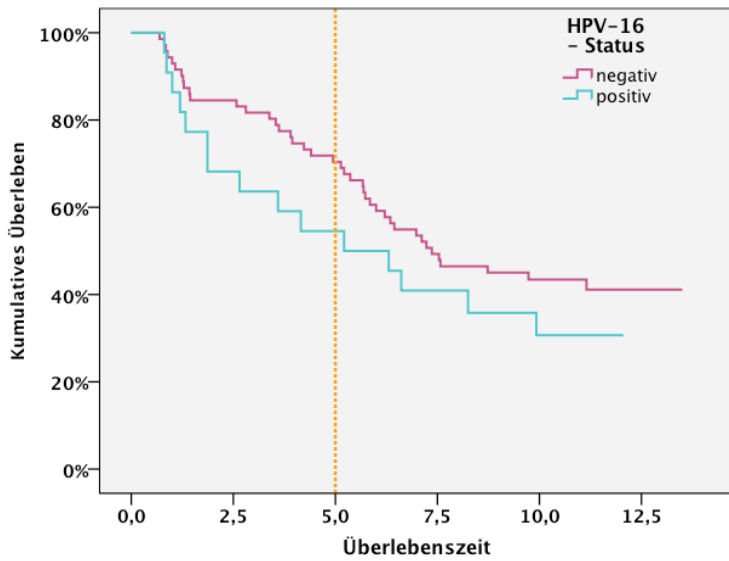
HPV16-positive Karzinome verteilen sich wie folgt auf die verschiedenen Primärlokalisationen: 43,5% der HPV16-positiven Zellen finden sich in Oropharynxkarzinomen, 30,4% in Mundhöhlenkarzinomen, 21,7% in Larynxkarzinomen und 4,3% in Hypopharynxkarzinomen. Vergleicht man die Rezidivrate von HPV16-positiven mit HPV16-negativen HNSCC, so zeigt sich bei positiven eine deutlich Höhere Rate von 40,9% im Gegensatz zu HPV-negativen Tumoren von 15,5% ( $p=0,01$ ).



**Abb. 27:** Rezidivquote in Abhängigkeit vom HPV16-Status

Außerdem korreliert der HPV16-Status signifikant positiv mit dem Lymphknotenstatus. Generell findet sich bei HPV16-positiven Tumoren ein höheres Lymphknotenstadium ( $p=0,03$ ).

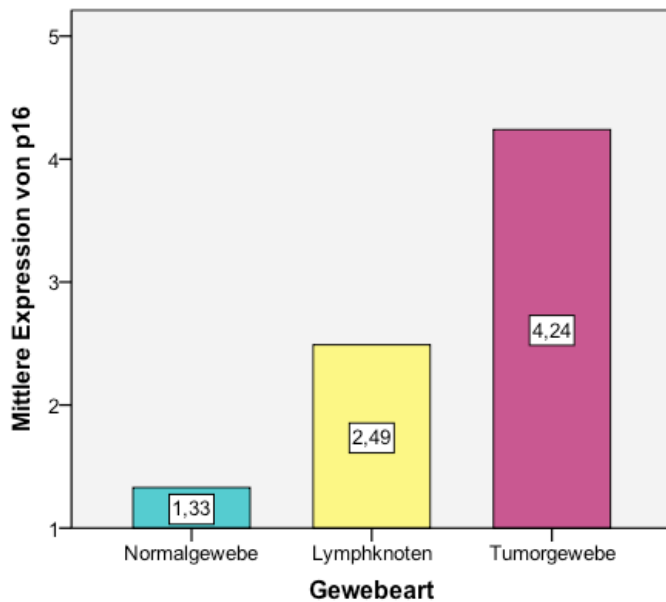
Vergleicht man HPV16-positive mit HPV16-negativen Kopf-Hals-Tumoren, so zeigt sich bei der Auswertung von insgesamt 93 Fällen ein besseres Gesamtüberleben bei Patienten mit HPV16-negativen Tumoren (siehe Abbildung 28,  $p=0,27$ ).



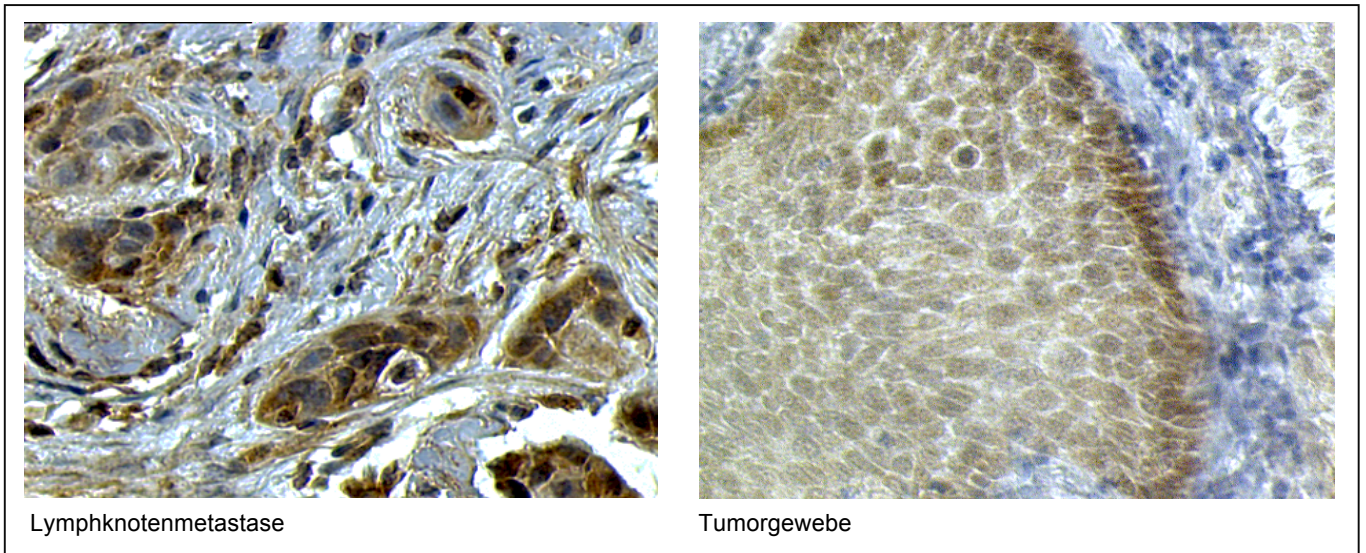
**Abb. 28:** Überleben in Abhängigkeit vom HPV16-Status  
 HPV-negativ (Median: 7,4 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 4,3-10,4)  
 HPV-positiv (Median: 5,2 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 1,7-8,7)

#### 4.2.2 p16

p16 ist in Lymphknotenmetastasen ca. doppelt so stark exprimiert wie in Normalgewebe. In Tumorgewebe ist es sogar mehr als 3-fach so stark exprimiert (s. Abb. 29)

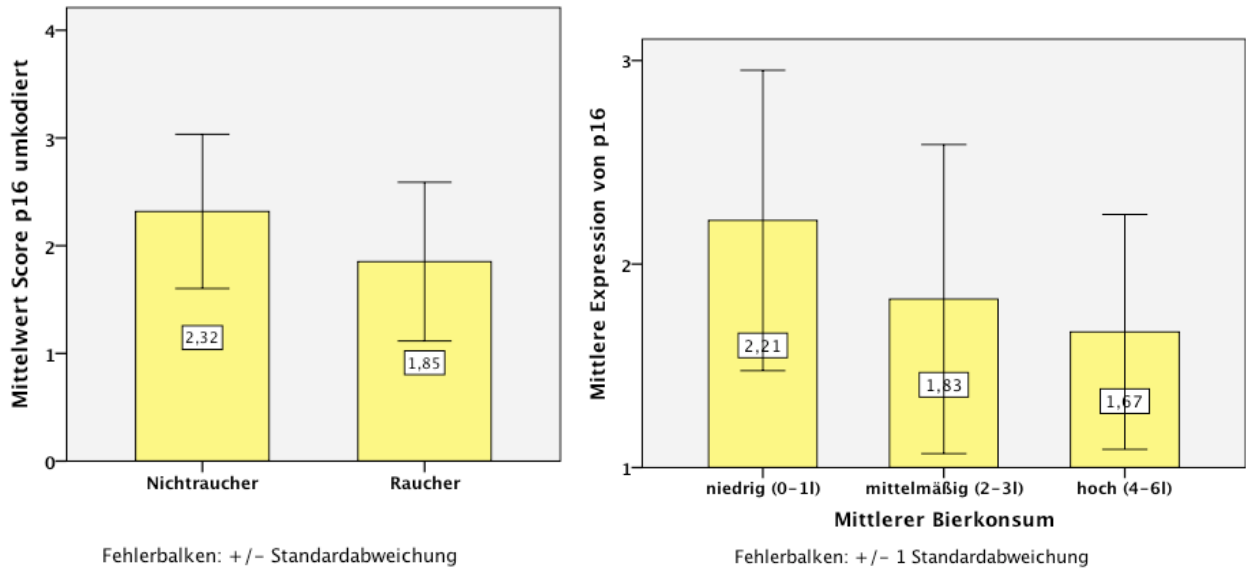


**Abb. 29:** Mittlere Expression von p16 in verschiedenen Gewebearten



**Abb. 30:** p16-Antikörperfärbung in Lymphknotenmetastase und Tumorgewebe (Vergrößerung 20-fach)

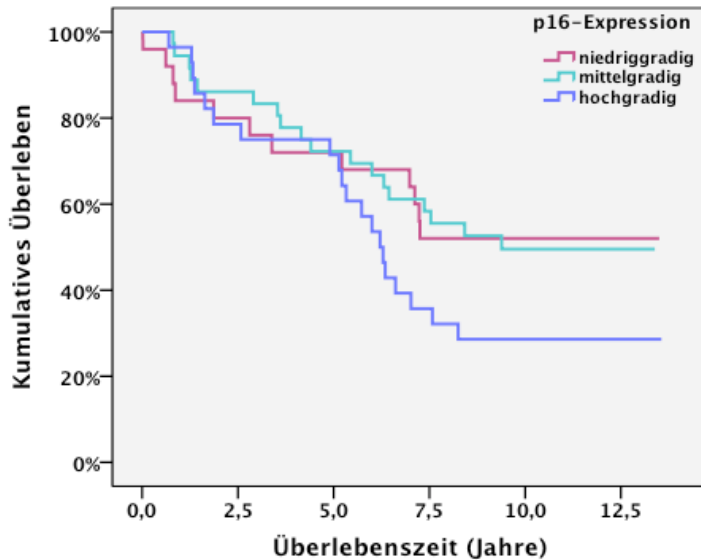
Es konnte ein negativ proportionaler Zusammenhang zwischen der p16-Expression im Tumorgewebe und dem Nikotinkonsum ( $p=0,014$ ) sowie dem Alkoholkonsum ( $p=0,05$ ) dargestellt werden (s. Abb. 31).



**Abb. 31:** Zusammenhang zwischen der Expression v. p16 in Tumorgewebe und Tabak- bzw. Bierkonsum  
 \* 1=niedrige Expression (Score 0-3); 2=mittelgradige Expression (Score 4-5); 3=hochgradige Expression (Score 6-7)

Betrachtet man die Überlebensprognose in Abhängigkeit vom p16-Expressionsstatus, so zeigt sich tendenziell eine schlechtere Prognose bei höherer Expression (s. Abb. 32,  $p=0,12$ ). Hierbei wurden alle Kopf-Hals-Tumoren zusammengefasst. Betrachtet man nur die einzelnen

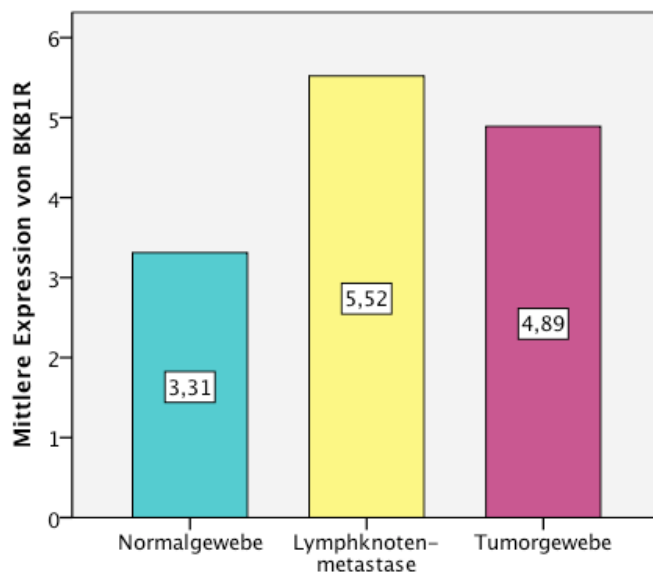
Tumorlokalisationen getrennt voneinander, so zeigt sich das gleiche Ergebnis für jede einzelne Tumorlokalisation. Besonders deutlich ist der Unterschied bei Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinomen, auch wenn die geringe Fallzahl der einzelnen Lokalisationen für eine hochsignifikante Aussage zu gering ist.



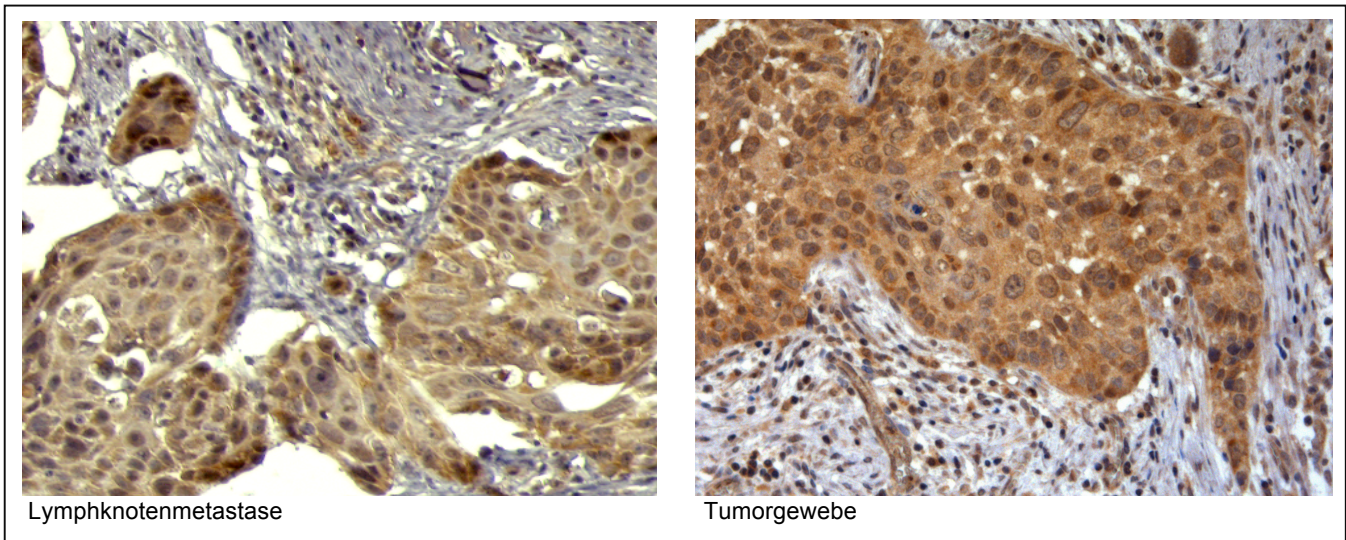
**Abb. 32:** Überleben in Abhängigkeit vom p16-Status  
 Niedriggradig exprimiert -  
 Mittelgradig exprimiert (Median: 9,4 Jahre)  
 Hochgradig exprimiert (Median: 6,2 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 5,4-7,0)

#### 4.2.3 BKB1R

BKB1R ist in Tumorgewebe deutlich höher exprimiert als in Normalgewebe ( $p < 0,01$ ), die Expression in Lymphknotenmetastasen übersteigt sogar diejenige von Tumorgewebe.



**Abb. 33:** Mittlere BKB1R-Expression in verschiedenen Geweben

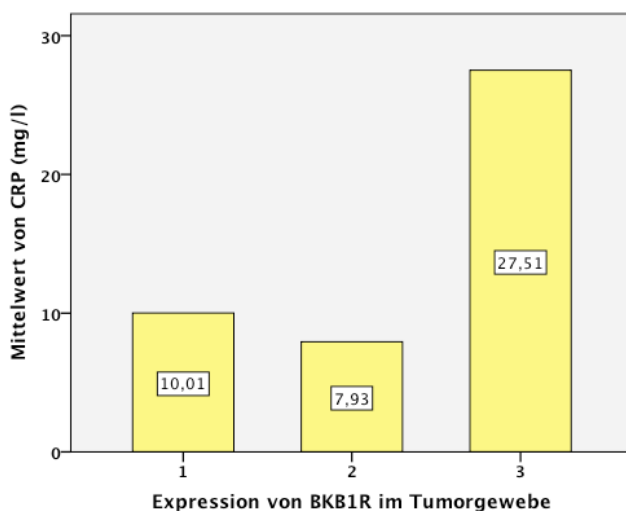


**Abb. 34:** BKB1R-Antikörperfärbung in Lymphknotenmetastase und Tumorgewebe (Vergrößerung 20-fach)

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die BKB1R-Expression im Tumor ( $p=0,24$ ) und in Lymphknotenmetastasen ( $p=0,67$ ) mit dem Lymphknotenstatus verglichen. Hier ergab sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang.

Außerdem zeigte sich, dass der BKB1-Rezeptorstatus in größeren Tumoren tendenziell höher ist als in Tumoren mit niedrigerem T-Status ( $p=0,09$ ).

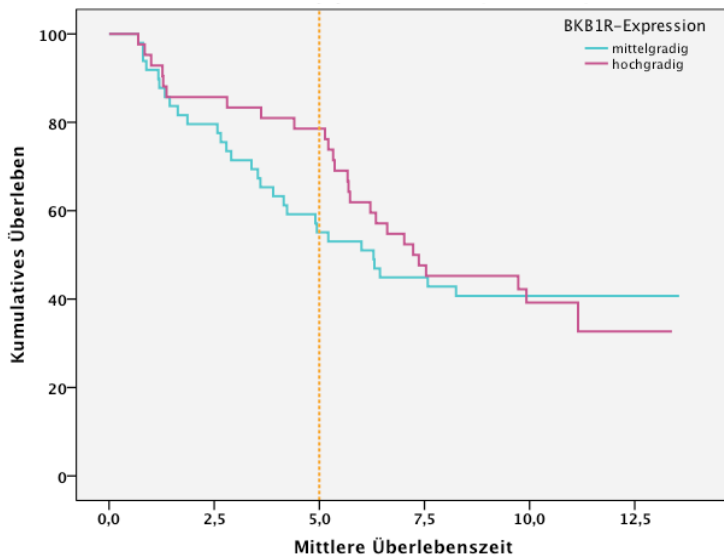
Nachdem BKB1R normalerweise in entzündetem Gewebe hochreguliert wird, wurde die Expression des Rezeptors mit dem CRP-Wert im Serum (vor Therapie) verglichen. Hier konnte ein signifikant positiver Zusammenhang gezeigt werden ( $p=0,045$ , s. Abb.35). Je höher die BKB1R-Expression im Gewebe, desto höher war der mittlere CRP-Wert im Serum: bei geringer Rezeptorexpression lag der mittlere CRP-Wert bei ca. 10, bei hoher Expression war der mittlere CRP-Wert fast drei mal so hoch (27,5).



**Abb. 35:** CRP-Mittelwert in Abhängigkeit von der BKB1R-Expression im Tumorgewebe

\* 1=niedrig exprimiert (Score 0-3); 2=mittelgradig exprimiert (Score 4-5); 3=hochgradig exprimiert (Score 6-7)

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 5 Jahre nach Erstdiagnose noch deutlich mehr Patienten mit hoher BKB1R-Expression als mit geringem Expressionsniveau überlebt hatten (s. Abb. 36). Allerdings hatte die Höhe der BKB1R-Expression 10 Jahre nach Erstdiagnose keinen Einfluss mehr auf die Prognose, weshalb die Überlebensunterschiede auch nicht statistisch signifikant sind ( $p=0,3$ ). Vor allem während der ersten zwei Jahre nach definitionsgemäßer „Heilung“ fällt die Überlebenskurve der Patienten mit hoch exprimiertem BKB1R steil ab.

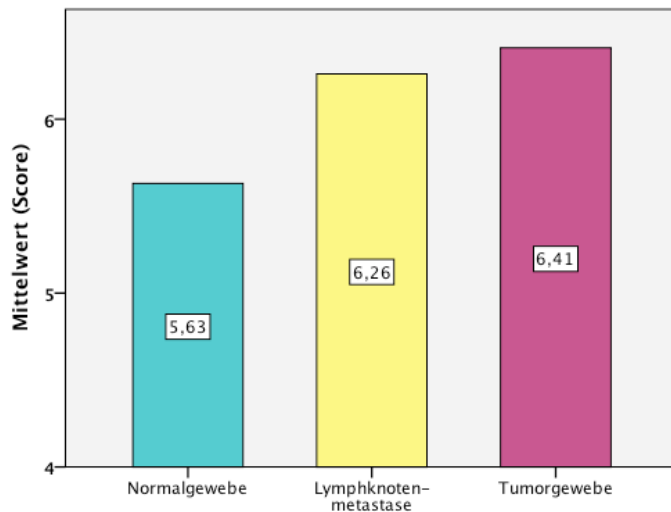


**Abb. 36:** Überlebenskurve in Abhängigkeit der BKB1R-Expression im Tumorgewebe  
Mittelgradig exprimiert (Median: 2,6 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 1,6-3,9)  
Hochgradig exprimiert (Median: 1,3 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 1,2-1,3)

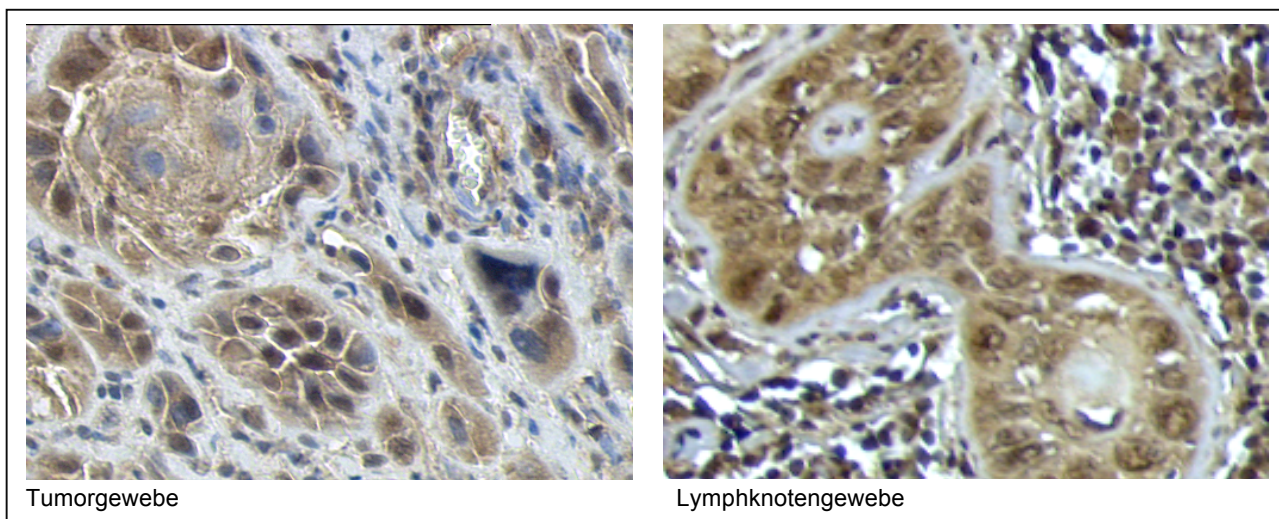
Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass Patienten mit einem höheren CRP-Wert auch ein besseres Gesamtüberleben zeigen würden. Dies ist jedoch nicht der Fall. Es zeigt sich eher die Tendenz zu einem etwas schlechteren Gesamtüberleben, je höher der CRP-Wert gemessen wurde.

#### 4.2.4 BKB2R

BKB2R ist in allen Gewebearten eher hoch exprimiert, wobei der Rezeptor im Tumorgewebe im Mittel am höchsten exprimiert ist, die Unterschiede sind statistisch signifikant ( $p<0,01$ ) (s. Abb. 37)



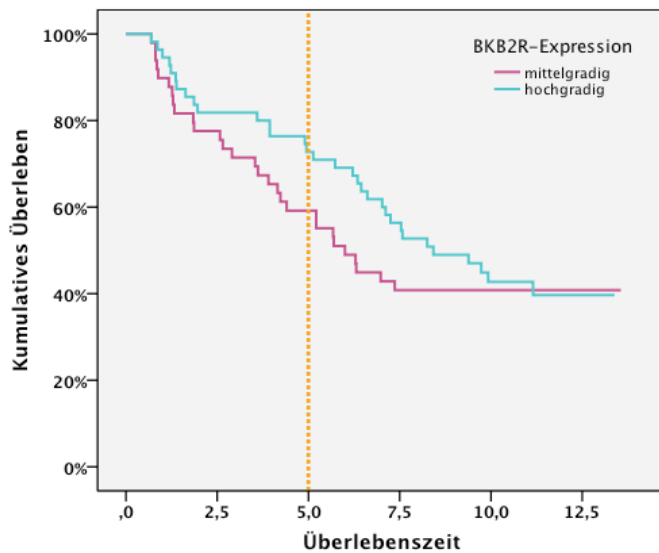
**Abb 37:** Mittlere BKB2R-Expression in verschiedenen Geweben



**Abb. 38:** BKB2R-Antikörperfärbung in Lymphknoten- und Tumorgewebe (Vergrößerung 20-fach)

Betrachtet man die Kaplan-Meier-Kurve, so zeigt sich – ähnlich wie bei der BKB1R-Expression – zunächst ein Unterschied im Überleben zugunsten der Patienten mit höhergradiger BKB2R-Expression, so dass die Überlebenskurven nach 5 Jahren deutlich auseinander liegen. Allerdings versterben die Patienten mit hochgradiger BKB2R-Expression vermehrt nach dem definitionsgemäßen Zeitpunkt der Heilung und 10 Jahre nach Diagnosestellung leben nur noch 40% der Patienten, unabhängig von der BKB2R-Expression im Tumorgewebe. Aus diesem Grund ist der Überlebensunterschied auch nicht statistisch signifikant ( $p=0,5$ ).



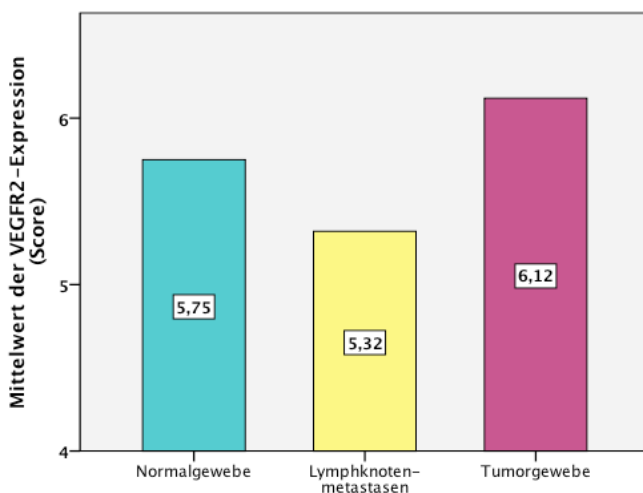


**Abb. 39:** Überlebenskurve in Abhängigkeit der BKB2R-Expression im Tumorgewebe  
 Mittelgradig exprimiert (Median: 6,0 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 4,5-7,5)  
 Hochgradig exprimiert (Median: 8,4 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 5,6-11,3)

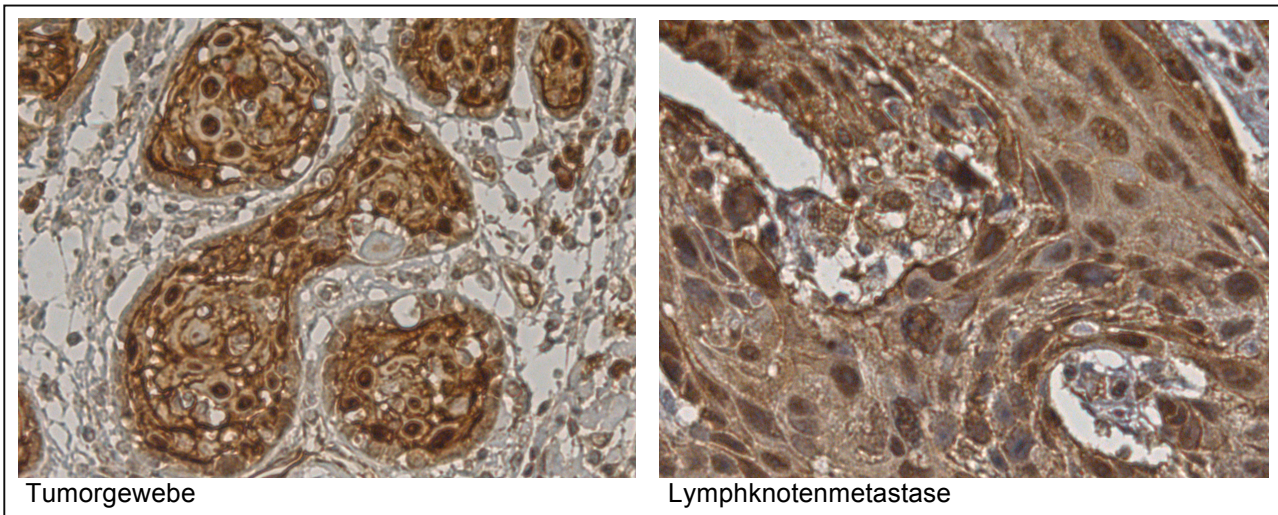
Allerdings korreliert sowohl der Lymphknotenstatus ( $p=0,002$ ) als auch der Differenzierungsgrad ( $p=0,04$ ) signifikant mit der Höhe der BKB2R-Expression im Tumorgewebe, so dass bei hoch exprimiertem BKB2R weniger Lymphknotenmetastasen bestehen, die Differenzierung jedoch schlechter ist.

#### 4.2.5 VEGFR2

Vergleicht man die mittlere Expression von VEGFR2 in den verschiedenen Geweben, so zeigt sich überall eine eher hohe Expression. Die Unterschiede sind minimal, wobei die Expression von VEGFR2 im Gewebe von Lymphknotenmetastasen im Mittel am geringsten ausgeprägt ist (s. Abb. 40)

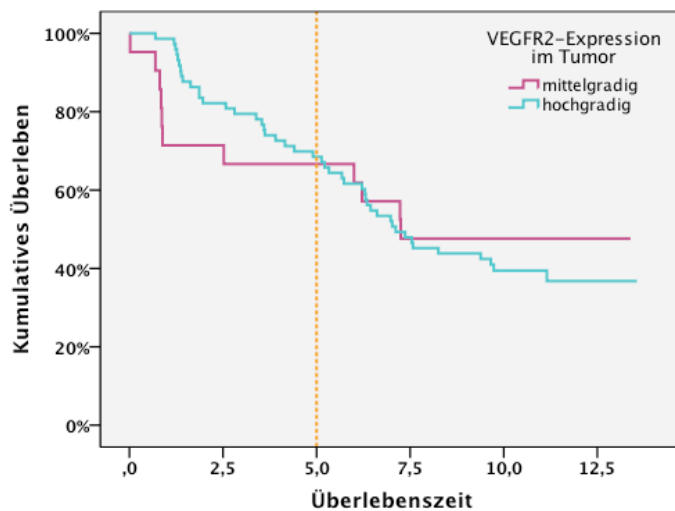


**Abb 40:** Mittlere VEGFR2-Expression in verschiedenen Geweben



**Abb. 41:** VEGFR2-Antikörperfärbung in Lymphknoten- und Tumorgewebe (Vergrößerung 20-fach)

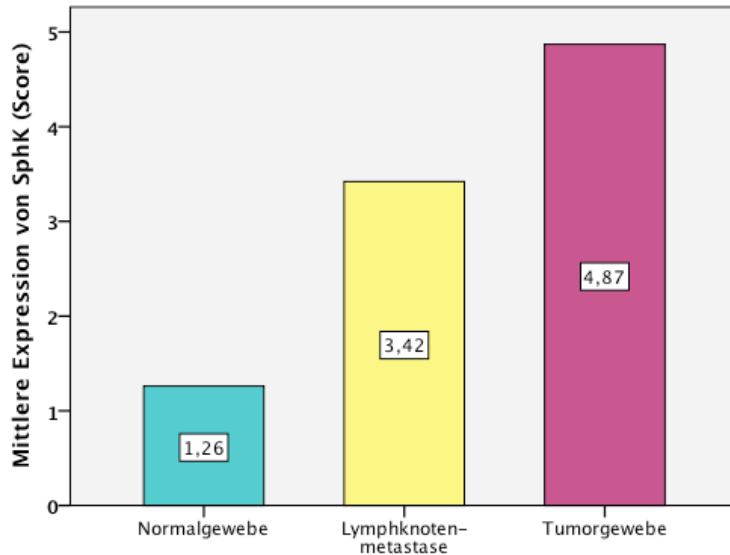
Betrachtet man die verschiedenen Kaplan-Meier-Kurven, so zeigt sich kaum ein Unterschied zwischen Patienten mit mittel- und hochgradiger VEGFR2-Expression. Eine Kurve für Patienten mit geringgradiger VEGFR2-Expression lässt sich nicht erstellen, da es nur vereinzelte Fälle mit geringer Expression gibt. Auch Fälle mit mittelgradig ausgeprägter VEGFR2-Expression sind deutlich seltener als Fälle mit hochgradiger Expression, so dass die Aussagefähigkeit der Überlebenskurve eingeschränkt zu werten ist ( $p=0,78$ ).



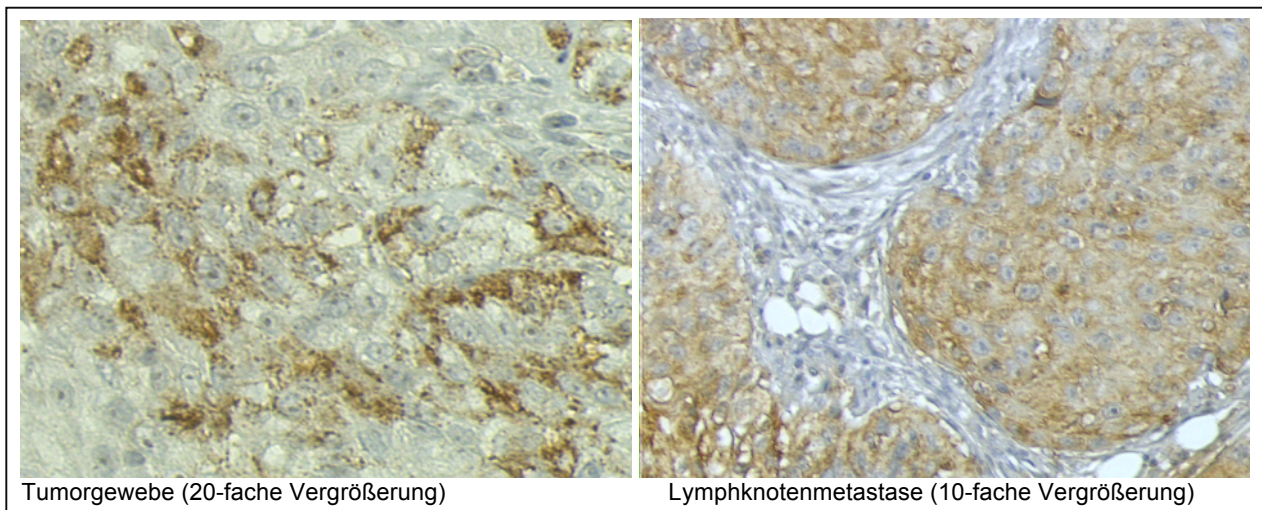
**Abb. 42:** Überlebenskurve in Abhängigkeit der VEGFR2-Expression im Tumorgewebe

#### 4.2.6 SphK1

Shingosinkinase-1 findet sich in Tumorgewebe hochsignifikant stärker exprimiert als in Normalgewebe ( $p < 0,01$ ), sowie im Gewebe der Lymphknotenmetastasen deutlich stärker als im Normalgewebe ( $p = 0,07$ , s. Abb. 43)

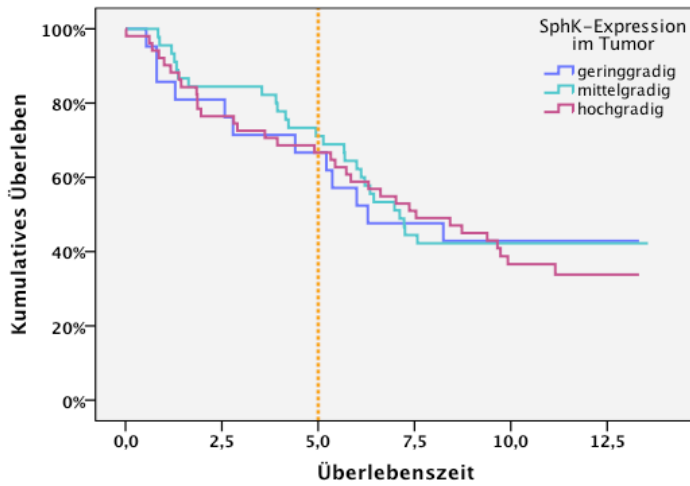


**Abb. 43:** Mittlere SphK1-Expression in verschiedenen Geweben



**Abb. 44:** SphK1-Antikörperfärbung in Lymphknoten- und Tumorgewebe (Vergrößerung 20-fach)

Auch wenn die SphK1 in Tumorgewebe deutlich höher exprimiert ist, als in Normalgewebe, so zeigt sich jedoch kein Unterschied im Überleben der Patienten bei verschieden starker SphK1-Expression im Tumorgewebe. Die Überlebenskurven decken sich beinahe (s. Abb. 45)



**Abb. 45:** Überlebenskurve in Abhängigkeit der SphK1-Expression im Tumorgewebe  
 Niedriggradig exprimiert (Median: 6,3 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 2,0-10,6)  
 Mittelgradig exprimiert (Median: 7,1 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 5,9-8,3)  
 Hochgradig exprimiert (Median: 7,5 Jahre; 95%-Konfidenzintervall: 4,5-10,6)

### 4.3 Zusammenhänge zwischen den einzelnen Tumorparametern

Faktor 1	Faktor 2	Signifikanzniveau	Korrelationskoeffizient r
<b>HPV16</b>	BKB1R	0,02	0,251
	P16	0,39	
	VEGFR2	0,11	
	SphK1	0,39	
	BKB2R	0,39	
<b>P16</b>	BKB1R	0,006	0,303
	BKB2R	0,022	0,251
	VEGFR2	0,019	0,269
	SphK1	0,12	
	HPV16	0,39	
<b>BKB1R</b>	VEGFR2	0,015	0,254
	HPV16	0,02	0,251
	p16	0,006	0,303
	SphK1	0,27	
	BKB2R	0,29	
<b>BKB2R</b>	p16	0,022	0,251
	SphK1	0,001	0,317
	VEGFR2	0,66	
	HPV16	0,39	
	BKB1R	0,29	
<b>SphK1</b>	BKB2R	0,001	0,251
	BKB1R	0,27	
	VEGFR2	0,81	
	HPV16	0,39	
	p16	0,12	
<b>VEGFR</b>	p16	0,019	0,269
	BKB1R	0,015	0,254
	HPV16	0,11	
	BKB2R	0,66	
	SphK1	0,81	

**Tab.21:** Zusammenhänge zwischen einzelnen gemessenen Parametern

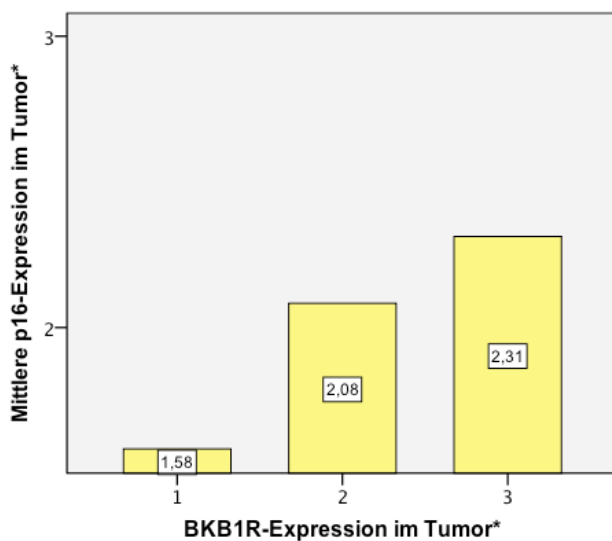
## HPV16

Korreliert man den HPV-Status mit den anderen in dieser Arbeit untersuchten Parametern, so zeigt sich lediglich mit dem Bradykinin-1-Rezeptor ein signifikanter, in diesem Falle positiver, Zusammenhang: Bei HPV16-positiven Tumoren ist der BKB1R im Mittel signifikant höher exprimiert als in HPV16-negativen Tumoren ( $p = 0,02$ , s. Abb. 46).

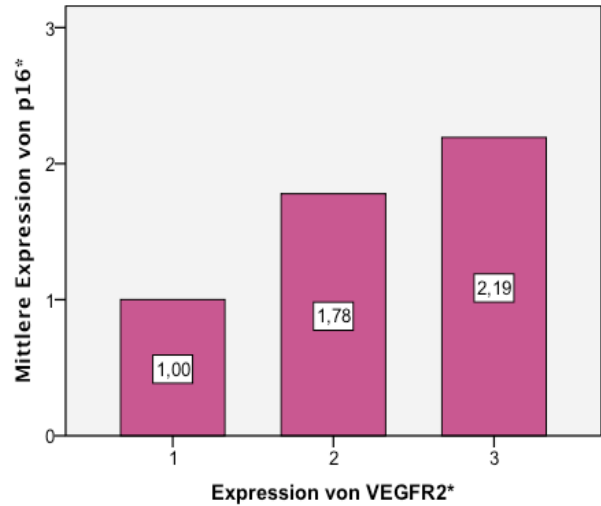
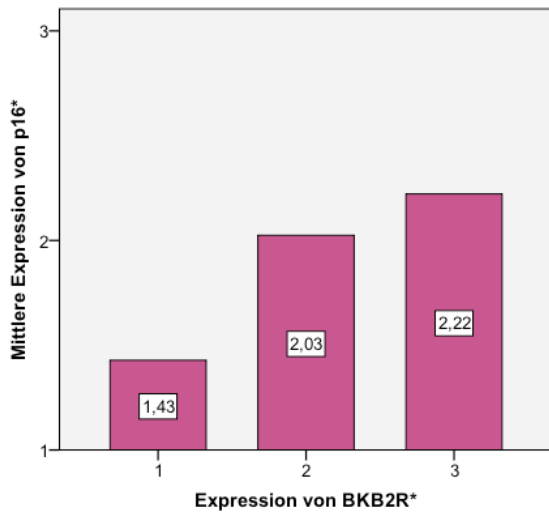
## P16

Gleiches konnte an p16 beobachtet werden: In Tumorgewebe mit hoher p16-Expression wird im Mittel signifikant mehr BKB1R exprimiert ( $p < 0,01$ ). Es zeigte sich zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen der p16-Expression und BKB2R ( $p < 0,01$ ) sowie zwischen p16 und VEGFR2 ( $p = 0,02$ ). Jedoch konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zwischen HPV16 und p16-Expression gezeigt werden, bei Oropharynx- und Larynxkarzinomen war die p16-Expression HPV-positiver Karzinome jedoch tendenziell größer als bei HPV-negativen Karzinomen (Oropharynx positiv: 2,1 negativ: 1,9; Larynxkarzinome positiv: 2,3 negativ: 1,9).

Betrachtet man die Expression von VEGFR2, so korreliert diese lediglich signifikant mit p16 ( $p = 0,02$ ).



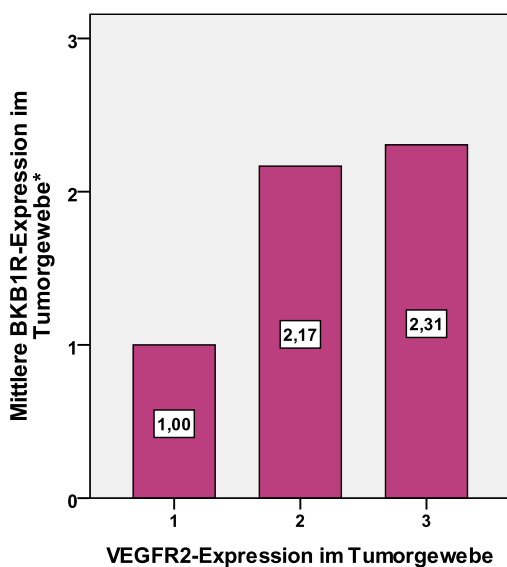
**Abb. 46:** Mittlere Expression des BKB1R in Tumorgewebe in Abhängigkeit vom HPV16-Status und von der p16-Expression im Tumor



**Abb. 47:** Mittlere Expression von p16 in Abhängigkeit von der BKB2R- und VEGFR2-Expression im Tumorgewebe

#### BKB1R

Außerdem wurde die BKB1R-Expression mit den anderen in dieser Arbeit untersuchten Tumormarkern verglichen. Es konnte neben dem Zusammenhang mit HPV16 und p16 auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von BKB1R und VEGFR2 ( $p=0,015$ ) gezeigt werden (s. Abb. 49).



**Abb. 48:** Zusammenhang zwischen der Expression von BKB1R und VEGFR2 in Tumorgewebe

## BKB2R und SphK

Neben dem signifikant positiven Zusammenhang zwischen BKB2R und p16, zeigt sich noch ein hochsignifikant positiver Zusammenhang für BKB2R mit der Sphingosinkinase-Expression ( $p=0,001$ ). Sphingosinkinase an sich korreliert mit sonst keinem hier gemessenen Faktor außer dem BKB2-Rezeptor.

Vergleicht man nun zusammenfassend Tumor- und Normalgewebe, findet man im Tumorgewebe insgesamt eine höhere mittlere Expression aller in dieser Arbeit untersuchten Parameter als im Normalgewebe. Dies zeigt sich sehr deutlich vor allem bei p16, Sphingosinkinase, HPV16 und BKB1R. Weniger ausgeprägt sind die Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe bei VEGFR2 und BKB2. Auch im Gewebe der Lymphknotenmetastasen zeigt sich meist eine höhere Parameterexpression als im Normalgewebe. Besonders auffällig ist hier das Expressionsmuster von BKB1R: Hier ist die Expression im Lymphknoten noch höher als im Tumorgewebe.

Betrachtet man die prognostische Aussagekraft der einzelnen gemessenen Parameter, so muss man feststellen, dass keiner dieser Parameter eine signifikante Aussage zulässt. Allerdings lassen sich deutliche Tendenzen darstellen. Der HPV16-Status nimmt während der gesamten 12 gemessenen Jahre kontinuierlich Einfluss auf das Gesamtüberleben, während mit der Höhe der BKB1R- und BKB2R-Expression zwar die 5-Jahres-Überlebensrate deutlich variiert, es nach 10 Jahren jedoch keinen nennenswerten Unterschied mehr zwischen den Überlebenskurven gibt. Die Höhe der p16-Expression nimmt vor allem Einfluss auf das Gesamtüberleben nach definiertem Heilungszeitpunkt. VEGFR2 und SphK beeinflussen die Überlebenskurven kaum.

## **5 Diskussion**

In dieser Arbeit soll zunächst einmal untersucht werden, ob die verschiedenen, in dieser Arbeit untersuchten Faktoren jeweils eine prognostische Aussagefähigkeit besitzen bzw. sich auf die Überlebenskurven auswirken. Vor allem soll auch der Zusammenhang der einzelnen Parameter mit dem Angiogeneseverhalten herausgearbeitet werden.

Außerdem soll beleuchtet werden, ob HPV16-positive Kopf-Hals-Tumore eine eigene Entität darstellen, was sich eventuell in der anderen Verteilung der Parameter, einer sich von der HPV16-negativen HNSCC unterscheidenden Überlebenskurve und einem anderen Risikoprofil der betroffenen Patienten widerspiegelt.

### **5.1 Diskussion der Methodik**

Zwar wurde das Kollektiv prospektiv erstellt und ist damit statistisch sehr gut auswertbar, jedoch ist die retrospektive Aufarbeitung im rein immunhistochemischen Versuch als Methode sicherlich diskutierbar. Zum einen sind Ergebnisse der Immunhistochemie grundsätzlich kritisch zu betrachten, da sie von den durchführenden und auswertenden Personen abhängig sind und die Ergebnisse so großen subjektiven Schwankungen unterliegen können. Außerdem ist ein Problem der hier verwendeten Microarray-Technik, dass sich beim Schneiden der Paraffinblöcke immer wieder einzelne Arrays ablösen und somit einige Fälle aus der Analyse herausfallen und die Fallzahl variiert.

Um die Fehlerquote so gering wie möglich zu halten, wurden die immunhistochemischen Färbungen von drei unabhängigen Personen beurteilt. Mithilfe der Erstellung eines Scores, der die Intensität und die Anzahl der angefärbten Zellen enthält, wurde außerdem versucht, die Subjektivität so gering wie möglich zu halten.

Natürlich ist fixiertes Gewebe nicht in dem Sinne „lebendig“, als dass man eine Entwicklung, beispielsweise durch Behandlung mit verschiedenen Stimulatoren, zeigen könnte. Rein immunhistochemische Versuche sind eher geeignet, mögliche Wege und Zusammenhänge als Ausgangspunkt für weitere Forschungen in einem großen Kollektiv darzulegen. Um diesen dann nachzugehen, müssten zum einen weitere klinische Studien folgen, zum anderen Grundlagenforschung im Sinne von Versuchen in der Zellkultur bzw. dem Tiermodell betrieben werden.



## 5.2 Allgemeine Beobachtungen

Bereits 1992 zeigten Roland et. al, dass die Lokalisation des Primärtumors einen Einfluss auf die Prognose hat. Sie untersuchten über 2000 Fälle, wobei Mundhöhlen- und Larynxkarzinomen allgemein besser differenziert waren als Pharynxkarzinome und wahrscheinlich aufgrund dessen eine bessere Prognose aufwiesen. Auch das mittlere Lymphknotenstadium war bei Patienten mit Mundhöhlen- und Larynxkarzinomen geringer (Roland et al., 1992).

Auch mit dem hier untersuchten Kollektiv konnte gezeigt werden, dass sowohl das Grading als auch das N-Stadium Einfluss auf die Prognose nahmen – je geringer differenziert das Tumorgewebe war und je größer und zahlreicher die Lymphknotenmetastasen, desto schlechter war die Prognose. Betrachtet man die verschiedenen Primärlokalisationen, so zeigt sich in dieser Arbeit die mit Abstand schlechteste Prognose für Hypopharynxkarzinome, die beste für Mundhöhlen- und Larynxkarzinome. Vergleicht man nun die Differenzierungsgrade von Tumorgewebe aus den verschiedenen Primärlokalisationen, so sind die Mundhöhlenkarzinome im Mittel am besten differenziert, die Hypopharynxkarzinome am schlechtesten. Im Vergleich mit lokalen Lymphknotenmetastasen zeigt sich ein ähnliches Bild: Hypopharynxkarzinome haben das höchste N-Stadium, Mundhöhlenkarzinome das niedrigste. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass aufgrund schlechterer Differenzierung und eines höheren N-Stadiums Hypopharynxkarzinome das schlechteste Überleben zeigen und umgekehrt Mundhöhlenkarzinome aufgrund der besten Differenzierung und der geringsten Neigung zu Lymphknotenmetastasen das beste Outcome haben. Larynx- und Oropharynxkarzinome bewegen sich dazwischen, sowohl beim Betrachten des Gratings, des N-Stadiums als auch in der Prognose.

Vergleicht man die Tumorgrößen – also die T-Stadien – mit den verschiedenen Lokalisationen, so erhält man ein ähnliches Bild. Hypopharynxkarzinome sind bei Erstdiagnose im Schnitt am größten, Mundhöhlenkarzinome am kleinsten. Da das Tumolvolumen maßgeblich mit der Prognose korreliert (O-charoenrat et al., 2003; Fukano et al., 1997) - so dass Patienten mit einem eher kleinen Tumor weniger Lymphknotenmetastasen und eine bessere Überlebenschance aufweisen - kann auch dieser Zusammenhang ein entscheidender Faktor für die unterschiedliche Prognose bei unterschiedlichen Tumorlokalisationen sein.

Fukano und O-charoenrat postulierten, dass die schlechtere Prognose bei größeren, und damit tiefer ins Gewebe eindringenden Tumoren vor allem aufgrund des dadurch größeren Risikos an Lymphknotenmetastasen zusammenhängt. In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass Faktoren wie Tumorgröße, N-Stadium und Grading Einfluss auf die Prognose haben und dass Tumoren in Primärlokalisationen mit schlechterer Prognose auch eine für die Prognose „schlechtere“ Zusammenstellung dieser Faktoren aufweisen. Welcher Faktor aber den größten Einfluss auf ein bessere oder schlechtere Prognose hat, lässt sich anhand dieser Daten nicht zeigen. Betrachtet man die unterschiedlichen Überlebenskurven, so ist die Differenz der Kurven jedoch bei den

verschiedenen Tumorgrößen am auffälligsten, was jedoch schlichtweg mit der späteren Diagnosestellung aufgrund von später auftretenden Symptomen beispielsweise am Hypopharynx zusammenhängen kann.

Außerdem zeigen Patienten dieses Kollektivs – ähnlich wie auch andere Kollektive von Patienten mit HNSCC - mit einem Lokalrezidiv ein deutlich schlechteres Überleben als Patienten, die rezidivfrei bleiben (vgl. Hauswald et al., 2011). Vergleicht man die Tumoren verschiedener Primärlokalisationen nun hinsichtlich der Rezidivquote, so haben überraschenderweise die Karzinome der Mundhöhle mit ca. 34% die höchste Rezidivrate und Hypopharynxkarzinome nur eine Rezidivrate von 12,5%. Bei Larynxkarzinomen scheint es hier am seltensten Rezidive zu geben. Dies ist sicherlich ein Mitgrund, warum die Überlebenskurven der verschiedenen Tumorlokalisationen nicht so enorm auseinander klaffen, wie man es nach vorangegangenen Überlegungen erwarten würde.

Es lässt sich zusammenfassen, dass in diesem Kollektiv die Primärlokalisation in Zusammenschau mit der Tumorgroße, dem Ausmaß der Lymphknotenmetastasen, dem Differenzierungsgrad sowie dem Auftreten von Rezidiven prognostisch bedeutend sind und zwar in dem Sinne, dass eine größere Tumorausdehnung, mehr und/oder größere Lymphknotenmetastasen, eine schlechtere Differenzierung und das Auftreten eines Rezidivs die Prognose des Patienten verschlechtert, was sicherlich der Erwartung entspricht und mit ähnlicher Literatur konform ist.

### **5.3 Prognostische Aussagekraft und Angiogeneseverhalten verschiedener Tumorparameter**

#### **5.3.1 HPV16 und p16**

Der kausale Zusammenhang zwischen der HPV16-Infektion und Zervixkarzinomen ist lange bekannt. Im Jahr 2000 wurde durch Maura Gillison nun auch der Kausalzusammenhang zwischen der lokalen Infektion mit dem Virus und Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen (Gillison et al., 2000). Da in Oropharynxkarzinomen der größte Anteil an HPV-positiven Zellen gefunden wurde und da der Primärtumor HPV-positiver Lymphknotenmetastasen meist im Oropharynx lokalisiert wurde, wird angenommen, dass vor allem Oropharynxkarzinome mit der Infektion durch das Virus zusammenhängen (Gillison et al., 2008). Seitdem beschäftigen sich etliche Forschungsgruppen mit der Entstehung, Prognose und Therapie HPV16-assoziiierter Kopf-Hals – bzw. Oropharynxkarzinome.

So werden in der Literatur HPV16-positive Kopf-Hals-Tumore bzw. Tumore mit hochpositiver p16-Expression allgemein als prognostisch günstig beschrieben. Im Jahr 2010 veröffentlichte Dayyani in „Head and Neck Oncology“ eine Metaanalyse über 34 Studien seit 1980, die sich mit

Kopf-Hals-Tumoren in Zusammenhang mit einer HPV-Infektion beschäftigt hatten (Dayyani et al., 2010). Hier waren 21% der 5681 Kopf-Hals-Tumoren HPV-positiv, bei den meisten wurde der Subtyp 16 nachgewiesen. Wurden lediglich die Oropharynxkarzinome betrachtet, so zeigte sich hier sogar eine HPV-Prävalenz von 41%.

Die Assoziation zwischen einer Infektion mit HPV16 und einer Überexpression von p16 in den Tumoren wird als so deutlich beschrieben, dass Klusmann et al. den p16-Status bei oropharyngealen Karzinomen sogar als Surrogatmarker für eine Infektion mit HPV vorschlugen (Li et al., 1994; Klusmann et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte eine höhere p16-Expression in HPV-positiven Oropharynx- und Larynx Tumoren nachgewiesen werden, der Zusammenhang war jedoch nicht als signifikant zu werten. 24,2% der HNSCC waren HPV16-positiv, die Oropharynx Tumore für sich genommen waren in 33,3% der Fälle HPV16-positiv (bei einer Gesamtzahl von 30), was ungefähr mit der Literatur vergleichbar ist. Da in 33 der 34 oben genannten Studien das Virus per PCR nachgewiesen wurde, in dieser Arbeit jedoch die In-Situ-Hybridisierung durchgeführt wurde, bei der lediglich Zellen als positiv gelten, wenn die Virus-DNA sich im Zellkern befindet, kann dies den etwas geringeren Prozentsatz der als HPV-positiven Tumore gewerteten Gewebe erklären (Boy et al., 2006). Denn es ist bekannt, dass die meisten HPV-Infektionen transient verlaufen und nach einigen Monaten ausheilen können bzw. dass nur bei einem kleinen Teil der Infizierten auch nach einigen Jahren noch eine persistierende Infektion nachgewiesen werden kann (Trottier et al., 2006 und Sycuro et al., 2008), denn erst der Übergang von episomal in der Zelle gelegener Virus-DNA zur Integration ins menschliche Genom scheint die tumoröse Entartung zu ermöglichen (zu Hausen et al., 1994).

Der positive Nachweis von HPV-DNA gilt weithin als prognostischer Marker für längeres Überleben (Dayyani et al., 2010), wobei in den meisten Studien Patienten mit allen verschiedenen Therapieregimen – also operative Therapie mit oder ohne adjuvante Radio-(Chemo-)Therapie und primäre Radio-(Chemo-)Therapie – eingeschlossen wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen jedoch denen der Literatur: Patienten des hier untersuchten Kollektives, die HPV16-positiv waren, hatten eine weitaus schlechtere Prognose. Auch wenn der HPV16-Status hier nicht signifikant mit dem p16-Status korreliert, so zeigt sich doch ähnliche Tendenz für p16-positive Tumoren: je höher p16 exprimiert war, desto schlechter war das Gesamtüberleben. Auch dies widerspricht der Literatur. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre der Ausschluss primär bestrahlter Patienten von dieser Studie, denn in der Literatur wird auch einheitlich beschrieben, dass HPV-positive Kopf-Hals-Tumoren zwar schlechter differenziert sind und ein höheres N-Stadium aufweisen, jedoch besser auf Strahlentherapie und kombinierte Strahlenchemotherapie ansprechen (Dayyani et al., 2010). Ähnliches konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden: Es gab zwar keinen signifikanten Zusammenhang zwischen HPV-positiven Tumoren und der Differenzierung, jedoch zeigten HPV-positive Tumore ein signifikant höheres N-Stadium ( $p=0,032$ ) sowie mehr Rezidive ( $p=0,011$ ) auf. Beides ist korreliert signifikant

mit einer schlechteren Prognose und kann so das schlechtere Überleben HPV-positiver, nicht primär bestrahlter Tumoren erklären. Interessant wäre nun, dieses Ergebnis mit dem Ergebnis eines primär bestrahlten Kollektives zu vergleichen.

### **5.3.2 BKB1R**

Zur prognostischen Aussagefähigkeit der Expression von BKB1R in Tumorgewebe gibt es momentan keine Literatur. Dlamini und Bhoola untersuchten die Expression von BKB1R in Ösophagustumoren, konnten in ihrer Arbeit jedoch keine höhere Expression von BKB1R in Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Plattenepithel nachweisen (Dlamini et al., 2005). In Prostatakarzinomen konnte dies aber gezeigt werden (Taub et al., 2003). Außerdem scheint eine erhöhte BKB1R-Expression mit einer höheren Invasivität, beispielsweise bei östrogenabhängigen Mammakarzinomen, einherzugehen (Ehrenfeld et al., 2011). Olejek et al beschrieben zudem eine höhere BKB1R-Expression in HPV-positiven Cervix-Karzinomen als im Normalgewebe (Olejek et al, 2000).

In dieser Arbeit konnte eine signifikant höhere BKB1R-Expression in Plattenepithelkarzinomen als im normalen Epithel des Kopf-Hals-Bereiches gezeigt werden, die sogar noch von der Höhe der Expression in Lymphknotenmetastasen überstiegen wurde.

Die sehr hohe Expression in tumorbefallenen Lymphknoten, aber auch die hohe Expression in Tumorgewebe an sich, könnte darauf zurückzuführen sein, dass BKB1R vor allem in entzündlichem Gewebe hochreguliert wird (Schanstra et al., 1998; Ni et al., 1998). Denn Tumorzellen fördern durch Produktion von diversen proinflammatorischen Komponenten Entzündungsreaktionen (Coussens et al., 2002). Diese These wurde auch von dem signifikant positiven Zusammenhang zwischen BKB1R-Expression im Tumorgewebe und dem CRP-Wert im Serum untermauert.

Betrachtet man nun die prognostische Aussagefähigkeit der BKB1R-Expression im Tumorgewebe, so zeigt sich in dieser Arbeit ein deutlich besseres Überleben bei höherer BKB1R-Expression als bei geringerer Expression. Dies - in Zusammenschau mit der Abhängigkeit vom CRP-Wert - könnte den Schluss nahelegen, dass das Überleben der Patienten mit höherer BKB1R-Expression aufgrund einer möglicherweise stärker ausgeprägten Entzündungsreaktion des Gewebes besser ist. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Überlebenskurve und dem CRP-Wert im Serum der Tumorpatienten konnte hier jedoch nicht gezeigt werden. Dieser These müsste in weiteren Studien zur Überlebenskurve in Abhängigkeit von verschiedenen Entzündungsparametern nachgegangen werden.

Interessant erscheint auch die hier gezeigte signifikant positive Korrelation zwischen der BKB1R-Expression und der Expression von HPV16 sowie p16. Auch dieser Zusammenhang scheint bisher nicht untersucht worden zu sein, so dass viel Raum für Spekulationen bleibt. Zum einen ist

es denkbar, dass HPV16-induzierte HNSCC eher eine Entzündungsreaktion verursachen als andere HNSCC. Außerdem geht man davon aus, dass HPV16-assoziierte Karzinome sich vor allem in lymphatischem Gewebe – also den Zungengrundtonsillen und den Gaumenmandeln – finden, wo von Haus aus mehr Entzündungsreaktionen stattfinden als in anderem Plattenepithelgewebe (Paz et al., 1997).

Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass p16 oder durch die HPV16-Infektion hochregulierte Faktoren wiederum die Expression von BKB1R fördern oder umgekehrt.

Es wäre in diesem Falle also zum Einen noch zu klären, ob eine Entzündungsreaktion mit daraus folgender höherer BKB1R-Expression prognostisch zuträglich ist, wobei sicherlich auch weitere Entzündungsparameter von Interesse wären. Zum anderen wäre interessant, ob sich der positive Zusammenhang zwischen Höhe BKB1R-Expression und HPV16-Infektion bzw. p16-Expression in weiteren Studien bestätigt und welcher Mechanismus dem zugrunde liegt.

### **5.3.3 BKB2R**

Es ist bekannt, dass der Bradykininrezeptor B2 ubiquitär vorhanden ist und somit auch in Normalgewebe regelmäßig nachzuweisen ist (Leeb-Lundberg et al., 2005). Auch in der immunhistochemischen Färbung dieser Arbeit konnte der BKB2R sowohl in Normal-, als auch in Tumor- und Lymphknotengewebe nachgewiesen werden. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von BKB2R in Normal- und Tumorgewebe, wobei die Expression im Tumorgewebe etwas höher lag als in Normalgewebe ( $p < 0,05$ ). Dies wurde auch von Zhang et al. bestätigt (Zhang et al., 2008), wobei auch diese Arbeitsgruppe einen signifikanten Unterschied in der Expression von BKB2R zwischen Normal- und Tumorgewebe nachweisen konnten ( $p = 0,045$ ).

Auch zeigen sich große Unterschiede im Expressionsverhalten von BKB2R im Tumorgewebe zwischen verschiedenen Patienten. Betrachtet man die prognostische Signifikanz, so zeigt sich in der Überlebenskurve zunächst ein besseres Überleben bei Patienten mit hochgradiger BKB2R-Expression im Tumorgewebe, im Gegensatz zur mittelgradig ausgeprägten BKB2R-Expression. Allerdings verschmelzen beide Überlebenskurven nach 10 Jahren, so dass am Ende des Beobachtungszeitraumes kein Unterschied mehr zu erkennen ist. Dies erklärt, warum der Einfluss der BKB2R-Expression auf das Überleben nicht statistisch signifikant ist.

Diese Ergebnisse stehen in leichtem Widerspruch mit der aktuellen Literatur. So wird angenommen, dass Bradykininrezeptoren eine Rolle in der Tumorangio-genese spielen, diese fördern und so das Tumorstadium begünstigen (Ikeda et al., 2004; Emerich et al., 2001). Für Brustkarzinome konnte außerdem nachgewiesen werden, dass bei Überexpression von BKB2R die Tumorzell-Proliferation gesteigert ist (Greco et al., 2005). Allerdings fehlen bisher Studien, die den Einfluss verschieden ausgeprägter BKB2R-Expression auf das Überleben untersuchen.

Vergleicht man in Tumorgewebe das Expressionsmuster von BKB2R mit verschiedenen anderen Angiogenesemarkern, so zeigt sich ein hochsignifikant positiver Zusammenhang zwischen der Höhe des BKB2R und der SphK ( $p < 0,01$ ) sowie ein auf dem 10-prozentigen Signifikanzniveau signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von BKB2R und egfR. Außerdem scheint auch VEGFR bei starker Expression von BKB2R hochreguliert zu sein, wenn auch nicht statistisch signifikant ( $p = 0,112$ ). Diese Beobachtungen gehen mit der Literatur konform und unterstützen die Aussage, dass BKB2R wesentlich an der Angiogenese beteiligt ist. Es wurde bereits vor einigen Jahren beschrieben, dass die Bildung von Sphingosinkinase durch BKB2R-Überexpression stimuliert werden kann (Blaukat et al., 2001). Außerdem wurde in einer Studie gezeigt, dass Mäuse, die kein Bradykinin bilden können, eine geringere Expression von VEGFR2 und damit auch ein schlechteres Tumorstadium aufwiesen (Ykeda Y. et al., 2004).

Interessant ist vor allem die Beobachtung, dass sowohl BKB2R, als auch BKB1R signifikant mit dem Tumorsuppressor-Protein p16 korrelieren ( $p < 0,05$ ). Hierin könnte ein Grund für das bessere Überleben während der ersten 5-7 Jahre bei Überexpression von BKB2R oder BKB1R liegen: Eventuell sind Bradykinin und seine Rezeptoren nicht nur an der Angiogenese und Entzündungsreaktion beteiligt, sondern stimulieren die Expression von p16 und haben so eine tumorsuppressive Wirkung. Ein solcher Zusammenhang konnte bis jetzt jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Außerdem zeigte sich ein hochsignifikant negativer Zusammenhang zwischen dem N-Stadium und der Expression von BKB2R ( $p = 0,002$ ), so dass auch die geringe Metastasierung eine Erklärung für das zunächst bessere Überleben der Patienten sein kann. Die schlechtere Differenzierung bei hoher BKB2R-Expression ( $p = 0,04$ ) könnte bei primär operierten Patienten eine untergeordnete Rolle spielen.

#### **5.3.4 VEGFR2**

Der VEGF-Rezeptor-2 scheint besonders wichtig für die Induktion der Endothelzellproliferation zu sein, wie durch die Herstellung von VEGF-Mutanten, die entweder an VEGFR1 oder -2 binden können, gezeigt wurde (Keyt et al., 1996).

Allerdings konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied in der Expression von VEGFR2 in Tumor- und Normalgewebe gezeigt werden ( $p = 0,44$ ). Zwischen der Expression von VEGFR2 in Normal- und befallenen Lymphgewebe konnte ein etwas größerer, wenn auch nicht signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,22$ ), VEGFR2 war in allen Gewebearten eher hoch exprimiert. In der Arbeit von Lalla et al. konnte jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der VEGFR2-Expression in Gefäßendothelzellen und Tumorzellen gezeigt werden, der vor allem in der Intensität bestand (Lalla et al., 2003). Auch konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen erhöhter Expression von VEGFR2 und Tumorstadium, der vor allem in der Intensität bestand (Lalla et al., 2003). Auch konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen erhöhter Expression von VEGFR2 und Tumorstadium, der vor allem in der Intensität bestand (Lalla et al., 2003).

Lymphknotenmetastasen, Rezidivhäufigkeit oder dem Gesamtüberleben errechnet werden. Zumindest ein Zusammenhang zum T-Stadium und der Prognose scheint jedoch als gegeben angesehen zu sein, wobei in den meisten Studien der Wachstumsfaktor VEGF, und nicht ein einzelner Rezeptor untersucht wurden (Kyzas et al., 2005).

Auch in einer Metaanalyse von 3 Studien konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der VEGF-Expression und dem Gesamtüberleben, nicht aber der Anzahl der Lymphknotenmetastasen gezeigt werden (Kyzas et al., 2005). Allerdings wurde in der Metaanalyse lediglich das 2-Jahres-Überleben berücksichtigt.

Betrachtet man den VEGFR2 in Zusammenschau mit den anderen hier untersuchten Parametern, so fällt auf, dass sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Expression von VEGFR2 und BKB1R bzw. p16, und ein tendenziell positiver Zusammenhang mit der Expression von BKB2R und HPV16 zeigen. Es wurde bereits beschrieben, dass Bradykinin über den VEGF-Rezeptor zur Angiogenese anregen kann, denn im Gegensatz zu Wildtypmäusen konnte in Mäusen ohne VEGF-Rezeptor durch Zugabe von Bradykinin die Angiogenese kaum stimuliert werden (Sanchez et al., 2008). Es wäre also durchaus möglich, dass die Stimulation des VEGF-Rezeptors über den Bradykinin-Bradykininrezeptor-Weg passiert und dass es eine Interaktion zwischen beiden Rezeptoren gibt. Der genaue Mechanismus bleibt noch zu klären.

### **5.3.5 SphK1**

Es konnte hier eine hochsignifikante Überexpression von SphK1 in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe nachgewiesen werden ( $p < 0,01$ ). Allerdings konnte kein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von SphK1 und der TumorgroÙe oder dem Differenzierungsgrad gezeigt werden. Logisch erscheint demnach, dass die Expression von SphK1 auch kaum Einfluss auf die Prognose zeigte. So kann die SphK1 nicht als prognostischer Marker gewertet werden. Allerdings konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen der Expression von SphK1 im Tumor und dem Lymphknotenstadium gezeigt werden. Über diesen Zusammenhang gibt es sehr wenig Literatur, allerdings wurde ein Zusammenhang bei Mammakarzinomen beschrieben: SphK1 scheint einen von egfR unabhängigen Effekt auf die Migration zu haben (Hart et al., 2005). Dies könnte auch bei HNSCC der Fall sein und eine Erklärung für diesen positiven Zusammenhang sein.

Für die SphK1 wurde bereits eine überlebens- und (Endothel-)proliferationsfördernde Wirkung gezeigt (Maceyka et al., 2002). Diese These konnte untermauert werden durch signifikant positive Korrelationen zwischen SphK1 und den Proliferationsfaktoren egfR ( $p = 0,024$ ), pAKT ( $p = 0,05$ ) und pMAPK ( $p < 0,01$ ) im Tumorgewebe sowie dem Angiogenesefaktor BKB2R ( $p = 0,001$ ). So scheint die Überexpression von SphK1 im Tumorgewebe die Proliferation und Angiogenese positiv zu beeinflussen. Die Zusammenhänge zwischen der Expression von SphK1

und egfR, pAKT und pMAPK wurden bereits in der Literatur beschrieben und gehen mit anderen Beobachtungen und Thesen konform (Meyer zu Heringdorf et al., 1999; Nemoto et al., 2009). Eine positive Korrelation zwischen SphK1 und BKB2R wurde bis jetzt nicht direkt untersucht, allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivierung des BKB2R die Aktivität von SphK1 stimuliert (Blaukart et al., 2001). Worauf dieser Zusammenhang basiert, muss noch geklärt werden.

#### **5.4 HPV16-induzierte Karzinome als eigene Tumorentität**

Verschafft man sich einen Überblick über die Literatur, die sich mit HPV16-positiven HNSCC beschäftigt, so scheinen diese Tumoren eine eigene Entität darzustellen.

Zunächst einmal scheint die Krankheit eher bzw. auch Patienten zu betreffen, die keine Noxen wie Alkohol oder Tabak konsumieren. Dafür scheint ein sexuell freizügigeres Verhalten ein Risikofaktor zu sein, so dass Patienten, die mehrere Sexualpartner - vor allem Oralpartner - angeben, häufiger betroffen zu sein (Gillison ML et al., 2008). Dies könnte auch das Ansteigen der Inzidenz von Tonsillenkarcinomen erklären (Hammerstedt et al., 2006). Die Betroffenen sind im Durchschnitt jünger und gehören einer höheren sozialen Schicht an. Außerdem sind vor allem Patienten mit Oropharynx- und Mundhöhlenkarzinomen HPV16-positiv (Gillison ML et al., 2008). HPV16-positive Tumoren scheinen allgemein schlechter differenziert und bei Erstdiagnose ein höheres N-Stadium aufzuweisen, jedoch strahlen- und chemosensitiver zu sein als die übrigen HNSCC (Dayyani et al., 2010; Fakhry et al., 2008).

Auch in dieser Arbeit bestätigt sich das Bild einer anderen Entität HPV16-positiver HNSCC. HPV-positive HNSCC waren etwas häufiger bei Nichtrauchern zu finden und auch das Alter der Patienten mit HPV-positiven HNSCC lag bei Erstdiagnose etwa 2 Jahre unter dem der Patienten mit HPV-negativen HNSCC. Alleine die Oropharynxkarzinome betrachtet, lag das Alter HPV-positiver Tumorpatienten sogar 3 Jahre und 8 Monate unter dem der anderen Tumorpatienten.

Ein möglicher Grund für den Altersunterschied wäre die höhere Aggressivität der Tumorzellen, die sich auch in diesem Kollektiv in einem höheren N-Stadium und einer höheren Rezidivquote und – wie oben bereits erwähnt – in der Literatur in einer schlechteren Differenzierung niederschlägt.

Zusammenfassend kann man aufgrund des anderen Noxenumfelds, des unterschiedlichen Patientengutes, des aggressiveren Tumorverhaltens und der besseren Ansprache auf Strahlen- und Chemotherapie davon ausgehen, dass HPV-positive HNSCC eine eigene Tumorentität darstellen.



## 5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keiner der hier untersuchten Parameter, über eine Nachbeobachtungszeit von insgesamt 13,5 Jahren, eine signifikant prognostische Aussagekraft besitzt. Eine Tendenz zur besseren Prognose lässt sich allerdings bei einem negativen HPV16-Status sowie bei geringerer Ausprägung von p16 zeigen. Außerdem dauert es zunächst länger, bis Patienten mit einer hohen Expression von BKB1R sowie BKB2R an ihrer Tumorerkrankung sterben. Interessant ist, dass gerade die Expression „typischer“ Angiogenesemarker wie SphK1 und VEGFR2 keinen Einfluss auf die Überlebenskurve zeigen.

Zwischen den einzelnen Angiogeneseparametern gibt es Zusammenhänge, über die in der Literatur schon länger spekuliert wird und die in dieser Arbeit untermauert werden konnten. Genaue Interaktionsmechanismen sind allerdings bis jetzt kaum erforscht.

HPV16-positive Kopf-Hals-Karzinome sind sicherlich als eigene Tumorentität zu werten, wenn auch in dieser Arbeit keine Unterscheidung getroffen werden konnte zwischen HPV16-induzierten Karzinomen und Karzinomen, bei denen lediglich das Virus intrazellulär nachgewiesen werden konnte. Entgegen der Annahme, dass HPV16-positive Kopf-Hals-Tumore eine bessere Prognose aufweisen, zeigte sich hier bei einem Kollektiv primär operierter Patienten eine gegenteilige Überlebenskurve. Von Interesse wäre sicherlich hier der Vergleich zur Überlebenskurve einer primär bestrahlten Population.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Abb	Abbildung
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Complex Methode
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BKB1R	Bradykinin-1-Rezeptor
BKB2R	Bradykinin-2-Rezeptor
CA	Carcinom
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
CISH	Chromogen-In-Situ-Hybridisierung
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CUP	Carcinom mit unklarem Primärtumor
DAB	3,3-Diaminobenzidin
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleid Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ENS	Extranodal spread (Kapselüberschreitung)
ERK1/2	Extracellular-regulated kinase 1 and 2
EU	Europäische Union
Fc	Fragment crystallizable, der konstante Bereich eines Antikörpers.
FGF-4	Fibroblast-Growth-Factor-4
Flk-1	VEGFR-2
Flt-4	VEGFR-3
γ-GT	gGT - gamma-Glutamyl-Transpeptidase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyramat-Transaminase
Hb	Hämoglobin
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinomas
HPV	Humanes Papillomavirus
kDA	Kilo-Dalton

KDR	Kinase insert domain containing receptor (= VEGF-Rezeptor-2)
l	Liter
LK	Lymphknoten
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
mRNA	Messenger ribonucleid acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ND	Neck Dissection
NGF	Nerve Growth Factor
NNH	Nasennebenhöhlen
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
p16	Protein 16
p53	Protein 53
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
PET	Positronenemissionstomographie
pH	Pondus Hydrogenii (lat. pondus = Gewicht; lat. hydrogenium = Wasserstoff)
PIGF	Placenta-Growth-Factor
Rac	Ras-related C3-botulinum toxin substrate
Rho	Ras homology
SCC	Squamous cell carcinomas
SphK	Sphingosinkinase
T	Tumorgröße
N	Lymphknotenstadium
M	Fernmetastasen
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TNM	Tumor, Node, Metastasis
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
VEGF	Vasoendothelial growth factor
VEGFR	Vasoendothelial growth factor receptor
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor

## 7 Literaturverzeichnis

### A

---

Alemanly R, Meyer zu Heringdorf D, van Koppen CJ (1999) Formyl peptide receptor signaling in HL-60 cells through sphingosine kinase. *J Biol Chem* 274:3994-3999

Alvarez MCA, Llorente PJL, Franco GV, Hermsen MA, Franco Albalad MP, Fernández Espina H, Suárez Nieto C (2006) Second primary tumors in head and neck cancer. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 57(10):462-466

Ambrosch P, Kron M, Steiner W (1998) Carbon dioxide laser microsurgery for early supraglottic carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 107(8):680-688

Antonio A, Rocher ESm (1962) Coronary vasodilation produced by bradykinin on isolated mammalian heart. *Circ Res* 11:910-915

Asano M, Yukita A, Matsumoto T, Kondo S, Suzuki H (1995) Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor. *Cancer Res* 55(22):5296-5301

### B

---

Bascands JL, Pecher C, Girolami (1993) Indirect inhibition by bradykinin of cyclic AMP generation isolated rat glomeruli and mesangial cells. *Mol Pharmacol* 44(4):818-826

Baseman JG, Koutsky LA (2005) The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 32(1):16-24

Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103(2):159-165

Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3(6):401-410

Blaukat A, Herzer K, Schroeder C (1999) Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtyp-specific phosphorylation. *Biochem* 38:1300-1309

Blaukat A, Dikic I (2001) Activation of Sphingosine Kinase by the Bradykinin B2 Receptor and Its Implication in Regulation of the ERK/MAP Kinase Pathway. *Biol Chem* 382:135-139

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr (1988) Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Research* 48:3282-3287

Boyer SN, Wazer DE, Band V (1996) E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cancer Res* 56:4620-4624

Boy S, Rensburg EJV, Engelbrecht S (2006) HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas – commensal, aetiological agent or contamination? *J oral pathol med* 35(2):86-90

Brown LM, Mason TJ, Pickle LW, Stewart PA, Buffler PA, Burau K, Ziegler RG, Fraumeni JF Jr (1988) Occupational Risk Factors for Laryngeal Cancer on the Texas Gulf Coast. *Cancer Research* 48:1960-1964

## C

---

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D (1996) Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56:2488-2499

Caamano J, Zhang SY, Rosvold EA, Bauer B, Klein-Szanto AJ (1993) p53 alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 142(4):1131-1139

Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395

Chan ATC, Teo PML, Huang DP (2004) Pathogenesis and Treatment of Nasopharyngeal Carcinoma. *Semin Oncol* 31:794-801

Chaturverdi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML (2008) Incidence Trends for Human Papillomavirus–Related and –Unrelated Oral Squamous Cell Carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 26:612-619

Claffey KP, Robinson GS (1996) Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 15(2):165-176

Collignon J, Gennigens C, Rorive A, Coucke P, Lifrange E, Maweja S, Fillet G, Jerusalem G (2009) Monoclonal antibodies and breast cancer. Current therapeutic progress. *Rev Med Liege* 64(5-6):279-283

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, Machtay M, Ensley JF, Chao KS, Schultz CJ, Lee N, Fu KK (2004) Postoperative Concurrent Radiotherapy and Chemotherapy for High-Risk Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 350(19):1937-1944

Cornelius CP, Andratschke M, Leunig A, Hilscher C (2009) Neck Dissection. In: *Manual Kopf-Hals-Malignome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 4. Auflage, Zuckerschwerdt Verlag München. S. 52-60

Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420 (6917) 860-867

Crile G (1906) Excision of cancer of the head and neck. With special consideration of the plan of dissection based on one hundred and thirty two operations. *JAMA* 4:1780-1785

## D

---

Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS (2010) Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head & Neck Oncology* 2:15

de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX (2007) Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 7(7):453-459

Dellian M (2009) Laserchirurgie. In: Manual Kopf-Hals-Malignome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 4. Auflage, Zuckerschwerdt Verlag München. S. 49-51

Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Nusgens BV, Lapière CM (1997) Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 57:5590-5597

De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255:989-991

Dlamini Z, Bhoola KD (2005) Upregulation of tissue kallikrein, kinin B1 receptor, and kinin B2 receptor in mast and giant cells infiltrating oesophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 58:915-922

Drube S, Liebmann C (2000) In various tumour cell lines the peptide bradykinin B2 receptor antagonist, Hoe 140 (Icatibant), may act as mitogenic agonist. *British Journal of Pharmacology*. 131:1553-1560

## E

---

Ehrenfeld P, Conejeros I, Pavicic MF, Matus CE, Gonzalez CB, Quest AF, Bhoola KD, Poblete MT, Burgos RA, Figueroa CD (2011) Activation of kinin B1 receptor increases the release of metalloproteases-2 and -9 from both estrogen-sensitive and -insensitive breast cancer cells. *Cancer Lett* 301(1):106-118

Elwood JM, Pearson JCG, Skippen DH, Jackson SM (1984) Alcohol, Smoking, Social and Occupational Factors in the Aetiology of Cancer of the Oral Cavity, Pharynx and Larynx. *Znt J Cancer* 34:603-612

Emami B, Spector JG (1998) Hypopharynx. In: Perez CA, Brady LW (eds) Principles and Practice of Radiation Oncology Lippincott-Raven 1047-1068

Emerich DF, Dean RL, Snodgrass P, Lafreniere D, Agostino M, Wiens T, Xiong H, Hasler B, Marsh J, Pink M, Kim BS, Perdomo B, Bartus RT (2001) Bradykinin modulation of tumor vasculature: II. activation of nitric oxide and phospholipase A2/prostaglandin signaling pathways synergistically modifies vascular physiology and morphology to enhance delivery of chemotherapeutic agents to tumors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 296(2):632-641

English D, Kovala AT, Welch Z, Harvey KA, Siddiqui RA, Brindley DN, Garcia JG (1999) Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *J Hematother Stem Cell Res* 8:627-634

## F

---

Faussner A, Bathon JM, Proud D (1999) Comparison of the response of B1 and B2 kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacology* 45:13-20

Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18(1):4-25

Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161(2):851-858

Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marmé D, Siemeister G (1997) Sp 1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* 15:669-676

Folkman J (1971) Tumour angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186

Folkman J (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82:4-6

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D (2001) Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 345(26):1890-1900

Fournier E, Virnbaum D, Borg JP (1997) Receptors for factors of the VEGF family. *Bull Cancer* 84:397-403

Fracchiolla NS, Pignataro L, Capaccio P, Trecca D, Boletini A, Ottaviani A, Polli E, Maiolo AT, Neri A (1995) Multiple genetic lesions in laryngeal squamous cell carcinomas. *Cancer* 75(6):1292-1301

Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, Devens F, Benner A, Bosch FX, Lichter P, Hofele C (2003) Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63(6):1179-1182

Fukano H, Matsuura H, Hasegawa Y, Nakamura S (1997) Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Head Neck* 19(3):205-210

## G

---

Geene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M (2002) *AJCC Cancer Staging Manual*, 6 edn. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York/London/Paris/Tokyo/Hong Kong

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000) Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 92:709-720

Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R (2008) Distinct Risk Factor Profiles for Human Papillomavirus Type 16 – Positive and Human Papillomavirus Type 16 – Negative Head and Neck Cancers. *JNCI* 100:407-420

Glade-Bender J, Kandel JJ, Yamashiro DJ (2003) VEGF blocking therapy in the treatment of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 3(2):263-276

Gospodarowicz MK, Miller D, Groome PA, Greene FL, Logan PA, Sobin LH (2004) The process for continuous improvement of the TNM classification. *Cancer* 100:1-5

Greco S, Elia MG, Muscella A, Romano S, Storelli C, Marsigliante S (2005) Bradykinin stimulates cell proliferation through an extracellular-regulated kinase 1 and 2-dependent mechanism in breast cancer cells in primary culture. *The Journal of endocrinology*, 186(2):291-301

Gross G, Ikenberg H, Petry KU, Pfister H, Schneede P, Schöfer H, Szeimies RM (2008) Condylomata acuminata und andere HPV assoziierte Krankheitsbilder von Genitale, Anus und Harnröhre. Leitlinie der Deutschen STD-Gesellschaft in Zusammenarbeit mit der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft. *J Dtsch Dermatol Ges* 6(2):153-162

## H

---

- Harish K (2005) Neck dissections: radical to conservative. *World J Surg Oncol* 3(1):21
- Hart S, Fischer OM, Prenzel N, Zwick-Wallasch E, Schneider M, Hennighausen L, Ullrich A (2005) GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways. *Biol Chem* 386(9):845-855
- Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P (2007) Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 99:777 – 789
- Hauswald H, Simon C, Hecht S, Debus J, Lindel K (2011) Long-term outcome and patterns of failure in patients with advanced head and neck cancer. *Radiation Oncology* 6:70
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB (1995) Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55:4525-4530
- Hicklin DJ, Ellis LM (2005) 1027 Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23:1011-1027
- Hoffmann M, Gorogh T, Gottschlich S, Lohrey C, Rittgen W, Ambrosch P, Schwarz E, Kahn T (2005) Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year- survival-analysis of 73 patients. *Cancer Lett* 218:199-206
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *284:1994-1998*
- Houck KA, Ferrara N, Winter J, Cachianes G, Li B, Leung DW (1991) The Vascular endothelial growth factor family – identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5:1806-1814
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29(11):1349-1353
- Hubbert NL, Sedman SA, Schiller JT (1992) Human Papillomavirus Type 16 E6 Increases the Degradation Rate of p53 in Human Keratinocytes. *J Virol* 66(10):6237-6241
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350(23):2335-2342

## I/J

---

- Ikeda Y, Hayashi I, Kamoshita E, Yamazaki A, Endo H, Ishihara K, Yamashina S, Tsutsumi Y, Matsubara H, Majima M (2004) Host Stromal Bradykinin B2 Receptor Signaling Facilitates Tumor-Associated Angiogenesis and Tumor Growth. *Cancer Res* 64:5178–5185
- Jain RK (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9(6):685-693



Jain RK, Munn LL (2000) Leaky vessels? Call Ang1! *Nat Med* 6(2):131-132

Jares P, Fernández PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, Nayach I, Traserra J, Cardesa A (1994) PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. *Cancer Res* 54(17):4813-4817

Jares P, Fernandez PL, Nadal A, Cazorla M, Hernández L, Pinyol M, Hernández S, Traserra J, Cardesa A, Campo E (1997) p16MTS1/CDK4I mutations and concomitant loss of heterozygosity at 9p21-23 are frequent events in squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene* 15:1445-1453

Jares P, Fernandez PL, Nadal A, Pinyol M, Hernández L, Cazorla M, Hernández S, Beà S, Cardesa A, Campo E (1999) Disregulation of p16MTS1/CDK4I protein and mRNA expression is associated with gene alterations in squamous-cell carcinoma of the larynx. *Int J Cancer* 81(5):705-711

Jussila L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkilä P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A, Detmar M, Tschachler E, Alitalo R, Alitalo K (1998) Lymphatic endothelium and Kaposi's Sarkoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Res* 58:1599-1604

## K

---

Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K et al. (1995) Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 55:5687-5692

Kerbel R, Folkman J (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors *Nat Rev Cancer* 2(10):727-739

Keyt BA, Nguyen HV, Berleau EE, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N (1996) Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors – generation of receptorselective VEGF variants by site directed mutagenesis. *J Biol Chem* 271:5638-5646

Khuri FR, Kim ES, Lee JJ, Winn RJ, Benner SE, Lippman SM, Fu KK, Cooper JS, Vokes EE, Chamberlain RM, Williams B, Pajak TF, Goepfert H, Hong WK (2001) The Impact of Smoking Status, Disease Stage, and Index Tumor Site on Second Primary Tumor Incidence and Tumor Recurrence in the Head and Neck Retinoid Chemoprevention Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:823-829

Klussmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003) Expression of p16 Protein Identifies a Distinct Entity of Tonsillar Carcinomas Associated with Human Papillomavirus. *Am J Pathol* 162(3):747-753

Kohamat T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R, Spiegel S (1998) Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* 273:23722-23728

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med* 4:844-847

Kyzas P, Cunha IW, Ioannidis JP (2005) Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clinical cancer research. AACR* 11(4):1434-1440

Kyzas P, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ (2005) Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *J cancer res clin oncol* 131(9):624-630

L

---

Lang S, Wollenberg B, Steuer-Vogt MK, Schwenzer K, Sautier W, Chucholowski M, Eckel R, Faas I, Wilmes E, Ehrenfeld M, Arnold W, Kastenbauer E, Hölzel D (2002) Klinische und epidemiologische Daten zu Malignomen des Kopf-Hals-Bereichs. *Laryngo-Rhino-Otol* 81:499–508

Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T (1999) Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99:301-312

Lee MJ, Thangada S, Paik JH, Sapkota GP, Ancellin N, Chae SS, Wu M, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Alessi DR, Hla T (2001) Akt-mediated phosphorylation of the G-protein-coupled receptor Edg-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol Cell* 8:693-704

Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57:27 –77

Lewis FA, Griffiths S, Dunicliffe R, Wells M, Dudding N, Bird CC (1987) Sensitive in situ hybridization technique using biotin-streptavidin-polyalkaline Phosphatase complex. *J Clin Pathol* 40:163-166

Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y (1994) Transcriptional repression of the susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* 54:6078-6082

Limaye V, Li X, Hahn C, Xia P, Berndt MC, Vadas MA, Gamble JR (2005) Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. *Blood* 105(8):3169-3177

Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Ide C, Coche E, Weynand B, Desuter G, Hamoir M, Remacle M, Marbaix E (2003) Predictive value of the fraction of cancer cells immunolabeled for proliferating cell nuclear antigen or Ki67 in biopsies of head and neck carcinomas to identify lymph node metastasis: comparison with clinical and radiologic examinations. *Head Neck* 25(4): 280-288

Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, Milstien S, Kohama T, Spiegel S (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem* 275:19513-19520

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage S. 138. Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ (1992) Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of the 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79:328-337

Lundahl RE, Foote RL, Bonner JA, Suman VJ, Lewis JE, Kasperbauer JL, McCaffrey TV, Olsen KD (1998) Combined neck dissection and postoperative radiation therapy in the management of the high-risk neck: A matched-pair analysis. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 40(3):529-534

Lutz J, Scher B, Müller L (2009) Bildgebende Diagnostik: MRT, CT, Sonographie, Angiographie, PET und Szintigraphie. In: Manual Kopf-Hals-Malignome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 4. Auflage, Zuckerschwerdt Verlag München. S. 25-31

## M

---

Maceyka M, Payne SG, Milstein S, Spiegel S (2002) Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585:193-201

Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappa B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385:540-544

Mamelle G, Pampurik J, Luboinski B, Lancar R, Lusinchi A, Bosq J (1994) Lymph Node Prognostic Factors in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Am J Surg* 168:494-498

Mashberg A, Samit AM (1989) Early Detection, Diagnosis, and Management of Oral and Oropharyngeal Cancer. *CA Cancer J Clin* 39:67-88

Mashberg A, Samit AM (1995) Early Diagnosis of Asymptomatic Oral and Oropharyngeal Squamous Cancers. *CA Cancer J Clin* 45:328-351

Mast G, Zimmermann F, Ihrler S (2009) Manual Kopf-Hals-Malignome; Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 4 edn. W. Zuckerschwerdt Verlag München, München

McKaig RG, Baric RS, Olshan AF (1998) Human papilloma-virus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *HeadNeck* 20:250-265

McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ (2001) Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol* 82(1):15-33

Mendenhall WM, Parsons JT, Mancuso AA (1998) Larynx. In: Perez CA, Brady LW (eds) *Principles and Practice of Radiation Oncology*. Lippincott-Raven 1069-1094

Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF (1994) Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 269(34):21583-21586

Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, Alemany R, Guo Y, Schmidt M, Jakobs KH (1999) Role of sphingosine kinase in Ca<sup>2+</sup> signalling by epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett* 461(217-222)

Miller K, Wang M, Gralow J (2007) Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 357(26):2666-2676

Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM (2002) Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 160(3):985-1000

Moss J, Lane MD (1971) The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 35:321-442

Munoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348(6):518-527

## N

---

Nadal A, Cardesa A (2003) Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 442(1):1-7

Nadal A, Campo E, Pinto J, Mallofré C, Palacín A, Arias C, Traserra J, Cardesa A (1995) p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of a correlation with prognostic factors. *J Pathol* 175(2):181-188

Nagpal JK, Das BR (2003) Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol* 39(3):213-221

Nemoto S, Nakamura M, Osawa Y, Kono S, Itoh Y, Okano Y, Murate T, Hara A, Ueda H, Nozawa Y, Banno Y (2009) Sphingosine kinase isoforms regulate oxaliplatin sensitivity of human colon cancer cells through ceramide accumulation and Akt activation. *The Journal of biological chemistry* 284(16):10422-10432

Ni A, Chao L, Chao J (1998) Transcription factor nuclear factor kappa B regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol Chem* 273(5):2784-2791

## O

---

O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, Rhys-Evans P (2003) Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol* 39(4):386-390

Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y (2000) Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor Edg-5 but not Edg-1 or Edg-3. *Mol Cell Biol* 20:9247-9261

Olejek A, Mazurek U, Michalski B, Kuśmierz D, Orchel J, Witek A, Wilczok T (2000) Profiles of expression of genes coding kininogen and kinin receptors as a marker of tissue pathology in cervical cancer coexisting with HPV infection (2000) *Wiad Lek* 53(5-6):247-254

Olivera A, Spiegel S (1993) Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365(557-560)

## P

---

Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP (1997) Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer (Phila.)* 79: 595-604

Pébay A, Toutant M, Prémont J, Calvo CF, Venance L, Cordier J, Glowinski J, Tencé M (2001) Sphingosine-1-phosphate induces proliferation of astrocytes: regulation by intracellular signalling cascades. *Eur J Neurosci* 13(12):2067-2076

Pitson SM, Xia P, Leclercq TM, Moretti PA, Zebol JR, Lynn HE, Wattenberg BW, Vadas MA (2005) Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J Exp Med* 201:49-54

Plate KH, Warnke PC (1997) Vascular endothelial growth factor. *J Neuro-Oncology* 35:365-372

Pouget-Schors D, Zimmermann F, Mast G (2009) Therapieentscheidung und multimodale Therapiekonzepte, Lebensqualität. In: Manual Kopf-Hals-Malignome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 4. Auflage, Zuckerschwerdt Verlag München. S. 39-42

Pugh CW, Ratcliffe PJ (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9(6):677-684

Pyne S, Pyne NJ (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* 349:385-402

## R

---

Lalla RV, Boisoneau DS, Spiro JD, Kreutzer DL (2003) Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors on Tumor Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck* 129:882-888

Regoli D, Jukic D, Gobeil F, Rhaleb NE (1993) Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. *Can J Physiol Pharmacol* 71(8):556-67

Rizzi A, Girolamo C, Amadesi C, Regoli D (1997) Kinin B1 and B2 receptors in pig vessels: characterization of two monoreceptor systems. *Arch Pharmacol* 356:662-670

Robert-Koch-Institut, Angaben zur Inzidenz und Mortalität für die BRD 2004 ([www.rki.de](http://www.rki.de), Zugriff am 03. Dezember 2009)

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Hrsg. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. Aufl. Berlin, Deutschland: Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2008

Roland NJ, Caslin AW, Nash J, Stell PM (1992) Value of grading squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 14:224-229

Röper B, Hölzel D (2009) Prognostische Parameter. In: Manual Kopf-Hals-Malignome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 4. Auflage, Zuckerschwerdt Verlag München. S.18-20

Ruas M, Peters G (1998) The p16INK4a/CDKN2 tumor suppressor and its relatives. *Biochem Biophys Acta* 1378:F115-F177

Ryschich E, Schmidt J, Hämmerling GJ, Klar E, Ganss R (2002) Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis. *Int J Cancer* 97(6):719-725

Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, Kuwano M (1996) Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells – possible roles of SP-1. *J Biol Chem* 271:28220-28228

## S

---

Sandler A (2007) Bevacizumab in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 13:4613-4616

Sanchez ML, Neysari S, Jakob S, Petrmpol M, Butz N, Banfi A, Zaugg CE, Humar R, Battagay EJ (2008) B2-kinin receptor plays a key role in B1-, angiotensin converting enzyme inhibitor-, and vascular endothelial growth factor-stimulated in vitro angiogenesis in the hypoxic mouse heart. *Cardiovascular research* 80(1):106-113

Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, Bascands JL (1998) The B1-agonist [desArg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappa B and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 101(10):2080-2091

Schiel S, Hafner SG, Mast G (2009) Histologische Diagnosesicherung mit praktischer Anleitung zur Probegewinnung. In: *Manual Kopf-Hals-Malignome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 4. Auflage, Zuckerschwerdt Verlag München. S. 33f

Schuler K, Winter W, Betz CS (2009) Tumorresektion. In: *Manual Kopf-Hals-Malignome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 4. Auflage, Zuckerschwerdt Verlag München. S.43-48

Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707

Shingaki S, Takada M, Sasai K, Bibi R, Kobayashi T, Nomura T, Saito C (2003) Impact of lymph node metastasis on the pattern of failure and survival in oral carcinomas. *Am J Surg* 185:278–284

Shirai K, Kaneshiro T, Wada M et al. (2011) A role of sphingosine kinase 1 in head and neck carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 4(3):454-462

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Furuya H, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM, Ogretmen B, Kawamori T (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature (London)* 359:843-845

Simke J, Graeme ML, Sigg EB (1967) Bradykinin induced bronchoconstriction in guinea pigs and its modification by various agents. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 165(2):291-301

Sobin L.H., Wittekind C (2010) *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th Edition, John Wiley & Sons, New York

Som PM (1987) Lymph nodes of the neck. *Radiology* 165:593-600

Steiner W (1993) Results of Curative Laser Microsurgery of Laryngeal Carcinomas. *Am J Otolaryngol.* 14(2):16-121

Strong MS, Jako GJ (1972) Laser surgery in the larynx. Early clinical experience with continuous CO2 Laser. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 81(6):791-8

Strutz J, Arndt O, Mann W (2001) *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie*. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart

Statistisches Bundesamt (2003) *Statistisches Jahrbuch für die Bundesrepublik Deutschland*

Sturgis EM, Wie Q, Spitz MR (2004) Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 31:726-733

Sycuro LK, Xi LF, Hughes JP, Feng Q, Winer RL, Lee SK, O'Reilly S, Kiviat NB, Koutsky LA (2008) Persistence of genital human papillomavirus infection in a long-term follow-up study of female university students. *J Infect Dis* 198(7):971-978

## T

---

Taub JS, Guo R, Leeb-Lundberg LMF, Madden JF, Daaka Y (2003) Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer. *Cancer Res* 63:2037–2041

Taylor-McCabe KJ, Ersahin C, Simmons WH (2001) Bradykinin metabolism in the isolated perfused rabbit heart. *J Hypertens* 19(7):1295-1299

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P (1992) Identification of the KDR tryosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1579-1586

Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA (1989) Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 165(3):1198-1206

Trottier H, Franco EL (2006) The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24(1):1-15

Tumorzentrum München (2009) Manual Kopf-Hals-Malignome. 4. Auflage 9-11. Zuckerschwerdt, München

## U

---

Ueno A, Naraba H, Oh-ishi S (1998) Mouse Paw Edema Induced by a Novel Bradykinin Agonist and it's Inhibition by B2-Antagonists. *Jpn J Pharmacol* 78:109-111

## V

---

Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G (1990) Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 265:19461-19466

van der Flier M, Coenjaerts F, Kimpen JL, Hoepelman AM, Geelen SP (2000) Streptococcus pneumoniae induces secretion of vascular endothelial growth factor by human neutrophils. *Infect Immun* 68:4792-4794

van Oijen MG, Rijksen G, ten Broek FW, Slootweg PJ (1998) Increased expression of epidermal growth factor receptor in normal epithelium adjacent to head and neck carcinomas independent of tobacco and alcohol abuse. *Oral Dis* 4(1):4-8

van Oijen MG, Slootweg PJ (2000) Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clin Cancer Res* 6(6):2138-2145

van Oijen MG, Tilanus MG, Medema RH, Slootweg PJ (1998) Expression of p21 (Waf1/Cip1) in head and neck cancer in relation to proliferation, differentiation, p53 status and cyclin D1 expression. *J Oral Pathol Med* 27(8):367-375

Vanmeir EG, Polverini PJ, Chazin VR, Su Huang HJ, de Tribolet N, Cavenee WK (1994) Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat Genet* 8:171-176

Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, Olsson SE, Høye J, Steinwall M, Riis-Johannessen G, Andersson-Ellstrom A, Elfegren K, Krogh G, Lehtinen M, Malm C, Tamms GM, Giacoletti K, Lupinacci L, Railkar R, Taddeo FJ, Bryan J, Esser MT, Sings HL, Saah AJ, Barr E (2006) High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 95(11):1459-1466

## W

---

Wachtvogel YT, de la Cadena RA (1993) Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. *Thromb Res* 72(1):1-21

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr (1998) Nf $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAFc-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281:1680-1683

Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, Spiegel S (1999) Sphingosine-1-phosphate stimulates cell migration through a Gi-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem* 274:35343-35350

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991) Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl J Med* 324:1-8

Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Sasaki C, Rimm DL, Psyrrri A (2004) Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clinical cancer research* 10(17):5684-5691

Woolgar JA (2005) Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 42(3):221-330

## X/Y/Z

---

Xia P, Gamble JR, Rye KA, Hii CS, Cockerill P, Khew-Goodall Y, Bert AG, Barter PJ, Vadas MA (1998) Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14196-14201

Zätterström UK, Wennerberg J, Ewers SB, Willén R, Attewell R (1991) Prognostic factors in head and neck cancer: histologic grading, DNA ploidy and nodal status. *Head Neck* 13:477-487

Zhang W, Bholra N, Kalyankrishna S, Gooding W, Hunt J, Seethala R, Grandis JR, Siegfried JM (2008) Kinin b2 receptor mediates induction of cyclooxygenase-2 and is overexpressed in head and neck squamous cell carcinomas. *Molecular cancer research : MCR* 6(12):1946-1956

zur Hausen H, de Villier EM (1994) Human Papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 48:427-447



## 8 Abbildungsverzeichnis

### Abbildungen

<b>Abbildung 1</b>	Einteilung des Pharynx in Naso-, Oro- und Hypopharynx	2
<b>Abbildung 2</b>	Entstehung von Plattenepithelkarzinomen	7
<b>Abbildung 3</b>	Level der Halslymphknoten	12
<b>Abbildung 4</b>	„Angiogenetic Switch“	13
<b>Abbildung 5</b>	Aufbau von Normalgefäßen und Tumorgefäßen	14
<b>Abbildung 6</b>	Effekte am VEGFR-2-Rezeptor (Flk-1/KDR)	17
<b>Abbildung 7</b>	S1P-Biosynthese und Abbau	18
<b>Abbildung 8</b>	Verschiedene Wirkungsweisen von S1P am Beispiel des EDG1-Rezeptors	19
<b>Abbildung 9</b>	Wirkstärke der Kinine und ihrer Metabolite an den unterschiedlichen Bradykininrezeptorsubtypen	21
<b>Abbildung 10</b>	Schematische Organisation (linearisiert) des HPV16-Genoms	23
<b>Abbildung 11</b>	Interaktion der HPV16 und p16 Proteine mit dem Zellzyklus	24
<b>Abbildung 12</b>	Darstellung der indirekten immunhistochemischen Antikörperdetektion	31
<b>Abbildung 13</b>	Verteilung der Primärlokalisationen	37
<b>Abbildung 14</b>	Verteilung der T-Stadien	38
<b>Abbildung 15</b>	Verteilung der N-Stadien	38
<b>Abbildung 16</b>	Verteilung der G-Stadien	38
<b>Abbildung 17</b>	Mittleres T-, G- und N-Stadium bei unterschiedl. Primärlokalisation	39
<b>Abbildung 18</b>	Gesamtüberlebensfunktion	40
<b>Abbildung 19</b>	Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Primärlokalisation	40
<b>Abbildung 20</b>	Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Tumorgroße (T-Stadium)	41
<b>Abbildung 21</b>	Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Lymphknotenstadium	42
<b>Abbildung 22</b>	Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Differenzierung	42
<b>Abbildung 23</b>	Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Differenzierung	43
<b>Abbildung 24</b>	Mittlere Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum	43
<b>Abbildung 25</b>	Mittlere HPV16-Infektionsrate in verschiedenen Gewebearten	44
<b>Abbildung 26</b>	HPV16-positives Tumorgewebe	44
<b>Abbildung 27</b>	Rezidivquote in Abhängigkeit vom HPV16-Status	45
<b>Abbildung 28</b>	Überleben in Abhängigkeit vom HPV16-Status	46
<b>Abbildung 29</b>	Mittlere Expression von p16 in verschiedenen Gewebearten	46
<b>Abbildung 30</b>	p16-Antikörperfärbung in Lymphknotenmetastase und Tumorgewebe	47

<b>Abbildung 31</b>	Zusammenhang zwischen der Expression v. p16 in Tumorgewebe und Tabak- bzw. Bierkonsum	47
<b>Abbildung 32</b>	Überleben in Abhängigkeit vom p16-Status	48
<b>Abbildung 33</b>	Mittlere BKB1R-Expression in verschiedenen Geweben	48
<b>Abbildung 34</b>	BKB1R-Antikörperfärbung in Lymphknoten- und Tumorgewebe	49
<b>Abbildung 35</b>	CRP in Abhängigkeit von der BKB1R-Expression im Tumorgewebe	49
<b>Abbildung 36</b>	Überlebenskurve in Abh. der BKB1R-Expression im Tumorgewebe	50
<b>Abbildung 37</b>	Mittlere BKB2R-Expression in verschiedenen Geweben	51
<b>Abbildung 38</b>	BKB1R-Antikörperfärbung in Lymphknoten- und Tumorgewebe	51
<b>Abbildung 39</b>	Überlebenskurve in Abh. der BKB2R-Expression im Tumorgewebe	52
<b>Abbildung 40</b>	Mittlere VEGFR2-Expression in verschiedenen Geweben	52
<b>Abbildung 41</b>	VEGFR2-Antikörperfärbung in Lymphknoten- und Tumorgewebe	53
<b>Abbildung 42</b>	Überlebenskurve in Abh. der VEGFR2-Expression im Tumorgewebe	53
<b>Abbildung 43</b>	Mittlere SphK-Expression in verschiedenen Geweben	54
<b>Abbildung 44</b>	SphK-Antikörperfärbung in Lymphknoten- und Tumorgewebe	54
<b>Abbildung 45</b>	Überlebenskurve in Abh. der BKB2R-Expression im Tumorgewebe	55
<b>Abbildung 46</b>	Mittlere Expression des BKB1R in Tumorgewebe in Abhängigkeit vom HPV16-Status und von der p16-Expression im Tumor	56
<b>Abbildung 47</b>	Mittlere Expression von p16 in Abhängigkeit von der BKB2R- und VEGFR2-Expression im Tumorgewebe	57
<b>Abbildung 48</b>	Zusammenhang zwischen der Expression von BKB1R und VEGFR2 in Tumorgewebe	57

## Tabellen

<b>Tabelle 1</b>	Klassifikation der Nasopharynx-Karzinome	2
<b>Tabelle 2</b>	Primärtumor (T) der Mundhöhle	3
<b>Tabelle 3</b>	Primärtumor (T) des Nasopharynx	3
<b>Tabelle 4</b>	Primärtumor (T) des Oropharynx	4
<b>Tabelle 5</b>	Primärtumor (T) des Hypopharynx	4
<b>Tabelle 6</b>	Lymphknotenmetastasen (N) mit Primärtumor in der Mundhöhle	4
<b>Tabelle 7</b>	Lymphknotenmetastasen (N) mit Primärtumor in der Mundhöhle	4
<b>Tabelle 8</b>	Lymphknotenmetastasen (N) mit Primärtumor im Oropharynx	4
<b>Tabelle 9</b>	Lymphknotenmetastasen (N) mit Primärtumor im Hypopharynx	5
<b>Tabelle 10</b>	Fernmetastasen (M) mit Primärtumor im Kopf-Hals-Bereich	5
<b>Tabelle 11</b>	Stadieneinteilung der Pharynxtumoren	5

<b>Tabelle 12</b>	Prozentualer Anteil der einzelnen Tumorentitäten an allen Kopf-Hals-Malignomen in der Bundesrepublik Deutschland 1998 (die in dieser Arbeit untersuchten Malignome sind farblich markiert)	8
<b>Tabelle 13</b>	Klinisch-pathologische Daten und Befunde von 180 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren	36
<b>Tabelle 14</b>	Vorhandene Risikofaktoren bei der untersuchten Patientengruppe	37
<b>Tabelle 15</b>	Ergebnisse der Immunhistochemie (VEGF-R)	38
<b>Tabelle 16</b>	Ergebnisse der Immunhistochemie (SphK)	35
<b>Tabelle 17</b>	Ergebnisse der Immunhistochemie (B1-Rezeptor)	36
<b>Tabelle 18</b>	Ergebnisse der Immunhistochemie (B2-Rezeptor)	37
<b>Tabelle 19</b>	Ergebnisse der Chromogen-In-Situ-Hybridisierung (HPV-16)	39
<b>Tabelle 20</b>	Ergebnisse der Immunhistochemie (p16)	40
<b>Tabelle 21</b>	Zusammenhänge zwischen einzelnen gemessenen Parametern	55

## 9 Danksagung

Allen voran möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Anja Pickhard für die hervorragende Betreuung, die Geduld und die freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Sie hat mich für die Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, die Tumorbilogie und das wissenschaftliche Denken und Arbeiten begeistert und hat stets für ein sehr angenehmes Arbeitsklima in unserer Forschungsgruppe gesorgt.

Meiner ersten Doktormutter Frau Prof. Steuer-Vogt (†) möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken. Nach schwerer Krankheit verstarb sie, bevor ich überhaupt mit dem Schreiben beginnen konnte und war leider nicht mehr in der Lage, die Arbeit zu verfolgen. Vielen Dank vor allem auch für die Überlassung der Patientendaten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nun gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Bier, der nach dem Tod von Frau Prof. Steuer-Vogt „ingesprungen“ ist und sich als mein zweiter Doktorvater zur Verfügung gestellt hat.

Ganz lieben Dank an Guido Piontek, der mich von Anfang an betreut und in die Laborarbeit eingewiesen hat, immer für Fragen offen war und mich bei allem unterstützt hat. Auch bei kleineren und größeren Missgeschicken war er immer zur Stelle!

Vielen herzlichen Dank an Ingrid Höppner, die mir in stundenlanger Arbeit die Gewebeblöcke geschnitten hat, mir wertvolle Kontakte im pathologischen Institut vermittelt hat und immer ein offenes Ohr für diverse Problemchen hatte.

Herzlichen Dank an Peter Woyczech, der mir neben seiner Routinearbeit bei der Detektion des Humanen Papillomavirus mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und unheimlich hilfsbereit war.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Jürgen Schlegel, in dessen neuropathologischem Labor ich meine Versuche durchführen und mit dessen Mitarbeitern ich zusammenarbeiten durfte.

Danke nach Kamerun, an Schwester Xaveria und Herrn Dr. Ndaa, die beide große Vorbilder sind mich aus der Ferne stets moralisch unterstützt und motiviert haben.

Inniger Dank gebührt schließlich meinen Eltern, die mich bei allen Vorhaben und in jeder Lebenslage unterstützen und mir immer mit Rat zu Seite stehen.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Anna-Katharina Haug
Geburtsdatum	13.11.1983
Geburtsort	Braunschweig
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutschland

### Schul- und Hochschulausbildung

1990-1994	Besuch der Grundschule Bayerisch Gmain
1994-2003	Besuch des Karlsgymnasiums Bad Reichenhall
04-08/2001	Besuch des Lycée St. Joseph, Sète, Frankreich
2003	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife in den Fächern LK Französisch, LK Mathematik, GK Deutsch, GK Geschichte
2001-2003	Musikstudium im Konzertfach für Violine am Mozarteum Salzburg bei Herrn Prof. Bruno Steinschaden als Jungstudentin
2003-2005	Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der TU/LMU München
2005	Abschluss der Vorklinik mit dem 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005-2010	Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums und Praktisches Jahr an der TU München
2010	Abschluss des Medizinstudiums mit dem 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2011	Beginn der Facharztausbildung zur HNO-Ärztin im Universitätsklinikum rechts der Isar, München