

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Univ.-Prof.Dr.Dr.J.Schubert)

**Einfluss der Tumorhypoxie auf die Prognose beim Plattenepithelkarzinom der
Mundhöhle**

H a b i l i t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr.med.habil.

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr.med.Dr.med.dent. Alexander Walter Eckert
geboren am 13.09.1968 in Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. U. Eckelt (Dresden)
2. Prof. Dr. Dr. W. Wagner (Mainz)
3. Prof. Dr. Dr. T.E. Reichert (Regensburg)

Verteidigung: 19.05.2009

Öffentliche Vorlesung: 16.06.2009

Referat und bibliographische Beschreibung

Beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle als eines der zehn häufigsten Malignomen des Menschen hat sich die generelle 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit trotz Fortschritte in der Diagnostik und Therapie der letzten Jahre nicht wesentlich gebessert und beträgt derzeit etwa rund 50%. Bisher existieren in Ergänzung zum TNM-System und Grading keine wirklich verlässlichen Marker zur detaillierten Prognoseabschätzung des Mundhöhlenkarzinoms.

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen wurde der Einfluss der hypoxie-relevanten Proteine Hypoxie-induzierender Faktor 1 alpha [HIF-1 α], Glukosetransportmolekül 1 [GLUT-1], von Hippel-Lindau-Protein [pVHL], Carboanhydrase 9 [CA IX] und Vascular Endothelial Growth Factor C [VEGF-C] an 82 Paraffinschnitten von Mundhöhlenkarzinomen untersucht und den klinisch-pathologischen Daten [TNM-System, Grading und prätherapeutischer Hb-Wert] gegenübergestellt. Die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit erfolgte durch KAPLAN-MEIER-Analysen, multivariate Cox's-Regressionen dienten zur Beurteilung des tumorassoziierten Versterbens in Abhängigkeit der Expression der jeweiligen Proteine.

Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit aller 82 betrachteten Karzinome betrug 62,4%. Der prätherapeutische Hb-Wert hatte keinerlei Einfluss auf die Prognose der Patienten. Das Überleben war von den Proteinexpressionen für HIF-1 α , GLUT-1 und pVHL abhängig: Beim HIF-1 α betrug die Überlebenswahrscheinlichkeit 85% bei negativer und schwacher Expression und nur 48% im Falle mäßiger oder starker Expression ($p=0,001$). Einen ähnlichen Einfluss hatten GLUT-1 [80% Überlebenswahrscheinlichkeit bei negativer/schwacher Expression zu nur 35% bei mäßiger oder starker Expression, $p=0,0064$] und pVHL [69% zu 28,5%, $p=0,018$]. Anhand der Koexpression von HIF-1 α , GLUT-1, pVHL und CA IX konnten Gruppen von Patienten charakterisiert werden, die durch sehr gute bzw. sehr schlechte Überlebensprognosen auffielen. 12 Patienten zeigten keine Expression aller 4 Proteine; das Überleben betrug 91,7%. Bei 18 Patienten konnte eine mäßige oder starke Expression der Proteine HIF-1 α und GLUT-1 nachgewiesen werden, die Überlebenswahrscheinlichkeit betrug nur noch gut 30%. Mittels der multivariaten Cox's-Regressionsanalyse (adjustiert nach Größe des Primärtumors und Grading) hatten diese Patienten ein mehr 14,8-fach erhöhtes Risiko des tumor-assoziierten Versterbens ($p=0,001$). Möglicherweise sind diese Tumoren unter hypoxischem Stress entdifferenziert, so dass sie stammzellähnlichen Charakter haben.

Im Ergebnis konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α , GLUT-1, pVHL und CA IX als unabhängige Prognosemarker herangezogen werden können. Durch Kenntnis ihrer Expression kann das Aggressionsverhalten des Mundhöhlenkarzinoms deutlicher charakterisiert und die Therapiestrategie in einem größeren Maße individualisiert werden.

Eckert, Alexander W.

Einfluss der Tumorhypoxie auf die Prognose beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle
Halle, Univ., Med. Fak. Habil., 118 Seiten, 2008

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite	
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Tumorassoziierte Proteine zur Prognosekalkulation beim Mundhöhlenkarzinom	
2.2	Tumorhypoxie und Hypoxiemarker	4
2.2.1	Hypoxie-induzierbarer Transkriptionskomplex [HIF]	7
2.2.2	Glukosetransportmoleküle	10
2.2.3	Carboanhydrase 9 (CA IX)	13
2.2.4	Vascular Endothelial Growth Factor C [VEGF-C]	14
2.2.5	Von Hippel-Lindau-Protein [pVHL]	16
2.3	Präoperative Hämoglobinkonzentrationen [Hb-Werte]	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Patienten	18
3.2	Immunhistochemie	18
3.2.1	HIF-1 α	19
3.2.2	GLUT-1	19
3.2.3	CA IX	20
3.2.4	VEGF-C	20
3.2.5	Von Hippel-Lindau-Protein [pVHL]	20
3.3	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen	21
3.4	Statistik zur Immunhistochemie	22
3.4.1	Überlebensstatistiken nach KAPLAN-MEIER	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Patienten und Überlebenswahrscheinlichkeit	23
4.2	Immunhistochemie zum Pathway der Hypoxie	27
4.2.1	HIF-1 α	27
4.2.2	GLUT-1	32

4.2.3	Carboanhydrase IX	37
4.2.4	VEGF-C	39
4.2.5	Von Hippel-Lindau-Protein [pVHL]	42
4.3	Koexpression von hypoxie-relevanten Proteinen	45
4.4	Anämie und präoperative Hämoglobinkonzentrationen	52
5	Diskussion	53
5.1	Patienten und Überlebenswahrscheinlichkeit	53
5.2	Pathways und Immunhistochemie	57
5.2.1	Rolle der Tumorhypoxie beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle	57
5.2.1.1	HIF-1 α	59
5.2.1.2	GLUT-1	65
5.2.1.3	CA IX	71
5.2.1.4	VEGF-C und Angiogenese	73
5.2.1.5	Von Hippel-Lindau-Protein [pVHL]	78
5.3	Koexpression von hypoxie-relevanten Proteinen	80
5.4	Tumoroxygenierung und Hämoglobinkonzentrationen	84
5.5	Ausblick	86
5.6	Modell zur Therapiestratifizierung beim Mundhöhlenkarzinom anhand der Expression hypoxie- relevanter Proteine	88
6	Zusammenfassung	91
7	Literatur	93
8	Thesen	116
9	Lebenslauf	
10	Erklärungen	
11	Danksagung	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1. ABC-Methode: Avidin-Biotin-Complex
2. AJCC: American Joint Committee on Cancer
3. CA IX: Carboanhydrase 9
4. CIP: Computerunterstützte individuelle Prognosestellung
5. DÖSAK: Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich
5. EGFR: Epithelial Growth Factor Receptor
6. G-Stadium: Grading
7. Gy: Gray - Einheit der Strahlendosis
8. GLUT-1: Glukosetransporter 1
9. Hb: Hämoglobinwert
10. HIF 1 α : Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 alpha
11. kDa Kilodalton
12. LDH: Laktatdehydrogenase
13. MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
14. MCT : Wasserstoffionen-Laktat-Austauscher
15. M-Stadium: Klassifikation bezüglich eventueller Fernmetastasen
16. mTOR mammalian target of rapamycin
17. NCHE : Natrium-Chlorid/Hydrogenkarbonat-Austauscher
18. NHE 1: Natrium/Wasserstoffionen[Protonen]-Austauscher
19. N-Stadium: Klassifikation bezüglich eventueller regionaler Metastasen
20. PET: Positronenemissionstomographie
21. pM-Stadium: Klassifikation bezüglich eventueller Fernmetastasen nach pathologischer Untersuchung
22. pN-Stadium: Klassifikation bezüglich eventueller regionaler Metastasen nach pathologischer Untersuchung
15. pT-Stadium: Klassifikaton bezüglich der TumorgroÙe/ -ausdehnung nach pathologischer Untersuchung
16. pTNM-Stadium: Zusammenfassung von pT-/ pN- und pT-Stadium
17. pVHL: von Hippel-Lindau-Protein
18. RAS Rat Sarcoma, ein Protoonkogen
19. R-Faktor: Klassifikation für das Fehlen oder das Vorhandensein eines Residualtumors

20. Src Sarcoma, zelleigenes Homolog des Rous-Sarkom-Virus
21. T-Stadium: Klassifikaton bezüglich der Tumorgröße/ -ausdehnung
22. TNM-Stadium: Zusammenfassung von T-, N- und M-Stadium
23. UICC: Union Internationale Contre Le Cancer
24. VEGF C: Vascular endothelial growth factor C
25. VHL: von Hippel-Lindau-Gen
26. wt pVHL Wildtyp des von Hippel-Lindau-Proteins

Meinen Eltern in memoriam

1 Einleitung

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist eines der zehn häufigsten bösartigen Neubildungen des Menschen mit einer globalen jährlichen Inzidenz von 780.000 Neuerkrankungen (Parkin et al. 2001, Lemaire et al. 2003). In den USA werden diesbezüglich pro Jahr 23.000 neue Fälle verzeichnet, von denen immerhin 13.000 versterben (Choi et al. 2006).

In Deutschland geht man davon aus, dass hinsichtlich der Mundhöhlenkarzinome mit 8.000 – 10.000 Neuerkrankungen pro Jahr zu rechnen ist (Howaldt et al. 2000, Schimming 2001). Somit entfallen etwa 1,3 bis 5% aller Krebserkrankungen auf diese Tumorentität (Fröhlich 1992). Leider konnte in den letzten Jahren trotz Etablierung moderner prognostischer Verfahren und dem Einsatz mikrochirurgischer Techniken keine signifikante Verbesserung der Überlebenschancen erreicht werden. Klassischerweise erfolgt die Kalkulation der Überlebenschancen durch das TNM-System nach den Vorgaben des American Joint Committee on Cancer (AJCC) bzw. der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) (Flemming 1997).

Wegen der hohen Rezidivrate und der nach wie vor ernüchternden Überlebenschancen besteht vermehrt Interesse daran, durch zusätzliche Parameter das Risiko für ein Rezidiv bzw. ein Fortschreiten der Erkrankung nach therapeutischen Optionen besser kalkulieren zu können (Dietz et al. 1999, Smith und Haffty 1999). Offensichtlich bildet das TNM-System das tatsächliche Malignitätspotential nur unzureichend ab. Die jeweiligen komplexen Vorgänge im Rahmen der Tumorgenese richtig verstehen und interpretieren zu können, muss folglich bis auf die zelluläre Ebene vorgedrungen werden. Mittlerweile mehren sich die Berichte in der Fachliteratur, das bekannte TNM-System und das Grading anhand von molekularpathologischen Faktoren im Gewebe zu ergänzen. Im Allgemeinen hat sich hierfür der Begriff „Tumormarker“ etabliert, weil zahlreiche im Rahmen der Tumorgenese relevante Proteine mittels immunhistochemischer Techniken darstellbar und quantifizierbar sind. Die Prognose des Mundhöhlenkarzinoms könnte durch die Kenntnis derartiger pathobiochemischer Anpassungsprozesse noch detaillierter kalkuliert werden (Vaupel 2004, Tilstone 2006, Oliveira et al. 2008). Während SCHLIEPHAKE noch im Jahre 2003 den Wert derartiger Tumormarker beim Mundhöhlenkarzinom kritisch betrachtete, wurde bereits 3 Jahre später auf den möglichen diagnostischen Zugewinn durch die Kombination des TNM-Systems und der Differenzierung mit solchen Tumormarkern hingewiesen (Schliephake 2003, Lothaire et al. 2006, Massano et al. 2006). Mitte bis Ende der 90er Jahre konnte diesbezüglich der

Einfluss von p53 als Tumor-Suppressor-Gen auf die Prognose beim Mundhöhlenkarzinom charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zum Wildtyp p53-mutierte Zellen mit einem schlechteren Überleben und einer erhöhten Rezidivrate vergesellschaftet waren. Dabei vermittelt p53 unter anderem die Hypoxie-induzierte Apoptose (Smith und Haffty 1999). Etwa zum gleichen Zeitpunkt erlangte auch die Angiogenese, also das Sprossen von Gefäßen zur tumoreigenen Sicherung der Nutrition, beim Mundhöhlenkarzinom an Bedeutung. Insgesamt sollte zum besseren Verständnis der einzelnen Abläufe innerhalb der Karzinogenese von verschiedenen „pathways“ gesprochen werden, welche durch die jeweiligen immunhistochemischen Methoden als sog. „Marker“ ihren Ausdruck finden und sich in der Routine problemlos charakterisieren lassen.

In den letzten Jahren kristallisierte sich heraus, dass die Hypoxie ein wesentliches Charakteristikum lokal fortgeschrittener Tumoren ist. Reduzierte Sauerstoffpartialdrücke im Tumorgewebe vermögen die Tumorprogression und auch die Therapieresistenz gegen ionisierende Strahlung zu steigern, welches ein großes Problem aus Sicht der Kliniker darstellt (Ljungkvist et al. 2007, Moeller et al. 2007). Im Detail ist eine hypoxische Situation mit veränderter Proliferationsrate, Tumornekrose, Apoptose, gesteigerter Glykolyse und auch Differenzierung assoziiert, woraus aggressivere Tumorformationen resultieren (Vaupel und Mayer 2007). Auf einen derartigen hypoxischen Stress adaptiert sich der Tumor durch eine gesteigerte Angiogenese, einen erhöhten Glucosestoffwechsel und eine optimierte mitochondriale Respiration (Liao und Johnson 2007, Kim et al. 2007). Einige Teilaspekte der Hypoxie sind bereits auch am Beispiel des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle gezeigt worden (Kunkel 2003). Bisher existieren jedoch keine Untersuchungen zum komplexen Einfluss der Hypoxie auf die Adaption von Mundhöhlenkarzinomen. Zudem wären multivariate Analysen zur detaillierten Kalkulation der Prognose bei dieser Tumorentität wünschenswert.

Es waren die Ziele dieser Arbeit, anhand einer monozentrischen Population von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle den Einfluss der Tumorhypoxie für prognostische Aussagen zu analysieren. Im einzelnen sollte geklärt werden, inwieweit auch die Lymphangiogenese vom Ausmaß der Hypoxie gesteuert wird und welche weiteren membranären Proteine unter hypoxischen Bedingungen die Tumorprogression ermöglichen. Im Ergebnis sollten dem Kliniker Proteine genannt werden, welche die Prognoseabschätzung beim Mundhöhlenkarzinom ergänzen und bei überschaubarem Aufwand durch immunhistochemische Techniken an Paraffinschnitten realisierbar sind. Eine weitere Zielstellung war es, anhand der Charakterisierung des Hypoxiegrades dem

Strahlentherapeuten bereits im Rahmen einer Probeexzision Aussagen zur Radiosensitivität des jeweiligen Tumors geben zu können.

2 Literaturübersicht

2.1 Tumorassoziierte Proteine zur Prognosekalkulation beim Mundhöhlenkarzinom

Die Thematik des Nachweises von Proteinen, welche innerhalb der Tumorprogression exprimiert werden und mittels immunhistochemischer Untersuchungen zur Prognoseabschätzung am Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle herangezogen werden können, ist in den letzten Jahren in großer Breite untersucht worden. Mitte der 90er Jahre fokussierten sich die Untersuchungen auf Adhäsionsphänomene (Stimson und Schantz 1993), zum Ende des Jahrzehnts standen Proliferationsmarker im Zentrum des Interesses (Sittel et al. 1999). Die Anzahl der nachweisbaren Molekülstrukturen ist mittlerweile nur noch schwer zu überschauen. SCHLIEPHAKE hat deshalb anhand des Mundhöhlenkarzinoms eine Einteilung der jeweiligen Moleküle vorgenommen und diese zur besseren Übersicht in 4 Gruppen eingeteilt (Tab.1, modifiziert nach Schliephake 2003).

Tab.1 Einteilung der Molekülgruppen für die Prognose beim Mundhöhlenkarzinom

Gruppe	Moleküle
I	Zellzyklusacceleratoren und Proliferationsmarker
II	Tumor-Supressor- und Apoptose-Marker
III	Angiogenesemarker
IV	Adhäsionsmoleküle und Matrixdegeneration

Da die etablierten Parameter TNM-System und histopathologische Differenzierung das Aggressionspotential des Mundhöhlenkarzinoms offensichtlich nur unzureichend abbilden, konzentriert sich die Forschung auf hochspezifische sog. Tumormarker, welche idealerweise nahezu zu 100% im Tumorgewebe, nicht aber bei Gesunden und benignen Erkrankungen zu finden sind (Dietz et al. 1999, Lordick et al. 2008, Schrader et al. 2008). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind Proteine, die im Sinne dieser Tumormarker die genannten Kriterien erfüllen, nicht bekannt (Lordick et al. 2008). Allerdings ist gegenwärtig hinreichend bekannt, dass zahlreiche Mechanismen durch die Hypoxie im Prozess der Tumorprogression

gesteuert werden. Bereits seit Ende der 80er Jahre ist der Einfluss eines verminderten Sauerstoffpartialdruckes im Tumorgewebe bekannt. Entsprechend hypoxische Tumoren zeigen keine oder nur eine geringe Ansprechrate bei einer Bestrahlung (Gatenby et al. 1988). Für eine erfolgreiche Bestrahlung wird Sauerstoff benötigt, allerdings ist auch der Tumorzellmetabolismus unter hypoxischen Bedingungen verändert (Teicher 1994, Denko 2008). Der Einfluss der Tumorphoxie ist sehr komplex und zumindest am Beispiel des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle noch nicht komplett verstanden (Moulder und Rockwell 1987, Janssen et al. 2005). Vom klinischen Standpunkt her hat die Tumorphoxie möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose bei Kopf-Hals-Karzinomen und sollte daher detaillierter untersucht werden (Gatenby et al. 1988, Kappler et al. 2008, Bache et al. 2008).

2.2 Tumorhypoxie und Hypoxiemarker

Die Hypoxie ist das Resultat einer Imbalance zwischen Sauerstoffzufuhr und Sauerstoffverbrauch im Tumorgewebe. Dieser komplexe Prozess wird durch eine Signaltransduktion, also eine ineinander geschalteten Kaskade von Regulatorproteinen, kontrolliert. Normalgewebe zeigen einen Sauerstoffgradienten mit einer Distanz von etwa 400 μm entfernt vom Blutgefäß (Dang und Semenza 1999). Die Adaptation an verminderte Sauerstoffpartialdrücke ermöglicht den Tumorzellen als Regulationsprozess, unter hypoxischen Bedingungen zu proliferieren und stellt möglicherweise einen Schlüsselprozess in der Tumorgenese und –progression dar (Janssen et al. 2005). Aus klinischer Sicht ist mittlerweile auch beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle gesichert, dass hypoxische Tumoren eine schlechtere Prognose haben (Janssen et al. 2005, Kunkel 2007). Zudem sind die entsprechenden hypoxischen Tumoren weniger strahlenempfindlich und zeigen außerdem infolge der Minderperfusion nicht selten ein vermindertes Ansprechverhalten auf diverse Chemotherapeutika (Yoshida et al. 2008, Janssen et al. 2005).

Ein eigenes Gefäßsystem ermöglicht den Tumorzellen die Zufuhr von Nährstoffen und vor allen Dingen von Sauerstoff. Sauerstoff vermag maximal 150 μm suffizient in das Gewebe zu diffundieren. Wenn allerdings das Tumorzellwachstum derart schnell verläuft, dass die Bildung eines Gefäßsystems nicht zeitgleich aufgebaut werden kann, kommt es zu einer Gewebshypoxie. Man kennt neben der chronischen oder durch Diffusion limitierten Hypoxie auch eine akute bzw. durch Minderperfusion initiierte Form der Hypoxie. Als Ursachen dafür werden kollabierende tumoreigene Gefäße durch einen hohen interstitiellen Tumordruck bzw. die direkte Interruption des intratumoralen Blutflusses diskutiert (Isa et al.

2006). Die mannigfaltigen Effekte einer solchen Tumorphypoxie wurden zuerst durch THOMLINSON und GRAY im Jahre 1955 vermutet (Thomlinson und Gray 1955), auf den negativen Einfluss auf das Ansprechen einer Bestrahlung bei niedrig oxygenierten Tumoren konnte bereits 1936 durch MOTTRAM hingewiesen werden (Mottram 1936). Außerdem hat die Tumorphypoxie einen limitierenden Effekt auf den Einsatz von Chemotherapeutika. So sind hypoxische Zellen unter anderem gegen 5-Fluouracil, Bleomycin und Cisplatin resistent (Isa et al. 2006).

In den letzten gut zehn Jahren sind mehrere Publikationen erschienen, welche eindeutig den Zusammenhang einer erhöhten Tumorphypoxie und schlechter Prognose bzw. einem nur geringen Ansprechen auf eine Bestrahlung bei zahlreichen Tumorentitäten belegen. In Tab. 2 sind die wesentlichsten Ergebnisse dieser Studien zusammengefasst.

Tab.2 Einfluss der Tumorphypoxie auf die Behandlungsergebnisse beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (modifiziert nach Janssen et al. 2005)

Autor	Studiendesign	Therapie	Ergebnisse	Signifikanz
Nordmark 1996	Fortgeschrittene Stadien III und IV, n=35	Radiotherapie + Nimoradazol	2-Jahres LCR 33% bei $pO_2 < 2,5$ mm Hg in mehr als 15% des Tumors, gegenüber 77% bei weniger als 15% des Tumorumfanges Hypoxische Fraktion – Prognoseindikator in der multivariaten Analyse	$p = 0,01$ $p = 0.018$
Brizel 1999	Fortgeschrittene Stadien IV, n=28	Nur Bestrahlung, fraktioniert 1x tgl. 2 Gy bis zu 66-70 Gy oder 2 x tgl. bis zu 70 – 75 Gy	Progressfreies Intervall 78% bei $pO_2 > 10$ mm Hg und nur 22% bei $pO_2 < 10$ mm Hg	$p = 0.009$
Brizel 1999	Tx – T4, N1 – N3, n= 63	Nur Bestrahlung, fraktioniert 1x tgl. 2 Gy bis zu 66-70 Gy oder 2 x tgl. bis zu 70 – 75 Gy	Mittlerer $pO_2 > 10$ mm Hg – korrelierte mit - längerem Überleben [2-Jahre 83% versus 35%] - längerem progressions-freien Intervall [73% versus 26%] - längere Rezidivfreiheit [73% versus 39%]	$p = 0.02$ $p = 0.005$ $p = 0.01$

Weiter Tab. 2

Autor	Studiendesign	Therapie	Ergebnisse	Signifikanz
Stadler 1999	Fortgeschrittene T4-Stadien, n= 59	Bestrahlung + Chemotherapie mit Mitomycin C und 5-Fluorouracil	Univariate Prognoserelevanz: - pO ₂ < 5mm Hg - pO ₂ < 2,5 mm Hg Multivariate Prognoserelevanz: - lediglich hypoxisches Subvolumen	p = 0.05 p = 0.01 p = 0.01
Rudat 2000	Stadium IV ohne Metastasierung n = 41	Radioterapie + gleichzeitige Chemotherapie mit Cisplatin/ 5-Fluorouracil	3-Jahres-Überleben höher bei Patienten mit höherem Sauerstoffpartialdruck im Tumor	p= 0.05
Nordsmark 2003	Fortgeschrittene Tumoren, n= 31	Fraktionierte Radiotherapie, 2 Gy für 5,5 bis 6,5 Wochen	2-Jahres-Überleben 90% zu 45% bei Tumoren mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck	p= 0.04
Rudat 2001	Tumore ohne Metastasierung, n = 134	Primäre Radio- oder Chemotherapie, ≥ 60 Gy	pO ₂ –Werte < 2,5 mm Hg – signifikanter Faktor für das Überleben in multivariater Analyse	p= 0.004
Dunst 2003	n= 125		Multivariate Analyse: Hypoxisches Tumolvolumen = unabhängiger Faktor für das Überleben	p= 0.001

Eine solche Tumorhypoxie kann auf exogenem oder endogenem Weg charakterisiert werden. Diese sog. exogenen Hypoxiemarker sind Chemikalien oder Arzneimittel, welche nach einer Administration von außen in den Körper unter hypoxischen Bedingungen akkumulieren. Ein klinisch relevanter exogener Hypoxiemarker ist Pimonidazol, ein 2-Nitroimidazol, welches zuvor intravenös verabreicht wird (Bussink et al. 2003). Nitroimidazole zeichnen sich durch ihre gute Löslichkeit und die geringe Metabolisierung aus, sie diffundieren in hypoxische Zellen. Allerdings ist der genaue Hypoxiestatus dadurch nicht immer komplett darstellbar (Isa et al 2006).

Bei den als endogen bezeichneten Hypoxiemarkern handelt es sich um membranständige Transportproteine oder auch membrangebundene Enzyme, welche durch den Transkriptionskomplex HIF 1 α aktiviert und kontrolliert werden (Bussink et al. 2003). Die endogenen Hypoxiemarker, zu denen die Glucosetransportmoleküle und auch die Carboan-

hydrasen gehören, werden typischerweise mittels immunhistochemischer Methoden detektiert (Airley et al. 2003). Außerdem wird der bekannte Vascular Endothelial Growth Factor [VEGF] zu den durch Hypoxie stimulierten endogenen Hypoxiemarkern gezählt. Nachfolgend sollen die in dieser Arbeit zur Anwendung kommenden, zu den endogenen Hypoxiemarkern zählenden Moleküle in Form des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors [HIF-1 α], des Glukosetransportmoleküls 1 [GLUT-1], der Carboanhydrase IX [CA IX] und dem Vascular Endothelial Growth Factor C [VEGF C] zum besseren Verständnis detaillierter dargestellt und näher erläutert werden.

2.2.1 Hypoxie-induzierbarer Transkriptionskomplex [HIF]

Alle Säugetierzellen benötigen molekularen Sauerstoff für ihre essentiellen metabolischen Prozesse einschließlich der oxydativen Phosphorylierung, wobei Sauerstoff als Elektronenakzeptor während der Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) dient (Wang et al. 1995). Durch hohe Metabolisierungsraten entstehen nicht selten im Tumor hypoxische, also schlecht perfundierte Regionen. Hypoxischer Stress aktiviert somit ein komplexes Gen-Expressionsprogramm, welches vom Hypoxie-induzierbaren Faktor und insbesondere von seiner Untereinheit α [HIF-1 α] gesteuert wird (Denko 2008, Swietach et al. 2007). Die hypoxische Situation ist somit ein indirekter Beitrag zur Steuerung des malignen Prozesses auf genetischer Ebene. HIF-1 ist ein heterodimeres Phosphoprotein, welches aus einer 120 kDa schweren α – und einer β -Untereinheit von 91 bis 94 kDa besteht (Wang et al. 1995, Huang und Bunn 2003). Während die β -Untereinheit, auch bekannt als Arylhydrocarbon-Rezeptor Nuclear Translocator [ARNT], konstitutiv exprimiert wird, handelt es sich bei der α -Untereinheit um ein extrem sauerstoffsensibles Protein (Dang und Semenza 1999). HIF-1 α ist ein Protein von sehr kurzer Halbwertszeit in normal oxygenierten Zellen und Geweben. Die Halbwertszeit beträgt weniger als 5 Minuten bei 21% Sauerstoff (Huang und Bunn 2003, Trastour et al. 2007). Reduzierter Sauerstoffpartialdruck im Gewebe führt schließlich zu einer Akkumulation von HIF-1 α durch Hemmung der von Hippel-Lindau-E3-Ubiquitin-vermittelten proteosomalen Degradation. In normoxygenierten Geweben erfolgt eine Inhibierung von HIF-1 α zunächst durch Bindung des von-Hippel-Lindau-Genproduktes [pVHL] an die HIF-1 α -Untereinheit, später durch Hydroxylierung von zwei Prolin-Resten [Pro402 und Pro564] in diesem Molekül (Trastour et al. 2007). Nach der Stabilisierung durch hypoxischen Stress wird das HIF-1 α –Protein in den Zellkern transportiert, wo es mit der β -Untereinheit dimerisiert und schließlich den aktiven HIF-Transkriptionskomplex bildet (Vleugel et al. 2005). Insgesamt wird deshalb auch von einer Messenger-Funktion von

HIF-1 α gesprochen. Diese Untereinheit transformiert die Reaktion aus dem Zytoplasma in den Zellkern, um dort die transkriptionelle Antwort auf die hypoxische Situation zu initialisieren (Brennan et al. 2005). Obwohl HIF-1 α 1995 von SEMENZA und Mitarbeitern ursprünglich eine Rolle als Regulator der Erythropoese zugesprochen wurde, sind heutzutage deutlich mehr Funktionen dieses Transkriptionskomplexes bekannt (Semenza 1995). Somit reguliert die α – Untereinheit als Antwort auf zelluläre Hypoxie die Transkription von mehr als 60 Proteinen, unter ihnen GLUT-1 als Vertreter der Glukosetransportmoleküle, als auch die Familie der Carboanhydrasen (Huang und Bunn 2003, Fillies et al. 2005). HIF bindet an die DNA-Sequenz 5'RCGTG-3' und steigert die Expression der Gene, welche u.a. die Glykolyse und den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) initiieren (Dang und Semenza 1999). Dabei stellt HIF-1 α eine Verbindungsstelle zwischen 2 pathobiochemischen Wegen dar; der durch Hypoxie induzierten Angiogenese und dem Tumorzellwachstum (Tanimoto et al. 2003).

Man kennt heute beim Transkriptionskomplex HIF drei verschiedene α -Untereinheiten, welche als HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α bezeichnet werden (Wei und Yu 2007, Seagroves und Johnson 2002). Abbildung 1 verdeutlicht schematisch den komplexen Vorgang der HIF-Aktivierung mit konsekutiver transkriptioneller Aktivität im Rahmen der Tumorprogression, Abb. 2 zeigt die strukturellen Unterschiede der einzelnen bekannten HIF-Moleküle.

Sehr intensiv untersucht wurde bisher HIF-1 α . Bei normoxischen Bedingungen im Gewebe degradieren die α -Untereinheiten sehr schnell als Folge der Interaktion mit dem von-Hippel-Lindau-Protein und der konsekutiven Hydrolyse durch Prolinhydrolasen (Seagroves und Johnson 2002, Pugh und Ratcliffe 2003, Kaelin 2008). Unter hypoxischen Bedingungen allerdings wird der Transkriptionskomplex HIF stabilisiert und nimmt schließlich eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von Hypoxie-induzierten Pathways bei der Tumorgenese ein. Als wichtigster gewebsspezifischer Effekt ist hier die Steuerung der Tumorangiogenese durch Aktivierung potenter Mitogene, wie des Vascular Endothelial Growth Factors [VEGF]. Eine solche Aktivierung von HIF führt aber auch zu zellautonomen Resultaten wie eine gesteigerte Glykolyse, Invasivität und die Expression von Wachstumsfaktoren (Seagroves und Johnson 2002, Koukourakis et al. 2006). Während HIF-1 α und HIF-2 α strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen und beide im Rahmen der Tumorprogression transkriptionelle Aktivitäten aufweisen, wurde HIF-3 α ein bremsender Effekt im Sinne einer negativen Regulation der beiden anderen HIF-Subtypen zugeschrieben (Pugh und Ratcliffe 2003). Mittlerweile ist bekannt, dass bei zahlreichen Karzinomen die wesentliche transkriptionelle Aktivität über HIF-1 α reguliert wird. Nur im Falle von pVHL-defizitären Tumorgeweben, bei welchen gleichzeitig das native HIF-1 α -Gen nicht exprimiert wird,

kommt es schließlich zu einer dominierenden Regulation der endogenen Hypoxieantwort über HIF-2 α (Sowter et al. 2003).

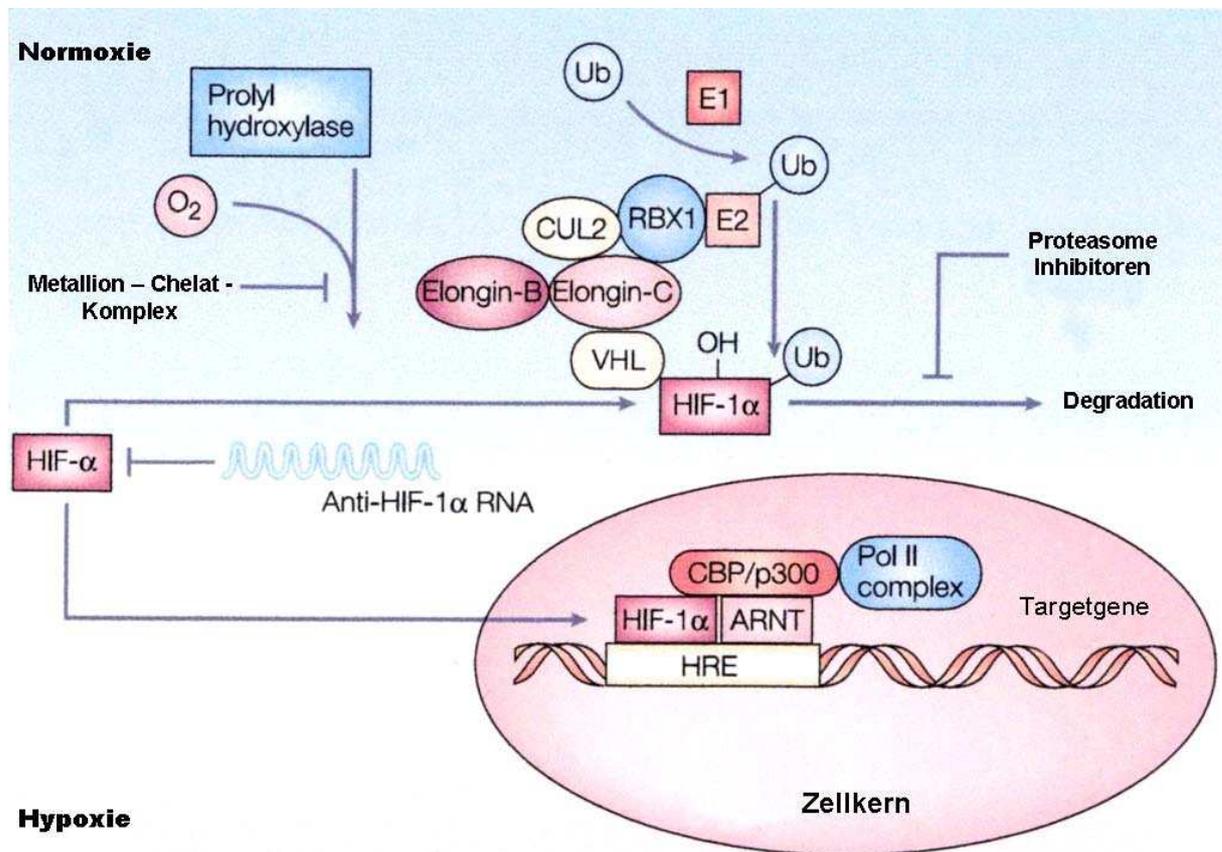


Abb.1

Schematische Darstellung der Aktivierung bzw. Inaktivierung von HIF. Unter Normoxie rasche Degradation von HIF-1 α durch Hydrolyse der Prolinreste 402 und 564 (HIF-Prolylhydroxylasen 1-3) und nachfolgende proteasomale Degradation in Form des von Hippel-Lindau (VHL)-Ubiquitin-Ligase-Komplexes. Außerdem β -Hydroxylation des Asparaginrestes 803 (HIF-Asparaginyl-Hydroxylase) und konsekutive Unfähigkeit zur Bindung an den p300/CBP-Proteinkomplex und ausbleibende transkriptionelle Aktivität. Unter Hypoxie Stabilisierung der Untereinheit HIF-1 α und Translokation derselben in den Zellkern mit nachfolgender Vereinigung mit der β -Untereinheit [HIF-1 β = ARNT (Arylhydrocarbon Rezeptor Nuclear Translocator)] und Ansteuern der Targetgene. HIF-1 α hat quasi eine „messenger“-Funktion zwecks Übertragung der Hypoxie-Antwort in den Zellkern.

Modifiziert nach Harris et al. 2002.

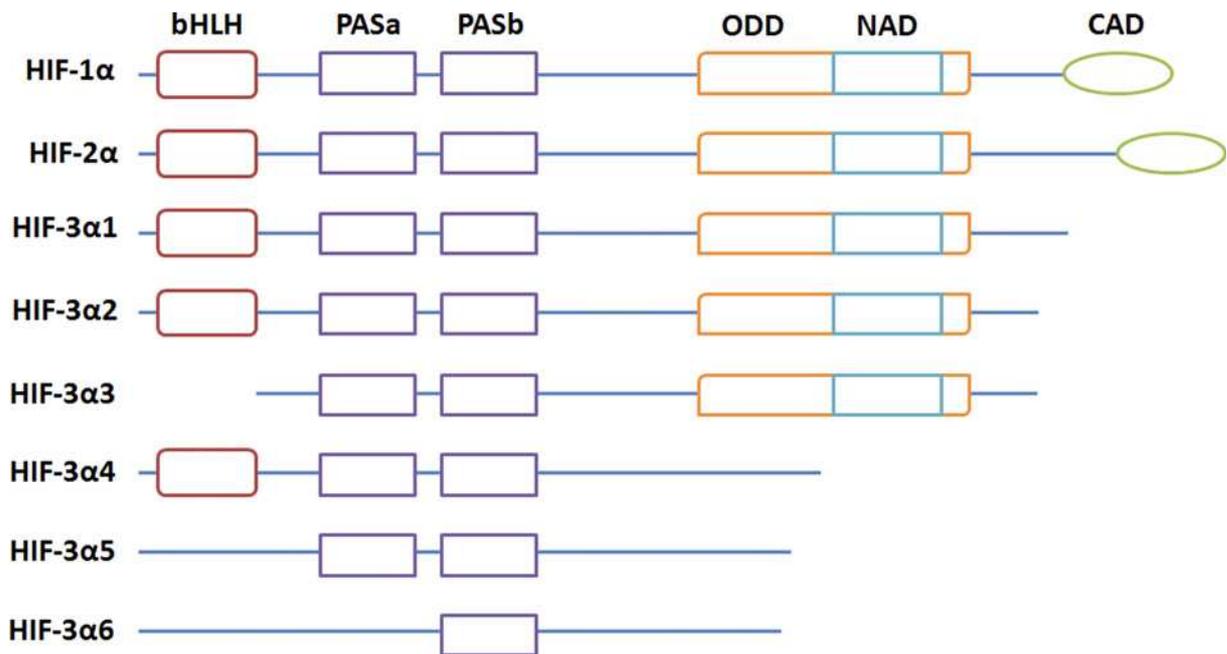


Abb.2 Strukturelle Unterschiede bei den einzelnen HIF-Subtypen
 HIF-3 α wird zusätzlich in mehrere Isoformen untergliedert. Hohe Übereinstimmungen bei HIF-1 α und HIF-2 α , während HIF-3 α in mehreren Isoformen existiert und teilweise strukturell dadurch wesentliche Abweichungen aufweist (nach Wei und Yu 2007).

2.2.2 Glukosetransportmoleküle

Der Glukosestoffwechsel unter hypoxischen Bedingungen spielt eine wichtige Rolle bei der Genese des Mundhöhlenkarzinoms. WARBURG wies bereits 1926 darauf hin, dass bei malignen Tumorzellen ein gesteigerter Glukosestoffwechsel vorliegt, welcher möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Nutrition und Progression maligner Tumoren hat (Warburg 1926).

Der Transport von Zuckermolekülen in die Zellen von Säugetieren wird durch spezielle Transportproteine katalysiert. Unter dem Proteinsymbol GLUT wird die Familie löslicher Carrierproteine [solute carriers 2A=SLC2A] zusammengefasst. Diese Superfamilie umfasst insgesamt 13 Mitglieder, die für den Transport von Zuckermolekülen und Polyolen verantwortlich sind. Ihnen allen gleich ist die Grundstruktur von 12 transmembranären Helices, 7 Glycinreste in den Helices, verschiedene basische und saure Reste an der interzellulären Proteinoberfläche sowie je zwei Tryptophan- und Tyrosin-Reste [Joost und Thorens 2001]. Auf der Basis dieser strukturellen Ähnlichkeiten kann die Superfamilie in 3

Subfamilien hinsichtlich ihrer jeweiligen Substratspezifität untergliedert werden: Klasse I vereint die bisher als Glukosetransporter verstandenen Proteine GLUT-1-4, Klasse II die auch als Fruktosetransporter bezeichneten Moleküle GLUT 5, GLUT-7, GLUT-9 und GLUT-11. Klasse III fasst die Proteine GLUT -6, GLUT-8, GLUT-10/12 und den Myo-Inositol-Transporter HMIT-1 zusammen. Sie alle zeigen eine gewebsspezifische Expression, welche aus Tabelle 3 ersichtlich ist.

Vom kieferchirurgischen Standpunkt aus ist GLUT-1 das bisher am besten untersuchte Protein, welches bereits 1977 durch KASAHARA beschrieben wurde (Kasahara 1977). Unter physiologischen Bedingungen wird GLUT-1 vor allem in Erythrozyten und Kapillarendothelien exprimiert (Reisser 1999a und 1999b).

Mittlerweile ist bekannt, dass eine hohe Expression von GLUT-1 als Ausdruck eines erhöhten Glukosestoffwechsels ein wichtiges Charakteristikum humaner Malignome unter hypoxischem Stress ist (Effert 2004, Ito 2004, Kunkel 2003a). Die prinzipielle Struktur dieses Glukosetransportmoleküls geht aus Abb. 4 hervor.

Das Transportmolekül Glut-1 besteht aus 12 transmembranären Alphaketten und realisiert den Glukosetransport in die Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen (Zuniga et al.

Tab.3 Gewebsspezifische Expression der GLUT-/SLC2A-Superfamilie (modifiziert nach Joost et al. 2002)

Gruppe	Gen	Chromosom	Expression
GLUT -1	SLC2A1	1p35-31.3	Erythrozyten, Gehirn, Kapillaren
GLUT-2	SLC2A2	3q26.2-27	Leberzellen
GLUT-3	SLC2A3	12p13.3	Gehirn
GLUT-4	SLC2A4	17p13	Muskel, Fettzellen, Herz
GLUT-5	SLC2A5	1p36.2	Darm, Hoden, Niere
GLUT-6	SLC2A6	9p34	Milz, Leukozyten, Gehirn
GLUT-7	SLC2A7	1p36.2	Nicht bekannt
GLUT-8	SLC2A8	9	Hoden, Gehirn, Muskelzellen
GLUT-9	SLC2A9	4p15.3-16	Leber, Niere
GLUT-10	SLC2A10	20q12	Leber, Pankreas
GLUT-11	SLC2A11	22q11.2	Herz, Skelettmuskulatur
GLUT-12	SLC2A12	6q23.2	Herz, Prostata
HMIT	SLC2A13	verschieden	Gehirn

2001). Hierbei werden für den transmembranären Transport zwei verschiedene Konformationen der Glukosetransportproteine vermutet. In einem ersten Schritt erfolgt die extrazelluläre Bindung des Glukosemoleküls über Wasserstoffbrückenbindungen. Diese Bindungsstelle verlagert sich schließlich vermutlich an die Innenseite der Zellmembran.

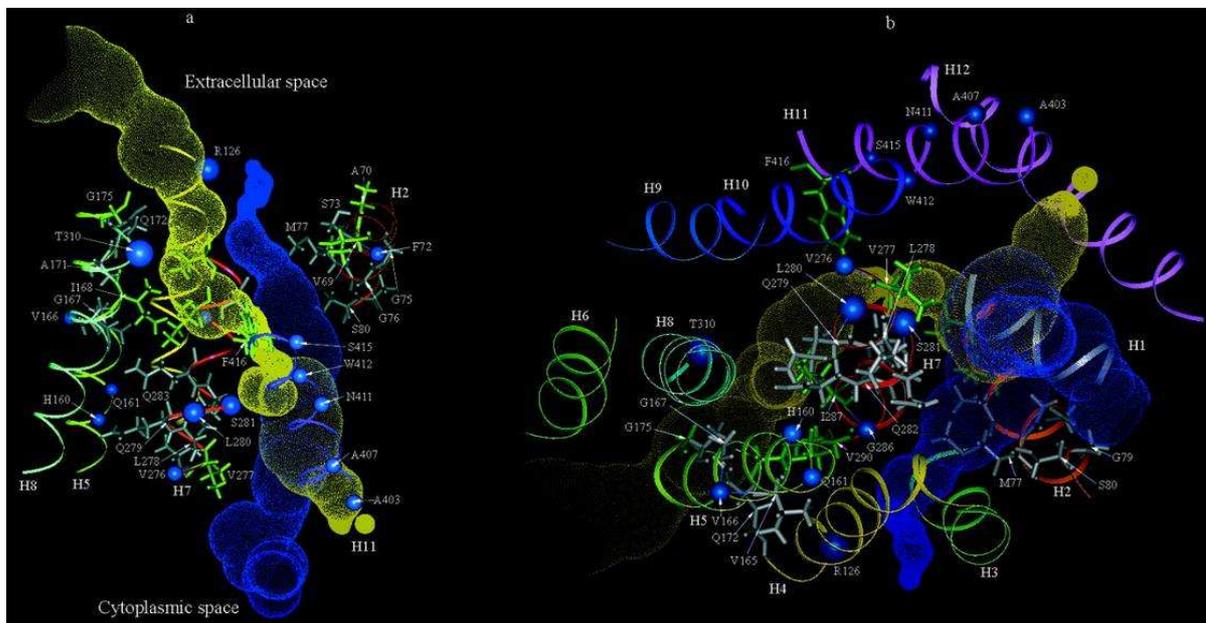


Abb. 4 Dreidimensionale Modellstruktur des Glut-1-Moleküls; Gelb = Hauptkanal, Blau = akzessorischer Kanal, farbige und verdreht = die insgesamt 12 Alpha-Helices.
(übernommen und modifiziert aus Zuniga et al. 2001)

Somit kann Glukose nach Lösung der Wasserstoffbrückenbindung in das Zytoplasma gelangen (Reißer et al. 1999).

Innerhalb der GLUT-Superfamilie spielt neben dem GLUT-1 auch GLUT-3 bei der Tumorgenese des Mundhöhlenkarzinoms eine Rolle, auch wenn in aller Regel letzteres Protein nicht in gleichem Maße exprimiert wird (Fukuzumi et al. 2000). GLUT-1 hat ein Molekulargewicht von 55 KDa und ist in quarternärer Struktur wirksam (Cloherty et al. 2001).

Der Zusammenhang zwischen einer Expression von Glut-1 und einer ungünstigen Prognose konnte bei einigen Karzinomen des Menschen nachgewiesen werden. Dies betrifft Larynx-Karzinome (Baer et al. 2002), Schilddrüsenkarzinome (Yasuda et al. 2005),

Ovarialkarzinome (Ozcan et al. 2005), Esophaguskarzinome (Kato et al. 2002), Pankreaskarzinome (Ito et al. 2004), Mamma-Karzinome (Brown und Wahl 1993, Brown et al. 1993, Stackhouse et al. 2005), Prostata-Karzinome (Effertt et al. 2004) und Karzinome des Gastrointestinaltraktes (Cooper et al. 2003). Erste univariate Untersuchungen weisen auch auf eine prognostische Bedeutung von GLUT-1 beim Mundhöhlenkarzinom hin (Kunkel et al. 2007).

2.2.3 Carboanhydrase 9 (CA IX)

Carboanhydrasen, auch Carbonat-Hydrolasen genannt, wurden erstmals 1933 durch MELDRUM und ROUHTON beschrieben (zitiert von N6grádi 1998). Es handelt sich um Zink-Metalloenzyme, welche die reversible Hydratation von Kohlendioxid zu Hydrogenkarbonat-Ionen und Wasserstoffionen katalysieren (Konno et al. 2006). Die Familie der Carboanhydrasen umfasst α -, β - und γ - Carboanhydrasen, wobei beim Menschen lediglich α - Carboanhydrasen nachgewiesen werden konnten (Lindskog 1997). Mittlerweile sind mehr als zehn humane Isoenzyme bekannt (Wykoff et al. 2000). So findet sich die Carboanhydrase I in Erythrozyten und bei der Carboanhydrase II handelt es sich um ein weit verbreitetes zytosolisches Enzym. Carboanhydrase III ist als Enzym niedriger Aktivität an roten Skelettmuskeln lokalisiert, und die Carboanhydrase IV stellt eine membrangebundene Isoform dar, welche u.a. im Zentralnervensystem, der Lunge und in der Niere nachgewiesen worden ist. Carboanhydrase V ist ein mitochondriales Enzym, Carboanhydrase VI wird als sekretorisches Glykoprotein im Speichel exprimiert. Während Carboanhydrase VII eine Isoform mit bisher unbekannter Funktion darstellt, kann Carboanhydrase VIII an Purkinje-Zellen gefunden werden.

Carboanhydrase IX (CA IX) ist mittlerweile als tumor-assoziiertes Isoenzym bekannt (N6grádi 1998). Strukturell ist es ein transmembranäres Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 54 bis 58 kDa und besitzt neben den intraplasmatischen Teil als Ankerstelle an der Zelloberfläche eine N-terminale, proteoglykanähnliche Struktur. Die Rolle dieses Enzyms in der Regulation der Zellproliferation und Oncogenese ist gegenwärtig noch nicht hinreichend untersucht. Das durch die katalysierte Reaktion resultierende Bicarbonat kann durch intrazelluläres und somit intratumorales Chlorid ausgetauscht werden, wodurch die für das Tumorwachstum benötigte intrazelluläre Alkalose aufrechterhalten wird. Somit schützt Carboanhydrase IX das Innere einer Tumorzelle vor einer Übersäuerung (Hoogsteen et al. 2005). Bei entsprechend niedrigem pH-Wert auf Grund der Akkumulation von Laktat würden die Proliferation der Tumorzellpopulation und damit auch das weitere Überleben des

Tumorzellverbandes gefährdet. Man schreibt daher der Carboanhydrase die Rolle eines Schlüsselenzyms zur Tumorprogression zu (Hoogsteen et al. 2005). Somit exprimieren gesunde humane Gewebe, mit Ausnahme von Anteilen des Verdauungstraktes, keine Carboanhydrase IX.

Carboanhydrase IX ist ein gegenüber hypoxischem Stress sehr empfindlich reagierendes Enzym. Sinken die intratumoralen Sauerstoffpartialdrücke lediglich für 16 Stunden unter 20 mm Hg, kommt es zu einer konsekutiven Hochregulation der Carboanhydrase IX, weshalb die Bestimmung dieses Enzyms für Aussagen zur Aggressivität beim Mundhöhlenkarzinom aussichtsreich erscheint (Hoogsteen et al. 2005).

2.2.4 Vascular Endothelial Growth Factor C [VEGF C]

Solide Tumoren wie das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle benötigen für ihr Wachstum die Neubildung von Blutgefäßen. Ab einem Tumolvolumen von 3 mm³ gelingt die Ernährung der Tumorzellen nicht mehr durch Diffusion. Ohne die Bildung neuer Blutgefäße wären Karzinome nicht in der Lage, über diese Größe hinaus zu wachsen (Hasina 2001). Dieses Phänomen wird Angiogenese genannt und charakterisiert die Formation solcher neuer Blutgefäße (Fox 1997, Herold-Mende et al. 1999, Fiedler et al. 2001). Die Angiogenese beinhaltet mehrere Schritte. In einem ersten Schritt werden die Endothelzellen bereits vorhandener Blutgefäße aktiviert. Die Folge ist eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Die immunhistochemische Darstellung von Endothelzellen gelingt durch Nachweis der Antigene CD31, CD34 oder des von-Willebrand-Faktors. Der zweite Schritt im Angiogeneseprozess ist die gezielte Wirkung von Mitogenen und Mediatoren. Ruhende Endothelzellen teilen sich, zeigen Migrationen als Antwort auf Angiogenesefaktoren und schließlich erfolgt die Kapillardifferenzierung und –anastomosierung für eine suffiziente Durchblutung (Fox 1997). Der wohl bekannteste Mediator ist der Vascular Endothelial Growth Factor [VEGF]. VEGF ist ein 34 – 42 kDa schweres, dimeres, multifunktionales Glykoprotein (Fox 1997). Eine im Tumor bestehende Gewebshypoxie steigert die Expression von VEGF im Tumorgewebe, wobei die Angiogenesefaktoren durch die zu den Tyrosinkinasen gehörenden Rezeptoren FLT-1 und FLK-1 reguliert werden (Fiedler et al. 2001). Zudem konnte bereits an humanen Mundhöhlenkarzinomzelllinien gezeigt werden, dass der hypoxische Stimulus über HIF-1 α vermittelt wird (Shemirani und Crowe 2002, Mohamed et al. 2004, Pufe et al. 2004).

Vom Standpunkt des Klinikers aus gehört die VEGF-Familie zu den am besten untersuchten Proteinen, wenn tumoreigene Gefäße charakterisiert werden sollen. Ihre Rolle als potente Mitogene sowohl in der Neubildung von Arterien und Venen als auch bei der Bildung von

lymphatischen Gefäßen steht außer Zweifel (Ferrara et al. 2003). Wegen der hohen Expression beim Mundhöhlenkarzinom wurde schon seit geraumer Zeit von einigen Autoren vermutet, dass mittels dieser Proteinstrukturen wertvolle Aussagen zwecks einer Prognoseabschätzung bei diesem Tumortyp gegeben werden könnten (Yang 2002).

Die Familie der VEGF-Proteine umfasst mittlerweile mehrerer Mitglieder. Allen gemeinsam ist ihre Struktur in Form eines dimeren Glykoproteins, welches durch Disulfid-Brücken miteinander vernetzt ist (Sauter et al. 1999).

Allerdings ist nicht die komplette VEGF-Familie zwecks prognostischer Aussagen beim Mundhöhlenkarzinom geeignet. Zum besseren Verständnis der mittlerweile 6 Mitglieder umfassenden Familie des Vascular Endothelial Growth Factors sind die einzelnen Proteinstrukturen und deren Isoformen unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen Funktion in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4 Übersicht über die wichtigsten Mitglieder der VEGF-Familie mit einer Bedeutung in der Tumorgenese

	VEGF –A	VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D
Isoformen	121, 165, 189 und 206 AS	167 und 186 AS		
Rezeptoren	VEGFR-1 VEGFR-2	VEGFR-1 VEGFR-2	VEGFR-3	VEGFR-3
Molekulargewicht	VEGF-A121 35 kDa VEGF-A165 45 kDa VEGF-A 189 55 kDa	VEGF-B167 42 kDa VEGF-B186 64 kDa	unprozessiert 58 kDa prozessiert 43 kDa	unprozessiert 53 kDa prozessiert 30 Kda
Funktion	Gefäßangiogenese	Gefäßangiogenese	Lymphangiogenese	Lymphangiogenese

Die beiden weiteren Mitglieder der VEGF-Familie in Form des Plazenta-Growth-Factors (PlGF) und VEGF-E wurden der Übersicht wegen nicht gesondert dargestellt, ihre Rolle im Rahmen der Tumorgenese ist noch weitgehend unklar.

In Ergänzung zur Tab. 4 sei erwähnt, dass neben dem VEGF-C der Einfluss von zwei Isoformen des VEGF-A, nämlich VEGF-A121 und VEGF-A 165, als unabhängige Prediktoren von Lymphknotenmetastasen beschrieben werden konnten (O-Charoenrat et al. 2001). VEGF-B scheint keinerlei Einfluss bei Kopf-Hals-Tumoren zu haben, deren Level entsprechen denen normaler epithelialer Zellen. Ebenso noch weitgehend unklar ist die Rolle von VEGF-D in den Frühstadien der lymphogenen Metastasierungskaskade (O-Charoenrat et al. 2001).

2.2.5 Von Hippel-Lindau-Protein [pVHL]

Das von-Hippel-Lindau-Gen [VHL] ist ein bekanntes Tumorsuppressor-Gen und in seiner Funktion innerhalb der Karzinogenese sehr eng mit dem Transkriptionskomplex HIF verbunden. Entdeckt im Jahr 1993 durch LATIF und Mitarbeiter, ist es auf dem Chromosom 3p25-26 lokalisiert und codiert ein 30 kDa schweres Protein, bestehend aus 213 Aminosäuren (Latif et al. 1993, Mukopadhyay et al. 1996, Iliopoulos et al. 1998, Fukuzumi et al. 2000).

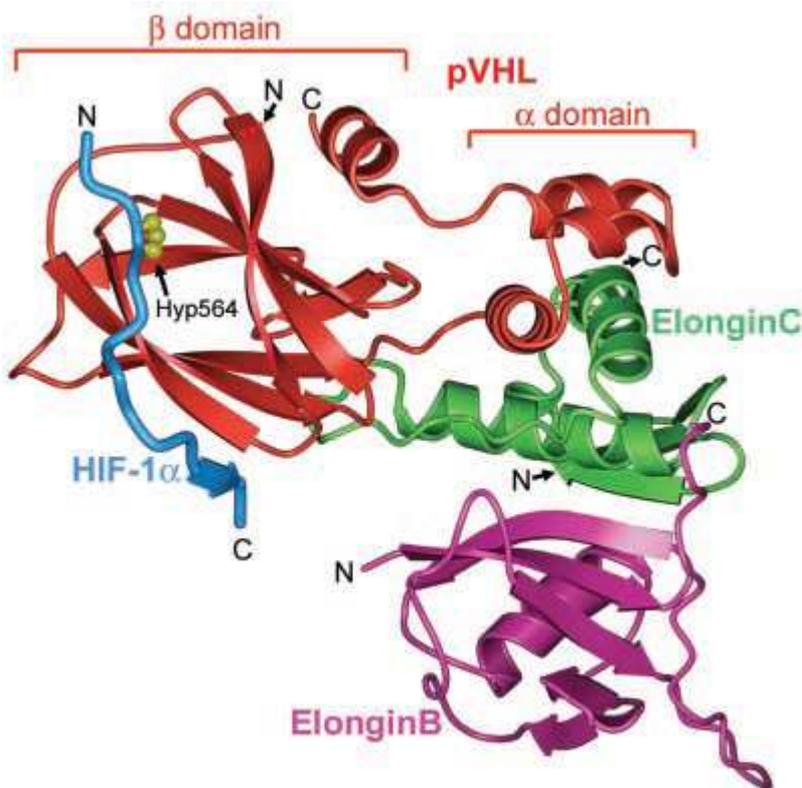


Abb. 3 Zusammenspiel des von Hippel-Lindau-Proteins [pVHL] mit dem Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α [HIF-1 α]. Die Bindung von pVHL an HIF-1 α ist abhängig von der Hydroxylierung des Prolinrestes 564 innerhalb der Oxygen Dependent Degradation Domain [ODD]. Diese Reaktion der Hydroxylierung zu Hydroxyprolin [Hyp 564] wird in Gegenwart von Sauerstoff durch sog. Prolylhydroxylasen vermittelt. Die so veränderte HIF-1 α -Untereinheit wird der proteosomalen Degradation zugeführt, die Aktivierung von entsprechenden Targetgenen bleibt aus (übernommen aus Min et al. 2002).

Defekte des Wildtyps durch Mutation der Allele oder in Form eines Verlustes sind in der Medizin als von-Hippel-Lindau-Erkrankung, einem hereditären Krebsyndrom mit gefäßreichen Tumoren des Zentralnervensystems, der Retina sowie in Kombination mit

anderen Tumoren wie Klarzelladenomen der Nieren und Phäochromozytomen bekannt (Kondo et al. 2002). Das VHL-Genprodukt bildet einen multimeren Komplex und wird als pVHL bezeichnet. pVHL enthält zwei Subdomänen, eine α - und eine β -Domäne, wobei letztere für die Interaktion mit HIF verantwortlich ist (Kondo et al. 2002). Es ist mittlerweile bekannt, dass bei einem Verlust von pVHL automatisch HIF hochreguliert und somit die Aktivierung der HIF-abhängigen Target-Proteine initiiert wird (Kondo et al 2002, Huang und Bunn 2003, Kaelin 2008). Es ist bekannt, dass durch den Wildtyp des von Hippel-Lindau-Proteins [wt pVHL] die mRNA-Expression von VEGF (verminderte Expression des Promotors) nachhaltig gebremst wird. Gleichfalls gilt als gesichert, dass bei einigen Tumorentitäten durch den Verlust von wt pVHL unter normoxischen oder auch hypoxischen Bedingungen unter anderen das VEGF-Gen und auch das GLUT-1-Gen hochreguliert werden können (Iliopoulos et al 1996). Deshalb ist es für detaillierte prognostische Abschätzungen für das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle wichtig, neben dem zentralen Transkriptionskomplex HIF 1 α auch dessen wichtigsten Regulator pVHL hinsichtlich seines Einflusses auf die Aggressivität der Tumoren näher zu untersuchen. Abb. 3 verdeutlicht das komplexe Zusammenspiel von pVHL und HIF-1 α in Gegenwart von Sauerstoff und der konsekutiven Degradation von HIF-1 α unter Normoxie-Bedingungen.

2.3 Präoperative Hämoglobinkonzentrationen [Hb-Werte]

In einigen experimentellen Studien wurde darauf hingewiesen, dass niedrige Hämoglobinkonzentrationen [Hb-Werte] mit einer schlechten Tumoroxygenierung einhergehen (Becker et al. 2000, Vaupel et al. 2005). Mit dem Ziel, in welchem Ausmaß die jeweiligen Hb-Werte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit der endogenen Hypoxieantwort korrelieren, wurden die präoperativen Hämoglobinkonzentrationen sowie der entsprechende Hämatokrit [Hk] erfasst. Die erhobenen Hb-Werte wurden in Anlehnung an BECKER und VAUPEL in folgende Kategorien unterteilt: Keine Anämie lag vor, falls der Hb-Wert bei Frauen größer als 7,4 mmol/l, bei Männern größer als 8,1 mmol/l betrug. Im Falle eines Hb von $< 6,8$ mmol/l handelte es sich bei beiden Geschlechtern um eine schwere Anämie. Milde Formen einer Anämie bestanden, wenn Hb-Werte bei Frauen zwischen 6,8 und 7,38 mmol/l und bei Männern zwischen 6,8 und 8,0 mmol/l vorgefunden werden konnten (Becker et al. 2000).

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Die Datenerfassung erfolgte auf der Grundlage der Patientenakten bis einschließlich 2003 und damit bis zum Erreichen eines 5-jährigen Nachbeobachtungszeitraumes.

Bei sämtlichen Patienten wurden folgende klinische Parameter erhoben: Alter, Geschlecht, Zeitpunkt der Diagnosestellung durch Probeexzision, Noxen wie Alkohol und Nikotin. Ferner wurden die Tumorausdehnung (T-Stadium), das Ausmaß von Lymphknotenmetastasen [N-Stadium] und eventuelle Fernmetastasen [M-Stadium] nach den Vorgaben des American Joint Committee on Cancer (AJCC) bzw. der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) aus dem Jahre 1990 zu einer TNM-Formel zusammengefasst (Flemming 1997). Zusätzlich wurden innerhalb der Datenbank die Certainty-Faktoren C1-C3 zwecks Einschätzung der diagnostischen Sicherheit bei der TNM-Formel erfasst (Wittekind 2004).

Außerdem wurden die histologische Differenzierung (Grading) (Veronesi 1989), das Auftreten von Rezidiven, ein möglicher Residualtumor (R-Klassifikation), die Therapiestrategie, der eventuelle Todestag und die eventuelle Todesursache erfasst.

Alle erhobenen Parameter orientierten sich an den Anforderungen der DÖSAK-Erhebung (Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich). Es wurde eine Datenbank im Statistik-Programm SPSS 12.0 erstellt. Datenlücken hinsichtlich des Überlebens oder Versterbens eines Patienten inklusive der Sterbeursache wurden durch Anfragen vorwiegend an die Hausärzte, bzw. in seltenen Fällen auch an die Krankenkassen und Einwohnermeldeämter, geschlossen.

3.2 Immunhistochemie

Sämtliche immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten an den jeweiligen Paraffinblöcken der entsprechenden Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom, welche freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Univ.-Prof. Dr. S. Hauptmann) zur Verfügung gestellt wurden. Als Ausschlusskriterien kamen in Betracht: Wenig Material (z.B. bei einer ausschließlichen Probeexzision) und altersbedingt nicht mehr zu immunhistochemischen Untersuchungen nutzbare Paraffinblöcke. Von diesen resultierenden 82 Fällen wurden Schnitte angefertigt und auf Objektträger gebracht.

Sämtliche in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden zwecks Wiederherstellung der verlorenen Immunreaktivität zunächst für 30 min in Xylol (Carl Roth GmbH + Co Kg Deutschland, Karlsruhe) eingelegt und in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol, Biomel GmbH Dessau, Deutschland) von 95% und 70% dehydriert, für 30 sec in destilliertes H₂O überführt und abschließend in ein PBS-Bad (Phosphate-buffered-Saline Puffer, Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Die Antigendemaskierung erfolgte mittels eines Citratpuffers (pH-Wert 6,0). Die Demaskierung wurde in einem Mikrowellenofen durchgeführt, die jeweiligen Einwirkzeiten hingen vom jeweiligen Primärantikörper ab und wurden entsprechend der Vorgaben der Hersteller eingehalten. Die Inaktivierung der endogenen Peroxidase erfolgte für 20 min. in einem Methanol/H₂O₂ Bad bei 4°C.

Nachfolgend sind die einzelnen immunhistochemischen Arbeitsgänge zur farblichen Detektierung der hypoxie-abhängigen Proteine in den Tumorgeweben etwas ausführlicher dargestellt.

3.2.1 HIF -1 α

Es wurde zur Färbung von HIF-1 α an Paraffinschnitten der Detektionskit der Firma DAKO [K5001 – Detektions Kit Peroxidase / DAB Rabbit/Mouse] verwendet. Die Einwirkungszeit des Primärantikörpers (HIF-1 alpha67-Sup, Fa. Acris) betrug 24 Stunden im Kühlschrank bei einer Konzentration von 1:500. Nach 3 Waschschritten mit Phosphate Buffered Saline (PBS) wurde für 30 Minuten der Brückenantikörper inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten mit PBS erfolgte für ebenfalls 30 Minuten die Inkubation des Streptavidin-Peroxidase-Komplexes und nach abermaligen 3 Waschschritten mit PBS die farbliche Detektion mit Diabenzidin [Konzentration 1 : 50]. Nach abschließender Spülung mit bidestilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun. Als negative Kontrolle galt die Inkubation ohne Primärantikörper. Die Postivkontrollen erfolgten an Glioblastomzellen wie bereits durch Dellas und Mitarbeiter beschrieben (Dellas et al. 2008).

3.2.2 GLUT-1

Es wurde der Primärantikörper Glut-1 (A-3536, Fa. Dako) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS-Puffer der Firma Acris verwendet. Orientierend an den Empfehlungen der Herstellerfirma wurden verschiedene Aufbereitungen der Präparate und Verdünnungen getestet.

Die Negativkontrollen erfolgten an Hirngewebe der Ratte und durch eine alleinige Inkubation ohne Primärantikörper. Als Positivkontrollen kamen humane Erythrozyten und Colonkarzinome zum Einsatz (Li et al. 2008).

3.2.3 CA IX

Der Primärantikörper (CA IX, H-120, SC 25599, Santa Cruz Biotechnology, inc.) wurde in einer Verdünnung von 1:100 in Fraktionen zu je 250 µl im Antibody Diluent (DAKO REAL) auf die Paraffinschnitte gebracht und so für 24 Stunden bei ca. 4°C inkubiert. Die Positivkontrolle wurde mit Aqua dest. gespült.

Die Einwirkzeit des biotinylierten Brückenantikörpers (Link, Biotinylated Secondary Antibody, Dako Cytomation) betrug 30 Minuten, anschließend wurde der Streptavidin-Peroxidasekomplex (HRP, Dako Cytomation) für weitere 30 min. inkubiert. Die farbliche Detektion erfolgte mittels DAB Chromogen (Dako Cytomation, 1:50) im Substrat Puffer bei einer Einwirkzeit von 10 min gemäß den Vorgaben des Herstellers.

Abschließend erfolgte die Gegenfärbung sämtlicher Paraffinschnitte mit Hämalaun (Mayer, Merck KGaA, Darmstadt) sowie die Eindeckung mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt).

3.2.4 VEGF-C

Die Inkubation des Primärantikörpers gegen VEGF-C (VEGF-C, 18-2255, Zymed Laboratories invitrogen immunodetection, San Francisco, CA) erfolgte ebenfalls in einer Verdünnung von 1: 100 im bereits beschriebenen Antibody Diluent bei 4°C für 24 Stunden. Alle weiteren Schritte entsprachen exakt denen für den Nachweis von Carboanhydrase 9.

3.2.5 Von Hippel-Lindau-Protein [pVHL]

Für die immunhistochemischen Nachweise für das von Hippel-Lindau-Genprodukt pVHL wurde ein monoklonaler Maus-Anti-pVHL-Antikörper [SPM 324] der Firma Abcam, Cambridge, Großbritannien verwendet. Die Primärkonzentration betrug 4 µg/ml in 10mM Citratpuffer, pH=6,0. Appliziert wurde der Primärantikörper schließlich in einer Verdünnung im Verhältnis 1:50 für 20 Minuten. Nach Abkühlen bei Raumtemperatur für ca. 20 Minuten und anschließender Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte die farbliche Detektion. Generell kamen folgende chronologische Arbeitsschritte bei den immunhistochemischen Färbungen zum Einsatz:

- Vorwärmung der Objektträger (60°C, 30 Minuten) und Behandlung in einem Entparaffinierer (Gerät „Midas E“)
- Aufbereitung in der Mikrowelle (20 Minuten, 600 Watt, in Natriumcitrat)
- Abkühlphase auf Zimmertemperatur und Spülvorgänge (Wasserstoffperoxid und destilliertes Wasser)
- Parallel dazu Vorbereitung des Primärantikörpers (Verdünnung mit PBS-Puffer s.o.)
- Aufziehen der Objektträger auf Coverplates und Einwirkung eines Proteinblockierers
- Applikation des Primärantikörpers und Inkubation im Ofen (37°C, 30 Minuten)
- Spülung und Einwirken des Sekundärantikörpers für 12 Minuten (Zimmertemperatur)
- Spülung und Einwirken einer Peroxidase für 12 Minuten (Zimmertemperatur)
- Spülung und Einwirkung (15 Minuten) der frisch hergestellten Färbelösung („Zymed Chromogen-Kit“)
- Hintergrundfärbung mit Hämalaun (Gerät „Midas E“)
- Eindeckung der Objektträger mit handwarmer Gelatine und Trocknung bei 55°C

3.3 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

Sämtliche gegen die verschiedenen Proteinstrukturen [GLUT-1, CA IX, VEGF C, HIF-1 α] gefärbten Plattenepithelkarzinome wurden lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 25-fach hinsichtlich Färbeintensität und Prozent positiv gefärbter Zellen im Tumorgewebe untersucht.

Zur Auswertung wurde als semiquantitatives Verfahren der Immunreaktive Score [IRS] nach REMMELE (Remmele und Stegner 1987) herangezogen. Die Auswertungskriterien sind in Tab. 5 zusammengefasst. Der Immunreaktive Score wurde für alle Färbungen wie folgt gewertet: bei einem IRS von 0 bis 2 handelte es sich um einer negative Färbung, bei einem IRS von 3 bis 4 war die Färbung gering. Betrug der IRS von 6 bis 8, so konnte von einer mäßigen Färbeintensität gesprochen werden. Intensive Färbungen lagen vor, wenn ein IRS

Tab.5 Immunreaktiver Score nach REMMELE und STEGNER

Anzahl der gefärbten Zellen	Punkte	Färbeintensität	Punkte
Keine pos. Zellen	0 Punkte	keine Färbeintensität	0 Punkte
< 10% pos. Kerne	1 Punkt	Schwache Färbeintensität	1 Punkt
10-50% pos. Kerne	2 Punkte	Mäßige Färbeintensität	2 Punkte
51-80% pos. Kerne	3 Punkte	Starke Färbeintensität	3 Punkte
> 80% pos. Kerne	4 Punkte		

von 9 bis 12 resultierte. Lediglich bei der Carboanhydrase wurde zusätzlich eine Auswertung nur anhand des Prozentsatzes positiv gefärbter Zellen in Anlehnung an SANDLUND und Mitarbeiter realisiert, da prinzipiell die Färbungen gegen dieses Protein vergleichsweise schwächer ausfallen (Sandlund 2007 et al. 2007, Taubert 2007, Bache et al. 2006).

Mit Hilfe nachstehender Formel konnte der IRS sehr einfach berechnet werden:

$$\text{Prozentsatz positiver Zellen} \times \text{Färbeintensität} = \text{IRS (0-12 Punkte)}.$$

3.4 Statistik zur Immunhistochemie

Sämtliche statistische Analysen wurden an einer Datenbank mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 12.0 ausgeführt. Die Vergleiche der jeweiligen Überlebenswahrscheinlichkeiten, die Zusammenhänge einer Expression eines Proteins und dem Überleben der Patienten erfolgten in den KAPLAN-MEIER-Analysen mittels des log-rank-Tests. Zur Verifizierung, ob eine Proteinexpression mit dem Tumorstadium, dem Ausmaß an regionären Lymphknoten oder auch der histopathologischen Differenzierung korrelierte, erfolgten der Chi-Quadrat-Test und der exakte Test nach FISCHER. Zusätzlich wurden bivariate Korrelationen mittel des Spearman's rank Test vorgenommen. Der Nachweis, ob ein Protein als unabhängiger Prognosemarker gewertet werden konnte, erfolgte durch eine Korrelation der Überlebenswahrscheinlichkeiten mit der Proteinexpression in der multivariaten Cox's-Regressionsanalyse (adjustiert nach Größe des Primärtumors und dem Grading). Für alle statistischen Tests galten folgende Signifikanzniveaus: Bei p-Werten von $< 0,05$ bestanden signifikante Zusammenhänge; bei einem p-Wert von $< 0,01$ wurde das Verhältnis als hoch signifikant gewertet.

3.4.1 Überlebensstatistiken nach KAPLAN-MEIER

Zum Vergleich der Überlebenszeiten wurde die Methode nach KAPLAN-MEIER (Kaplan 1958) zugrunde gelegt. Diese bietet den Vorteil eines geringen Informationsverlustes, da die Ereignisse (Tod eines Patienten) die Beobachtungsintervalle definieren und diese nicht fest vorgeben.

Zur Berechnung wurde die überlebte Zeit in Tagen vom Zeitpunkt der Diagnosestellung der Tumorerkrankung bis zum Tag des eventuellen Todes herangezogen. Es wurden folgende Todesursachen unterschieden: a) am Tumor verstorben oder mit deutlichen Zeichen des Tumorprogresses und b) nicht am Tumor verstorben.

4 Ergebnisse

4.1 Patienten und Überlebenswahrscheinlichkeit

In der Zeit von 1994 bis 1999 wurden 109 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle behandelt. An den Paraffinschnitten von 82 Patienten konnten weiterführende immunhistochemische Nachweise für die genannten hypoxie-relevanten Proteine durchgeführt werden. Es handelte sich dabei um 60 Männer und 22 Frauen. Der jüngste Patient war 23 Jahre, der älteste 83 alt, so dass ein Altersdurchschnitt von 59 Jahren resultierte.

Bei mehr als der Hälfte aller Patienten bestanden günstigere T₁- und T₂- Tumoren, jedoch musste bei mehr als 50% eine Lymphknotenmetastasierung festgestellt werden. In der Folge lag somit bei knapp 40% aller Fälle das prognostisch ungünstigste Stadium IV der Tumorerkrankung vor. Was die Differenzierung der Tumoren anbetraf, so entfiel die Mehrheit (39 von 82, 47,6%) auf mäßig differenzierte Formen. Zur besseren Übersicht sind die jeweiligen klinischen Daten aller Patienten in Tab. 6, die entsprechenden pathologischen Parameter in Tab. 7 zusammengefasst.

Sämtliche Behandlungsoptionen (operative Strategie, Rekonstruktion der enoralen Weichteilstrukturen) sind im Detail von LAUTNER dargestellt worden (Lautner 2007). Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit der hier inkludierten 82 Patienten betrug 62,4%. Die entsprechende KAPLAN-MEIER-Überlebenskurve geht aus der Abb. 5 hervor. Der Einfluss der Größe des Primärtumors auf das Überleben der Patienten ist in Abb. 6 dargestellt, der Zusammenhang zwischen vorhandenen Lymphknotenmetastasen und der Überlebenswahrscheinlichkeit geht aus Abb. 7 hervor. Die Abhängigkeit des Überlebens vom Grading ist in Abb. 8, die des Stadiums der Tumorerkrankung in Abb. 9 dargestellt.

Der Zusammenhang zwischen der Größe des Primärtumors (T-Stadium) und dem Überleben der Patienten war statistisch hoch signifikant (log rank-Test, $p=0,00001$). Es zeigte sich außerdem, dass der Zusammenhang zwischen der Anzahl der Lymphknotenmetastasen und dem Überleben statistisch hoch signifikant war (log rank-Test, $p=0,00001$). Interessanterweise konnte jedoch kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Überleben der Patienten und der Differenzierung (Grading) der Mundhöhlenkarzinome nachgewiesen werden (log rank-Test, $p=0,2116$). Der Zusammenhang zwischen dem Überleben der Patienten bei Mundhöhlenkarzinomen und dem Stadium der Tumorerkrankung war erwartungsgemäß wiederum statistisch hoch signifikant (log rank-Test, $p=0,0033$).

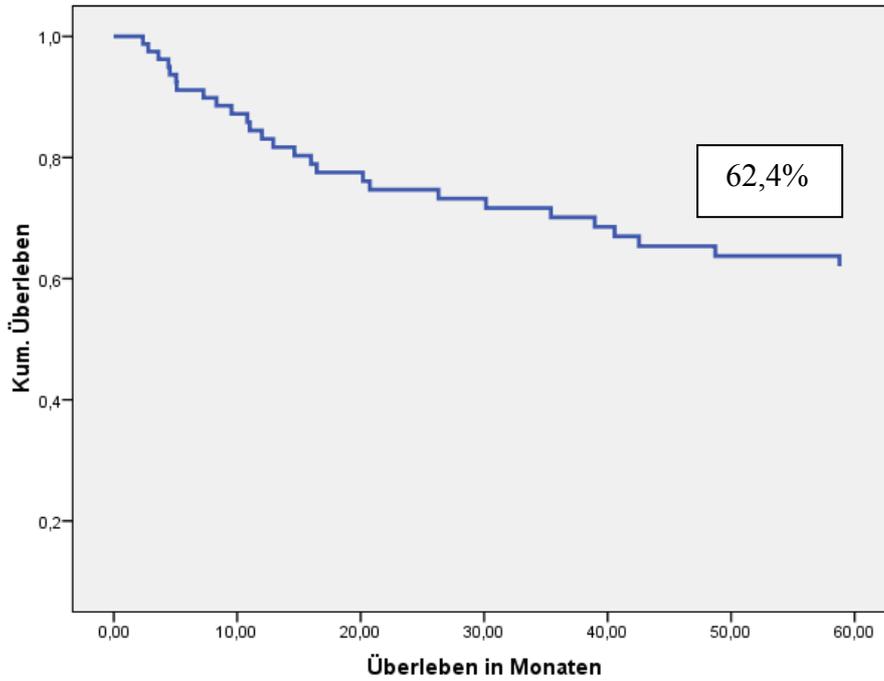


Abb.5 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei 82 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Behandlungszeitraum 1994 – 1999)

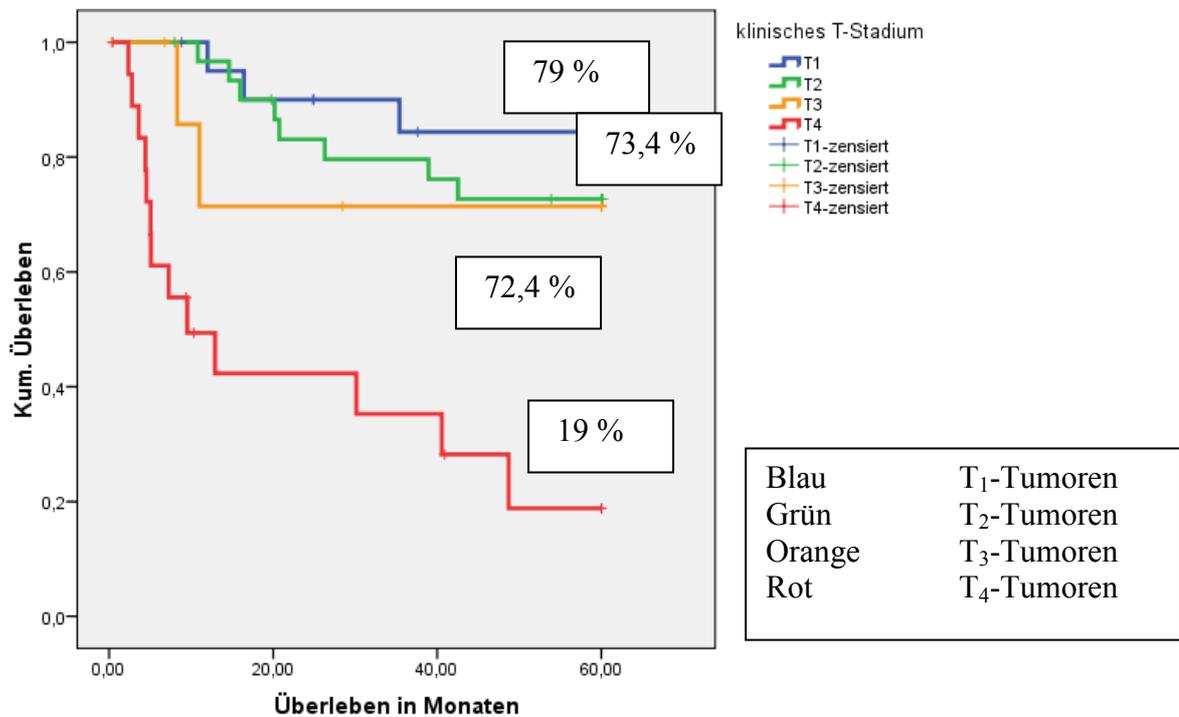


Abb.6 Abhängigkeit der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei 82 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle von der Größe des Primärtumors (Behandlungszeitraum 1994 – 1999)

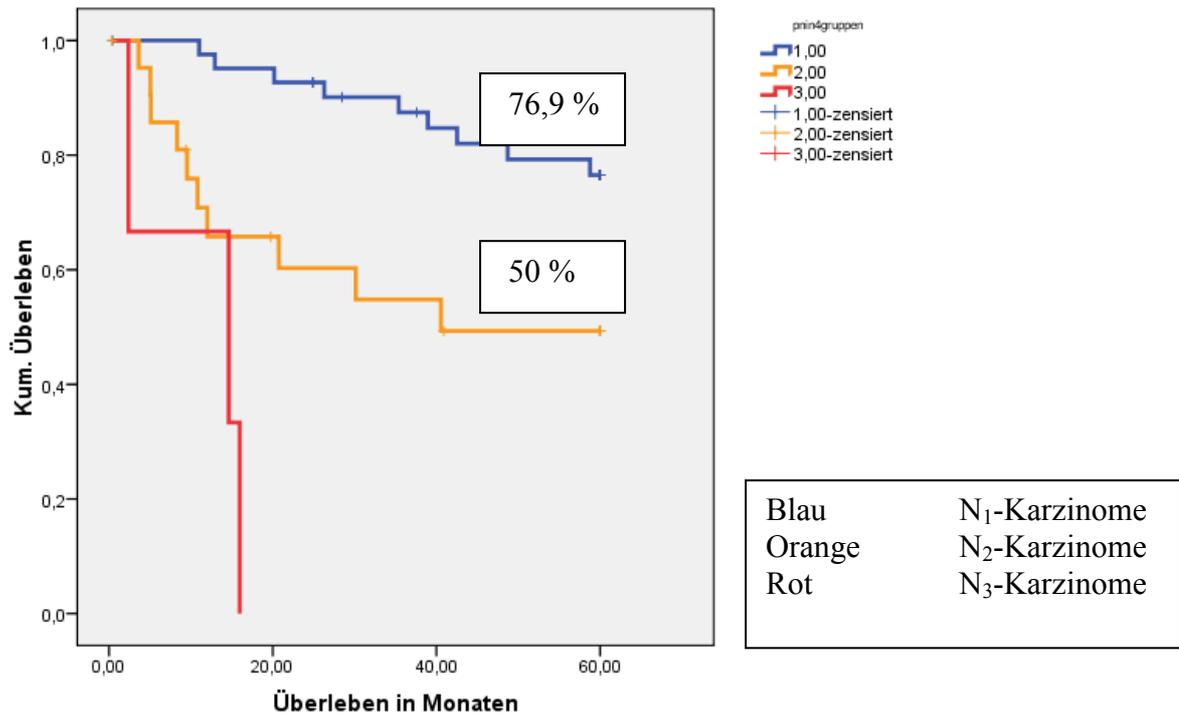


Abb.7 Abhängigkeit der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei 82 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle von der Anzahl der Lymphknotenmetastasen (Behandlungszeitraum 1994 – 1999)

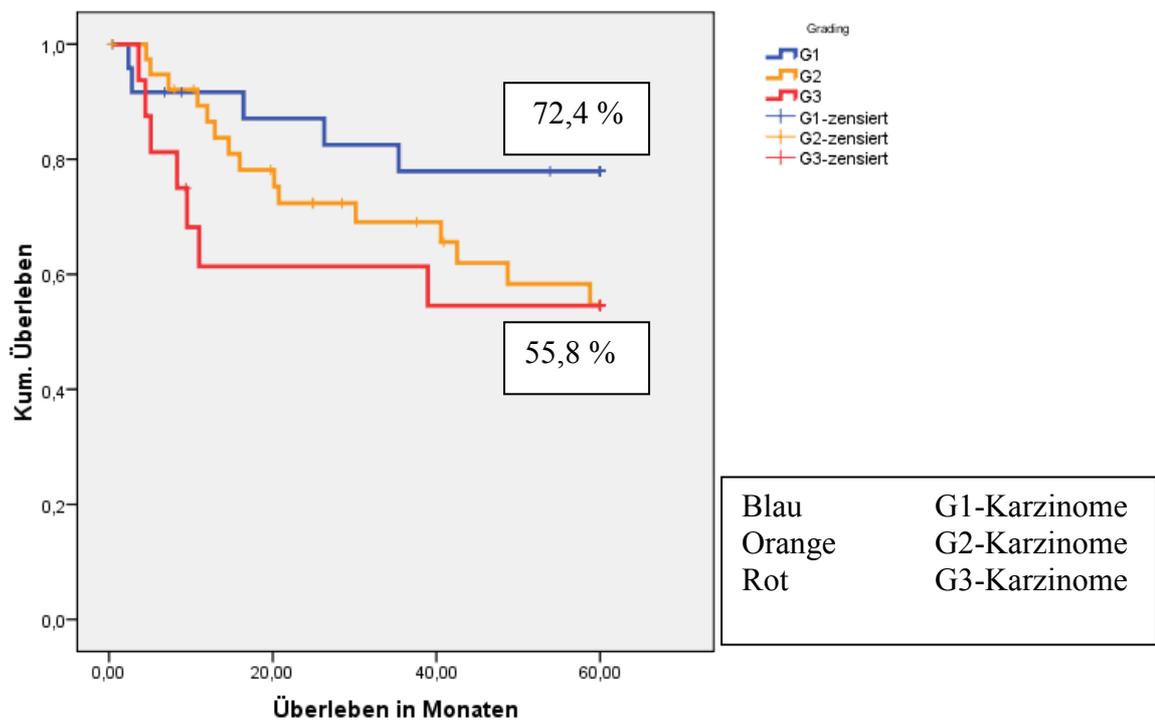


Abb.8 Abhängigkeit der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei 82 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle von der histologischen Differenzierung (Grading) (Behandlungszeitraum 1994 – 1999)

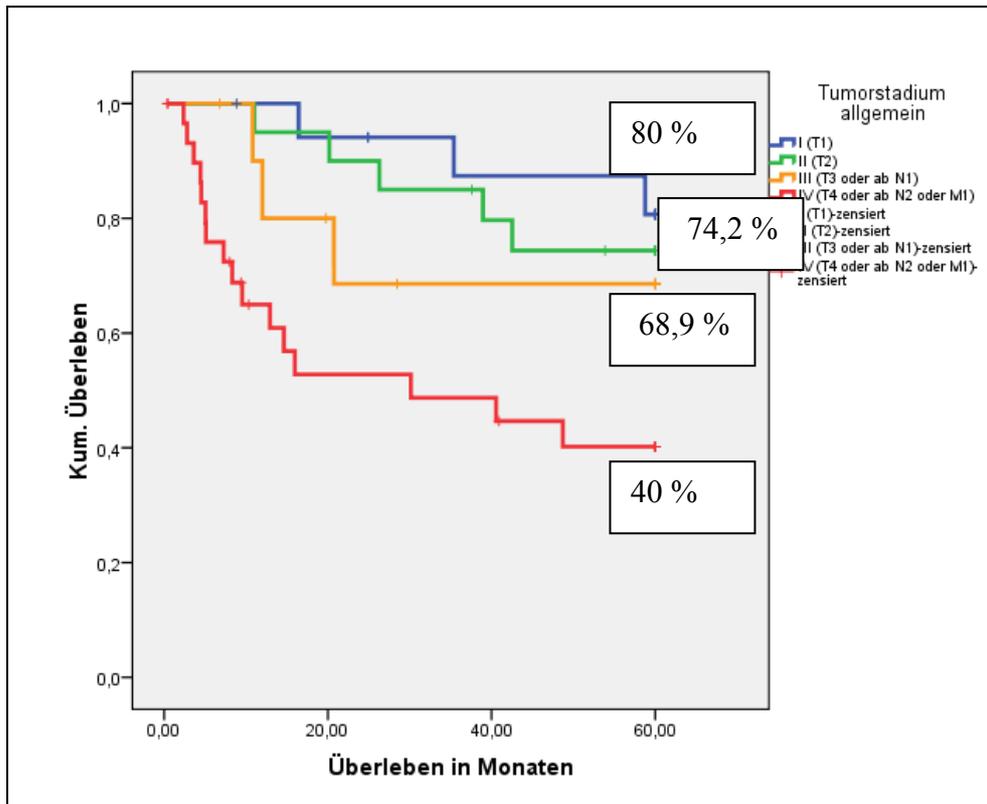


Abb.5 Abhängigkeit der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei 82 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle vom Stadium der Tumorerkrankung (Behandlungszeitraum 1994 – 1999)

Tab.6 Klinische Daten bei 82 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Behandlungszeitraum 1994 – 1999)

Variable	Anzahl	%
Alter		
Durchschnitt	59,0 Jahre (23 - 83 Jahre)	
Geschlecht		
Frauen	22	26,8
Männer	60	73,2
Tumorlokalisation		
Zunge	18	42,9
Mundboden	13	30,9
Wangenschleimhaut	1	2,4
Oberkiefer	4	9,5
Klinisches T-Stadium		
T1	22	26,8
T2	31	37,8
T3	10	12,2
T4	19	23,2
Klinisches N-Stadium		
N0	37	45,1
N1	27	32,9
N2a	1	1,2
N2b	8	9,8
N2c	7	8,5
N3	2	2,5

Tab.7 Pathohistologische Daten bei 82 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (1994 – 1999)

Variable	Anzahl	%
Pathologisches T-Stadium		
CIS	1	1,2
pT1	20	24,4
pT2	28	34,1
pT3	8	9,8
pT4	20	24,4
ohne pathologische Einteilung	5	6,1
Pathologisches N-Stadium		
N0	43	52,4
N1	11	13,5
N2a	1	1,2
N2b	11	13,5
N2c	3	3,6
N3	1	1,2
ohne pathologische Einteilung	12	14,6
Stadium der Tumorerkrankung		
I	19	23,2
II	20	24,4
III	11	13,5
IV	32	38,9

4.2 Immunhistochemie zum Pathway der Hypoxie

4.2.1 HIF-1 α

Im Rahmen des Regulationssystems hat der Transkriptionsfaktor HIF-1 α eine dominierende Rolle, weshalb dessen Expression zuerst analysiert wurde. An allen Paraffinschnitten der 82 Tumorgewebe konnten immunhistochemische Nachweise für HIF-1 α durchgeführt werden. Unter Anwendung des Immunreaktiven Scores nach REMMELE kam es bei 11 (13,4%) Geweben zu einer negativen Expression von HIF-1 α . Bei 24 Schnitten (29,3%) fanden sich schwache, bei 40 (48,8%) konnten mäßige Expressionen festgestellt werden. Bei 7 Tumorgeweben (8,5%) wurde der Transkriptionsfaktor HIF-1 α überexprimiert. Entscheidend war die heterogene Verteilung der jeweiligen Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium, dem N-Stadium, der Differenzierung und dem Stadium der Tumorerkrankung. In Tab. 8 sind die jeweiligen HIF-1 α -Expressionen in Abhängigkeit von der Größe des Primärtumors dargestellt.

Tab. 8 Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und der Größe des Primärtumors beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS HIF-1 α	T1	T2	T3	T4
Negativ 0-2	1	8	1	1
Schwach 3-4	11	8	3	2
Mäßig 6- 8	9	12	5	14
Stark 9 - 12	1	3	1	2

Tab. 9 Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und Anzahl von Lymphknotenmetastasen beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=70)

IRS HIF-1 α	N0	N1	N2a	N2b	N2c	N3
Negativ 0-2	6	1	1	1	1	0
Schwach 3-4	15	3	0	0	1	0
Mäßig 6- 8	19	4	0	10	1	1
Stark 9 - 12	3	3	0	0	0	0

Insgesamt fällt sowohl bei der Tumorgröße als auch bei der regionalen Metastasierung auf, dass kein Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und beiden klinisch-pathohistologischen Parametern bestand. So fanden sich sämtliche Überexpressionen von HIF-1 α bei den prognostisch günstigeren N0- /N1-Stadien, wohingegen bei den N2c- bzw. N3-Tumoren keine oder nur vereinzelt mäßige bis starke Expressionen für HIF-1 α gefunden werden konnten (Tab. 9). Es bestand auch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression des Transkriptionskomplexes HIF-1 α und dem Tumorstadium (χ^2 -Test, $p = 0,08$) sowie dem N-Stadium (χ^2 -Test, $p = 0,157$).

Zusätzlich gab es keine Korrelation zwischen der Expression von HIF-1 α und der histopathologischen Differenzierung. So wurde bei mehr als der Hälfte der hoch differenzierten Karzinome mäßige bis starke Expressionen gegen HIF-1 α beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte aus bisheriger klinischer Sicht nicht erwartet werden, dass mehr als 40% der mäßig- und schlecht differenzierten Mundhöhlenkarzinome eine negative oder nur geringe Expression von HIF-1 α zeigen. Alle Ergebnisse zum Zusammenhang des Gradings und der Expression von HIF-1 α sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab.10 Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und dem Grading beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS HIF-1 α	G1	G2	G3
Negativ 0-2	4	5	2
Schwach 3-4	8	13	3
Mäßig 6- 8	13	16	11
Stark 9 - 12	1	5	1

Die statistische Analyse ergab, dass zwischen der Expression von HIF-1 α und dem Grading kein signifikanter Zusammenhang bestand (χ^2 -Test, $p = 0,654$).

Ferner konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und dem Stadium der Tumorerkrankung gefunden werden. Es entfielen gut 50% der mäßigen bis starken Expressionen von HIF-1 α auf die günstigeren Stadien I und II. Im Gegensatz dazu zeigten etwa 35% der fortgeschrittenen Stadien III und IV negative oder nur mäßige Expressionen von HIF-1 α als Ausdruck einer geringgradigen Hypoxie. Die jeweiligen Expressionen sind im Detail in Tab. 11 zusammengefasst.

Tab.11 Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und dem Grading beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS HIF-1 α	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Negativ 0-2	2	3	1	5
Schwach 3-4	7	7	4	6
Mäßig 6- 8	10	8	4	18
Stark 9 - 12	0	2	2	3

Es zeigte sich, dass die Hypoxie einen wesentlichen Einfluss auf das Überleben der Patienten hatte. Die Expressionen für HIF-1 α waren der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit umgekehrt proportional. Zudem waren anhand der Expressionen dieses Proteins sehr detaillierte prognostische Aussagen möglich. Je stärker HIF-1 α exprimiert wurde, desto geringer war die Überlebenswahrscheinlichkeit. So fand sich bei einer negativen Expression von HIF-1 α eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 90%, wohingegen das Überleben im Falle einer Überexpression von HIF-1 α als Ausdruck hochgradiger Hypoxie im Tumorgewebe auf lediglich 30% sank (Abb. 10). Der Zusammenhang zwischen der

Expression von HIF-1 α und dem Überleben der Patienten war statistisch signifikant (χ^2 -Test, $p = 0,013$). Allerdings ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und dem Auftreten von Rezidiven (χ^2 -Test, $p = 0,552$, Tab. 12). Schließlich konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Stadium der Tumorerkrankung und der Hypoxie, gemessen an der Expression von HIF-1 α , bewiesen werden (χ^2 -Test, $p = 0,699$).

Tab.12 Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und einem Rezidiv beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS HIF-1 α	Rezidiv	Kein Rezidiv	unbekannt
Negativ 0-2	2	9	0
Schwach 3-4	4	20	0
Mäßig 6- 8	11	28	1
Stark 9 - 12	3	4	0

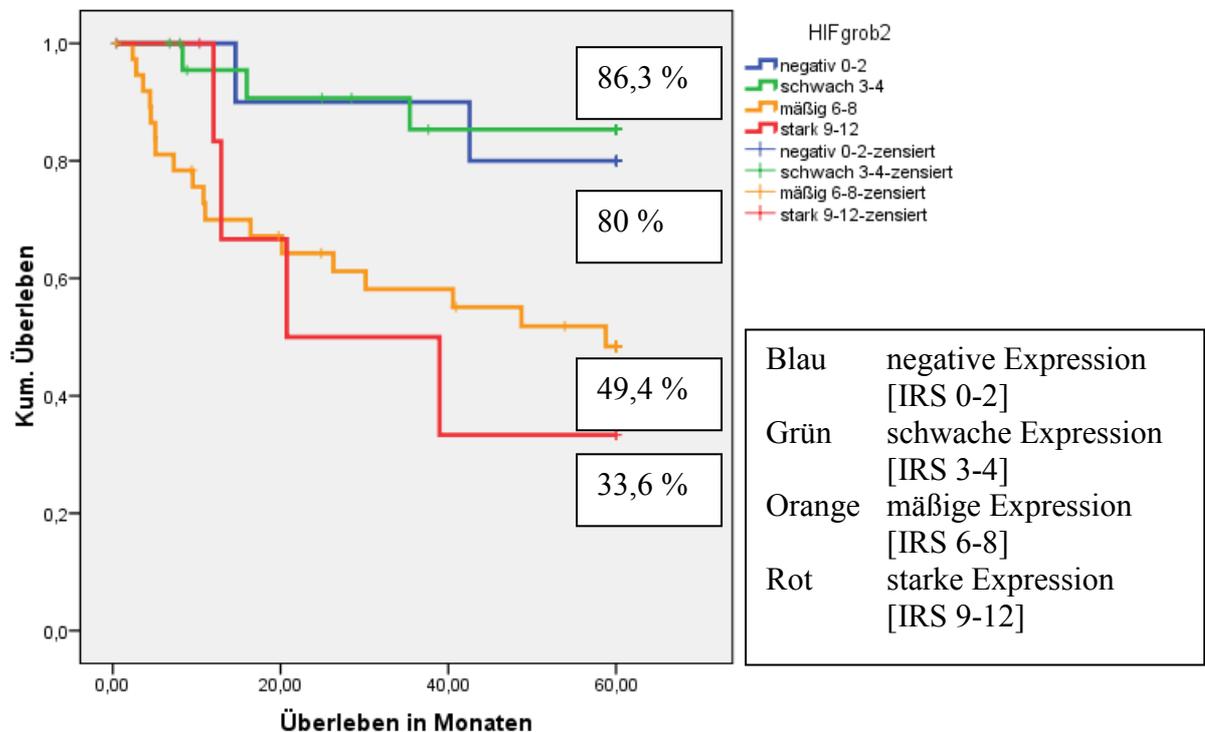


Abb. 10 Abhängigkeit des Überlebens beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle von der Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α (n=82, + zensierte Fälle)

Nach Zusammenfassen der im klinischen Verlauf günstigeren negativen und schwachen Expressionen für HIF-1 α (Gruppe 1) und einer Gegenüberstellung mit den mäßigen und starken Expressionen für dieses Protein (Gruppe 2) war das Überleben in der Gruppe 2 mit den mäßigen und starken HIF-1 α -Expressionen im Tumor ca. 45% schlechter. In der multivariaten Cox's-Regressionsanalyse (adj. nach Tumorgröße und Grading) fand sich ein 3,7-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens, wenn der Nachweis von HIF-1 α im Tumorgewebe einen IRS-Wert von ≥ 6 aufwies ($p = 0,0013$). In der Abb. 12 ist das Überleben in Abhängigkeit von verschiedenen Färbeintensitäten für HIF-1 α im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle dargestellt.

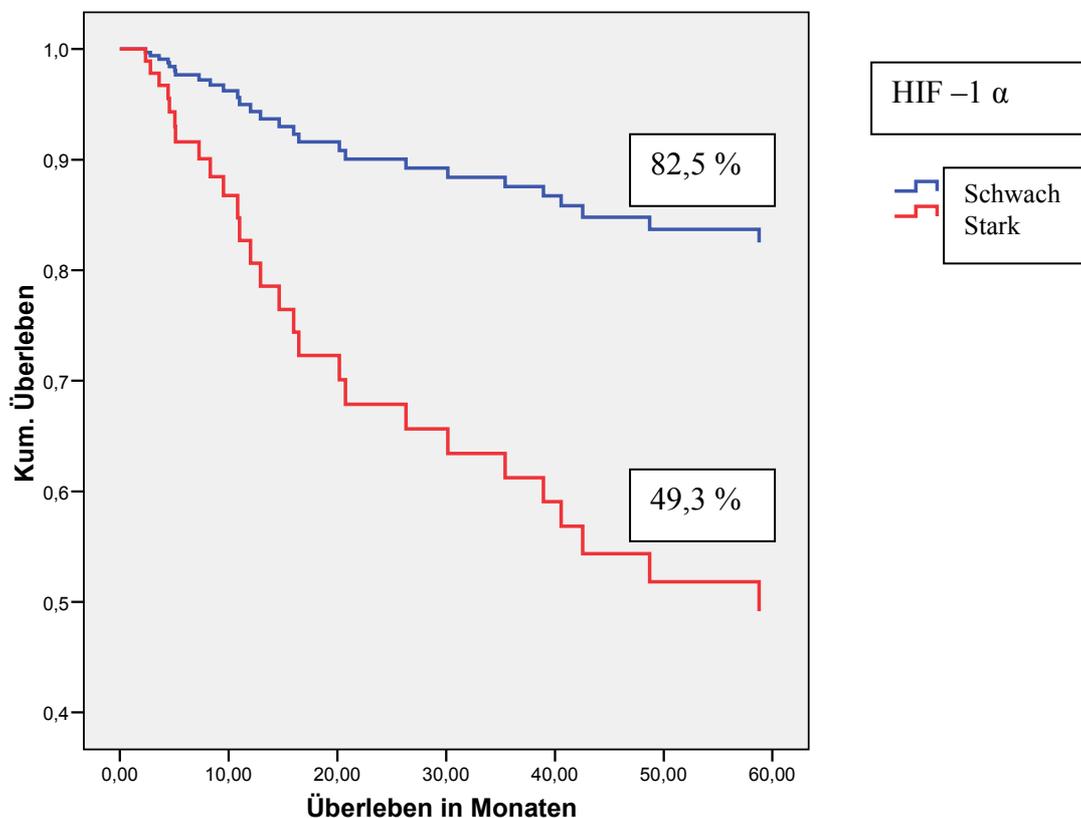


Abb. 11 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle in Abhängigkeit von der Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α . (Cox-Regressions-Analyse, $n=82$)
 Blaue Linie: Negative oder schwache Expression von HIF-1 α [IRS 0-4]
 Rote Linie: Mäßige bis starke Expression von HIF-1 α [IRS 6-12]

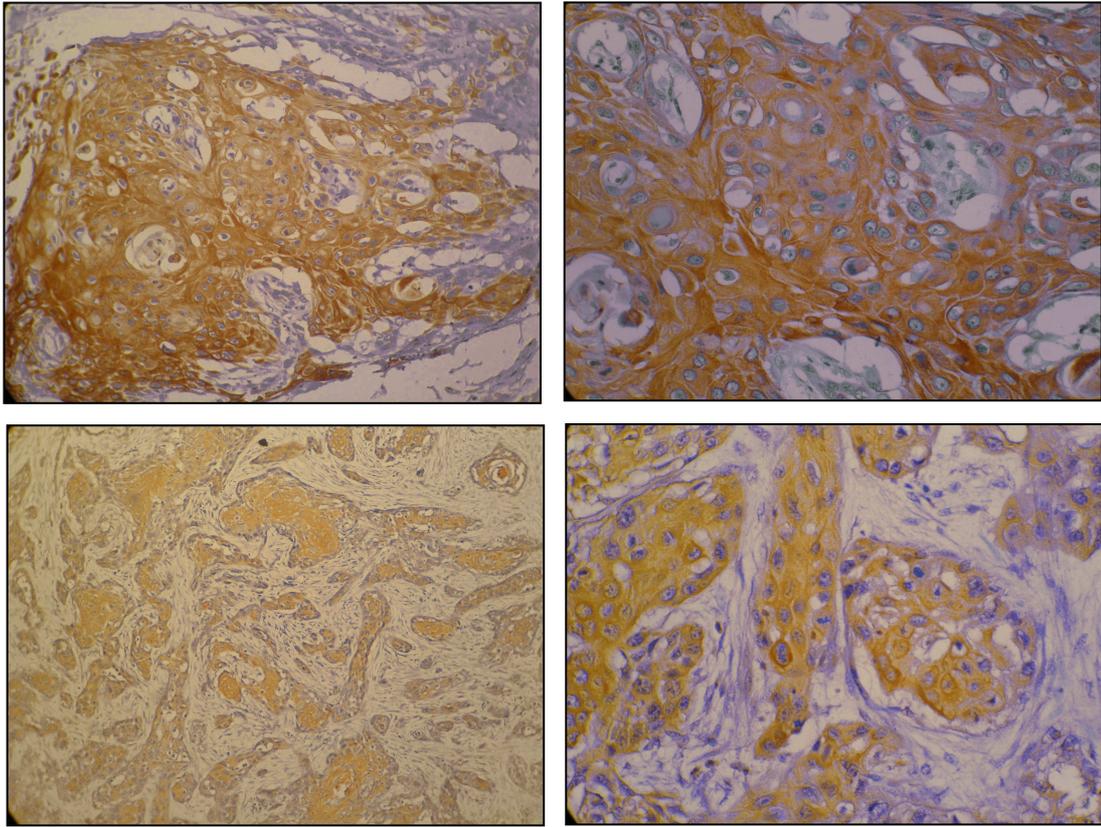


Abb. 12 Immunhistochemische Färbungen für HIF-1 α im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle
 Links oben IRS 12, Vergrößerung 100-fach
 Rechts oben IRS 12, Vergrößerung 200-fach
 Links unten IRS 8, Vergrößerung 100-fach
 Rechts unten IRS 8, Vergrößerung 200-fach

4.2.2 GLUT-1

Immunhistochemische Färbungen für das Glukosetransportmolekül GLUT-1 konnten in 79 von 82 Fällen vorgenommen werden. 47 (59%) der Schnitte waren positiv für GLUT-1 gefärbt. In 32 (41%) Fällen wurde eine negative Färbung gegen dieses Protein registriert. Die einzelnen Expressionen sind in den Tabellen 13 – 16 zusammengefasst. Tab. 13 zeigt den Zusammenhang zwischen der Expression von GLUT-1 und der Größe des Primärtumors, Tab. 14 stellt die GLUT-1-Expression dem N-Stadium gegenüber. Aus Tab. 15 geht die Expression dieses Proteins in Abhängigkeit vom Grading und aus Tab. 16 der Zusammenhang zwischen der GLUT-1-Expression und dem Stadium der Tumorerkrankung hervor.

Tab. 13 Zusammenhang zwischen der Expression von GLUT-1 und der Größe des Primärtumors beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=79)

IRS GLUT-1	T1	T2	T3	T4
Negativ 0-2	11	14	2	5
Schwach 3-4	3	2	3	5
Mäßig 6- 8	4	11	1	6
Stark 9 - 12	4	3	2	3

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von GLUT-1 und der Größe des Primärtumors. Sowohl beim klinischen T-Stadium (χ^2 -Test, $p = 0,340$) als auch beim pT-Stadium (χ^2 -Test, $p = 0,147$) konnte keine signifikante Korrelation beobachtet werden. Zudem konnte auch kein statistischer Zusammenhang zwischen der Expression von GLUT-1 und den übrigen etablierten klinischen und histologischen Parametern gefunden werden. So korrelierte GLUT-1 nicht mit der Differenzierung (χ^2 -Test, $p=0,856$), der Anzahl von Lymphknotenmetastasen (χ^2 -Test, $p = 0,135$) und dem Stadium der Tumorerkrankung (χ^2 -Test, $p = 0,101$). Es konnte ein Einfluss des Glukosetransportmoleküls GLUT-1 auf die Entstehung eines Rezidivs gefunden werden, auch wenn die statistische Signifikanz knapp verfehlt wurde (χ^2 , $p = 0,079$). So entwickelten negativ GLUT-1 exprimierende Karzinome in 14,3% der Fälle ein Rezidiv. Dieser Wert betrug bei schwacher GLUT-1-Expression 18,2% und stieg auf 65% an, wenn dieses Protein mäßig oder stark exprimiert wurde. Die Expression von GLUT-1 korrelierte deutlich mit dem Überleben der Patienten. Negativ GLUT-1-exprimierende Tumorpatienten hatten ein 5-Jahres-Überleben von 75%. Das Überleben sank auf 40% im Falle einer mäßigen Expression dieses Proteins (Abb. 13).

Tab. 14 Zusammenhang zwischen der Expression von GLUT-1 und der Anzahl von Lymphknotenmetastasen beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=79)

IRS GLUT-1	N0	N1	N2	N3
Negativ 0-2	16	11	5	0
Schwach 3-4	6	3	4	0
Mäßig 6- 8	9	7	4	2
Stark 9 - 12	5	4	3	0

Tab. 15 Zusammenhang zwischen der Expression von GLUT-1 und der histopathologischen Differenzierung [Grading] beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=79)

IRS GLUT-1	G1	G2	G3
Negativ 0-2	11	16	5
Schwach 3-4	3	7	3
Mäßig 6- 8	6	9	7
Stark 9 - 12	4	6	2

Tab. 16 Zusammenhang zwischen der Expression von GLUT-1 und dem Stadium der Tumorerkrankung beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=79)

IRS GLUT-1	I	II	III	IV
Negativ 0-2	10	12	3	7
Schwach 3-4	3	1	1	8
Mäßig 6- 8	3	6	2	11
Stark 9 - 12	3	1	3	5

Typische immunhistochemische Färbungen für GLUT-1 sind in Abb. 15 ersichtlich. Charakteristisch ist dabei die membranständige Färbung.

Aufgrund der verhältnismäßig kleinen Gruppen von Karzinomen, die GLUT-1 stark exprimierten, ließen sich detaillierte Aussagen zur Prognose bei mäßigen Expressionen gegen dieses Protein treffen. Eine mäßige Expression im Tumor korrelierte mit verkürzten Überlebenszeiten. Der prognostische Einfluss des Glukosetransportmoleküls GLUT-1 wird noch deutlicher, wenn man mäßige und starke Expressionen zusammenfasst und diese den negativen oder geringen Expressionen gegenüberstellt. Die multivariate Cox's-Regressions-Analyse (adj. nach Tumorgröße und Grading) erfolgte durch Vergleich der drei großen Gruppen: Karzinome mit einer negativen oder einer schwachen Färbung für GLUT-1 (zusammen n = 46) wurden den Tumoren mit einer mäßigen bis starken Expression (n = 31) gegenübergestellt (Abb. 14). Dabei konnte ein 4-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens festgestellt werden, wenn GLUT-1 mäßig und stark im Karzinom exprimiert wurde ($p = 0,014$).

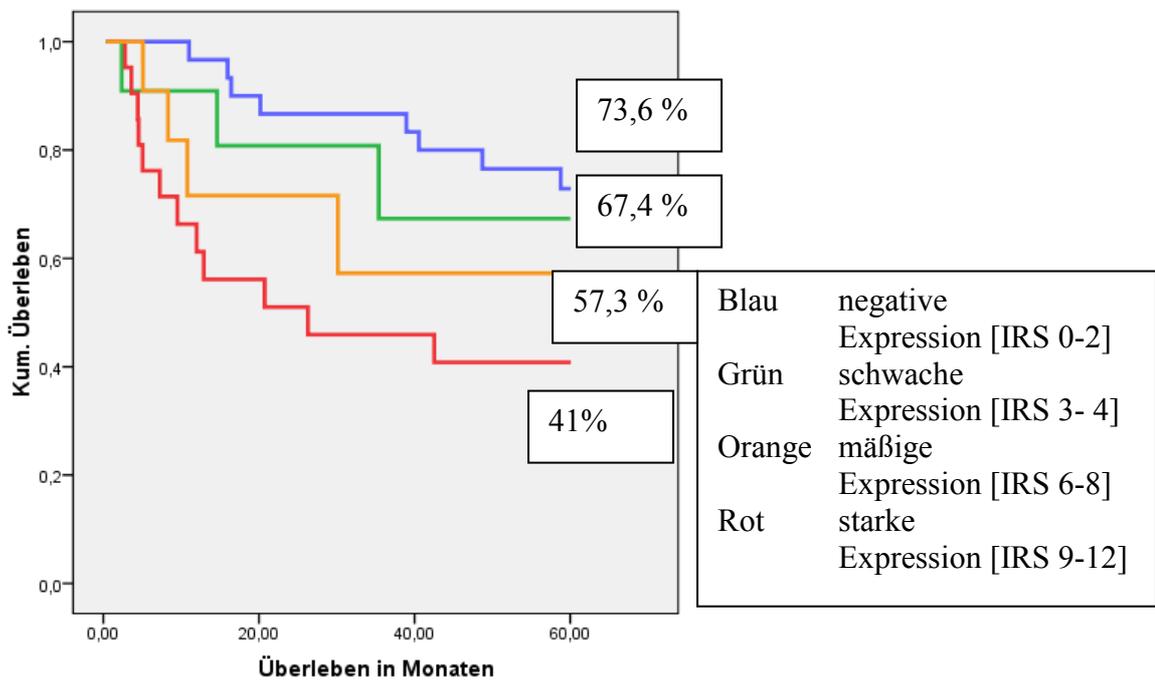


Abb. 13 KAPLAN-MEIER-Statistik zur Abhängigkeit des Überlebens beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle von der Expression des Glukosetransportmoleküls GLUT-1 (n=82)

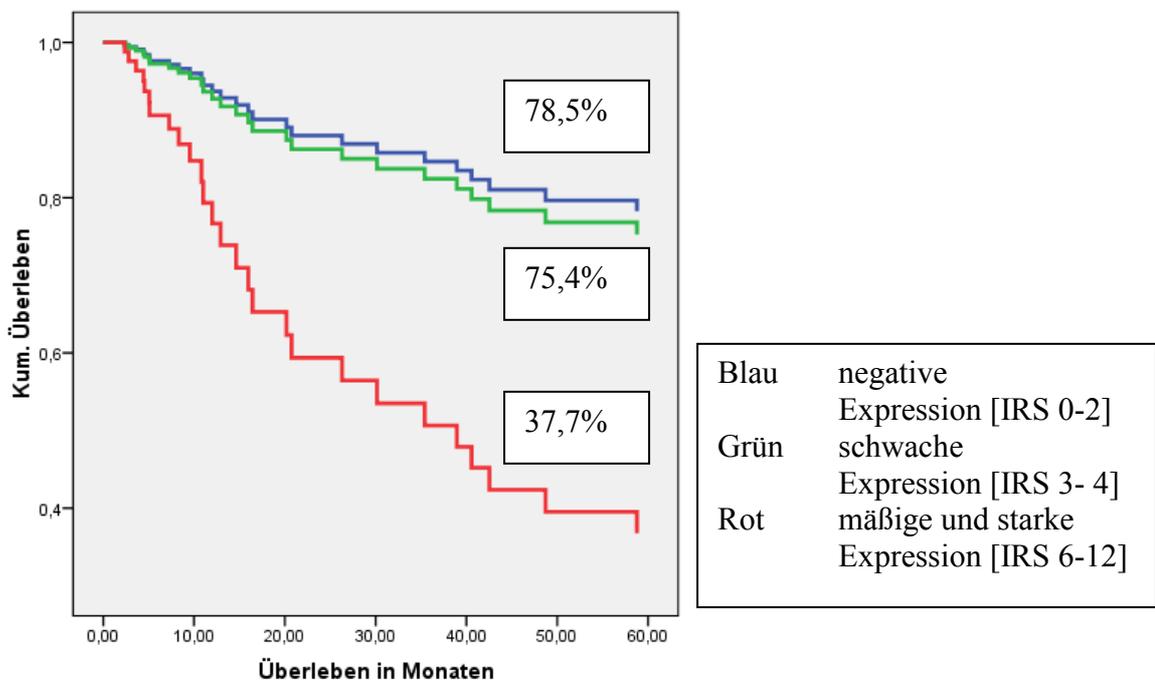


Abb. 14 Cox's-Regressionsanalyse zur Abhängigkeit des Überlebens beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle von der Expression des Glukosetransportmoleküls GLUT-1 (n=82)

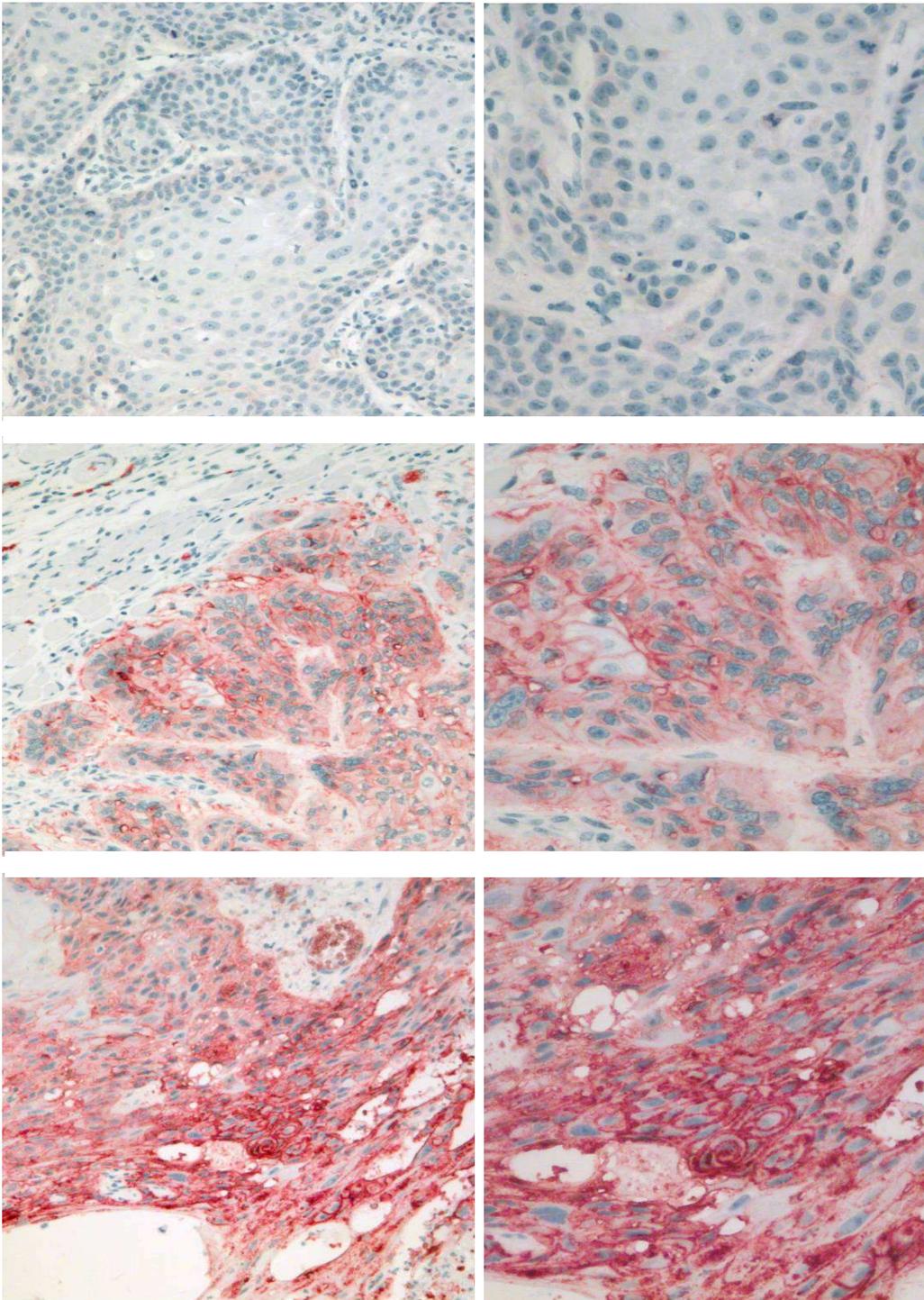


Abb. 15 Immunhistochemische Färbung für GLUT-1 an mehreren Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, 100- (links) bzw. 200- (rechts) fache Vergrößerungen im Lichtmikroskop

Oben:	Negative Expression	[IRS = 0-2]
Mitte :	Mäßige Expression	[IRS = 6]
Unten:	Starke Expression	[IRS = 12]

4.2.3 Carboanhydrase IX

Alle 82 Mundhöhlenkarzinome konnten für CA IX immunhistochemisch untersucht werden. Dabei waren die immunhistochemischen Nachweise für dieses Enzym bei 35 (42,6%) Patienten positiv (IRS ≥ 3) und in 47 (57,4%) Fällen negativ (IRS 0-2).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit war im Falle von negativer Expression von CA IX mit 63,6% allerdings nur minimal besser als bei Vorliegen einer mäßigen bis starken CA IX-Expression (61,5%, Abb. 16). Dabei korrelierte die Expression von CA IX nicht mit dem Tumorstadium (χ^2 -Test, $p = 0,494$; Tab. 17) und dem Ausmaß von Lymphknotenmetastasen (χ^2 -Test, $p = 0,945$; Tab. 18). Zudem bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von CA IX und dem Grading (χ^2 -Test, $p = 0,392$; Tab. 19) sowie dem Stadium der Tumorerkrankung (χ^2 -Test, $p = 0,905$; Tab. 20).

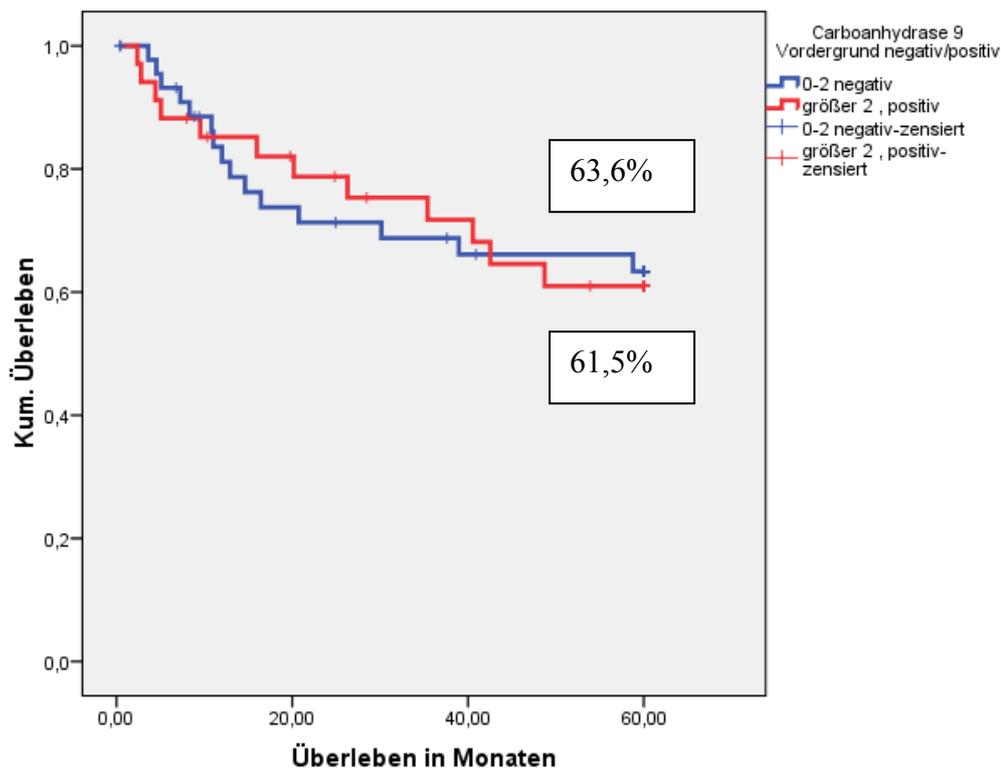


Abb. 16

Abhängigkeit des Überlebens beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle von der Expression der Carboanhydrase IX (n=82, + zensierte Fälle)

Blaue Linie negative bis schwache Expression [IRS 0-6]

Rote Linie mäßige und starke Expression [IRS 8-12]

Tab. 17 Zusammenhang zwischen der Expression von CA IX und der Größe des Primärtumors beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS CA IX	T1	T2	T3	T4
Negativ 0-2	12	19	6	10
Schwach 3-4	7	6	3	5
Mäßig 6- 8	3	5	1	3
Stark 9 - 12	0	1	0	1

Tab. 18 Zusammenhang zwischen der Expression von CA IX und der Größe des Primärtumors beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS CA IX	N0	N1	N2a	N2b	N2c	N3
Negativ 0-2	21	17	0	4	3	2
Schwach 3-4	9	5	1	3	3	0
Mäßig 6- 8	7	4	0	0	1	0
Stark 9 - 12	0	1	0	1	0	0

Tab. 19 Zusammenhang zwischen der Expression von CA IX und dem Grading beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS CA IX	G1	G2	G3
Negativ 0-2	15	21	11
Schwach 3-4	8	12	1
Mäßig 6- 8	2	6	4
Stark 9 - 12	1	0	1

Tab. 20 Zusammenhang zwischen der Expression von CA IX und dem Grading beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS CA IX	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Negativ 0-2	11	12	6	18
Schwach 3-4	6	5	3	7
Mäßig 6- 8	2	2	2	6
Stark 9 - 12	0	1	0	1

Das typische immunhistochemische Färbemuster für den Nachweis von CA IX an Mundhöhlenkarzinom-Geweben unter Darstellung verschiedener Farbeintensitäten geht aus der Abb. 17 hervor.

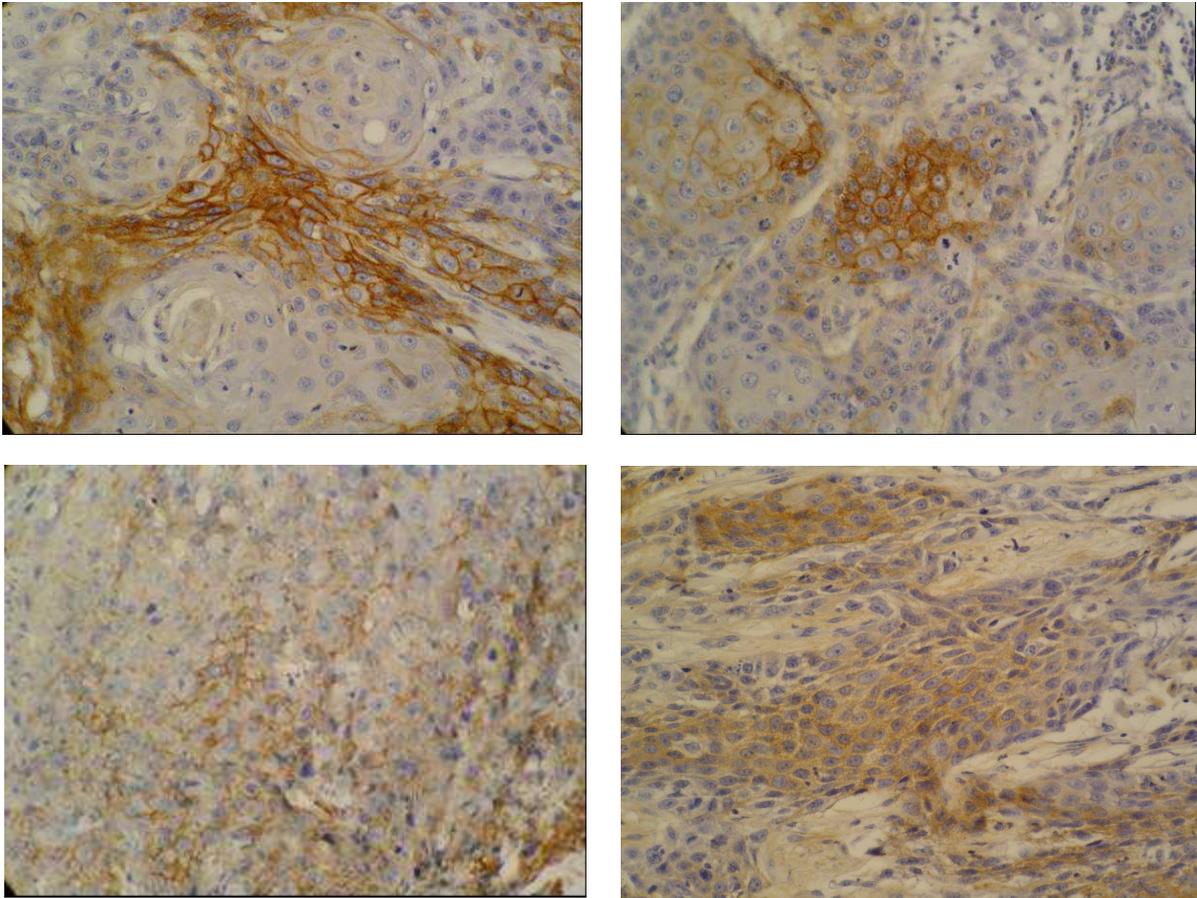


Abb. 17 Immunhistochemische Färbungen für Carboanhydrase 9 [CA IX] am Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle
Typische membranständige Färbemuster
Links oben IRS 9, Vergrößerung 200-fach
Rechts oben IRS 6, Vergrößerung 200-fach
Links unten IRS 3, Vergrößerung 200-fach
Rechts unten IRS 4, Vergrößerung 200-fach

4.2.4 VEGF-C

Die immunhistochemischen Nachweise für VEGF-C ergaben, dass die Mehrheit der Präparate (n=44) durch eine negative Färbung auffiel. In Tab. 21 ist zunächst der Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF-C und der Größe des Primärtumors zusammengefasst.

Tab. 21 Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF-C und der Größe des Primärtumors beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS VEGF-C	T1	T2	T3	T4
Negativ 0-2	10	17	4	13
Schwach 3-4	8	8	7	3
Mäßig 6- 8	4	6	0	1
Stark 9 - 12	0	0	0	1

Tab. 22 Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF-C und der Anzahl von Lymphknotenmetastasen beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS VEGF-C	N0	N1	N2a	N2b	N2c	N3
Negativ 0-2	18	17	0	4	3	2
Schwach 3-4	12	6	1	4	3	0
Mäßig 6- 8	7	3	0	0	1	0
Stark 9 - 12	0	1	0	0	0	0

Tab.23 Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF-C und dem Grading beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS VEGF-C	G1	G2	G3
Negativ 0-2	10	23	11
Schwach 3-4	11	12	3
Mäßig 6- 8	5	3	3
Stark 9 - 12	0	1	0

Die Tab. 22 verdeutlicht die Gegenüberstellung der Färbeintensitäten für VEGF-C bezüglich des Lymphknotenstatus, Tab. 23 den Zusammenhang VEGF-C-Expression und Grading. Aus der Tab. 24 geht schließlich das Verhältnis zwischen der VEGF-C-Expression und dem Stadium der Tumorerkrankung hervor. Das charakteristische Färbemuster gegen dieses Mitogen der Lymphangiogenese ist in Abb. 18 dargestellt.

Tab.24 Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF-C und dem Stadium der Tumorerkrankung beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=82)

IRS VEGF-C	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Negativ 0-2	11	12	6	15
Schwach 3-4	8	7	1	10
Mäßig 6- 8	0	0	5	6
Stark 9 - 12	0	1	0	0

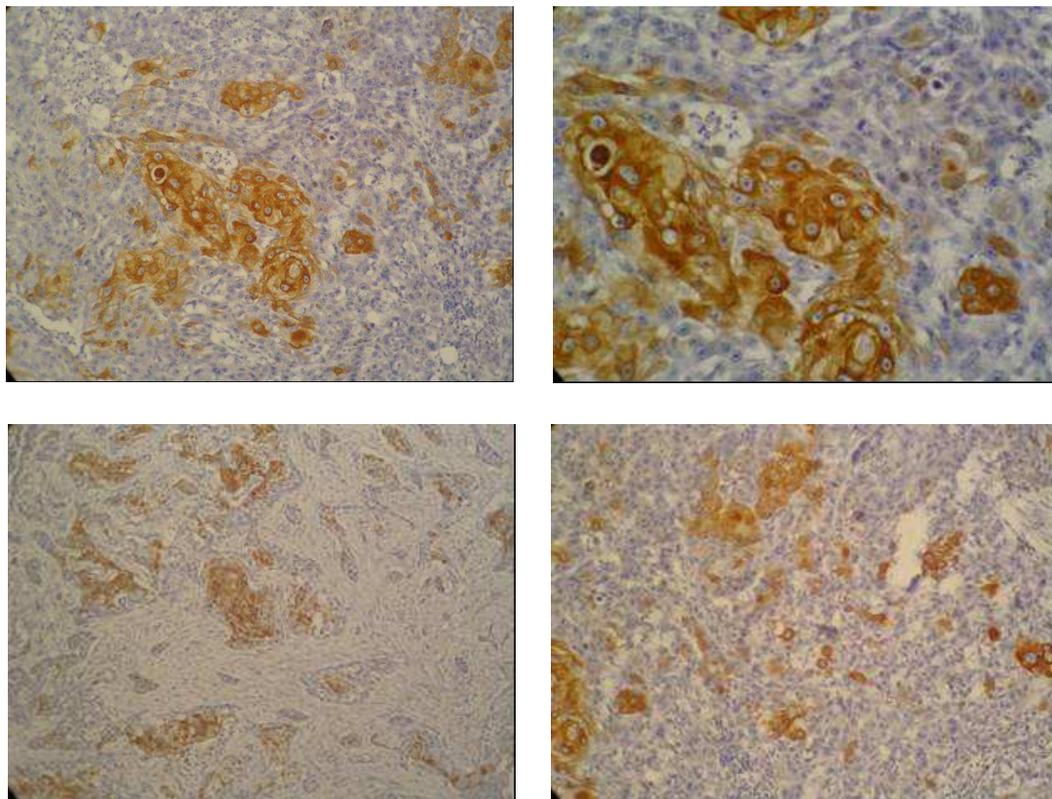


Abb. 18 Immunhistochemische Färbungen für VEGF-C am Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle.
 Links oben Starke Expression [IRS 9, 100-fache Vergrößerung]
 Rechts oben Starke Expression [IRS 9, 200-fache Vergrößerung]
 Links unten Mäßige Expression [IRS 6, 100-fache Vergrößerung]
 Rechts unten Mäßige Expression [IRS 6, 200-fache Vergrößerung]

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF-C und den klinisch-pathologischen Parametern. Die Expressionen korrelierten nicht mit der Tumorgöße (χ^2 -Test, $p = 0,31$), der Anzahl von regionären Lymphknotenmetastasen (χ^2 -Test, $p = 0,894$), dem Grading (χ^2 -Test, $p = 0,198$) und dem Stadium der Tumorerkrankung (χ^2 -Test, $p = 0,588$). Allerdings konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der

VEGF-C-Expression und der Entwicklung eines Rezidivs gefunden werden (Bivariate Korrelation, Spearman´s rank-Test, $p = 0,046$).

4.2.5 Von Hippel Lindau Protein [pVHL]

Von den erfassten 82 Patienten konnten in 77 Fällen immunhistochemische Färbungen für pVHL vorgenommen werden. Es handelte sich in mehr als der Hälfte aller Karzinome ($n = 57$; 54,3%) um negative Färbungen. Schwache Färbungen konnten bei 13 Tumorgeweben (12,4%) registriert werden. Lediglich in 7 Fällen wurde pVHL mäßig bzw. stark exprimiert (6,7%). Die entsprechende Verteilung der einzelnen Färbeintensitäten in Abhängigkeit von der Größe des Primärtumors geht aus Tab. 24 hervor. Tab. 25 zeigt den Zusammenhang der Expression von pVHL und dem Ausmaß von Lymphknotenmetastasen, Tab. 26 die Beziehung zum Grading. Schließlich ist die Expression von pVHL dem Stadium der Tumorerkrankung gegenübergestellt (Tab. 27).

Tab. 24 Zusammenhang zwischen der Expression von pVHL und der Größe des Primärtumors beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ($n=77$)

IRS pVHL	T1	T2	T3	T4
Negativ 0-2	17	21	7	12
Schwach 3-4	4	5	1	3
Mäßig 6- 8	1	2	1	0
Stark 9 - 12	1	1	0	1

Tab. 25 Zusammenhang zwischen der Expression von pVHL und der Anzahl von Lymphknotenmetastasen beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ($n=77$, 65 Fälle mit einer histologischen Lymphknotenuntersuchung)

IRS pVHL	N0	N1	N2a	N2b	N2c	N3
Negativ 0-2	30	6	0	9	1	1
Schwach 3-4	6	2	1	2	1	0
Mäßig 6- 8	1	2	0	0	0	0
Stark 9 - 12	2	1	0	0	0	0

Tab. 26 Zusammenhang zwischen der Expression von pVHL und dem Grading beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=77)

IRS pVHL	G1	G2	G3
Negativ 0-2	19	25	13
Schwach 3-4	2	8	3
Mäßig 6- 8	1	2	1
Stark 9 - 12	1	2	0

Tab.27 Zusammenhang zwischen der Expression von pVHL und dem Stadium der Tumorerkrankung beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=77)

IRS VEGF-C	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Negativ 0-2	17	14	6	20
Schwach 3-4	2	3	1	7
Mäßig 6- 8	1	1	1	1
Stark 9 - 12	0	1	1	1

Im Chi-Quadrat-Test konnte gefunden werden, dass die Expression von pVHL nicht mit der Tumorgröße ($p=0,264$), mit dem Ausmaß von Lymphknotenmetastasen ($p= 0,163$), der histopathologischen Differenzierung ($p=0,778$) und dem Stadium der Tumorerkrankung ($p=0,926$) korrelierte.

Die Expression des von-Hippel-Lindau-Proteins hatte jedoch einen deutlichen Einfluss auf das Überleben der Patienten. Interessanterweise fand sich eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Expression von pVHL und dem 5-Jahres-Überleben der Patienten. So konnte im Fall einer negativen bzw. schwachen Expression von pVHL eine Überlebenschance von 69% gefunden werden, während dieser Wert bei einer mäßigen bis starken Expression dieses Proteins auf nur noch 20% abfiel. Abb. 19 zeigt die entsprechenden KAPLAN MEIER Kurve.

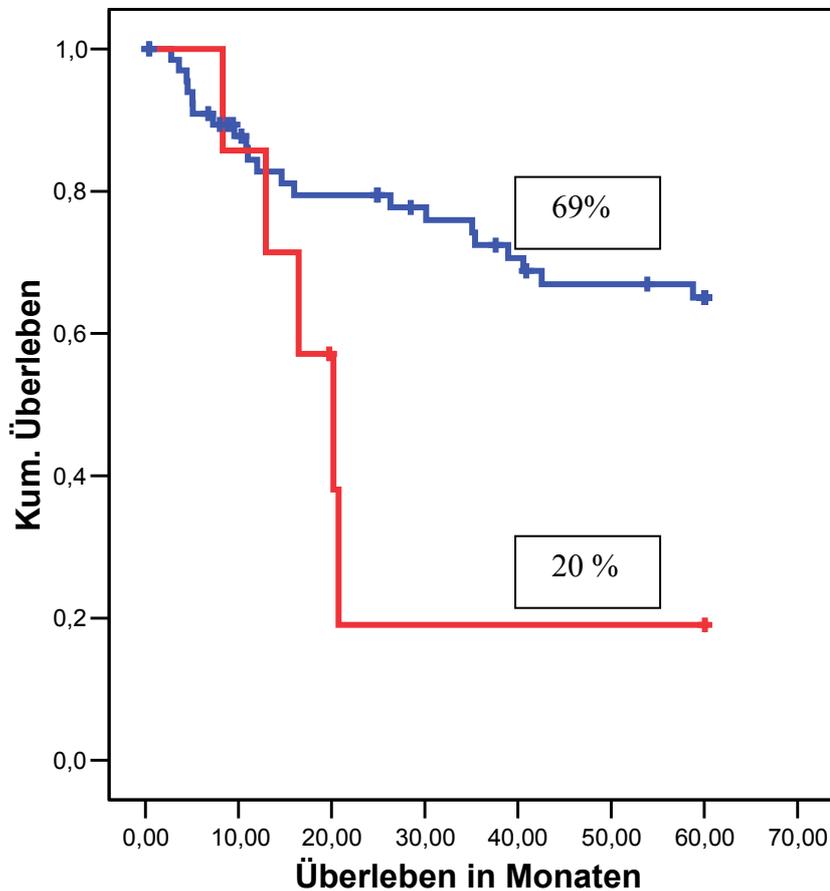


Abb. 19 Abhängigkeit des Überlebens beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle von der Expression des von Hippel-Lindau-Proteins [pVHL] (n=77, + zensierte Fälle)
 Blaue Kurve: IRS 0-4
 Rote Kurve: IRS 6 -12

Mit Hilfe der multivariaten Cox's Regressionsanalyse (adj. nach Tumorgroße und Differenzierung) konnte ein 3,7-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens gefunden werden, wenn im Tumorgewebe pVHL mäßig bzw. stark exprimiert wurde ($p = 0,014$). Ein typisches immunhistochemisches Färbemuster für pVHL ist in Abb. 20 gezeigt.

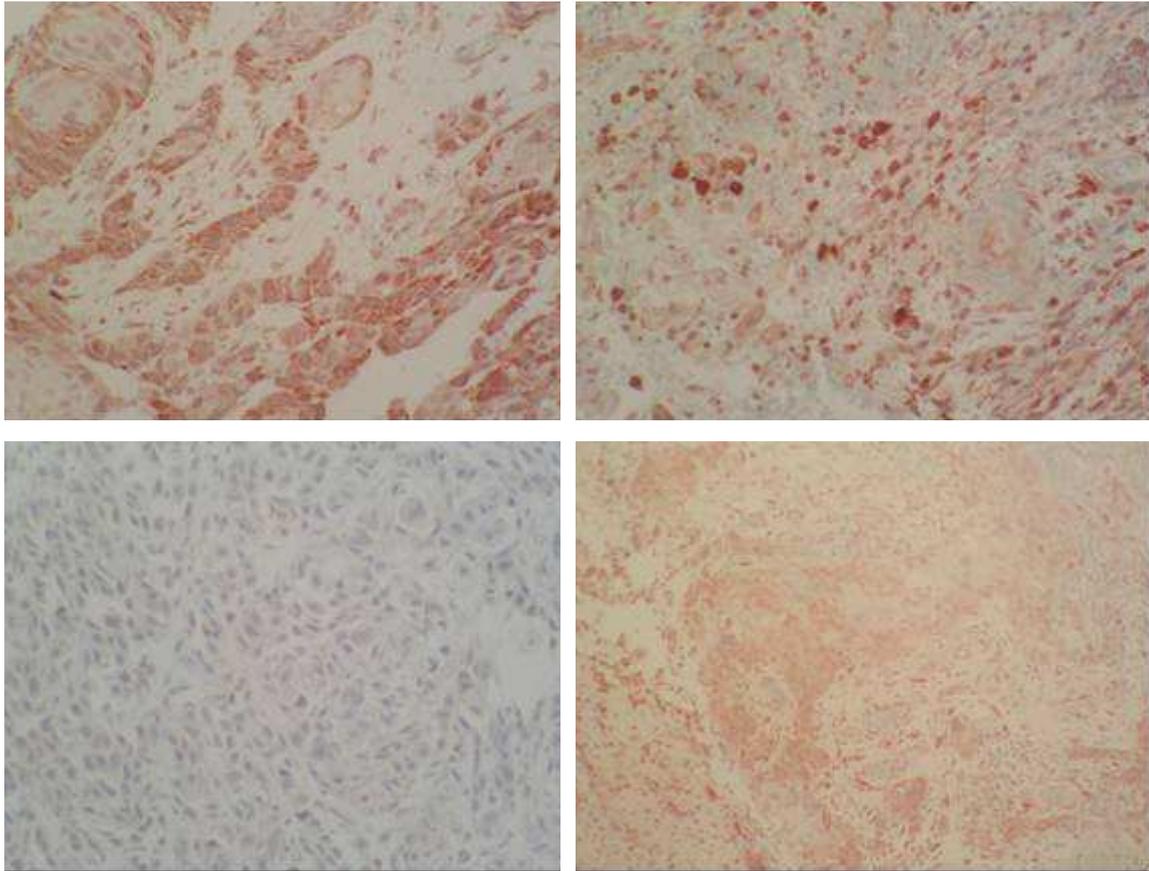


Abb. 20 Immunhistochemische Färbungen für pVHL am Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

Links oben:	starke Expression	[IRS 12, Vergrößerung x 200]
Rechts oben:	mäßige Expression	[IRS 8, Vergrößerung x 100]
Links unten:	negative Expression	[IRS 0, Vergrößerung x 100]
Rechts unten:	mäßige Expression	[IRS 8, Vergrößerung x 100]

4.3 Koexpression von hypoxie-relevanten Proteinen

Zwecks einer detaillierten Abschätzung der Prognose der Karzinompatienten für die klinische Routine war es sinnvoll, den Einfluss mehrerer exprimierter Proteine genauer zu analysieren. Zunächst wurden die Proteine HIF-1 α und GLUT-1 miteinander kombiniert und in der KAPLAN-MEIER-Analyse untersucht.

Aus der Abbildung 21 geht ein additiver Effekt der beiden hypoxie-abhängigen Proteine HIF-1 α und GLUT-1 hervor. Waren beide Proteine nicht bzw. schwach exprimiert, ergab sich ein 5-Jahres-Überleben von mehr als 83%, wohingegen im Falle einer mäßigen bis starken Expression beider Proteine die Überlebenschancen um mehr als 50% auf nur noch 25,7% sank. Beide Proteine HIF-1 α und GLUT-1 sind unabhängige

Prognosemarker beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. In der multivariaten Cox's-Regressions-Analyse zeigte sich ein 10-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens, wenn HIF-1 α und GLUT-1 mäßig bis stark exprimiert waren ($p = 0,001$).

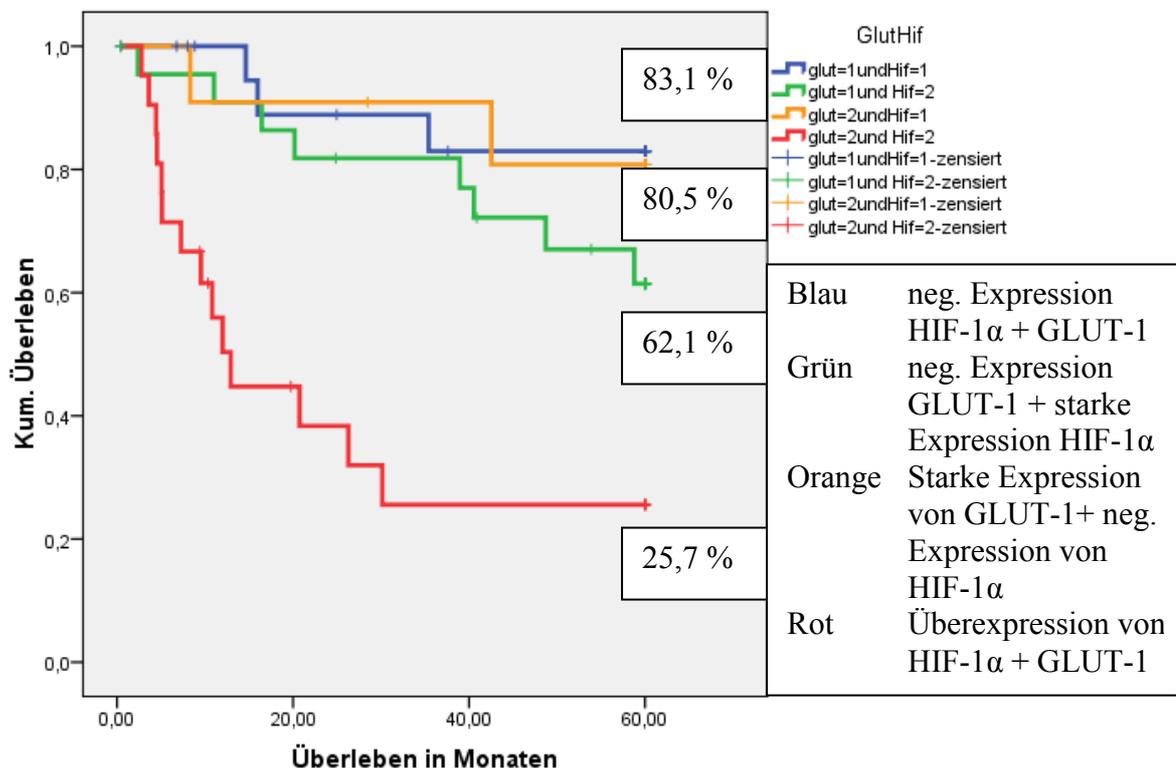


Abb. 21 KAPLAN-MEIER-Analyse zur Koexpression von HIF-1 α und GLUT-1 an 77 Geweben eines Mundhöhlenkarzinoms

Ähnliche Zusammenhänge konnten bei der gemeinsamen Betrachtung von HIF-1 α und CA IX gefunden werden. So zeigten jene 22 Mundhöhlenkarzinome, welche die beiden Proteine HIF-1 α und CA IX nicht exprimierten, eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 95%, während die Karzinome, die beide Proteine überexprimierten, eine Überlebenswahrscheinlichkeit von nur noch 55% aufwiesen (Abb. 22).

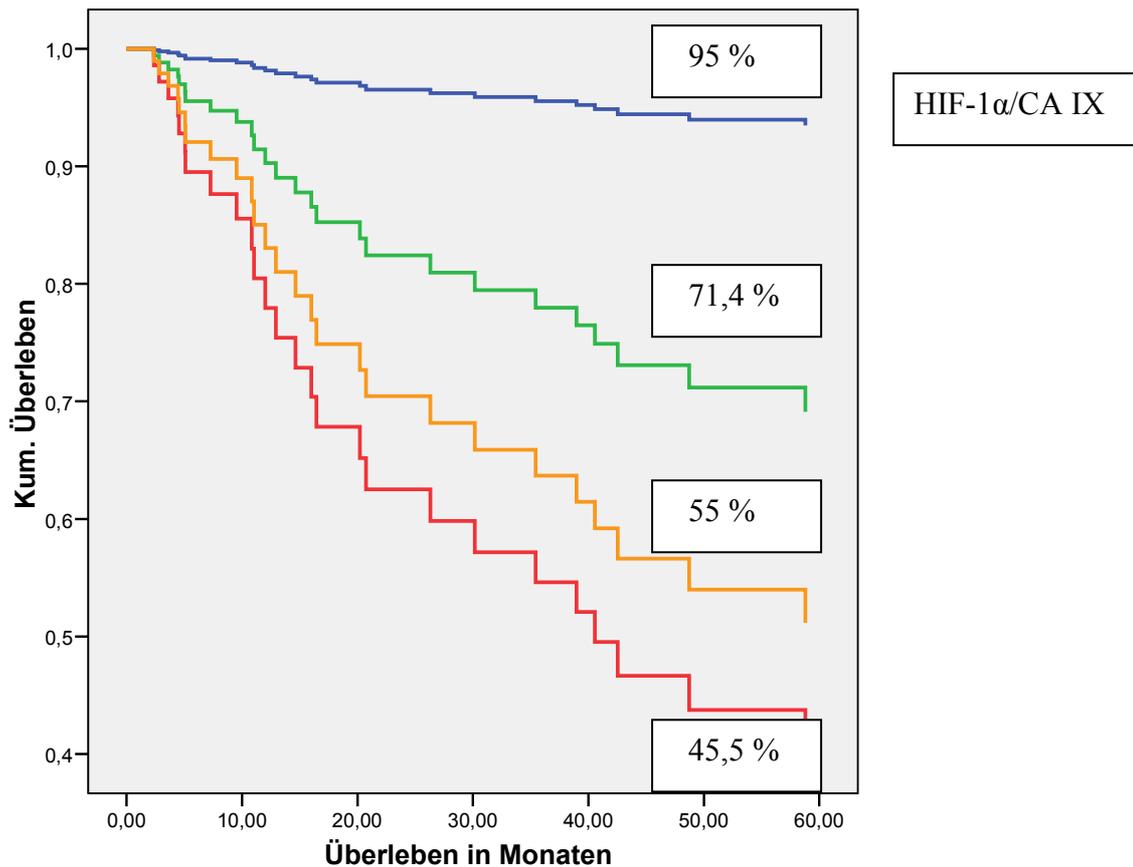


Abb. 22 Cox's-Regressions-Analyse zum Einfluss des Transkriptionsfaktors HIF-1 α und der Carboanhydrase 9 (CA IX) auf das Überleben bei 82 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

Blau	HIF-1 α und CA IX Expression
Grün	HIF-1 α negative oder schwache und CA IX mäßige bis starke Expression
Orange	HIF-1 α und CA IX mäßige bis starke Expression
Rot	HIF-1 α mäßige bis starke und CA IX negative oder schwache Expression

Zur Frage, welchen Einfluss eine gleichzeitige Expression von HIF-1 α und pVHL auf das Überleben bei Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom hatte, wurde die Beziehung zwischen der Expression beider Proteine und dem Überleben mittels der Cox's-Regressionsanalyse untersucht. Im Falle einer negativen oder lediglich schwachen Expression beider Proteine betrug das Überleben mehr als 80%. Bei einer mäßigen bis starken Expression von HIF-1 α in Kombination mit einer negativen oder schwachen pVHL-Expression fiel dieser Wert auf 53%, um im Falle einer mäßigen bis starken Expression beider Proteine auf nur noch gut 20% abzufallen. Die entsprechenden Überlebenswahrscheinlichkeiten sind in Abb. 23 zusammengefasst. In der multivariaten

Cox's-Regressionsanalyse (adj. nach Tumorgroße und Grading) konnte eine 8,1-fach erhöhte Risiko des tumorassoziierten Versterbens gefunden werden, wenn sowohl HIF-1 α als auch pVHL im Tumorgewebe mäßig bis stark exprimiert wurden ($p = 0,013$).

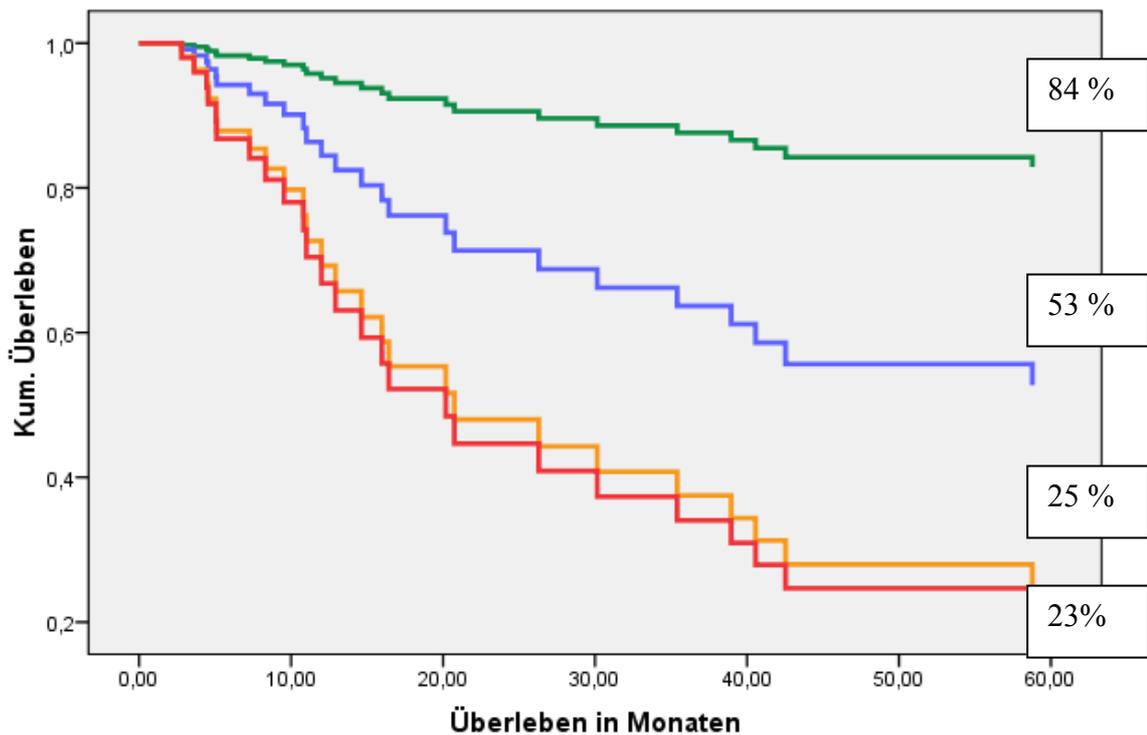


Abb. 23 Cox's-Regressions-Analyse (adj. nach Tumorgroße und Grading) zum Einfluss des Transkriptionsfaktors HIF-1 α und dem von Hippel-Lindau Protein (pVHL) auf das Überleben bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=77)

Grün	HIF-1 α und pVHL negativ
Blau	HIF-1 α mäßig oder stark exprimiert und pVHL negativ
Orange	HIF-1 α negativ oder schwach und pVHL mäßig oder stark exprimiert
Rot	HIF-1 α und pVHL mäßig oder stark exprimiert

Schließlich wurden die Proteine HIF-1 α , GLUT-1 und pVHL gemeinsam hinsichtlich ihres Einflusses auf das Überleben der Mundhöhlenkarzinompatienten betrachtet. Dabei gelang es, anhand der Coexpression dieser drei Proteine Gruppen mit unterschiedlicher Überlebensprognose zu formulieren. Es fand sich eine erste Gruppe mit 22 Patienten (28,6%), welche alle drei Proteine nicht oder lediglich schwach exprimierte und eine Überlebenswahrscheinlichkeit von mehr als 85% aufwies. Wenn nur HIF-1 α mäßig oder

stark exprimiert wurde, eine Induktion des Zielproteins GLUT-1 aber ausblieb und pVHL ebenfalls negativ oder allenfalls schwach exprimiert wurde, konnte immerhin noch eine Überlebensprognose von 75% konstatiert werden (n=20, 25,9% der Gesamtpopulation). Im Gegensatz dazu betrug die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit nur noch gut 33%, wenn alle drei Proteine hochgradig im Tumorgewebe nachweisbar waren. Eine derart ungünstige Überlebensprognose traf für knapp ein Viertel der betrachteten Patienten zu (n=18, 23,3%). Die dazugehörigen KAPLAN-MEIER-Kurven sind aus Abb. 24 ersichtlich, die Ergebnisse der entsprechenden Cox's-Regressionsanalyse sind in Abb. 25 dargestellt.

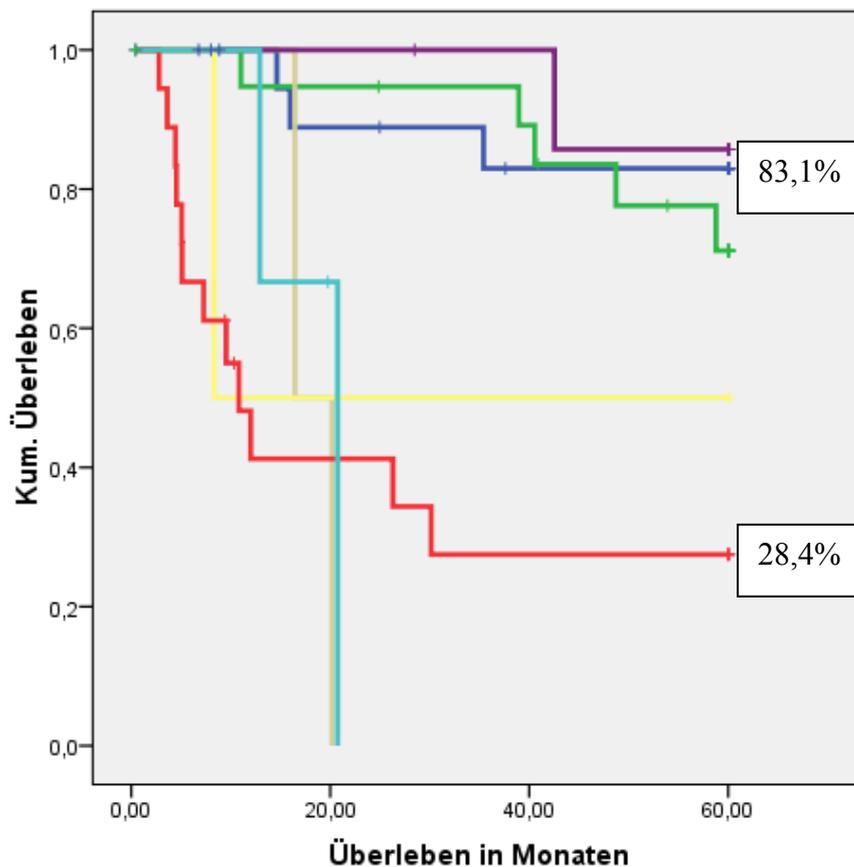


Abb. 24 KAPLAN-MEIER-Analyse zum Einfluss des Transkriptionsfaktors HIF-1 α und dem von Hippel-Lindau Protein (pVHL) und dem Glukosetransportmolekül GLUT-1 auf das Überleben bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=77; + = jeweils zensiert)
 Grün GLUT-1 und pVHL negativ bis schwach; HIF-1 α mäßig bis stark
 Blau HIF-1 α , GLUT-1 und pVHL negativ bis schwach
 Rot HIF-1 α , GLUT-1 mäßig bis stark, pVHL negativ exprimiert
 Wegen der zum Teil anhand der Proteinexpressionen sehr kleinen Gruppen erfolgt zur besseren Übersichtlichkeit nur eine nähere Erklärung zu diesen drei Hautgruppen.

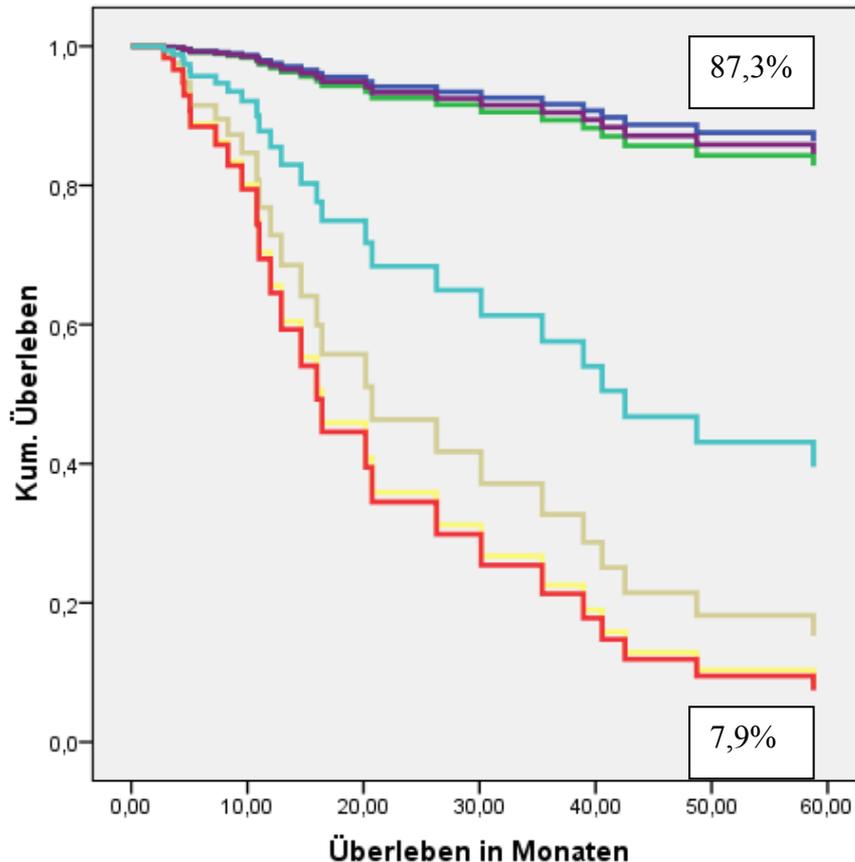


Abb. 25 Cox's-Regressions-Analyse (adj. nach Tumorgröße und Grading) zum Einfluss des Transkriptionsfaktors HIF-1 α , dem von Hippel-Lindau Protein (pVHL) und dem Glukosetransportmolekül GLUT-1 auf das Überleben bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=77)
 Zur besseren Übersicht Beachtung der blauen und der roten Kurve
 Blaue Kurve: HIF-1 α , GLUT-1 und pVHL negativ [IRS 0 – 2]
 Rote Kurve: HIF-1 α und GLUT-1 stark positiv [IRS 6 - 12] in Kombination mit pVHL negativ [IRS 0 - 2]

Die Korrelation einer mäßigen bis starken Expression des Transkriptionskomplexes HIF-1 α und pVHL in Kombination mit dem Glukosetransportmolekül GLUT-1 mit einem verkürzten Überleben der Patienten war statistisch hoch signifikant (log rank-Test, $p = 0.000014$, Abb. 24). Mittels der multivariaten Cox's-Regressionsanalyse (adj. nach Tumorgröße und Grading) konnte gezeigt werden, dass alle drei Proteine unabhängige Prognosemarker sind. Wenn diese Proteine im Tumorgewebe mäßig bis stark exprimiert werden, besteht ein mehr als 17-fach erhöhtes Risiko des tumor-assoziierten Versterbens (Cox's-Regressionsanalyse, $p = 0,000093$, Abb. 25).

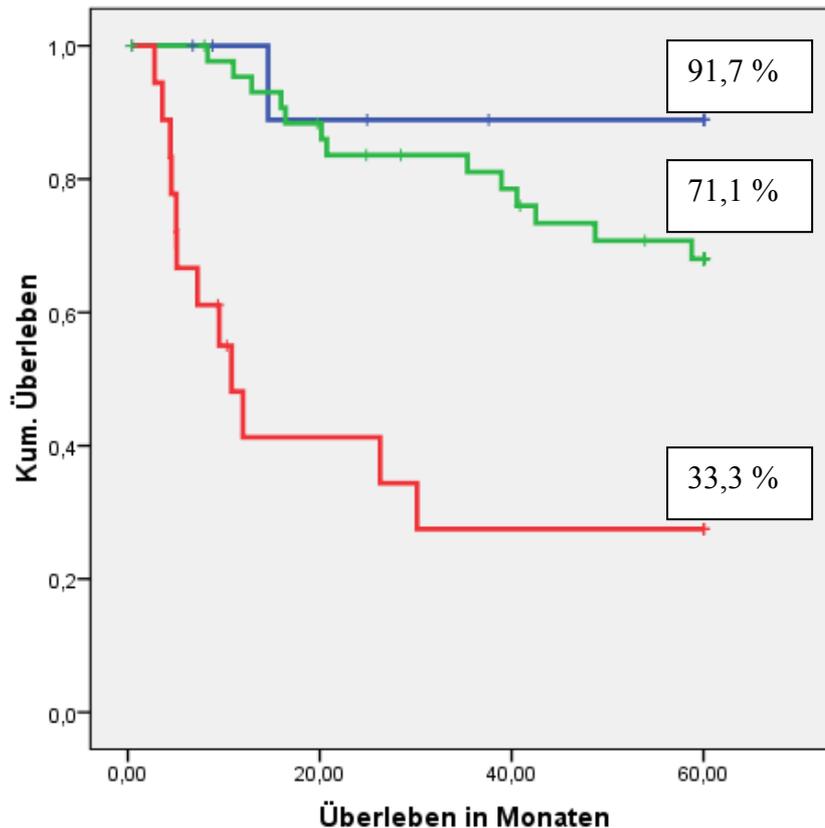


Abb. 26 KAPLAN-MEIER-Analyse zur Korrelation der Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α , des von Hippel-Lindau Proteins (pVHL), des Glukosetransportmoleküls GLUT-1 und der CA IX auf das Überleben bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (n=75, + zensierte Fälle)

Blau	alle vier Proteine (HIF-1 α , GLUT-1, pVHL und CA IX) negativ, n = 12 Patienten
Rot	HIF-1 α und GLUT-1 hochgradig exprimiert, pVHL negativ und CA IX positiv oder auch negativ (n=18 Patienten)
Grün	Population von Karzinomgeweben ohne charakteristisch Koexpression aller vier Proteine, n=45 Patienten

Dieser eindeutige Trend der Verschlechterung des Überlebens in Abhängigkeit einer hohen Expression hypoxie-relevanter Proteine erhärtete sich, wenn zu den bisher betrachteten drei Proteinen noch die Expression der CA IX hinzugezogen wurde. Hierbei konnte eine Gruppe von 12 Patienten herauskristallisiert werden, deren Tumoren alle vier Proteine nicht oder nur schwach exprimierten. Das Überleben war mit 91,7% sogar noch etwas besser und nahezu dem der gesunden Normalpopulation identisch. Demgegenüber fand sich eine weitere Gruppe mit insgesamt 18 Patienten, deren 5-Jahres-Überlebenwahrscheinlichkeit nur noch

rund 33% betrug, wenn HIF-1 α und GLUT-1 mäßig bis stark im Karzinomgewebe nachgewiesen wurden (log rank-Test, $p = 0,000056$, Abb. 26). Die dritte große Gruppe umfasste jene 45 Patienten, die eine uncharakteristische Coexpression von HIF-1 α , GLUT-1, pVHL und CA IX aufwiesen. Die Überlebenswahrscheinlichkeit für diese Gruppe war entsprechend mit gut 71% etwas höher als die der gesamten betrachteten Stichprobe. Die multivariate Cox's-Regressionsanalyse (adj. nach Tumorgröße und Grading) bescheinigte zeigte für die Patienten mit mäßiger bis starker Expression von GLUT-1 und HIF-1 α in ihrem Tumor ein 14,8-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens ($p = 0,000003$).

4.4 Anämie und präoperative Hämoglobinkonzentrationen

Zur Frage eines möglichen Einflusses des präoperativen Hb-Wertes auf die Prognose der Karzinom-Patienten und für Rückschlüsse auf das Ausmaß der Tumorhypoxie anhand des Hb-Wertes erfolgte eine detaillierte Erfassung der Hämoglobinkonzentrationen aller 82 Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom. Dabei betrug der durchschnittliche Hb-Wert aller Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom 8,89 mmol/l, der Median 9,1 mmol/l. Unter Berücksichtigung der Grenzwerte für einen optimalen Hb-Wert nach Vaupel zeigten sich bei nur drei Patienten (2,5% des Gesamtkollektivs) eine schwere Anämie ($Hb \leq 6,8$ mmol/l). All drei Patienten waren Männer. Bei knapp 19% der Patienten fand sich eine milde Form der Anämie, wobei dies 8 Männer und 2 Frauen waren. Mehr als die Hälfte aller Patienten präsentierte unmittelbar vor der Tumoroperation normale Hämoglobinkonzentrationen; bei 43 Patienten lag der Hb-Wert zwischen 8 und 9,4 mmol/l. Nach den Vaupel'schen Kriterien war die Hämoglobinkonzentration bei etwa einem Drittel aller Patienten ($n = 24$) zu hoch. Im Chi-Quadrat-Test konnte keinerlei Zusammenhang zwischen dem präoperativen Hb-Wert und der Expression von hypoxie-assoziierten Proteinen gefunden werden. So konnte kein Einfluss auf die Expression des Transkriptionskomplexes HIF-1 α [χ^2 -Test, $p = 0,958$) und dem Glukosetransportmolekül GLUT-1 bestätigt werden [χ^2 -Test, $p = 0,397$]. Lediglich bei der membranständigen Carboanhydrase 9 zeigte sich ein Trend zur Signifikanz zwischen der Expression dieses Enzyms und einem niedrigen Hb-Wert [χ^2 -Test, $p = 0,055$]. Außerdem konnte kein Zusammenhang zwischen dem präoperativen Hb-Wert und dem Überleben der Karzinompatienten registriert werden (log rank-Test, $p=0,68$).

5 Diskussion

5.1 Patienten und Überlebenswahrscheinlichkeit

Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle gehören zu den zehn häufigsten Malignomen des Menschen. Weltweit ist von einer steigenden Inzidenz dieser Tumorentität auszugehen (Hemprich und Müller 1989, Lippmann et al. 1994, Howaldt 2000). Diese Inzidenzzunahme beim Mundhöhlenkarzinom ist mittlerweile durch umfassende Studien sowohl bei Männern als auch bei Frauen nachgewiesen (Conway et al. 2006). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt dominieren noch männliche Patienten eindeutig das Krankengut (Chen et al. 1999). Der Altersgipfel der Erkrankung liegt jenseits des 50. Lebensjahres (Choi et al. 2006), obwohl in umfassenden neueren Analysen vermehrt von deutlich jüngeren Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle berichtet wird (Ordnung et al. 1992, Martin-Granizo et al. 1997, Chen et al. 1999, Oliver et al. 2000, Popovtzer et al. 2004, Garavello et al. 2007). Durch eine Zunahme der Noxen wurde vor allem in den letzten Jahren vermehrt von jüngeren weiblichen Patienten berichtet (Chidzonga 2006). Allerdings ist die Anzahl jüngerer Karzinompatienten seit Anfang der 90er Jahre unverändert und die ursprünglich vermutete schlechtere Prognose jüngerer Patienten hat sich im Rahmen einer groß angelegten Multizenterstudie in Südengland nicht bestätigt (Warnakulasuriya et al. 2007). Zu berücksichtigen ist, dass bei Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom im Sinne der Feldkanzerogenisierung von einem 10-30%igem Risiko für die Entstehung eines Zweitkarzinoms im Kiefer-Gesichtsbereich ausgegangen werden muss (Silvermann 2001). Ätiopathologisch bekannt und belegt ist für das Entstehen eines Mundhöhlenkarzinoms die chronische Exposition von Alkohol bzw. intensivem Tabakgenuss (Brugere et al. 1986, Boyle et al. 1993, La Vecchia et al. 1997, Hasina und Lingen 2001). Dadurch resultieren Genveränderungen mit den entsprechenden Verlusten in der Zellregulation. Erst dadurch ist es den Tumorzellen möglich, zu überleben und alle Charakteristika eines malignen autonomen Wachstums zu entfalten. Eine derartige Genveränderung in Form des Gluthathion-S-Transferase M1-Genotyps ist mittlerweile bekannt (Tripathy und Roy 2006). Direkte DNA-Schädigungen durch Nikotin konnten am humanen Tonsillengewebe nachgewiesen werden (Semmler et al. 2006). Zudem ist die synergistische Wirkung von Alkohol und Nikotin bekannt, wodurch das Risiko eines Mundhöhlenkarzinoms im Vergleich zur Normalbevölkerung um das 5 bis 16-fache ansteigen kann (van der Waal 1998).

Das Problem der Behandlung von Mundhöhlenkarzinomen liegt in der bekanntermaßen nicht gerade günstigen Prognose; die 5-Jahres-Überlebensrate bei oralen Plattenepithelkarzinomen

liegt bei etwas mehr als 40% und hat sich in den letzten 30 Jahren trotz Zugewinns moderner diagnostischer als auch operativer Verfahren nicht wesentlich verbessert (Hausamen 2000). Die Angaben in der Literatur in den letzten Jahren schwanken erheblich zwischen 30% (Sargeran et al. 2008) und Werten bis 65% (Metelmann 2000, Hyckel 1992, De Cassia Braga Ribeiro 2003).

Die im Rahmen dieser aktuellen Untersuchungen beobachtete 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrug gut 62% und ordnete sich im oberen Drittel der in der Literatur beschriebenen Angaben ein. Im direkten Vergleich mit den Ergebnissen der 80er Jahre aus der eigenen Klinik konnte somit eine Verbesserung des Überlebens um ca. 8 -10% verzeichnet werden, auch wenn die statistische Signifikanz verfehlt wurde (χ^2 -Test, $p = 0,2$, Tischendorf 1990, Lautner 2006). Moderne diagnostische Verfahren und die Einführung der Mikrochirurgie in das Fachgebiet erbrachten jedenfalls keine deutliche Verbesserung (Shklar 1995). An dieser Stelle muss spekulativ bleiben, ob diese aktuell beobachtete Verbesserung eine Konsequenz der mikrochirurgischen Techniken oder ein Effekt der doch deutlich verbesserten Therapieoptionen im Rahmen einer Bestrahlung ist (Kuhnt et al. 2005). Vergleichbare Überlebensquoten konnten in einer umfassenden Arbeit von CHEN und Mitarbeitern gefunden werden. Hierbei wurden im Raum Taiwan insgesamt 703 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle erfasst. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit aller Patienten betrug knapp 58% (Chen et al. 1999). Ähnliche Überlebenschancen im deutschsprachigen Raum konnten in einer aktuellen Erfassung im Saarland bestätigt werden. Hier betrug die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 55,1% (Brenner et al. 2005).

Mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit reiht sich im internationalen Vergleich die Patientengruppe der halleschen Kieferchirurgie im oberen Teil ein, wenn man bedenkt, dass in Brasilien lediglich 33,4% das Mundhöhlenkarzinom nach 5 Jahren überlebten (Ribeiro et al. 2000).

WOOLGAR berichtete im Rahmen einer Untersuchung an 200 Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom von einer den eigenen Ergebnissen vergleichbaren 5-Jahresüberlebensrate von 64 %, welche bei Patienten ohne vorhandene Lymphknotenmetastasen sogar 81% betrug (Woolgar et al. 1999).

Einige aktuelle Veröffentlichungen belegten sogar noch höhere Prozentsätze. So wird beispielsweise aus der Würzburger Klinik von 75 % Überlebenden nach 5 Jahren berichtet (Müller et al. 2004). Nachteilig ist bei derartigen Studien allerdings das nicht streng homogene Krankengut, wobei auch teilweise Lippenkarzinome mit einer bekanntlich deutlich besseren Prognose in die Statistik inkludiert wurden (Bilkay et al. 2003). Der klare

Vorteil der eigenen analysierten Stichprobe liegt darin, dass hierbei mittels einer monozentrischen Studie ausschließlich gut dokumentierte Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle betrachtet wurden. Die aus kieferchirurgischer Sicht wichtigste Registerdatenanalyse des DÖSAK (Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich), bei der 30 Kliniken mit einer Fallzahl von mindestens 50 Patienten eingeschlossen wurden, gibt einen Bereich der 5-Jahresüberlebensrate von 46,5 bis 71% an (Eckardt 2001). Die Prognose ist beim Mundhöhlenkarzinom vom Stadium der Tumorerkrankung und auch von der Lokalisation des Primärtumors abhängig (Hicks et al. 1997, Inagi et al. 2002).

Vom klinischen Aspekt her zeigten insbesondere Unterkieferkarzinome die schlechteste Überlebenszeit (De Vicente et al. 2001). Die 5-Jahresüberlebensrate steht in direktem Zusammenhang mit dem Tumorstadium (Lo et al. 2003).

Die eigenen Resultate unterstützen die Ergebnisse von CHEN und Mitarbeitern und auch jene von LO und Koautoren. CHEN et al. bestätigten die Abhängigkeit des Überlebens vom Stadium der Tumorerkrankung. So betrug diese im Stadium I noch 72%, während im fortgeschrittenen Stadium IV nur 11,8% der Patienten fünf oder mehr Jahre überlebten (Chen et al. 1999). Etwas günstiger waren die Prognoseaussagen in der Studie von LO an 375 Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom. Hier betrug das Überleben im Stadium I 75% und beim Stadium IV noch 30% (Lo et al. 2003).

Die hier präsentierten Ergebnisse zur Überlebensprognose beim Mundhöhlenkarzinom waren allerdings eindeutig besser als die Erhebungen aus den Vereinigten Staaten von Amerika aus der National Cancer Data Base, welche von einer Überlebenswahrscheinlichkeit von lediglich 42 % berichteten (Funk et al. 2002).

Die Prognose einer Tumorerkrankung muss zwangsläufig auch von der gewählten Therapie abhängig sein (kurative, palliative Strategie). So konnten große Verbesserungen zum Gesamtüberleben der Patienten in letzter Zeit durch radiologische oder kombiniert radiochemotherapeutische Konzepte erreicht werden. Beispielsweise berichtete KUHNT über ein Überleben von 50% bei lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Malignomen durch Optimierungen der Radiochemotherapie (Kuhnt et al. 2007). Aktuelle Resultate einer Heidelberger Arbeitsgruppe bestätigten diesen positiven Trend, indem sie bei 207 Patienten mit einer neoadjuvanten, kombinierten Radiochemotherapie (40 Gy + Cisplatin) ein Gesamtüberleben von 49,5% nach 5 Jahren bescheinigen konnten (Freier et al. 2008).

Umfassende Erhebungen zum Überleben aus unserer Klinik stammen aus dem Jahre 1990 und beschreiben den Zeitraum von 1948 bis 1982 mit einer Rate von 44%, allerdings auf einen 10-Jahres-Überleben errechnet (Tischendorf 1990).

Neben dem gesicherten Einfluss von Alkohol und Nikotin als Risikofaktoren für das Entstehen eines Mundhöhlenkarzinoms ist vor allen Dingen der Zeitpunkt der Diagnosestellung mit den entsprechenden therapeutischen Interventionen wesentlich für das Überleben des Patienten (La Vecchia 1997). Eine größere amerikanische Analyse der letzten Jahre bestätigte, dass aus Sicht der Kliniker die Tumorgroße und eine niedrige histologische Differenzierung signifikant die Prognose der Patienten beeinflusste.

Die Autoren verwiesen aber auch darauf, dass eine patientenbezogene und individuelle Risikoanalyse erfolgen sollte, welche in Zukunft mehr an Bedeutung erlangen wird. Bei einer derartigen Risikoanalyse wären neben den klassischen klinischen Parametern weitere Prognosefaktoren auf molekularer Ebene wünschenswert. Nur dadurch könnte eine spezifische Tumorthapie eingeleitet werden, welche individuell die besten Chancen für ein Therapieansprechen beim Mundhöhlenkarzinom bietet (Brandwein-Gensler et al. 2005). Zur Abschätzung des individuellen Risikos bei Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom wurde Anfang der 90er Jahre die Computergestützte individuelle Prognosestellung [CIP] etabliert, welche seinerzeit eine eindrucksvolle Methode darzustellen schien, anhand prätherapeutischer klinischer und pathologischer Parameter die individuelle Prognose berechnen zu können (Platz et al. 1992). In einer aktuellen Studie musste jedoch zur Kenntnis genommen werden, dass mittels CIP keine adäquaten Abschätzungen zur individuellen Prognose beim Mundhöhlenkarzinom möglich sind (Odenwald 2007). Die Ursachen hierfür mögen einerseits im nicht mehr aktuellen Datenmaterial der Jahre 1977 – 1982 liegen, andererseits respektiert die CIP in keiner Weise Veränderungen der Tumoren auf molekularer Ebene. Auf den ergänzenden Charakter von während der Tumorprogression exprimierten Proteinen wurde bereits Ende der 90er Jahre hingewiesen (Chiesa et al. 1999). Schon damals wurde unterstrichen, dass durch derartige als Tumormarker beschriebene Proteine das etablierte TNM-System und die histopathologische Differenzierung bei nur geringen Mehrkosten wirkungsvoll ergänzt werden könnten. Insgesamt muss anhand der klinischen und pathohistologischen Ergebnisse konstatiert werden, dass der prädiktive Wert des TNM-Systems und des Gradings im Einzelfall nicht ausreichend ist (Bisoffi et al. 2006).

Neben dieser immer noch eingeschränkten Vorhersage des individuellen Risikos anhand des TNM-Systems und der histologischen Differenzierung bleibt insbesondere die Therapie fortgeschrittener oder inoperabler Tumoren äußerst problematisch. Hier ist eine adaptierte Therapie geradezu erforderlich, um dem Patienten eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls bei akzeptabler Lebensqualität ermöglichen zu können. Ein Erfolg versprechender Ansatz scheint auch beim Mundhöhlenkarzinom die Kenntnis des Hypoxiegrades im Tumor

darzustellen. Dabei ist offensichtlich das hypoxische Tumolvolumen für die Prognose und auch für die Therapiestrategie bedeutsamer als das gesamte Tumolvolumen selbst (Kuhnt et al. 2005). Aus klinischer Sicht zeigte KUHNT, dass in Abhängigkeit von den Nekrosevolumina signifikante Überlebensvorteile für die Patienten bestehen, wenn die Radiatio mit einer Chemotherapie kombiniert wird (Kuhnt et al. 2005). Noch präziser gelänge eine solche auf den jeweiligen Patienten zugeschnittene Therapie, wenn bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung detaillierte Einblicke in die hypoxische Situation des Tumorgewebes möglich wären.

5.2 Pathways und Immunhistochemie

5.2.1 Rolle der Tumorhypoxie beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

Seit etwa 10 – 15 Jahren stehen sog. molekulare Marker als Ausdruck der pathobiochemischen Situation im Tumor in Form von Proteinexpressionen als Ergänzung zum TNM-System und zum Grading auch beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses. Zunächst fokussierte sich die Forschung neben dem p53-Status auf Proteine, die als sog. Proliferationsmarker zusammengefasst wurden (Bisoffi et al. 2006, Wendt und Bank 2002). Mittlerweile scheint ein verminderter Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe eine zentrale Rolle für die Aggressivität des malignen Prozesses darzustellen. Diese Tumorhypoxie ist ein generelles Phänomen in zahlreichen soliden Malignomen des Menschen, und ihre Rolle als biologischer Prozess zur Unterstützung der Tumorprogression ist mittlerweile unbestritten (Kim et al. 2005). Unter hypoxischen Bedingungen werden die Tumorzellen mittels komplexer Vorgänge auf die neue Situation adaptiert, welche genetischen Veränderungen und adaptativen Prozessen unterliegen, um überleben und proliferieren zu können. Die Folgen einer ausgeprägten Tumorhypoxie manifestieren sich als Änderungen des Proteoms in Form einer unspezifischen Adaptation an die „neue“ Mikroumgebung. Die generellen Wege zur Adaptation sind anaerober Metabolismus, Angiogenese sowie Änderungen des Zell-zu-Zell-Kontaktes, um die Situation verminderten Sauerstoffangebotes zu überwinden. Der angepasste Tumorzellverband ist danach so gut adaptiert, dass das Überleben und die Proliferation bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck sogar besser als zuvor funktionieren (Höckel und Vaupel 2001). Abb. 27 zeigt schematisch einen der möglichen Adaptationsprozesse an die hypoxische Situation in einem Tumorzellverband in Form der Ausbildung eines eigenen tumorspezifischen Gefäßsystems.

Im Rahmen der aktuellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass einerseits bereits bei sehr kleinen Tumoren eine hochgradige Expression von HIF-1 α als Ausdruck der schon im Frühstadium existenten Tumorhypoxie vorliegen kann. So fanden sich bei den prognostisch günstigeren T₁- und T₂- Tumoren in 47% der Fälle bereits mäßige bis starke Expressionen für HIF-1 α , was als Ausdruck des Wechsels zu einem hypoxischerem und somit klar aggressiverem Typ zu werten ist (vgl. Tab. 8). Andererseits konnte auch bewiesen

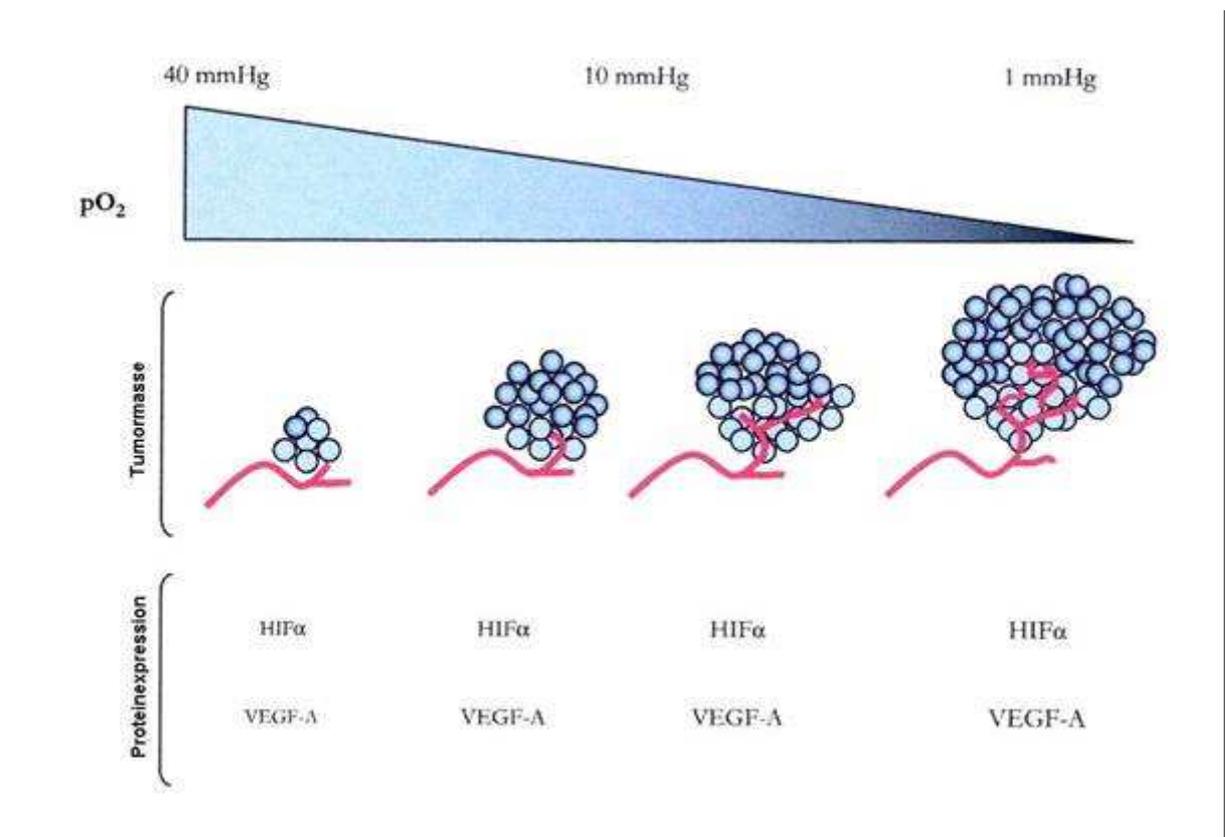


Abb. 27 Schematische Darstellung der Anpassung des Tumorzellverbandes an die zunehmende Hypoxie. Typisch für eine echte Hypoxie ist die Stabilisierung von HIF-1 α , welches schließlich die Induktion von Targetgenen, wie z.B. VEGF-A, nach sich zieht (übernommen und modifiziert aus Brahimi-Horn und Pouyssegur 2006).

werden, dass die gesteigerte Expression des HIF-1 α -Proteins nicht nur in einer favorisierten gesteigerten Gefäßneubildung mündet (siehe Abb. 27), sondern zahlreiche weitere Proteine induziert, welche die Anpassung des Tumorzellverbandes an die hypoxische Situation ermöglichen. Solche Parameter der Tumor-Mikroumgebung wie Hypoxie, Entzündung und

tumorinduzierte Gefäßneubildung spielen deshalb eine kritische Rolle hinsichtlich der Aggressivität des Tumors und auch für den Therapieerfolg (De Schutter et al. 2005).

Zahlreiche Studien haben versucht, den Oxygenierungsstatus von Mundhöhlenkarzinomen mittels Sauerstoffmikroelektroden direkt zu analysieren (Brizel et al. 1999 a/b, Stadler et al. 1999, Rudat et al. 2000, Nordmark et al. 2003). Nachteilig ist hier das aufwendige intraoperative Procedere. Zudem bestehen einige Verfälschungsmöglichkeiten durch unkorrekte Position der Sonde. Zusätzlich besteht die Gefahr, den hypoxischen Anteil mit der Sonde überhaupt nicht zu erreichen, wodurch deutlich besser oxygenierte Tumoren vermutet werden würden. Nicht unerwähnt bleiben sollte auch das Risiko, durch derartige Manipulationen den Prozeß des Verschleppens von Tumorzellverbänden in die Umgebung zu begünstigen. Eine zweite Möglichkeit des Nachweises der Tumorphoxie besteht in exogenen Hypoxiemarkern wie 2-Nitroimidazolderivaten. Diese müssen jedoch zuvor intravenös verabreicht werden. Die dritte und aussichtsreichste Methode besteht im immunhistochemischen Nachweis sog. endogener hypoxie-relevanter Proteine, welche im Rahmen der Tumorprogression exprimiert werden und Rückschlüsse auf den Oxygenierungsstatus des jeweiligen Tumors zulassen.

5.2.1.1 HIF-1 α

Die Tumorphoxie als zentraler Faktor im Rahmen der Tumorprogression hat mehrere Ursachen. Neben strukturellen und funktionellen Abnormalitäten des tumoreigenen Gefäßsystems steigt die Diffusionsdistanz für den Sauerstoff im Gewebe. Schließlich steigert auch die tumorbedingte oder therapieassoziierte Anämie die Sauerstofftransportkapazität. Dieses Phänomen der intratumoralen Hypoxie ist unabhängig von der Größe des Tumors, der histopathologischen Differenzierung und dem Stadium der Tumorerkrankung (Vaupel et al. 2001). Das zentrale Regulationsprotein der Tumorphoxie ist die Alpha-Untereinheit des hypoxie-induzierbaren Transkriptionskomplexes HIF (Kaanders et al. 2002, Harris 2002, Denko 2008). Bei Normoxie degradiert HIF-1 α in Form seiner Sauerstoff-abhängigen Domäne. Hierzu wird offenbar das von-Hippel-Lindau-Protein [pVHL] im Rahmen eines von Metall-Ionen abhängigen Multiproteinkomplexes benötigt (Maxwell et al. 1999). Man geht davon aus, dass pVHL in den HIF-1 α -Bindungskomplex inkludiert ist.

Insgesamt scheint die Regulation von HIF-1 α aber wesentlich komplexer zu sein. Somit erfolgt die Regulation von HIF-1 α nicht allein durch hypoxischen Stress, sondern auch im engen Zusammenspiel mit Veränderungen im von-Hippel-Lindau-Protein-Level [pVHL].

Ein Onkogen, das die Expression von HIF-1 α unterstützt, ist v-SRC (Dang und Semenza 1999, Huang und Bunn 2003). Zusätzlich scheint aber auch eine Aktivierung durch Wachstumsfaktoren wie Insulin oder den Insulin like growth factor eine Rolle zu spielen (Maxwell et al. 1999). Wegen dieses komplexen Prozesses liegt die Vermutung nahe, nicht allein von Proteinen zu sprechen, welche ausschließlich durch die Hypoxie im Tumor hochreguliert werden. Vielmehr handelt es sich um Proteine oder Marker, die mit einem geringem bzw. schlechtem Überleben der Patienten assoziiert sind (Isa et al. 2006). Entscheidend ist allerdings, dass auch im Falle einer nicht durch hypoxischen Stress bedingten Stabilisierung von HIF-1 α gleichfalls die Zielproteine durch Aktivierung der Targetgene gebildet werden. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Literatur ist gesichert, dass eine hohe Expression von HIF-1 α eindeutig mit einer schlechteren Prognose und vermindertem Ansprechen radiologischer Therapiestrategien verbunden ist (Vleugel et al. 2005). Die Rolle von pVHL im Tumorprozess ist nicht umfassend geklärt, auch wenn klar ist, dass dieses Protein neben der HIF-Bremmung noch weitere Tumorsuppressor-Aktivitäten vermittelt. Eine generelle Regulation des Tumorwachstums durch hypoxischen Stress sollte jedoch dann vorliegen, wenn HIF-1 α überexprimiert wird und gleichzeitig pVHL im Tumorgewebe negativ ist (Maxwell et al. 1999).

Mittlerweile gilt auch am Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle als gesichert, dass die Tumorphypoxie eine zentrale Rolle hinsichtlich der Aggressivität dieser Tumorentität spielt (Beasley et al. 2002). Ein Haupteffekt der Tumorphypoxie ist die Stabilisierung des Transkriptionskomplexes HIF-1 α und die folgende Induktion zahlreicher Pathways, welche unter anderem die Glykolyse, eine erhöhte Invasivität und die Expression von Wachstumsfaktoren des Tumors beinhalten (Koukourakis et al. 2006). Der Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und der Prognose konnte in den letzten Jahren bei einer Vielzahl von malignen Tumoren belegt werden. So zeigten TRASTOUR und Mitarbeiter an 132 invasiven Mammakarzinomen, dass eine Überexpression von HIF-1 α mit einem schlechteren Überleben der Patientinnen korrelierte (Trastour et al. 2007). Weiterhin fanden sie keine Korrelation zwischen HIF-1 α -Expression und dem T- sowie N-Stadium, registrierten jedoch einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Überexpression dieses Proteins und gering differenzierten Mammakarzinomen (Trastour et al. 2007). Im klaren Gegensatz dazu zeigten die eigenen Ergebnisse, dass es keinerlei Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und dem Grading der Mundhöhlenkarzinome gab. Ähnliche Ergebnisse zum Einfluss der Expression von HIF-1 α auf die Prognose der Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom konnten durch LIN und

Mitarbeiter gezeigt werden. So fand sich im Falle niedriger nukleärer Färbeintensitäten für HIF-1 α eine Überlebenswahrscheinlichkeit von rund 70%, während dieser Wert auf etwa 45% bei Vorliegen starker Expressionen von HIF-1 α absank. Die Autoren konnten zudem nachweisen, dass HIF-1 α im Normalgewebe nicht oder nur sehr gering, in Dysplasien aber schon vermehrt und mit deutlich höherer Intensität exprimiert wurde. Sie schlussfolgerten, dass die Expression von HIF-1 α ein zeitiges Ereignis innerhalb der Karzinogenese darstellt und als bedeutende Schaltstelle zu einem maligneren Phänotyp gewertet werden muss (Lin et al. 2008). Im Vergleich dazu erlauben jedoch die eigenen Ergebnisse durch Anwendung des REMMELE-Scores eine noch detailliertere Prognoseabschätzung in Abhängigkeit von der HIF-1 α -Expression. HIF-1 α negative Tumoren ermöglichten mehr als 80% 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit. Diese sank auf Werte von 30 - 45% im Falle einer mäßigen bzw. starken Expression.

Die eigenen Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denen von FILLIES und Mitarbeitern, welche eine geringe Expression von HIF-1 α bei T1-/T2-Tumoren des anterioren Mundbodens ohne Lymphknoten-Metastasen mit einer schlechteren Prognose hinsichtlich des Überlebenszeitraums und des progressionsfreien Intervalls assoziierten (Fillies et al. 2005). BEASLEY und Mitarbeiter fanden ebenfalls bei einer hohen Expression von HIF-1 α an insgesamt 79 Kopf-Hals-Malignomen ein besseres Überleben der Patienten. Einschränkend war bei diesen Autoren die Heterogenität der untersuchten Malignome, welche aus nur 31 Mundhöhlenkarzinomen, aber auch zahlreichen Larynx- und Oropharynx-Karzinomen bestand (Bealsey et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse zum Einfluss der Expression von HIF-1 α auf die Prognose von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle konnten durch WINTER und Koautoren bestätigt werden. Hierbei war eine hochgradige Expression von HIF-1 α mit einem signifikant schlechteren Überleben dieser Tumorpatienten korreliert. Ebenfalls signifikant geringer war das progressionsfreie Intervall im Falle einer hohen Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α (Winter et al. 2006).

Die aktuellen eigenen Resultate bestätigen die Schlussfolgerungen in der Literatur zu anderen Malignom-Entitäten, welche keinen Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und einigen klinisch-pathologischen Faktoren (Tumorgröße, Differenzierung, Ausmaß von Lymphknotenmetastasen) nachweisen. Die recht heterogene Verteilung der jeweiligen HIF-1 α – Nachweise beim T-Stadium sollte jedoch vermuten lassen, dass es bereits bei kleinen Primärtumoren hypoxische Varianten gibt, die ein aggressiveres Potential zeigen und möglicherweise schneller rezidivieren.

Die Aussagen haben auch erheblichen Wert für die Entscheidung zu einer adjuvanten Bestrahlung bzw. einer Radio-Chemotherapie. So wurde bisher bei Tumoren mit positivem

Lymphknotenstatus ($\geq pN_1$) immer bestrahlt, auch in den meisten Fällen bei einem T₁/T₂-Stadium und negativem Lymphknotenbefall entschloss man sich zur zusätzlichen radiologischen Therapie. In Anbetracht nur geringer HIF-1 α -Expressionen sind letztere Karzinome möglicherweise klar übertherapiert (Fillies et al. 2005). Untertherapiert hingegen erscheinen dann jene Tumoren mit einer Tumorformel T₁/T₂N₀, wenn sie hochgradig HIF-1 α exprimieren und somit klar hypoxisch und somit auch generell von aggressiverem Verhalten hinsichtlich eines Rezidivs sind. Für diese Subgruppe aggressiver, aber hypoxischer Tumoren sollte ein individuelles Therapieregime generiert werden. Für eine individualisierte Therapie kann der Expressionsstatus von HIF-1 α herangezogen werden. Es ist bekannt, dass durch diesen Transkriptionskomplex verschiedene Enzyme (u.a. Häm-Oxygenase 1, Manganat-Superoxid-Dismutase) hochreguliert werden, wodurch reaktiver Sauerstoff im Gewebe reduziert wird. Folglich kommt es zum Versagen radio- und chemotherapeutischer Interventionen, was für adjuvante radiologische Strategien von großer Bedeutung ist (Sasabe et al. 2007).

Auch anhand weiterer anderer Karzinome konnte eindeutig gezeigt werden, dass HIF-1 α einen unabhängigen Prognosemarker darstellt. Am Mammakarzinom decken sich die Ergebnisse mit den eigenen in der Weise, dass die Expression von HIF-1 α keinen Einfluss auf die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen hatte (Trastour et al. 2007). Außerdem konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass eine hohe Expression von HIF-1 α beim Mammakarzinom ebenfalls mit einem deutlich schlechteren Überleben assoziiert ist, auch wenn aus klinischer Sicht bei den Patienten keine befallenen Lymphknoten detektiert worden waren (Vleugel et al. 2005). Am Beispiel des Gallenblasenkarzinoms kam man zu vergleichbaren Ergebnissen: Eine Überexpression von HIF-1 α war signifikant assoziiert mit einem schlechteren Überleben der Patienten und einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit (Palit et al. 2005). Somit konnte auch anhand dieser Tumorentität dargestellt werden, dass HIF-1 α in der multivariaten Analyse einen unabhängigen Prognosemarker darstellt (Theodoropoulos et al. 2004).

Bei Karzinomen der Lunge führten hohe Expressionen von HIF-1 α ebenfalls zu signifikant schlechteren Überlebenszeiten. Ein ähnlicher Effekt von HIF-1 α für die Tumorprogression konnte auch am Beispiel des Nierenzellkarzinoms bestätigt werden. WIESENER und Mitarbeiter zeigten, dass 68% dieser Tumoren eine Überexpression von HIF-1 α aufwiesen. Hinsichtlich des komplexen Zusammenspiels von pVHL und HIF-1 α sowie HIF-2 α konnten KRIEG und Mitarbeiter an 7 Nierenkarzinomzelllinien zeigen, dass pVHL beide genannten HIF-Untereinheiten zu regulieren vermag. Im Experiment konnte nachgewiesen werden, dass nur der Wildtyp des VHL-Genes unter normoxischen Bedingungen HIF-1 α und HIF-2 α

destabilisiert, so dass Mutationen dieses Gens mit einer automatischen Stimulation beider Proteine einhergehen. Wenn aber in das Genom ein intaktes VHL-Gen reinkludiert wird, kommt es zu einer sofortigen Suppression sowohl von HIF-1 α als auch von HIF-2 α unter normoxischen Bedingungen (Krieg et al. 2000).

Generell zeigen immunhistochemische Nachweise für HIF-1 α zwei typische Färbemuster. Man kann zwischen perinekrotischer und diffuser Färbung unterscheiden (Vleugel et al. 2005). Im Rahmen umfassender Studien zum Expressionsverhalten von HIF-1 α beim Mammakarzinom zeigte sich, dass perinekrotische Färbeintensitäten weitaus mehr mit einem schlechten Überleben einhergehen als eine diffuse Intensitätsvermehrung von HIF-1 α . Bei Tumortypen, welche HIF-1 α lediglich diffus im Tumorgewebe exprimierten, fehlten in aller Regel die Produkte der aktivierten Target-Gene in Form von GLUT-1 und CA IX (Vleugel et al. 2005). In den eigenen Untersuchungen wurden lediglich die invasiven Anteile der Tumorfront hinsichtlich der nukleären Färbungen für HIF-1 α analysiert. Weiterführende Forschungen zur Frage des prognostischen Wertes der diffusen HIF-1 α -Expression am Beispiel des Mundhöhlenkarzinoms sind derzeit noch in Arbeit.

Die wesentlichen Effekte auf die Tumorprogression der am besten untersuchten HIF-Subtypen HIF-1 α , HIF-2 α und teilweise auch HIF-3 α sind in Abb. 28 zusammengefasst.

Für die Tumorprogression ist dabei bedeutsam, dass HIF-2 α zu 48 % der Gensequenzen mit HIF-1 α identisch ist und zu einem Großteil übereinstimmende Targetproteine anzusteuern vermag. In der Literatur wird daher nicht selten von einer „Ersatzfunktion“ in Form des HIF-2 α gesprochen, wenn solche Tumoren in nur unzureichender Menge über HIF-1 α verfügen. Allerdings ist der Einfluss von HIF-2 α innerhalb der Karzinogenese beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle bei weitem noch nicht so umfassend untersucht worden (Krieg et al. 2000).

Die aktuellen eigenen Ergebnisse zeigen einmal mehr, dass die Progression des Mundhöhlenkarzinoms im Sinne eines zentralen Regulators durch HIF-1 α gesteuert sein dürfte. Indem es die Expression mehrere Proteine irreguliert (Harris 2002), vermittelt es dabei Verbindungen zwischen der Angiogenese und dem Tumorzellwachstum (Tanimoto et al. 2003). Zusätzlich organisiert HIF-1 α die Induktion verschiedener weiterer Targetgene und spielt auch eine Rolle im Rahmen der Matrixdegeneration, welche durch Induktion von CA IX mit konsekutiver Senkung des extrazellulären pH-Wertes realisiert wird.

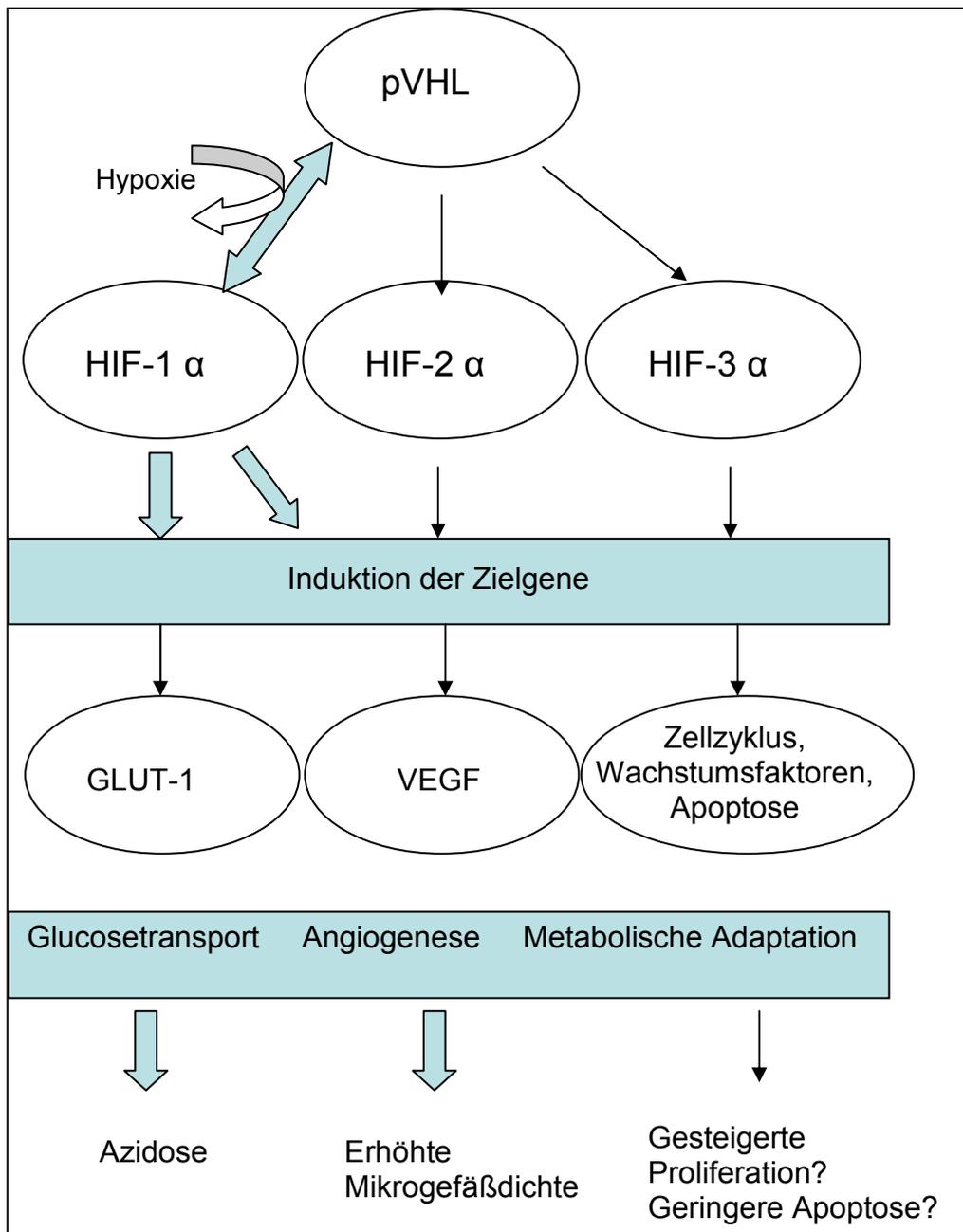


Abb. 28 Aktivierungskaskade von Angiogenese, Glukosetransportmolekülen durch den Transkriptionskomplex HIF-1 α im Zusammenspiel mit dem Tumorsuppressorgen VHL (modifiziert nach Seagroves und Johnson 2002)

Es ist generell akzeptiert, dass HIF-1 α die Neubildung tumoreigener Gefäße (Angiogenese) stimuliert. Innerhalb eines Mehrschrittgeschehens wird zunächst VEGF A und im weiteren Geschehen dann auch Angiopoetin aktiviert. Letzteres ist an der Modellierung der neu gebildeten Gefäße beteiligt (Acker und Plate 2003). Infolge einer Aktivierung von VEGF-C greift HIF-1 α zusätzlich auch in die Metastasierungskaskade ein, zumal gerade VEGF-C sehr selektiv die Lymphangiogenese stimuliert. Zudem reguliert HIF-1 α im

Mundhöhlenkarzinom den Glukosetransporter GLUT-1 hoch, welcher der Nutrition der Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen dient (Abb. 28). Bekannt ist, dass HIF-1 α eine wesentliche Rolle für die Tumorzellproliferation spielt (Übersicht in Rankin und Giaccia 2008). Ungeklärt ist, in welcher Größenordnung HIF-1 α damit die Proliferationsrate von Mundhöhlenkarzinomen steigert. Für die Beantwortung dieser Fragestellung wäre eine Gegenüberstellung der Expression von HIF-1 α mit Proliferationsmarkern wie Ki67 sinnvoll. Man weiß heute, dass auch bei Normoxie des Tumorzellverbandes HIF-1 α induziert werden kann. Derartige Regulationen erfolgen durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (Pi-3K) oder auch durch einen weiteren Aktivierungsweg in Form der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK). Für beide Fälle gilt, dass folglich die HIF-1 α –induzierten Signalkaskaden aktiviert werden (Cohen et al. 2004). Es bleibt zu diskutieren, ob sich HIF-1 α aufgrund seiner erheblichen Labilität in Gegenwart von Sauerstoff überhaupt eignet, den Grad der Hypoxie in einem Tumorgewebe verlässlich zu bestimmen. Um die Frage zu beantworten, ob die Bestimmung von HIF-1 α durch die Entnahme des Tumorgewebes verfälscht werden könnte, führten TRASTOUR und Mitarbeiter Versuche am Tiermodell durch. Bei der Maus wurden Mammakarzinome induziert und jeweils mehrere Probeexzisionen entnommen. Die Fixatierung der histologischen Schnitte erfolgte unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen. Dabei blieben die HIF-1 α –Level unverändert, so dass die Entnahmebedingungen der klinischen Routine keine Verfälschungen der Expression von HIF-1 α mit sich bringen sollten (Trastour et al. 2007). Somit eignet sich die Immunhistochemie als apparativ einfache Technik hervorragend, HIF-1 α -Expressionen auch an Karzinomgeweben der Mundhöhle nachzuweisen und zu quantifizieren. Limitierend für den Einsatz von HIF-1 α in der klinischen Routine ist lediglich die nicht ganz einfache Färbeprozedur (Schütze 2007).

Im Rahmen dieser Untersuchungen zur Expression von HIF-1 α am Mundhöhlenkarzinom konnte gezeigt werden, dass dieses Protein als unabhängiger Marker zur Prognosekalkulation geeignet ist. Die multivariate Cox's-Regressionsanalyse (adj. nach Tumorgröße und Grading) bestätigte ein 3,7-fach erhöhtes Risiko des tumor-assoziierten Versterbens, wenn dieses Protein im Mundhöhlenkarzinomgewebe überexprimiert wird ($p = 0,01$).

5.2.1.2 GLUT-1

Die Progression eines Tumors von der epithelialen Neoplasie zum schließlich definitiven invasiven malignen Prozess erfolgt durch ein komplexes Mehrschrittgeschehen (Burstein et al. 2006). Ein zentraler und zudem hypoxie-abhängiger Prozess ist die gesteigerte Glykolyse.

Eine hohe Glykolyserate unter anaeroben Bedingungen ist typisch für maligne Tumoren und allgemein seit den 30-er Jahren des vergangenen Jahrhunderts als **WARBURG-Effekt** bekannt. Dabei wird Glukose schnell in Lactat umgewandelt, welches dann nicht mehr zur Energiegewinnung innerhalb des Karzinoms zur Verfügung steht (Dang und Semenza 1999, Denko 2008). Die Abb. 29 zeigt schematisch die pathobiochemische Situation einer an die Hypoxie adaptierten Tumorzelle.

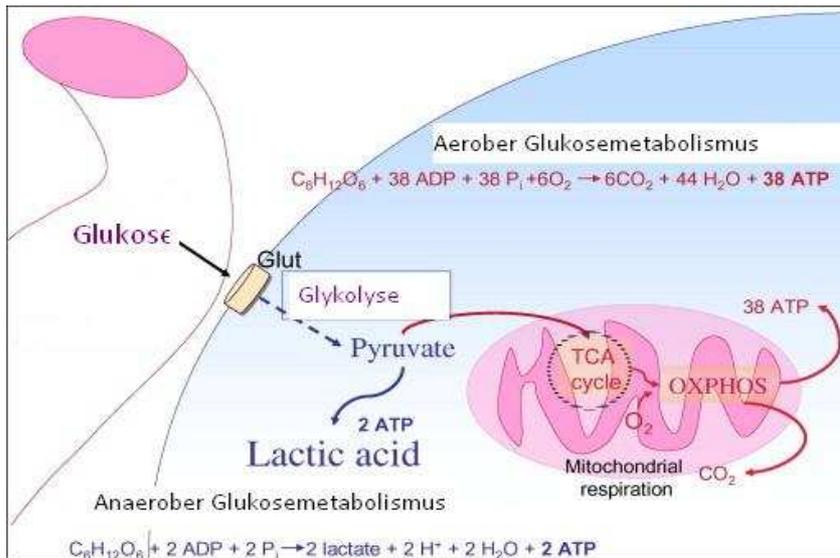


Abb. 29 Hypoxie-adaptierte Tumorzelle, ausgedrückt in Form des membranständigen Glukosetransportmoleküls Glut-1 (übernommen und modifiziert nach Brahimi-Horn und Pouysségur 2007)

Unter hypoxischen Bedingungen verändern die Tumorzellen ihren Stoffwechsel zur anaeroben Glykolyse. Die anaerobe Glykolyse stellt zwar nur 2 ATP-Moleküle bereit, ist jedoch die einzige Möglichkeit zur Energiegewinnung unter hypoxischen Bedingungen. Voraussetzung dafür ist allerdings der Glukosetransport in die Tumorzelle hinein. Dies wird durch die HIF-1 α - abhängige Stimulation von Glukosetransportmolekülen realisiert (Harris 2002). Die zwei Effekte, Stimulation der Gefäßneubildung als auch erhöhte Glykolyse, werden durch HIF-1 α angeregt. Unklar ist bis heute jedoch, welcher der beiden prinzipiellen Wege, die als *angiogenetic switch* bzw. *glycolytic switch* bezeichnet werden, vom Tumor präferiert wird (Gatenby und Gillies 2004). Durch diesen aktuellen Kenntnisstand sind auch jene Arbeiten von vor etwa 5 – 10 Jahren zu werten, welche in einer gesteigerten Angiogenese den alleinigen Faktor zur Prognoseabschätzung auf molekularer Ebene sahen (Li et al. 2003, Wong et al. 2003, Uehara et al. 2004). Teilweise war sogar der Einfluß einer

erhöhten Gefäßneubildung auf die Überlebenssituation komplett negiert worden (Gleich et al. 1997, Carlile et al. 2001).

Allerdings fand man auch immer wieder Patienten mit schlechter Prognose bei besonders geringen Expressionen von VEGF und seinen Rezeptoren. Man spricht zum Teil von einer regelrecht invertierten „U-shape-Kurve“ bezüglich der Prognose in Abhängigkeit von VEGF (Bussink et al. 2003). Hintergrund ist, dass mittelgradig vaskularisierte Tumore die beste Prognose haben. Hochgradig mit neuen Gefäßen ausgestattete Karzinome können schnell metastasieren, während bei sehr geringer Vaskularisation mit nachfolgend insuffizienter Sauerstoffversorgung mögliche strahlentherapeutische Therapien nicht effektiv sein können (Kaanders et al. 2002).

Ob der Tumorzellverband eher die Gefäßneubildung vorantreibt oder die anaerobe Glykolyse favorisiert, Tumoren mit besonders hoher und besonders niedriger Expression von VEGF haben eine schlechte Prognose (Shintani 2004, Bussink 2003).

Demgegenüber fanden nur zwei Arbeiten keinen Zusammenhang von VEGF-Expression und Prognose (Salven 1997 und Carlile 2001).

Auch die frühere Annahme, anhand der alleinigen Charakterisierung des tumoreigenen Gefäßsystems Rückschlüsse auf die Aggressivität des Tumortypes schließen zu können, hat sich nicht umfassend bestätigt. Die dazu herangezogene Mikrogefäßdichte [Micro vessel density, MVD] zeigte zwar einen Zusammenhang mit dem Auftreten von Rezidiven, ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der MVD und dem Überleben der Patienten fand sich jedoch nicht (Lopez-Graniel et al. 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Mikrogefäßdichte mit der Tumorgröße korrelierte, so dass dieses Charakteristikum als unabhängiger Prognosemarker vermutet worden war (Lopez-Graniel et al. 2001). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage, wodurch im Falle einer nur geringen oder gar ausbleibenden Gefäßneubildung die Energiezufuhr für die Tumorzelle und deren weitere Proliferationsaktivitäten geregelt wird. Eine Lösung ist die Hochregulation von Glukosetransportmolekülen, wobei GLUT-1 die dominierende Rolle beim Mundhöhlenkarzinom spielt (Reißer et al. 2008, Mellanen et al. 1994).

GLUT-1 ist somit ein weiteres Protein, welches innerhalb der durch HIF-1 α induzierten Kaskade als Folge von Tumorhypoxie exprimiert wird. Allerdings konnten beim Mammakarzinom auch GLUT-1-positive Gewebe ohne eine entsprechende Aktivierung von HIF-1 α registriert werden. In derartigen Fällen werden andere Faktoren wie Mitogene, Wachstumsfaktoren und aktivierte Onkogene als Ursachen für die HIF-1 α –unabhängige Stimulation diskutiert (Vleugel et al. 2005). Beim immunhistochemischen Nachweis von

GLUT-1 konnte eine Übereinstimmung mit den GLUT-1-mRNA-Expressionen nachgewiesen werden. Diese Tatsache ist für den klinischen Alltag bedeutend, weil dieses Protein mit hoher Sensitivität im Rahmen der allgemeinen histologischen Diagnostik bestimmbar ist (Mellanen et al. 1994).

Bereits LAUTNER konnte eindrucksvoll zeigen, dass die Expression von GLUT-1 nachhaltigen Einfluss auf das Überleben der Mundhöhlenkarzinom-Patienten hatte. So zeigten Patienten, deren Tumoren eine hohe Expression von GLUT-1 aufwiesen, eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von lediglich 24%. Im Falle einer geringen Expression dieses Glukosetransportmoleküls stieg das Überleben der Patienten deutlich an und betrug nach 5 Jahren knapp 74% (Lautner 2007). Neben der Nutrition und Energiegewinnung der Tumorzelle zieht eine derartig gesteigerte Glykolyse jedoch weitere mannigfaltige Veränderungen in der Tumorzelle bzw. dem umgebenden Tumorstroma nach sich (Cardone et al. 2005). In der Tumorgenese ist zunächst die Aktivierung der erhöhten Glukoseaufnahme der erste Schritt zu einem maligneren Phänotyp. Die gesteigerte Glykolyse hat aber auch zur Folge, dass der intrazelluläre pH-Wert sinkt. Bei einer solchen Ansäuerung wird der Ablauf der DNA-Replikation gefährdet; zudem unterstützt ein alkalischer pH-Wert im Inneren der Tumorzelle die weitere Glykolyse. Die gesteigerte Glykolyse bringt deshalb einige Anpassungsprozesse an der Zellmembran der Tumorzellen mit sich. Es handelt sich hierbei zumeist um transmembranäre Austauschmoleküle, welche aktiv in den Prozess der Stabilisierung des intrazellulären pH-Wertes involviert sind. Als zentrales Protein wurde hierzu der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE-1) beschrieben (Cardone et al. 2005). In einer schematischen Übersicht sind die wichtigsten Prozesse an der Tumorzellmembran zusammengefasst (Abb. 30).

Der komplexe Prozess der Adaptation der Tumorzellmembran an die hypoxische Situation im Austausch mit dem Tumorstroma hat möglicherweise entscheidenden Einfluss auf die frühe Metastasierungskaskade. Neben der bereits erwähnten Stabilisierung des pH-Wertes im Inneren der Tumorzelle [pH_i] zieht dieser Prozess die Degradation der extrazellulären Matrix nach sich und leitet damit den Beginn der Metastasierungskaskade ein. Im Rahmen der Konstanterhaltung des pH_i kommt es automatisch zu einer Absenkung des pH-Wertes im Tumorstroma [pH_e]. Ein derartiger Abfall des pH_e zieht schließlich Verluste des Zell-zu-

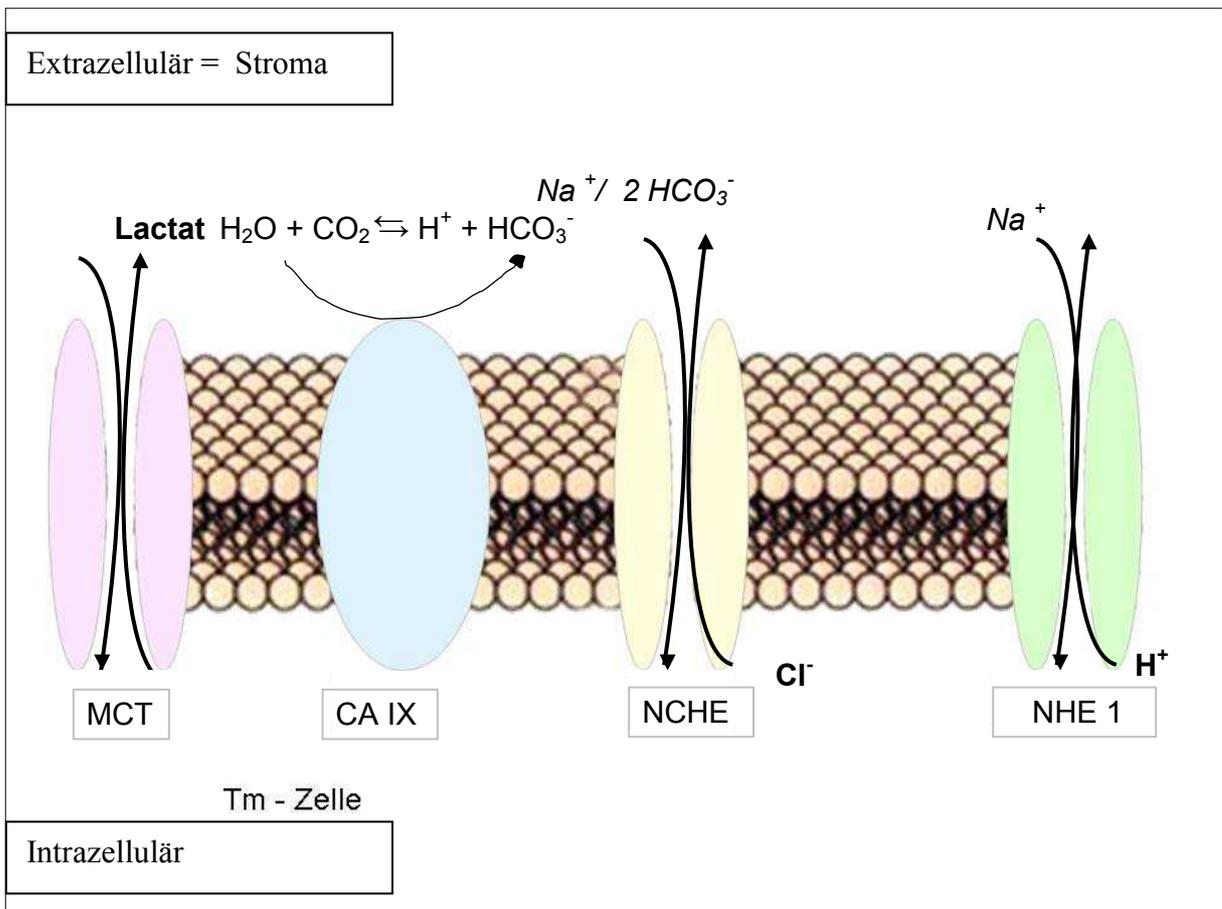


Abb. 30 Vereinfachte schematische Darstellung der hypoxie-abhängigen Veränderungen der Tumor-Zellmembran.

MCT	=	Wasserstoffionen-Laktat-Austauscher
CA IX	=	Carboanhydrase 9
NCHE	=	Natrium-Chlorid/Hydrogenkarbonat-Austauscher
NHE 1	=	Natrium /Wasserstoffionen[Protonen]-Austauscher

Zell-Kontaktes nach sich; der Primärtumor wird gewissermaßen auf die Metastasierung „vorbereitet“. Dies zeigt sich u.a. darin, dass die Tumorzellen Pseudopodien für die nachfolgende Migration entwickeln. Man spricht dann von einer sog. amöboiden Struktur. Im Falle eines gleichzeitigen, Hypoxie-induzierten Apoptoseverlustes ist die Tumorzelle nunmehr zur Metastasierung befähigt (Cardone et al. 2005). Die eigenen Ergebnisse stützen diese Hypothese in der Weise, dass mit steigender GLUT-1-Expression ein erhöhtes Risiko zur Metastasierung nachgewiesen werden konnte (14,3% Rezidive bei negativer GLUT-1-Expression versus 65% im Falle einer hohen Expression).

Anhand dieser detaillierten Untersuchungen konnte schließlich die Annahme von TIAN und Mitarbeitern bestätigt werden, dass durch den Glukosetransporter GLUT-1 die Aufrechterhaltung des glykolytischen energetischen Metabolismus in hypoxischen

Tumorregionen organisiert wird (Tian et al. 2004). Für den Kliniker ist die Kenntnis der glykolytischen Situation des Karzinoms deshalb genau so von großer Bedeutung. Tumoren mit einer hohen Vaskularisationsdichte sind aufgrund der gegebenen Substratzufuhr durch die Angiogenese aggressiv, während hypoxische Tumoren hingegen ein derartiges Gefäßsystem nicht besitzen und realisieren die energetische Situation durch transmembranäre Transportmoleküle, welche einen direkten Substrattransport in die Tumorzelle ermöglichen. Zahlreiche Publikationen belegen eine Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von GLUT-1 und einem signifikant vermindertem Überlebensintervall der Tumorpatienten. So konnten durch KATO und Mitarbeiter signifikante Zusammenhänge zwischen der Expression von GLUT-1 und der Primärtumorgröße wie auch dem Ausmaß von Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden (Kato et al. 2002). Ähnlich deutliche Zusammenhänge konnten durch TOHMA und Mitarbeiter am Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre nachgewiesen werden. Sie fanden bei 63 Karzinomen des Ösophagus zwei generelle immunhistochemische Typen. Stark positiv exprimierende Tumoren zeigten eine schlechte Überlebenswahrscheinlichkeit, während geringgradige GLUT-1-Expressionen mit einem signifikant besseren Überleben einhergingen (Tohma et al. 2005). Die Ergebnisse der Gruppe um MINETA stützen eindrucksvoll die eigenen Resultate. Sie konnten bei insgesamt 99 Hypopharynxkarzinomen bei knapp der Hälfte der Fälle eine Überexpression an GLUT-1 nachweisen. Entsprechend klar zeigten sich auch die gefundenen Unterschiede beim Überleben der Patienten. GLUT-1-überexprimierende Tumorformen zeigten eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 35%, die schwach GLUT-1-exprimierenden Karzinome präsentierten mit 57% Überlebenswahrscheinlichkeit eine bessere Prognose (Mineta et al. 2002).

Es darf somit allgemein als gesichert gelten, dass eine Überexpression des Glukosetransportmoleküls GLUT-1 mit einem schlechten Überleben der Patienten korreliert. Tumoren, welche GLUT-1 stark exprimieren, zeigen eine statistisch signifikant kürzere Überlebenszeit (Kunkel 2007). Allerdings ist der Einfluss der Tumorhypoxie auf die Überexpression von GLUT-1 umstritten. Vielmehr wird heute davon ausgegangen, dass diese starke Expression des Glukosetransportmoleküls ein Effekt einer frühen *Ras*- bzw. *Src*-Transformation sei (Kunkel 2007). Pedersen dokumentierte einen von der Hypoxie unabhängigen Effekt einer GLUT-1-Überexpression auf ein schlechtes Ansprechen kleinzelliger Lungenkarzinome auf eine Bestrahlung (Pedersen et al. 2001). Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die Expression von GLUT-1 in zahlreichen Tumorentitäten sowohl hypoxie-abhängig als auch ohne den Einfluss des hypoxischen Stresses erfolgen kann.

Die Expression von GLUT-1 kann auch in Verbindung mit der Positronenemissionstomographie zur Einschätzung des Malignitätscharakters von Mundhöhlenkarzinomen herangezogen werden. In diesem Zusammenhang zeigten LI und Mitarbeiter, dass erhöhte Aufnahmen von 2-[18F]fluoro-2-desoxy-D-Glukose [FDG] teilweise auch mit einer erhöhten GLUT-1-Expression korrelierten. Es konnte nachgewiesen werden, dass geringer differenzierte und auch rezidivierende Mundhöhlenkarzinome mehr GLUT-1 exprimierten aber auch mehr FDG aufnahmen (Li et al. 2008).

5.2.1.3 CA IX

Ein weiteres Enzym, welches hypoxie-abhängig durch HIF-1 α reguliert wird, ist die Carboanhydrase 9 [CA IX] (Harris 2002). Die Rolle dieses Enzyms in der Tumorgenese beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle wurde in früheren Arbeiten eher unterschätzt. Der detaillierte Mechanismus seiner Aktivierung und Deaktivierung ist komplex. Normalerweise unterliegen Tumorzellen bei hypoxischem Stress der Apoptose. Der entscheidende Schritt in der Tumorprogression scheint die Anpassung der Tumorzellen an die hypoxischen Umgebungsbedingungen zu sein. Mit zunehmender Hypoxie sinkt der intrazelluläre pH-Wert (pHi) und leitet den hypoxie-bedingten Zelltod ein. Für die Konstanz dieses intrazellulären pH-Wertes sind in Ergänzung zur Abb. 30 noch weitere Enzymsysteme, unter ihnen der mitogen-sensitive Kalium-Austauscher und protonenpumpende ATPasen, involviert (Beasley et al. 2001). Die Carboanhydrase verstoffwechselt Kohlendioxid, welches während des aeroben Tumormetabolismus entsteht und aus der Zelle transportiert wird. Durch die Konversion zu Bikarbonat- und Wasserstoff-Ionen wird einerseits der extrazellulären pH (pH_e) gesenkt. Das resultierende Bikarbonat wird in die Tumorzelle im Austausch mit Chlorid gepumpt, der intrazelluläre pH wird konstant gehalten. Durch den gleichzeitig sinkenden pH_e entsteht extrazellulär ein stark saures Milieu, was dem weiteren Tumorwachstum bei der Zerstörung der extrazellulären Matrix hilfreich ist. Neben der Unterstützung von Tumorzellmigration und -invasion werden durch den sauren extrazellulären pH Wachstumsfaktoren induziert (Beasley et al. 2001).

Insgesamt wurde der Wert der Carboanhydrase IX hinsichtlich prognostischer Aussagen bei Tumoren kontrovers diskutiert. In einer aktuellen, umfassenden Arbeit zeigten ERIKSEN und OVERGAARD, dass die CA IX keinen Einfluss auf die Prognose beim Mundhöhlenkarzinom hat. Obwohl bei 320 Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom unterschiedliche Färbeintensitäten gegen CA IX festgestellt werden konnten, fand sich kein

Zusammenhang zwischen der Expression dieses Enzyms und der Prognose (Eriksen und Overgaard 2007). Diese Aussage konnte durch die eigenen Ergebnissen bestätigt werden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von KIM und Mitarbeitern. Sie stellten am Beispiel von Lungenkarzinomen einen klaren Zusammenhang zwischen der Expression von CA IX und der Prognose der Patienten fest (Kim et al. 2005). Es ist zudem bekannt, dass CA IX als Protein wesentlich stabiler als HIF-1 α ist, wodurch speziell bei Paraffinschnitten noch weniger artifizielle Defizite durch eine routinemäßige Entnahme bei diesem Protein zu erwarten sind. Ähnlich klare Ergebnisse fanden NIEMELA und Koautoren am Beispiel des Kolorektalen Karzinoms. Sie zeigten an 1134 Gewebeproben dieser Tumorentität, dass CA IX im Vergleich zu normaler Darmmukosa in den Tumoren deutlich höher exprimiert wurde. Dabei bestand kein Zusammenhang zwischen der Expression von CA IX und der Differenzierung und dem klinischen Stadium nach DUKES (Niemela et al. 2007).

Mittlerweile ist auch beim Mammakarzinom gesichert, dass die Überexpression von CA IX mit einem deutlich geringeren Überleben einhergeht. Weiterhin dokumentiert seine Präsenz im Tumorgewebe von Mammakarzinomen eine höhere Malignität, welche unabhängig von der Tumorgroße und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen entsteht (Trastour et al. 2007). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen HUSSAIN und Mitarbeiter. In einer aktuellen Studie von 144 Patientinnen mit Mammakarzinomen konnten sie nachweisen, dass die Expression von CA IX als prognostischer Faktor herangezogen werden könnte. Tumoren, die dieses Enzym hochgradig exprimierten, zeigten eine geringere Überlebenschancen. Diese betrug 83% im Gegensatz zu den Tumoren mit einer negativen Expression von CA IX, welche eine Überlebenschancen von 96% aufwiesen (Hussain et al. 2007).

An Karzinomen des Magens bzw. des Ösophagus veranschaulichten DRIESSEN und Mitarbeiter den Einfluss der Expression von CA IX. An 154 Tumorgewebe zeigte sich der signifikante Einfluss der Expression von CA IX auf das Überleben der Patienten. Während bei einer negativen Expression 47% der Patienten überlebten, sank die Prognose auf nur noch 27% im Falle einer hohen Expression von CA IX (Driessen et al. 2006).

Einige Autoren sehen in der sehr sensiblen Expression von CA IX aber noch höhere Malignitätspotentiale der entsprechenden Tumoren (Kim et al. 2005). So ist CA IX nicht nur ein hoch aktives Enzym, sondern auch in einigen Prozessen der Adhäsion, des Zell-zu-Zell-Kontaktes und wahrscheinlich auch bei der Zellproliferation involviert (Driessen et al. 2006). Diese Annahmen wurden dadurch bestätigt, dass die Expression von CA IX am Beispiel der Ösophagus- und Magenkarzinome auch mit einer gesteigerten Prävalenz von Lymphknotenmetastasen assoziiert war. So fanden sich bei den CA IX-positiven Tumoren in

56 % der Fälle Lymphknotenmetastasen, während bei den CA IX-negativen Patienten lediglich bei 39% der Fälle derartige Metastasen gefunden werden konnten (Driessen et al. 2006).

Dass CA IX innerhalb der Tumorgenese eine klare Rolle bei der Entstehung eines erhöhten Aggressionspotentials spielt, konnte zudem auch in tierexperimentellen Studien gezeigt werden. Ferner konnte dadurch bestätigt werden, dass dieses Enzym durch hypoxischen Stress aktiviert wird (Takacova et al. 2007). Basierend auf den Angaben der Literatur und den eigenen Ergebnissen lässt sich sagen, dass die Expression der CA IX ein prognostischer Faktor für zahlreiche Karzinome wie der Mamma, der Lunge, der Speiseröhre und des Magens ist. Allerdings konnte für das Mundhöhlenmalignom keine Beziehung zwischen der Expression der CA IX und der Prognose detektiert werden.

5.2.1.4 VEGF-C und Angiogenese

Die Entstehung von Metastasen ist bei malignen Tumoren des Menschen jener limitierende Schritt, welcher schließlich die Therapieoptionen und nicht zuletzt das Überleben der Patienten einschränkt. Dem Auftreten liegt ein koordinierter mehrstufiger Prozess zugrunde, in dem die Beteiligung zahlreicher Gene diskutiert wird (Pepeer 2001, Cheng et al. 2008,).

Neben der Entwicklung eines tumoreigenen Gefäßsystems sowie seiner Acceleratoren spielt auch die Präformation tumoreigener Lymphgefäße eine Rolle. Der Prozess des „Sprossens“ bereits vorexistierender Gefäße wird unter dem Begriff Angiogenese zusammengefasst (Trubiani 2003). Bereits 1971 postulierte FOLKMANN, dass das Wachstum solider Tumoren durch die Bildung eigener neuer Gefäße ermöglicht wird (Folkman 2002).

Mittlerweile ist die Angiogenese in Tumoren, also die tumoreigene Gefäßneubildung, recht umfassend untersucht worden. Der VEGF (vascular endothelial growth factor) gehört zu den am meisten untersuchten Proteinen. Aufgrund der zum Teil nicht unerheblichen Expression von VEGF auch in oralen Tumorgeweben wird von einigen Autoren vermutet, dass VEGF als sehr nützlicher Marker bei oralen Plattenepithelkarzinomen Bedeutung erlangen könnte (Yang 2002). Zu den Arbeiten, welche einen eindeutigen Zusammenhang des Onkoproteins VEGF mit einem schlechten klinischen Verlauf sehen, zählen die Veröffentlichungen von SMITH et al. sowie MAEDA und Koautoren. Sie konnten eine Korrelation zwischen der VEGF-Expression und einer geringen Überlebensrate feststellen (Maeda et al. 1998, et al. Smith et al. 2000 und 2001).

Seit 2002 unterscheidet man zwischen der Neubildung von Blut- und Lymphgefäßen innerhalb maligner Tumoren. Dabei werden für Lymphgefäße zwei prinzipielle Wege diskutiert. Einerseits geht man davon aus, dass Lymphgefäße aus primären Lymphangioblasten entstehen, welche schließlich zu Lymphgefäßen umgestaltet werden können. Die zweite Theorie zur Neubildung lymphatischer Gefäße beruht auf venösen endothelialen Zellen, welche aufgrund spezifischer Signale eine Transdifferenzierung erfahren. Dabei spielen VEGF-C und dessen Rezeptor VEGFR-3 eine zentrale Rolle (Alitalo und Carmeliet 2002). Hierbei induziert VEGF-C das Wachstum, die Migration und auch das Überleben der lymphoepithelialen Zellen. Da das System der Lymphknotenmetastasierung sehr sensibel ist und die meisten migrierenden Tumorzellen nur eine sehr kurze Überlebenszeit haben, erfordert die lymphogene Metastasierungskaskade eine präzise Präformation tumoreigener Lymphgefäße.

Lymphogene Metastasen können sich aber auch im Zuge einer gesteigerten Angiogenese entwickeln. In neuen Blutgefäßen zirkulieren die Tumorzellen dann und machen sich das chaotische Gefäßsystem zunutze. Es ist bekannt, dass tumoreigene Gefäße in ihren Wänden zahlreichen Öffnungen als Durchtrittsstellen zeigen (Alitalo und Carmeliet 2002). DRIESSEN und Mitarbeiter veranschaulichten den Einfluss von VEGF auf das Verhalten von 154 Ösophagus- und Magenkarzinomen. Im Falle einer positiven VEGF-Expression konnte eine deutlich erhöhte Mikrogefäßdichte registriert werden. Gleichfalls fiel bei den VEGF-positiven Tumoren eine erhöhte hämatogene Metastasierungsrate auf (78% bei VEGF positiv zu 34% VEGF negativ, $p < 0,0001$, Driessen et al. 2006). Leider differenzierten die Autoren nicht innerhalb der VEGF-Familie, so dass der konkrete Einfluss der jeweiligen Subtypen nicht erfasst werden konnte. Deshalb können beide prinzipielle Formen der Gefäßneubildung in Form der Bildung von tumoreigenen Blut- als auch Lymphgefäßen für prognostische Aussagen zusammen betrachtet werden.

Aus der Sicht des Kliniker gilt seit Jahrzehnten als gesichert, dass das Auftreten von Lymphknotenmetastasen beim Mundhöhlenkarzinom prognostisch ungünstig ist. Neben vielen anderen demonstrierten KAININS und Mitarbeiter den Einfluss von Lymphknotenmetastasen auf die Prognose beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Neben der Anzahl bestätigter Lymphknotenmetastasen hat auch deren Lokalisation einen entscheidenden Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten (Kainins et al. 1977). Allerdings wurde vermutet, dass zum Zeitpunkt der chirurgischen Intervention schon eine Dissemination von Tumorzellen über die Lymphwege stattgefunden haben muss, ohne dass diese im Präparat histologisch bestätigt werden konnten (Kainins et al. 1977). Aus einer

aktuellen Arbeit von KESKI-SANTTI und Mitarbeitern geht hervor, dass beim Zungenkarzinom die Größe des Primärtumors und die Infiltrationstiefe einen Einfluss auf das Auftreten okkult zervikaler Lymphknotenmetastasen haben. So fanden sich bei den pT_1 -Tumoren 23% zervikaler Lymphknotenmetastasen, beim Stadium pT_2 erhöhte sich dieser Wert auf immerhin 50% (Keski-Santti et al. 2007). Es wurde angenommen, dass die Koordinierung der Lymphangiogenese dem eigentlichen invasiven Karzinom vorausgeht. CICCO und Mitarbeiter fanden dabei am Beispiel des Zungenkarzinoms, dass die Expression von VEGF-C bei mehr als 80% der Tumoren stark war und deutlich mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korrelierte. Einzig limitierend war bei dieser Untersuchung die kleine Stichprobenzahl von 15 (Cicco et al. 2004). Speziell beim Karzinom der Zunge scheint eine frühzeitige Lymphangiogenese eine prognostisch wichtige Rolle zu spielen. Munoz-Guerra und Mitarbeiter konnten an 61 Zungenkarzinomen der Tumorstadien T_1 und T_2 zeigen, dass bei mehr als der Hälfte dieser Tumoren bereits eine intratumoral gesteigerte Lymphangiogenese nachgewiesen werden konnte. Diese Lymphangiogenese hatte zwar keinen entscheidenden Einfluss auf das Gesamtüberleben der beobachteten Population, aber auf das krankheitsfreie Intervall. So waren bei negativer intratumoraler Formierung von Lymphgefäßen nach 5 Jahren 89,6% der Patienten krankheitsfrei, während dieser Wert auf 67,2% im Falle einer positiven Lymphangiogenese innerhalb des Tumors sank (Munoz-Guerra et al. 2004). Ähnliche Ergebnisse fanden SEDIVY und Mitarbeiter. Sie konnten an insgesamt 28 Mundhöhlenkarzinomen den Einfluss der lymphatischen Mikrogefäßdichte auf das Auftreten von Lymphknotenmetastasen nachweisen.

Das Risiko zur Lymphknotenmetastasierung bzw. zum Auftreten von Spätmanifestationen in den Lymphknoten war bei verstärkter Lymphgefäßdichte signifikant erhöht und die VEGF-C-Expression korrelierte klar mit der lymphatischen Mikrogefäßdichte. Die Autoren schlugen vor, dass das Mitogen VEGF-C und die Lymphgefäßdichte zur Charakterisierung von Risikopatienten geeignet erscheint und empfahlen die Ergänzung der Routinediagnostik um die Bestimmung der Lymphangiogenese. Die Expression von VEGF-C war zudem unabhängig von den meisten klinisch-pathologischen Parametern und hatte wie bei den eigenen Ergebnissen keinerlei Einfluss auf das Überleben der Patienten (Sedivy et al. 2003). Bei einigen Tumorentitäten konnte bewiesen werden, dass die Expression von VEGF tumorspezifisch mit einem erhöhten Malignitätsgrad korreliert ist. Beim Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass die Expression von VEGF klar mit der Ausbildung eines tumoreigenen Gefäßsystems und somit mit einer erhöhten Malignität einherging (Brown et al. 1995). Ähnliche Resultate wurden am Beispiel maligner Ovarialtumoren demonstriert.

Mehr als 90% der analysierten Ovarialmalignome präsentierten eine starke Expression von VEGF als Maß für einen gesteigerten Tumorstoffwechsel, während im gesunden Ovarialgewebe keinerlei Expression dieses Mitogens nachgewiesen werden konnte (Abu-Jawdeh et al. 1996). In einer eindrucksvollen Arbeit konnten BANCER-TODESCA und Koautoren am Beispiel von Dysplasien der Vulvaregion zeigen, dass mit steigendem Dysplasiegrad die Expression von VEGF zunahm und auch die Mikrogefäßdichte anstieg (Bancer-Todesca et al. 1997). Allerdings erfassen alle diese Studien die generelle Funktion von VEGF als permeabilitätssteigendes und migrationsförderndes Agens im Rahmen der Tumorgenese. Nachteilig ist jedoch die Tatsache, dass mittels der oft gleichzeitig ermittelten Mikrogefäßdichte nicht immer die reale tumoreigene Gefäßneubildung erfasst wird, da VEGF auch im Rahmen einer chronischen Entzündung oder bei Heilungsprozessen exprimiert wird (Senger et al. 1993, Sauter et al. 1999). Es erscheint sinnvoller, den durchaus verschiedenen Einfluss der einzelnen Vertreter der VEGF –Familie innerhalb der Tumorgenese detaillierter zu analysieren (Sauter et al. 1999). KITADAI und Koautoren konnten sowohl in Zelllinien als auch anhand von 48 Paraffinschnitten des Ösophaguskarzinoms zeigen, dass die Expression von VEGF-C ein potenter Stimulator der Lymphangiogenese darstellt. Im Falle einer hohen Expression dieses Proteins fanden sich signifikant mehr Lymphknotenmetastasen (Kitadai et al. 2001).

Allerdings existieren bisher wenige Arbeiten zur Frage des Einflusses von VEGF-C auf die Lymphangiogenese und damit auf die Entstehung von Lymphknotenmetastasen beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. KISHIMOTO und Mitarbeiter zeigten, dass VEGF-C insbesondere in frühen Stadien des Mundhöhlenkarzinoms sehr gut mit der Bildung von Lymphknoten korreliert, während bei den fortgeschritteneren T₃- und T₄- Formen keinerlei Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF-C und dem Ausmaß von regionären Lymphknotenmetastasen festgestellt werden konnte. Somit erwies sich VEGF-C bei den früh erkannten Tumorstadien als wertvoller Prediktor für das Risiko von Lymphknotenmetastasen (Kishimoto et al. 2003). Die Autoren fanden mittels einer multivariaten Analyse, dass VEGF-C einen unabhängigen Prognosemarker darstellt. So konnte gezeigt werden, dass VEGF-C hoch signifikant mit der Lymphknotenmetastasierung korreliert. Es fand sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der Expression dieses Proteins und dem T-Stadium und der histopathologischen Differenzierung (Kishimoto et al. 2003). Trotzdem konnten Unterschiede beim Überleben der Karzinompatienten festgestellt werden. Bei den VEGF-C-negativen Patienten zeigte sich ein Überleben von 83,3%, während in der Gruppe mit einer hohen Expression das Überleben auf nur 50,7% sank (Kishimoto et al. 2003). Die klare Korrelation zwischen der Expression von VEGF-C und der Prognose bei frühen Stadien des

Mundhöhlenkarzinoms unterstreicht die Eignung dieses Proteins als zeitig anwendbaren Indikator für eine lymphonodale Metastasierung. Sie erfüllt die Forderung von KAININS und Mitarbeiter, schon zum Zeitpunkt der Operation ohne bestehende Metastasierung Aussagen zu einer derartigen Tendenz treffen zu können. Individualisierte Therapieschemata könnten somit realisiert werden. Es wäre denkbar, die VEGF-C-Expression zur Frage einer Neck dissection bei T₁- oder T₂- Tumoren heranzuziehen. Eine positive VEGF-C-Expression kann bei (noch) fehlendem Nachweis in der Bildgebung bzw. im histologischen Präparat als Ausdruck für eine initiale Lymphknotenmetastasierung gelten. Bei Vorliegen eines gering differenzierten Tumors und Überexpression von VEGF-C sollte die Therapie um die Halslymphknotenausräumung ergänzt werden.

Diese Untersuchungen von KISHIMOTO et al. haben eine gewisse Einschränkung, da lediglich eine Unterscheidung zwischen positiv (mehr als 25 % der Färbungen im Tumorgewebe) und negativ mit Intensitäten von VEGF-C zwischen 0 und 25 % erfolgte. Exakter ist das Vorgehen in der eigenen Studie mit Hilfe des Immunreaktiven Scores nach REMMELE, welcher sowohl die Färbeintensitäten als auch den flächenmäßigen Anteil der Färbung berücksichtigt.

Auf den Zusammenhang der Expression von VEGF-C und einer gesteigerten Lymphangiogenese wurde auch von O-CHAROENRAT und Mitarbeitern hingewiesen. Sie zeigten den Einfluss dieses angiopotenten Proteins an 54 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Allerdings war die Nachbeobachtungszeit der Patienten durchschnittlich nur 20 Monate. Dadurch war zwar die Korrelation zwischen der Expression von VEGF-C und der Lymphangiogenese signifikant, aber hinsichtlich des Überlebens der Patienten ließ sich lediglich eine Tendenz zur Signifikanz zeigen (O-Charoenrat et al. 2001).

Der Einfluss von VEGF-C auf das Metastasierungsverhalten am Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle konnte auch durch die Arbeitsgruppe um NEUCHRIST bestätigt werden. Sie zeigten an 4 Zelllinien und 16 Karzinomen den Einfluss auf das Metastasierungsverhalten. So korrelierte die VEGF-C-Expression mit dem Auftreten von Rezidiven; die statistische Signifikanz wurde aufgrund der geringen Stichprobe verfehlt (Neuchrist et al. 2003). Demgegenüber wurde in einer aktuellen Veröffentlichung von FAUSTINO berichtet, dass die VEGF-C-Expression nicht zur Detektion okkulter Lymphknotenmetastasen herangezogen werden kann, auch wenn das Risiko eines Auftretens derartiger Metastasen in der Literatur zwischen 23% und 45% beschrieben wird (Faustino et al. 2008).

Bisher konnte das Ausmaß von Lymphknotenmetastasen lediglich anhand des T-Stadiums kalkuliert werden. OKADA und Mitarbeiter zeigten in einer neueren Studie an 38 Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom den Zusammenhang zwischen Größe des Primärtumors und der Anzahl von Lymphknotenmetastasen. Dabei fand sich, dass bei den klinisch günstigeren T₁- und T₂-Formen nur bei 30% der Patienten Lymphknotenmetastasen auftraten, während bei den fortgeschrittenen T₃- und T₄-Tumoren doppelt so häufig Metastasen verzeichnet werden mussten (Okada et al. 2003). Diese Resultate standen in klarem Gegensatz zu den eigenen, welche eine Unabhängigkeit der VEGF-C-Expression von den klinischen und histologischen Parametern bestätigten.

Neben dem bekannten Mechanismus einer Aktivierung von VEGF-C durch die Tumorhypoxie kann dieses Protein auch durch Onkogene aktiviert werden. Als möglicher Weg wird unter anderem Ras diskutiert, welches eine direkte Stimulation von VEGF-C ermöglicht (Blancher et al. 2001).

Die aktuellen eigenen Untersuchungen und die von weiteren Autoren berechtigen zu der Annahme, dass mittels der VEGF-C-Expression und der Assoziation zu der Lymphangiogenese noch detailliertere Zusatzinformationen in wertvoller Ergänzung zum klassischen Grading gewonnen werden (vergl. Müller et al. 1992). Es ergibt sich, wahrscheinlich bedingt durch die verhältnismäßig kleine Gruppe von Patienten mit nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen, mit Ausnahme bivariater Korrelationen nur ein Trend zur Signifikanz zwischen dem Expressionsmuster von VEGF-C und der Entstehung dieser Metastasen bei Mundhöhlenkarzinomen in der eigenen Untersuchung.

5.2.1.5 Von Hippel-Lindau-Protein [pVHL]

Die Wirkung von pVHL als Tumorsuppressor-Protein ist unumstritten. Die am besten charakterisierte Funktion von pVHL ist seine Fähigkeit, den Hypoxie-induzierten Faktor alpha [HIF- 1 α] zu regulieren. Durch die Bindung mit dem VHL-Protein, welches ein Bestandteil des E₃-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist, wird HIF- 1 α ubiquitinyliert und anschließend durch das Proteasom 26S abgebaut (Luu et al. 2008). Die β -Domäne dieses Proteins bindet direkt an die sauerstoffabhängige Untereinheit von HIF-1 α und initiiert somit in normoxischen Geweben die Inaktivierung des Transkriptionskomplexes HIF. Am Nierenzellkarzinom konnte demonstriert werden, dass in einer Vielzahl von Fällen Mutationen des VHL-Genes vorlagen, wodurch die Expression des VHL-Proteins mit seinen suppressorischen Aktivitäten ausblieb (Wiesener et al. 2001, Kaelin 2008, Luu et al. 2008).

Immunhistochemische Untersuchungen zum pVHL eignen sich daher vorzüglich, um zu klären, ob eine Expression von HIF-1 α möglicherweise durch Mutationen des von Hippel-Lindau-Genes oder durch das Vorliegen einer echten hypoxischen Situation im Tumorgewebe bedingt ist. Klarzellige Nierenzellkarzinome wiesen in einem hohen Maße Defekte am VHL-Gen auf, so dass eine automatische Hochregulation von HIF-1 α und dessen Targetproteinen die Folge war. Typischerweise ist dann die Färbung gegen HIF-1 α diffus im Tumorgewebe und nicht in der Invasionsfront bzw. in den perinekrotischen Zonen zu finden (Wiesener et al. 2001).

Die Inaktivierung des VHL-Genes erfolgt durch Deletionen. Insgesamt sind ca. 59% der klarzelliger Nierenzellkarzinome für VHL mutiert und damit für dieses Gen inaktiviert (Huu et al. 2008, Krieg et al. 2000).

Der prognostische Einfluss von pVHL konnte am Beispiel von Nierenzell-, Ovarial- und Uteruskarzinomen in einer aktuellen Arbeit demonstriert werden. Der Wert dieses Proteins als prognostischer Marker scheint bei urologischen und gynäkologischen Karzinomen unumstritten zu sein (Lin et al. 2008, Nyhan et al. 2008). Bisher existieren jedoch keinerlei Analysen, welche die prognostische Bedeutung von pVHL beim Mundhöhlenkarzinom erfasst haben. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand ist dies also der erste Bericht, welcher den Zusammenhang einer Expression von pVHL und der Prognose beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle verdeutlicht. In der eigenen Untersuchung konnte für das Genprodukt des von Hippel-Lindau-Proteins, in Analogie zu den gynäkopathologischen Tumoren von LIN und Mitarbeitern, neben dem Einfluss auf das Gesamtüberleben ebenso ein Einfluss auf das Rezidivverhalten gefunden werden. Wenn beim Mundhöhlenkarzinom pVHL mäßig bis stark exprimiert wurde, zeigte sich neben dem schlechteren Überleben gleichzeitig ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv. Ursächlich könnten hier Mutationen des VHL-Genes sein, wobei sog. *missense*-Mutationen bekannt sind (Luu et al. 2008).

Die Rolle von pVHL in der Tumorprogression dürfte komplex sein und sollte in Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor HIF betrachtet werden. Die Folge ist bei pVHL-negativen oder defizitären Tumoren eine automatische Aktivierung des Transkriptionskomplexes HIF, wodurch schließlich automatisch die Expression von CA IX stimuliert wird (Wykoff et al. 2000). Eine Inaktivierung des pVHL führt dann auch zu einem Verlust der Regulation der Expression der Carboanhydrase IX durch verminderten Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe. Es ist zu erwarten, dass pVHL hinsichtlich seines komplexen Einflusses auf die Tumorgenese bei zahlreichen Tumorentitäten noch intensiver untersucht werden wird (Frew und Krek 2008).

5.3 Koexpression von hypoxie-relevanten Proteinen

Zur genauen Prognosekalkulation dürfte es hilfreich sein, mehrere Faktoren zu analysieren. In der multivariaten Analyse konnte anhand der eigenen Resultate gezeigt werden, dass sich die Proteine HIF-1 α , GLUT-1, CA IX und pVHL als unabhängige Prognosemarker eignen. Die aktuellen Ergebnisse zeigten erstmals, dass im Falle einer negativen Expression dieser vier hypoxie-relevanten Proteine eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von mehr als 90 % festgestellt werden konnte. Außerdem war es möglich, Aussagen zur kontrovers diskutierten Rolle der Carboanhydrase in der Tumorprogression des Mundhöhlenkarzinoms treffen zu können. Offensichtlich wird dieses Enzym bei dieser Tumorentität erst bei höherem und vor allem längerem andauerndem Sauerstoffdefizit hochreguliert. Bei der gemeinsamen Betrachtung des Einflusses von HIF-1 α und CA IX auf das Überleben der Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom konnte anhand der eigenen aktuellen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine negative Expression beider Proteine mit einem 5-Jahres-Überleben von 95% einhergeht. Bisher sind derartige positive Daten nicht bekannt. Erklärt werden kann diese Phänomen durch ein Ausbleiben einer klonalen Selektion dieser Tumoren. Es kann davon ausgegangen werden, dass derartige Karzinome nicht hypoxisch sind. Damit verwundert es nicht, dass auch im Rahmen dieser aktuellen Untersuchungen der prädiktive Wert von CA IX im Rahmen einer einzigen Betrachtung dieses Enzyms nicht bewiesen werden konnte. Charakteristisch war hingegen die Koexpression von HIF-1 α und CA IX, wodurch einmal mehr der stimulierende Effekt von HIF-1 α auf weitere Proteine demonstriert werden konnte (vergl. Abb. 22). Die streng lineare Korrelation der HIF-1 α - und CA IX-Expression bei Karzinomen der Lunge unterstreicht, dass eine Expression von HIF-1 α konsekutiv die Expression von CA IX nach sich zieht (Kim et al. 2005).

Am Beispiel des Lungenkarzinoms konnte durch KIM und Mitarbeiter gezeigt werden, dass eine hohe Expression von HIF-1 α signifikant mit der Expression von CA IX korrelierte. Ganz ähnlich verhielt sich der Zusammenhang zwischen HIF-1 α und VEGF, auch wenn statistisch nur eine Tendenz zur Signifikanz gefunden werden konnte (Kim et al. 2005). Diese Untersuchungen an anderen Tumorentitäten beweisen eindeutig die zentrale regulierende Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 α im Rahmen der Tumorgenese.

Auch bei einigen anderen Malignomen des Menschen war es von Interesse, in welcher Art und Weise die unter hypoxischem Stress exprimierten Proteine mit der Prognose der Patienten korrelierten. So fanden KIVELA und Mitarbeiter am Beispiel des Kolorektalen Karzinoms eine vermehrte Expression von CA IX, welche jedoch keinerlei Regulation durch

das Tumor-Suppressor-Genprodukt pVHL erfuhr (Kivela et al. 2005). Beim Mammakarzinom konnten TRASTOUR und Mitarbeiter an 132 invasiven Tumoren die Koexpression von HIF-1 α und CA IX demonstrieren. Diese Untersuchungen unterstreichen die Komplexität des hypoxischen Stresses, so dass von einer durch Hypoxie getriggerten Expressionskaskade gesprochen werden kann. In diesen konkreten Fällen wurde das extrem sauerstofflabile HIF-1 α durch die erhöhte Tumorphoxie stabilisiert und dadurch die Expression von CA IX induziert (Trastour et al. 2007). Noch deutlicher konnten VLEUGEL und Koautoren den regulierenden Einfluss des Transkriptionsfaktors HIF auf die jeweiligen Target-Gene demonstrieren. Sie zeigten an 200 Mammakarzinomen die Expression von HIF-1 α , welche hoch signifikant mit der gleichzeitigen Expression von CA IX und GLUT-1 korrelierte (Vleugel et al. 2005). Beim Nierenzellkarzinom fanden sich vor allem hohe Werte für die durch HIF-1 α induzierten und regulierten Targetproteine GLUT-1 und VEGF. Während in Anwesenheit von HIF-1 α die Expression von VEGF um das fünffache gesteigert wurde, zeigte sich im Falle von GLUT-1 sogar eine Steigerung um das zehnfache, wenn die entsprechenden Nierenzellkarzinome HIF-1 α positiv waren (Wiesener et al. 2001). DRIESSEN und Mitarbeiter untersuchten die Koexpression von CA IX und VEGF an insgesamt 154 Karzinomen des Magens und des Ösophagus. Dass beide Proteine hochreguliert wurden, liegt am Einfluss von HIF-1 α . In seiner durch hypoxischen Stress stabilisierten Form bindet HIF-1 α an Promotor-Regionen beider Gene und veranlasst die Produktion der jeweiligen Genprodukte, im konkreten Fall von CA IX und VEGF (Driessen et al. 2006).

Generell scheint auch der Grad der Koexpression für detaillierte prognostische Aussagen wertvoll zu sein. Nur dadurch kann es gelingen, die jeweiligen tumoreigenen pathobiochemischen Wege zur Ausprägung seiner Aggressivität verstehen und richtig interpretieren zu lernen. Erste Ansätze in diese Richtung konnten am Beispiel der Ösophaguskarzinome gezeigt werden. Dabei fand sich eine Koexpression von CA IX und VEGF bei 36% der analysierten Tumorgewebe. Allerdings präsentierten diese Tumoren eine nochmals schlechtere Prognose im Vergleich zu jenen, welche lediglich eines der beiden Proteine überexprimierte. Gleichzeitig resultierte bei diesen Tumoren im Vergleich zum Rest der Studienpopulation eine erhöhte Infiltrationsrate (86% im Falle von CA IX und VEGF-Überexpression versus 59% bei CA IX- und VEGF- negativen Fällen, $p = 0,001$, Driessen et al. 2006). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, anhand der Expressionsmuster beider Proteine von einer Subgruppe von Tumoren mit deutlich erhöhtem Malignitätspotential sprechen zu können. Ganz ähnliche Ergebnisse fanden KOUKOURAKIS und Mitarbeiter bei einer Studie zum Expressionsverhalten von HIF-1 α und HIF-2 α am Beispiel von

insgesamt 75 Kopf-Hals-Malignomen. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression beider Proteine HIF-1 α und HIF-2 α und VEGF sowie der Mikrogefäßdichte (Koukourakis et al. 2002).

Eine Analyse, welche vier hypoxie-relevante Proteine an einem gut dokumentierten Patientengut hinsichtlich deren Einfluss auf die Überlebensprognose zusammenfasste, existierte bisher nicht. Die hier präsentierten Daten sind die erste Veröffentlichung, welche ein 14,8-fach erhöhtes Risiko des tumor-assoziierten Versterbens in Abhängigkeit der Expression von HIF-1 α , GLUT-1, CA IX und pVHL an Geweben des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle festgestellt hat.

WIJFFELS und Mitarbeiter analysierten den Zusammenhang zwischen der Hypoxie und dem daraus resultierenden Proliferationsverhalten von Mundhöhlenkarzinomen. Dabei konnte anhand von 39 allerdings sehr heterogen verteilten Malignomen des Kopf-Hals-Bereiches gezeigt werden, dass in hypoxischen Arealen kaum proliferative Aktivitäten vorzufinden waren. Lediglich in gut oxygenierten Arealen konnte ein entsprechendes Proliferationspotential verzeichnet werden. Dennoch unterstreicht dies die Heterogenität der Tumorgewebe und den folglich chaotischen Zuständen hinsichtlich der Nutrition und Oxygenation. Derartige hypoxische, nicht hochgradig proliferativ tätige Tumorzellverbände könnten jedoch ein erhöhtes Aggressionspotential besitzen und resistent auf radio- bzw. chemotherapeutische Therapien reagieren (Wijffels et al. 2008).

Bisher existieren auch keine Veröffentlichungen, welche den synergistischen Effekt der Expression von HIF-1 α und GLUT-1 auf eine Steigerung des tumorassoziierten Versterbens am Beispiel des Mundhöhlenkarzinoms demonstrieren. In einer aktuellen Publikation der Arbeitsgruppe um van der GROEP konnte auf eine derartige Koexpression von HIF-1 α und GLUT-1 erstmals am Beispiel des Mammakarzinoms hingewiesen werden. Bei den sporadischen Mammakarzinomfällen sind etwa ein Drittel aller Tumoren sowohl HIF-1 α als auch GLUT-1 positiv, was etwa den eigenen Zahlen am Mundhöhlenkarzinom entspricht. Dennoch wurde in dieser Veröffentlichung das möglicherweise deutlich erhöhte Risiko eines tumorbedingten Versterbens in einem multivariaten Ansatz nicht untersucht (van der Groep et al. 2008).

Eine partielle Koexpression von HIF-1 α und CA IX konnte durch KAPPLER und Mitarbeiter bei Kopf-Hals-Malignomen gezeigt werden. Wenn diese beiden Proteine geringgradig exprimiert wurden, betrug das 5-Jahres-Überleben 50% und sank auf nur 13% im Falle einer hohen Expression beider Proteinstrukturen. Einzige Nachteile dieser Analyse waren die mit nur 34 Karzinomen geringe Stichprobe und die heterogene Verteilung der

einzelnen Tumorlokalisationen (Kappler et al. 2008). In einer bivariaten Analyse wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und CA IX an insgesamt 59 Geweben von Mundhöhlenkarzinomen durch WINTER und Mitarbeitern nachgewiesen (Winter et al. 2007). Jedoch konnte auch in dieser Analyse nicht der Einfluss einer gemeinsamen Expression dieser beiden hypoxie-relevanten Proteine auf das Überleben der Patienten gezeigt werden. Nach gegenwärtigem Stand der Literatur stellen deshalb die eigenen Resultate die ersten dar, welche im Falle einer negativen Expression von HIF-1 α und CA IX in einer multivariaten Analyse ein Überleben der entsprechenden Patienten von 95% bescheinigen. Zudem zeigte sich jene Gruppe von 22 Patienten mit der negativen Expression beider Marker hinsichtlich TNM-System und Grading heterogen verteilt, d.h. die negative Expression ereignete sich unabhängig dieser etablierten klinisch-pathologischen Kriterien. Vergleichbare Resultate erzielten BACHE und Mitarbeiter an 34 fortgeschrittenen Kopf-Hals-Malignomen. Sie fanden in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen, dass im Falle eines Ausbleibens der hypoxie-relevanten Proteine HIF-1 α und CA IX ein deutlich verbessertes Gesamtüberleben registriert werden konnte (Bache et al. 2006).

Gleichfalls scheint ein weiterer regulierender Pathway beim Mundhöhlenkarzinom über eine Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase [Pi-3K] zu erfolgen. Regulierend ist dann auch eine erhöhte intratumorale Zelldichte. Abb. 31 verdeutlicht schematisch das Modell einer Aktivierung von CA IX als Folge einer vorangegangenen HIF-1 α -Stabilisierung bzw. über den Pi-3K-Pathway (Kaluz et al. 2002). Interessanterweise scheint auch bei dem pathobiochemischen Weg einer Aktivierung mittels der Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase zumindest eine minimale Aktivität des Transkriptionskomplexes HIF-1 α notwendig zu sein. Die aktuellen Ergebnisse bestätigen diese Resultate in der Weise, dass nur im Falle einer negativen Expression von HIF-1 α eine Pi-3K-abhängige CA IX-Aktivierung ausbleibt. Die Überlebenszeit der Patienten mit diesen Karzinomen entspricht praktisch der in der Normalpopulation.

Noch vor wenigen Jahren wurde in Frage gestellt, ob sich CA IX zur weiteren Differenzierung von Tumoren eignet (Nógrádi 1998). Noch im Jahre 2005 fanden FILLIES und Mitarbeiter nur einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α und dem Überleben der Patienten, jedoch keine Korrelation zwischen den Proteinen GLUT-1 und CA IX als HIF-1 α getriggerte Effektorproteine (Fillies et al. 2005).

Insgesamt scheint es allerdings mit Hilfe einer Kombination dieser endogenen Hypoxiemarker möglich zu sein, recht detailliert das Aggressionspotential maligner Tumoren charakterisieren zu können. Ähnlich wie bei den eigenen Resultaten, die im Falle

einer negativen Expression von HIF-1 α und CA IX ein 5-Jahres-Überleben von 95% bescheinigten, konnte ein derartiger Trend in einer jüngsten Veröffentlichung auch beim Cervix-Karzinom bestätigt werden. Es wurde sogar berichtet, dass bei dieser Tumorentität bei negativer Expression von HIF-1 α und dem Apoptoseinhibitor Survivin eine Überlebenschance von 100% besteht (Dellas et al. 2008).

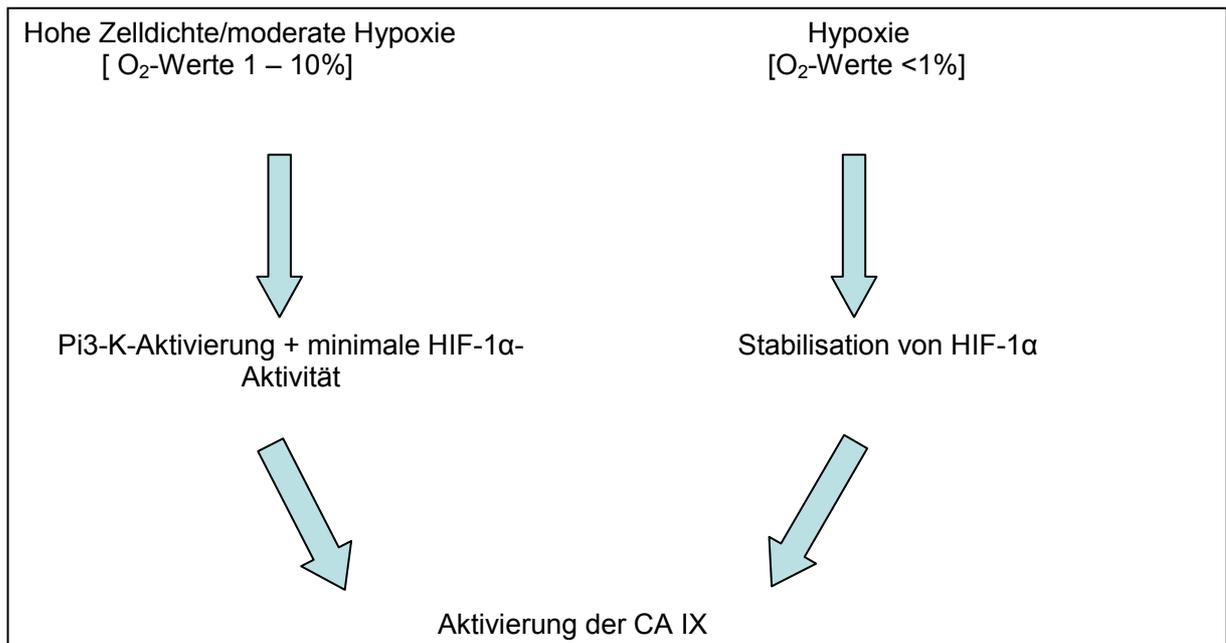


Abb. 31 Schematische Darstellung möglicher Aktivierungen der Carboanhydrase 9
 Pi3-K = Phosphatidyl-Inositol-3'-K, modifiziert nach Kaluz et al. 2002

5.4 Tumoroxygenierung und Hämoglobinkonzentrationen

Aus Sicht des Klinikers ergibt sich die logische Frage, ob Zusammenhänge zwischen der prätherapeutischen Hämoglobinkonzentration und der Oxygenierung des Tumors existieren und zu einer Prognosekalkulation herangezogen werden könnten. Die Ergebnisse hierzu sind nicht einheitlich. Am Beispiel verschiedener Tumorentitäten wie Mamma-, Zervix- und auch Kopf-Halstumoren war bei einer Zunahme des Hb-Wertes eine erhöhte Sauerstoffversorgung des jeweiligen Tumors nachweisbar. Bei anämischen Patienten verschlechterte sich infolge

der verminderten Sauerstofftransportkapazität die Tumoroxygenierung. Allerdings waren auch relativ hohe Hb-Werten mit einer Verschlechterung der Oxygenierung des Tumors verbunden. Ursächlich könnte hierfür die Perfusionsstörung aufgrund der erhöhten Viskosität und den ungünstigen rheologischen Bedingungen im „chaotischen“ Gefäßbett der jeweiligen Tumoren sein. Somit wurde von einem „optimalen“ Hb-Wert gesprochen, welcher neben einer guten Sauerstoffzufuhr auch eine hinreichende Viskosität garantiert. Dieser Hb-Wert liegt zwischen 8,07 und 9,4 mmol/l [13 – 15g/dl] (Vaupel et al. 2006). Zieht man den mittleren Hb-Wert der eigenen Patienten heran, so lag dieser mit einem Wert von 8,89 mmol/l im Bereich dieses „optimalen“ Hb-Wertes.

Anhand der eigenen aktuellen Ergebnisse konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer generellen Anämie und der endogenen Hypoxieantwort im Tumorgewebe festgestellt werden. Dies bedeutet, dass anhand der Bestimmung des präoperativen Hb-Wertes keinerlei Rückschlüsse auf das Ausmaß der Tumorphoxie gezogen werden können. Die Arbeitsgruppe um WINTER und Mitarbeiter konnte an insgesamt 151 Patienten mit einem Kopf-Hals-Malignom zeigen, dass die Expression von verschiedenen hypoxie-relevanten Proteinen wie HIF-1 α und CA IX in keiner Weise mit dem Hb-Wert korrelierte (Winter et al. 2006). Im Tierexperiment konnte zudem demonstriert werden, dass bei zunehmender Tumorgröße eine therapeutische Anpassung der Hb-Werte keinen Effekt auf die Oxygenierung im Tumor selbst hatte (Kelleher et al. 1995).

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Hämoglobinkonzentration und der endogenen Hypoxieantwort konnte lediglich an einer Population fortgeschrittener Zervixkarzinome bewiesen werden. So fand man eine inverse Korrelation zwischen dem Hb-Wert und der Expression von Survivin, einem Inhibitor der Apoptose (Bache et al. 2007). Die eigenen Untersuchungen können derartige Zusammenhänge nicht belegen. Es liegt die Vermutung nahe, dass bei fortgeschrittenen Karzinomen das Tumorleiden den Gesamtorganismus in einer Weise beeinflusst, dass die allgemeine Tumoranämie scheinbar herangezogen werden kann, um Rückschlüsse auf die hypoxische Situation zu erlangen. Im Gegensatz zu den Resultaten von BACHE und Mitarbeitern muss im Rahmen der vorliegenden Resultate aber der Schluss gezogen werden, dass die Tumorphoxie als wichtiger prognostischer Schritt bereits sehr zeitig mit der Tumorprogression realisiert wird.

5.5 Ausblick

Die Kenntnis des Hypoxiestatus beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist zur detaillierten Prognosekalkulation von wesentlicher Bedeutung. Entscheidend für die Behandlung ist eine patientenbezogene Therapie, welche neben den etablierten klinisch-pathologischen Parametern die Oxygenierung des Tumors als Entscheidungshilfe einschließt. Hypoxische Tumortypen zeigen sich resistent gegenüber einer Bestrahlung. Um die komplette Wirksamkeit entfalten zu können, ist eine Radiatio auf Sauerstoff im Tumorgewebe angewiesen. Nur dadurch können die extrem kurzlebigen freien Radikale hinsichtlich ihrer Lebenszeit verlängert werden, um schließlich irreversible Schäden an der Tumor-DNA bewirken zu können (Isa et al. 2006).

Therapeutische Ansatzmöglichkeiten zur Erhöhung der Ansprechrate bestünden im 2-Methyl-Estradiol, einem natürlichen Inhibitor von HIF. Hierbei wäre zu erwarten, dass 2-Methyl-Estradiol in Kombination mit Paclitaxel [Taxol®] eine zunehmende Rolle in der Therapie fortgeschrittener Kopf-Hals-Malignome spielen könnte, obwohl hierbei die Hemmung sehr zentral und ohne die Kalkulation eventueller Nebenwirkungen erfolgen würde (Brennan et al. 2005).

Auch die Effektivität einer möglichen chemotherapeutischen Intervention könnte unter Kenntnis der hypoxischen Situation im Tumorgewebe besser vorhergesehen werden. Zentraler Punkt ist hierbei sicher die Expression der Carboanhydrase IX, welche maßgeblich auch an der extrazellulären pH-Regulation beteiligt ist. Niedrige pH-Werte sind nicht mit zahlreichen Chemotherapie-Regimen (Cisplatin, 5-Fluorurazil) zu vereinbaren, weshalb derartige Therapieoptionen nicht erfolgreich verlaufen würden. Mit Respekt auf die durch KALUZ und Mitarbeiter gefundenen Zusammenhänge einer Aktivierung von CA IX durch den Pi-3K-Pathway könnten durch gezielte immunhistochemische Untersuchungen zusätzliche Informationen erhalten werden, ob der jeweilige Tumor das Aggressionspotential eher auf verminderten Sauerstoffpartialdruck oder den genannten Pathway zurückzuführen ist (Kaluz et al. 2002). HIF-1 α - und pVHL-positive Karzinome sind mit hoher Sicherheit durch den Pi-3K-Pathway reguliert. In diesem Zusammenhang wären Inhibitoren dieses pathobiochemischen Weges denkbar. Erste Erfolg versprechende Ansätze konnten an Zelllinien durch IWASE und Mitarbeiter gezeigt werden. Hierbei wurde im Experiment nachgewiesen, dass Inhibitoren der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase [Pi-3K-Inhibitoren] die Erfolgsrate von Cisplatin, 5-FU oder Docetaxel in der Therapie des Mundhöhlenkarzinoms steigern könnten (Iwase et al. 2007). Ein ähnlicher Einfluss konnte einem bedeutenden Regulator der Protein-Translation und Zellproliferation, bekannt als Mammalian Target of

Rapamycin [mTOR], beim Karzinom des Ösophagus bescheinigt werden. Immerhin war bei dieser Tumorentität im Rahmen einer umfassenden immunhistochemischen Analyse zur Expression von mTOR nachgewiesen worden, dass etwa ein Viertel aller Tumoren mTOR exprimierten und signifikant schlechter differenziert waren. Möglicherweise bestünde beim Mundhöhlenkarzinom neoadjuvant die Option einer erfolgreichen Blockade von mTOR (Boone et al. 2008).

Eine weitere Therapiemöglichkeit besteht in der Blockade der Glykolyse in der Tumorzelle. Erste Ansätze mit 2-Deoxy-Glukose, welche über die Glukosetransportmoleküle in die Tumorzelle gelangt, durch die Hexokinase phosphoryliert wird und schließlich den Glukosemetabolismus blockiert, sind in der klinischen Testphase (Jin et al. 2007).

Bisher hatten sich chemotherapeutische Konzepte nicht in der Weise bewährt, dass von einem Regime zur nachhaltigen Verbesserung der Gesamtüberlebensrate der Patienten und auch der Lebensqualität gesprochen werden konnte (Metelmann 2000). Möglicherweise sind durch die aktuellen Untersuchungen zum Oxygenierungsstatus des Mundhöhlenkarzinoms detailliertere Aussagen hinsichtlich eines Ansprechens chemotherapeutischer Konzepte realisierbar. Die immunhistochemische Analyse des Hypoxiegrades beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle unterstützt somit Chance für eine individualisierte Therapie. Die Patienten partizipieren in der Zukunft davon in zweifacher Hinsicht:

Erstens könnten wenig effektive Bestrahlungen vermieden werden. Sekundär chirurgische Maßnahmen hätten folglich weniger strahlenbedingte Nebenwirkungen.

Zweitens könnten Patienten dadurch noch besser hinsichtlich einer zusätzlichen Chemotherapie selektiert werden (Isa et al. 2006).

Das für die Lymphangiogenese auf molekularer Ebene essentielle Protein VEGF-C wird offenbar auch durch den Epidermal Growth Factor (EGFR) hochreguliert (O-Charoenrat et al. 2001). Hier beständen schon etablierte therapeutische Strategien in Form von sog. EGFR-Blockern wie Cetuximab[®]. Mittlerweile ist eine derartige EGFR-Blockade in der Therapie von Kopf-Hals-Malignomen etabliert, die Ergebnisse sind vielversprechend. So konnten BONNER und Mitarbeiter in einer randomisierten multizentrischen Studie am Beispiel lokal fortgeschrittener Kopf-Hals-Malignome den additiven therapeutischen Effekt des EGFR-Blockers Cetuximab[®] in Kombination mit der Bestrahlung hervorheben. Es wurde bei einer gleichzeitigen Anwendung von Cetuximab[®] plus Bestrahlung eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens von knapp 20 Monaten im Vergleich zur ausschließlichen Radiatio demonstriert (Bonner et al. 2006). Vielleicht gelingt es sogar, mit neuen „Immuntherapien“ unter Verwendung noch weiterer Antikörper gegen während der Tumorprogression

exprimierte Proteine die Strahlenbelastung einer adjuvanten Radiatio zu minimieren. Neben einem gesteigerten Effekt dieser Maßnahmen gegen die Tumorerkrankung könnte dies die Lebensqualität der Patienten steigern, zumal bis zu einem Wert von 50 Gy die strahlenbedingte Xerostomie reversibel sein kann (Siedeck et al. 2008).

Ein weiterer Aspekt für die Zukunft ist die Entwicklung einfacher Testmethoden, wie z.B. durch eine Blutuntersuchung, um sich mit minimalem Aufwand einen Überblick über die Oxygenierung im Tumor verschaffen zu können. Erfolg versprechende Ansätze wurden hierzu in Form der Serum-Laktatdehydrogenase bereits veröffentlicht. Eine mögliche Korrelation zwischen diesem Serum-Enzym und der Laktatdehydrogenase (LDH) im Tumor könnte zur Charakterisierung der Tumorphoxie herangezogen werden (Lukacova et al. 2008).

5.6 Modell zur Therapiestratifizierung beim Mundhöhlenkarzinom anhand der Expression hypoxie-relevanter Proteine

Basierend auf den breit angelegten immunhistochemischen Untersuchungen am Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle kann im Ergebnis folgende in Abb. 32 zusammengefasste Hypothese des Regulationssystems postuliert werden. Diese zeigt den komplexen Mechanismus zur Umsetzung eines erhöhten Aggressionspotentials des Tumors, welches unter hypoxischen Bedingungen, aber auch unter normalen Oxygenationsbedingungen realisiert werden kann. Während bei ersteren der verminderte Sauerstoffpartialdruck im Gewebe die auslösende Rolle spielen dürfte, wird dies bei normoxischen Bedingungen durch anderweitig vermittelte pathobiochemische Wege gesteuert, wobei jener über die Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase [PI-3K-Pathway] wahrscheinlich von wesentlicher Bedeutung ist. Daraus geht hervor, dass sich der normoxische Tumor bei einer fehlenden Expression von pVHL dem hypoxischen Muster anpasst. Mit Hilfe der hypoxie-relevanten Proteine HIF-1 α und pVHL, welche sich gegenseitig beeinflussen, aber auch unter gleichzeitiger Analyse der Expression zweier Zielproteine in Form von GLUT-1 und CA IX konnten Patientengruppen mit sehr gutem Überlebenschancen (n=12) und sehr ungünstiger Prognose (n=21) charakterisiert werden. Offensichtlich hat die erste Gruppe von Patienten, deren Tumoren keines der vier Proteine exprimiert, das geringste Aggressionspotential. Im Gegensatz dazu kann vermutlich davon ausgegangen werden, dass jene Karzinome mit einer hohen Expression dieser Proteine HIF-1 α und GLUT-1 neben dem erhöhten Aggressionspotential möglicherweise Stammzellcharakter angenommen haben (Wouters und Koritzisky 2008, Axelson et al. 2005,

Helczynska et al. 2003). Entscheidend bei dieser Aussage ist, dass zur Charakterisierung der Aggressivität des Tumors ein Protein allein nicht genügt, sondern erst die Kombination aller Protein-Expressionen zur detaillierteren Prognoseaussage führt (Abb. 33).

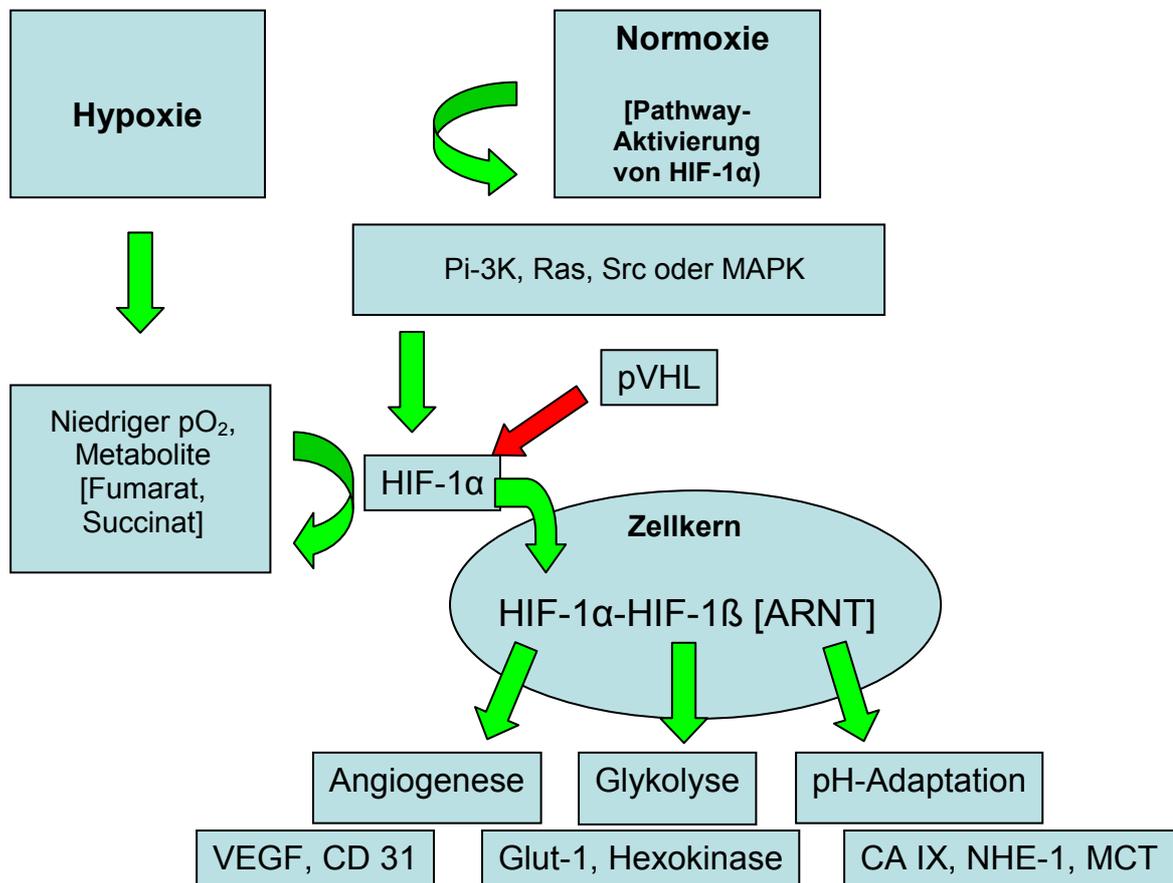


Abb. 32 Vereinfachte Darstellung eines internen Regulationssystems zur gesteigerten Aggressivität im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle
 Grüne Pfeile = Aktivierung
 Roter Pfeil = Blockade

In der multivariaten Cox's-Regressionsanalyse konnte für die prognostisch ungünstigste Gruppe ein 14,8-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens gegenüber der Population mit der besten Überlebensprognose beobachtet werden. Die vier analysierten Proteine sollten aus diesen Gründen bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Rahmen der histologischen Sicherung immunhistochemisch zwecks Stratifizierung der Therapie bestimmt werden. Selbst wenn man den pVHL- und CA IX-Expressionsstatus

unberücksichtigt lässt, verbleibt für diese Gruppe (HIF-1 α und GLUT-1 mäßig bis stark exprimiert) immer noch ein 10-fach erhöhtes Risiko des tumorbedingten Todes ($p = 0,001$). Ein auf diesen Erwägungen basierender Vorschlag zu einer individualisierten

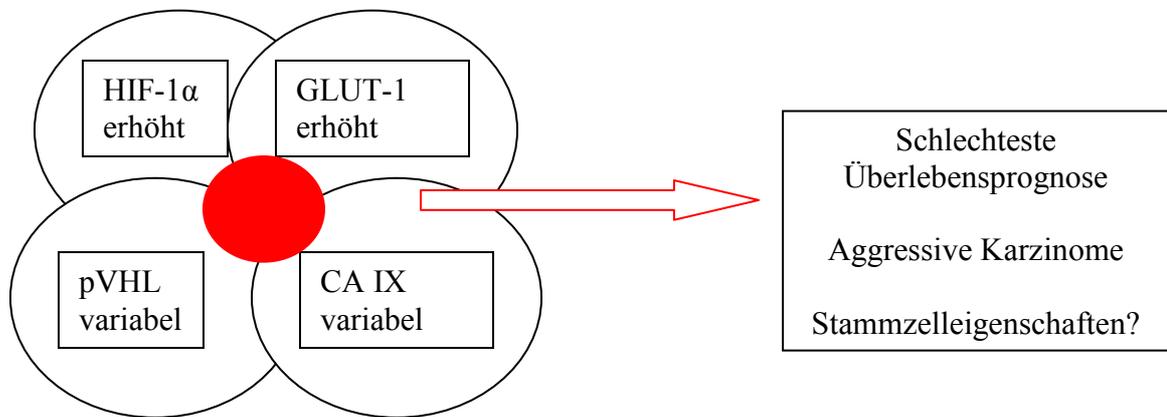


Abb. 33 Schematische Darstellung zur Kalkulation des Aggressionspotentials beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Eine gleichzeitige mäßige bis starke Expression von HIF-1 α , GLUT-1 in Verbindung mit einem negativen Expressionsmuster für pVHL und negativer oder verstärkter CA IX –Expression ist assoziiert mit einem mehr als 20-fach erhöhtem Risiko des tumorassoziierten Versterbens (rote Schnittmenge, Cox's-Regression, $p = 0,007$). Derartige Karzinome haben stammzellähnliche Eigenschaften (Axelson et al. 2005, Helczynska et al. 2003).

Therapie beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist aus Abb. 34 ersichtlich. Dieser soll einerseits der vermuteten Aggressivität des Tumors Rechnung tragen und im Sinne einer Ausschöpfung bzw. Kombination aller Optionen innerhalb der Hochrisikogruppe dienlich sein, andererseits aber eine Übertherapie zugunsten des Erhalts hoher Lebensqualität bei guter Prognose in der Population mit niedrigem Risiko vermeiden.

Diese Ergebnisse müssen im Rahmen einer prospektiven multizentrischen Studie unter Berücksichtigung ethischer Gesichtspunkte erhärtet und zum Zwecke der individualisierten Therapie interdisziplinär erörtert werden (Patient, Kieferchirurg, Strahlentherapeut und Onkologe).

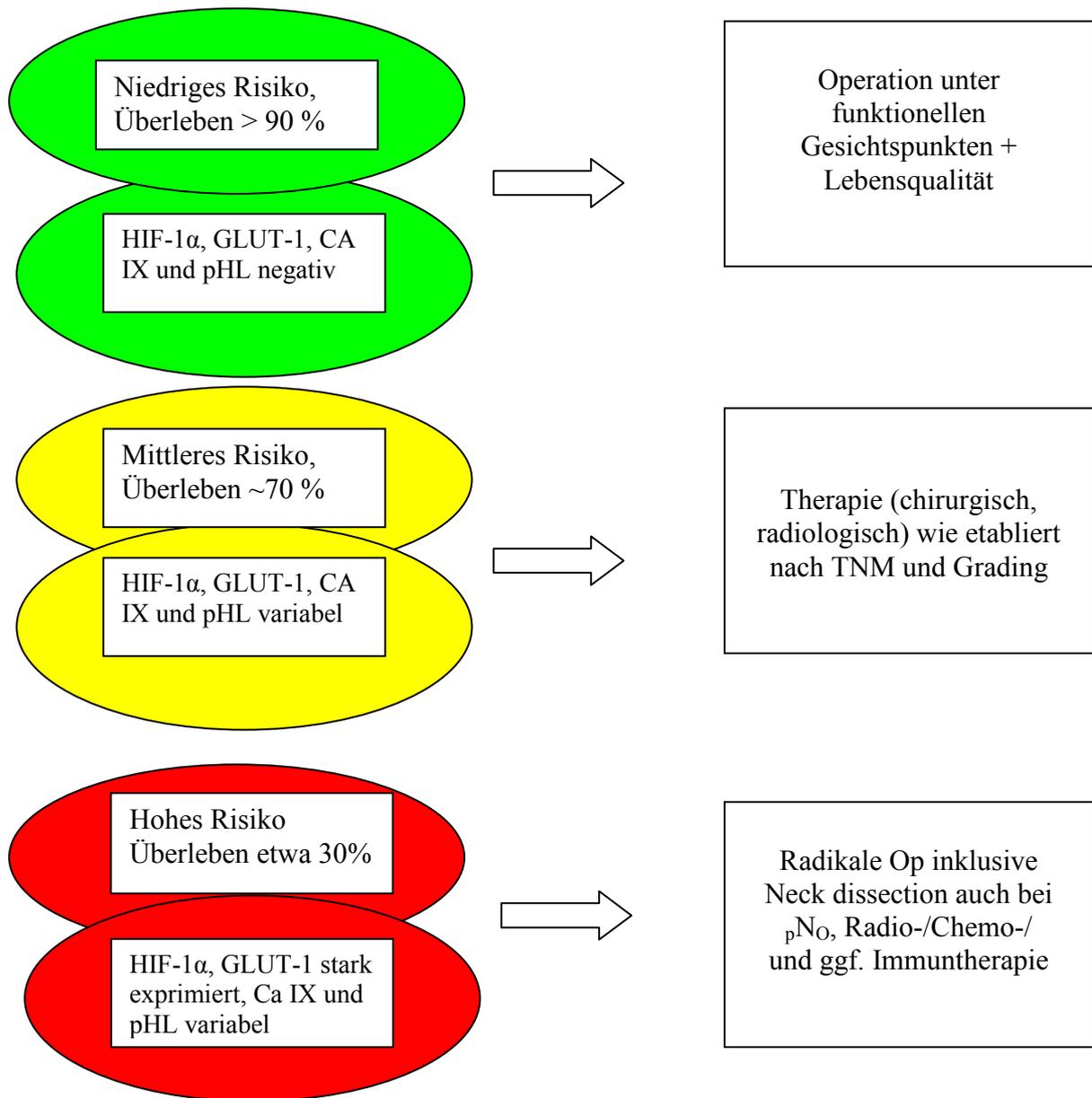


Abb. 34 Einteilung des Aggressionspotentials in drei Risikogruppen beim Mundhöhlenkarzinom und dessen Bedeutung für eine individualisierte Therapie

6 Zusammenfassung

Als eines der zehn häufigsten Malignome des Menschen bleibt die Therapie des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle eine Herausforderung. Diese Tumorentität unterliegt wie andere Tumoren komplexen Regulationsmechanismen auf molekularer Ebene, um ihr komplettes aggressives Potential zu erreichen. Ein sehr wahrscheinlicher Einflussfaktor

hoher Aggressivität ist das Auftreten der Tumorphoxie, in Folge derer eine ganze Kaskade charakteristischer Proteine exprimiert werden. Nur dadurch ist es den Tumorzellen möglich, sich an die hypoxische Umgebung zu adaptieren und schließlich ihre zellulären Prozesse und die Proliferation aufrechterhalten zu können.

In einer umfassenden Analyse wurden an den Geweben von 82 klinisch und auch histopathologisch lückenlos dokumentierten Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle immunhistochemische Untersuchungen für die hypoxie-relevanten Proteine HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, pVHL und VEGF-C durchgeführt und mit den klinischen und pathohistologischen Parametern korreliert. Dabei zeigten sich bereits in den einzelnen Betrachtungen für die Proteine HIF-1 α , GLUT-1 und pVHL ein klarer Zusammenhang zwischen deren Expression und dem Überleben der Patienten. Für das Protein VEGF-C, einem potenten Mitogen der Lymphangiogenese, fand sich in der bivariaten Analyse eine statistisch signifikante Korrelation auf die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen.

Bezüglich der Überlebensprognose zeigte sich der Einfluss der vier Proteine HIF-1 α , GLUT-1, CA IX und pVHL in der multivariaten Analyse bei gemeinsamer Expression im Tumorgewebe noch deutlicher. Anhand charakteristischer Expressionsmuster aller dieser Proteine war es möglich, drei Gruppen von Patienten mit völlig unterschiedlicher Prognose zu verifizieren. Mit mehr als 90 % 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit konnten so 12 Patienten detektiert werden, deren Prognose praktisch mit der der Normalbevölkerung vergleichbar war. Die dazu gehörigen Karzinome exprimierten keines der genannten Proteine. Im klaren Gegensatz dazu wurde eine 21 Patienten umfassende Gruppe gefunden, deren Tumoren eine mäßige bis starke Expression von HIF-1 α und GLUT-1 und eine variable Expression für CA IX und pVHL aufwiesen. Ihr Überleben war nahezu 60 % schlechter als das der Population mit der besten Prognose und immerhin noch etwa 30 % geringer als die aktuelle durchschnittliche Überlebensstatistik des Mundhöhlenkarzinoms erwarten lässt.

Es erscheint deshalb mehr als sinnvoll, bereits zum Zeitpunkt der Diagnosesicherung durch Probeexzision diese kostengünstigen Parameter mitzubestimmen. In der Zusammenschau mit den bekannten klinischen Prognoseparametern wird es dann möglich sein, den Patienten eine individualisierte Therapie ihres Tumorleidens unter der Prämisse „soviel (radikal) wie nötig, so wenig wie möglich“ anzubieten. Dadurch ist es möglich, der Lebensqualität als einem wesentlichen Parameter der Tumorthherapie für den Patienten, erhebliche Bedeutung zukommen zu lassen. Eine solche Therapiestratifizierung würde erlauben, einen Großteil von Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen wesentlich schonender bei gleich guter Überlebensprognose behandeln zu können.

7 Literatur

1. Abu-Jawdeh GM, Faix JD, Niloff J, Tognazzi K, Manseau E, Dvorak HF, Brown LF: Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. *Lab Invest* 74 (1996) 1105 – 1115
2. Acker T, Plate KH: Role of hypoxia in tumor angiogenesis – molecular and cellular angiogenic crosstalk. *Cell Tissue Res* 314 (2003) 145 - 155
3. Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, Harris AI, Davidson SE, Hunter RD, West CM, Stratford IJ: GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding. *Int J Cancer* 10 (2003) 85 - 91
4. Alitalo K, Carmeliet P: Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 1 (2002) 219 – 227
5. Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pahlman S: Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells – a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol* 16 (2005) 554 - 563
6. Baer S, Casaubon L, Schwartz MR, Marcogliese A, Younes M: Glut3 expression in biopsy specimens of laryngeal carcinoma is associated with poor survival. *Laryngoscope*, 112 (2002) 393 – 396
7. Bache M, Kappler M, Said HM, Staab A, Vordermark D: Detection and specific targeting of hypoxic regions within solid tumors: current preclinical and clinical strategies. *Curr Med Chem* 15 (2008) 322 - 338
8. Bache M, Holzapfel D, Kappler M, Holzhausen H-J, Taubert H, Dunst J, Hänsgen G: Survivin protein expression and hypoxia in advanced cervical carcinoma of patients treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol* 104 (2007) 139 – 144
9. Bache M, Reddemann R, Said HM, Holzhausen H-J, Taubert H, Becker A, Kuhnt T, Hänsgen G, Dunst J, Vordermark D: Immunohistochemical detection of osteopontin in advanced head-and-neck cancer: prognostic role and correlation with oxygen electrode measurements, hypoxia-inducible-factor-1 α -related markers, and hemoglobin levels. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 66 (2006) 1481 - 1487
10. Bancar-Todesca D, Obermair A, Bilgi S, Kohlberger P, Kainz C, Breitenacker G, Leodolter S, Gitsch G: Angiogenesis in vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 64 (1997) 496 – 500

11. Beasley NJP, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, Millard P, Fuggle S, Harris AL: Hypoxia-inducible Factors HIF-1 α and HIF-2 α in Head and Neck Cancer: Relationship to Tumor Biology and Treatment Outcome in Surgically Resected Patients. *Cancer Res* 62 (2002) 2493 - 2497
12. Beasley NJP, Wykoff CC, Watson PH, Leek R, Turley H, Gatter K, Pastorek J, Cox CJ, Ratcliffe P, Harris AL: Carbonic Anhydrase IX, an Endogenous Hypoxia Marker, Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and its Relationship to Hypoxia, Necrosis and Microvessel Density. *Cancer Res* (2001) 61: 5262 – 5267
13. Becker A, Stadler P, Lavey RS, Hänsgen G, Kuhnt T, Lautenschläger C, Feldmann HJ, Molls M, Dunst J: Severe Anemia is associated with poor tumor oxygenation in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* (2000) 46: 459 - 466
14. Bilkay U, Kerem H, Ozek C, Gundogan H, Guner U, Gurler T, Akin Y: Management of lower lip cancer: a retrospective analysis of 118 patients and review of the literature. *Ann Plast Surg* 50, 1 (2003) 43-50
15. Bisoffi M, Heaphy CM, Griffith JK: Telomeres: Prognostic markers for solid tumors. *Int J Cancer* 119, 10 (2006) 2255-2260
16. Blancher C, Moore JW, Robertson N, Harris AL: Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α , HIF-2 α , and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res* 61 (2001) 7349 – 7355
17. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselaqa J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK: Radiotherapy plus cetuximab for squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354 (2006) 567 – 678
18. Boone J, Ten Kate FJ, Offerhaus GJ, van Diest PJ, Rinkes ICH, van Hillegersberg R: mTOR in squamous cell carcinoma of the oesophagus: a potential target for molecular therapy? *J Clin Pathol* 61 (2008) 909 - 913
19. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, Correo R, Eby YJ, Ruppert JM, Sidransky D: The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 19 (1993) 4477 – 4480

20. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J: The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer* 93 (2006) E 73 - 80
21. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J: Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 581 (2007) 3582 – 3591
22. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, Genden E, Urken ML, Wang BY: Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol* 29 (2005) 167 - 178
23. Brennan PA, Mackenzie N, Quintero M: Hypoxia-inducible factor 1 α in oral cancer. *J Oral Pathol Med* 34 (2005) 385 - 389
24. Brenner H, Stegmaier C, Ziegler H: Verbesserte Langzeitüberlebensraten von Krebspatienten. *Dtsch Arztebl* 102, Ausgabe 39 (2005) A2628-2633
25. Brizel DM, Dodge RK, Clough RW, Dewhirst MW: Oxygenation of head and neck cancer; changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol* 53 (1999) 113 – 117
26. Brown RS, Wahl RL: Overexpression of Glut-1 Glucose Transporter in Human Breast Cancer. An Immunohistochemical Study. *Cancer* 72 (1993) 2979 - 2985
27. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ: Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 26 (1995) 86 - 91
28. Brugere J, Gruenel P, Leclerc P, Rodriguez J: Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth. *Cancer* 57 (1986) 351-400
29. Burstein DE, Nagi C, Kohtz DS, Lumerman H, Wang BY: Immunohistochemical detection of GLUT-1, p63 and phosphorylated histone H1 in head and neck squamous intraepithelial neoplasia: evidence for aberrations in hypoxia-related, cell cycle- and stem-cell-regulatory pathways. *Histopathology* 48 (2006) 708-716
30. Bussink J, Kaanders JHAM, van der Kogel AJ: Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol* 67 (2003) 3-
31. Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ: The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchangers in metastasis. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 786 - 795

32. Carlile J, Harada K, Baillie R, Macluskey M, Chisholm DM, Ogden GR, Schor SL, Schor AM: Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumor progression and field cancerisation. *J Oral Pathol Med* 30 (2001) 449 - 457
33. Chen YK, Huang HC, Lin LM, Lin CC: Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern taiwan. *Oral Oncol* 35 (1999) 173 - 179
34. Chen J, Wen Y, Li L, Wang C: Expression of vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 19 (2001) 303 – 305
35. Cicco de RL, Watson JC, Bassi DE, Litwin S, Klein-Szanto AJ: Simultaneous Expression of Furin and Vascular Endothelial Growth Factor in Human Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma Progression. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 4480 – 4488
36. Cheng GZ, Zhang W, Wang L-H: Regulation of Cancer Cell Survival, Migration, and Invasion by Twist: AKT2 Comes to Interplay. *Cancer Res* 68 (2008), 957 - 960
37. Chidzonga MM: Oral malignant neoplasia: A survey of 428 cases in two Zimbabwean hospitals. *Oral Oncol* 42 (2006)177 -183
38. Chiesa F, Mauri S, Tradati N, Calabrese L, Giugliano G, Ansarin M, Anderle J, Zurrida S, Orecchia R, Scully C: Surfing prognostic factors in head and neck cancer at the Millennium. *Oral Oncol* 35 (1999) 590 - 596
39. Chloherly EK, Hamill S, Levine K, Carruthers A: Sugar Transporter Regulation by ATP and Quaternary Structur. *Blood Cell Mol Dis* 27 (2001) 102 - 107
40. Choi K-K, Kim M-J, Yun P-Y, Lee J-H, Moon H-S, Lee T-R, Myoung H: Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. *Oral Oncol* (2006) 42: 208 - 217
41. Cohen NA, Lai SY, Ziober AF, Ziober BL: Dysregulation of Hypoxia inducible Factor 1 α in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines Correlates With Invasive Potential. *Laryngoscope* 114 (2004) 418 - 423
42. Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya KAAS, Ogden G, Macpherson LMD: Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom 1990-1999 – recent trends an regional variation. *Oral Oncol* 42, 6 (2006) 586-592

43. Cooper R, Sarioglu S, Sokmen S, Fuzun M, Kupelioglu A, Valentine H, Gorken IB, Airley R, West C: Glucose transporter-1 (Glut-1): a potential marker of prognosis in rectal carcinoma? *Br J Cancer* 89 (2003) 870-876
44. Dang CV, Semenza GL: Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 24 (1999) 68 - 72
45. De Cassia Braga Ribeiro K, Kowalski LP, Latorre Mdo R: Perioperative complications, comorbidities and survival in oral or oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129, 2 (2003) 219-228
46. Dellas K, Bache M, Pigorsch SU, Taubert H, Kappler M, Holzapfel D, Zorn E, Holzhausen H-J, Hänsgen G: Prognostic Impact of HIF-1 α Expression in Patients with Definitive Radiotherapy for Cervical Cancer. *Strahlenther Onkol* 184 (2008) 169 - 174
47. De Schutter H, Landuyt W, Verbeken E, Goethals L, Hermans R, Nuyts S: The prognostic value of the hypoxia markers CA IX, and GLUT-1 and the cytokines VEGF and IL6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy +/- chemotherapy. *BMC Cancer* 5 (2005) 42
48. De Vicente JC, Reico OR, Pendas SL, Lopez-Arranz JS: Oral squamous cell carcinoma of the mandibular region: A survival study. *Head Neck* 23 (2001) 536 – 543
49. Dietz A, Rudat V, Vanselow B, Conradt C, Möhler T: Prognostische Bedeutung von bFGF, VEGF und MMP-2 im Serum von Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren: *HNO* 47 (1999) 695 - 701
50. Denko NC: Hypoxia, HIF 1 and glucose metabolism in the solid tumor: *Nature Rev Cancer* 8 (2008) 705 - 713
51. Driessen A, Landuyt W, Pastorekova S, Moons J, Goethals L, Haustermans K, Naftoux P, Penninckx F, Geboes K, Lerut T, Ectors N: Expression of carbonic anhydrase (CA IX), a hypoxia-related protein, rather than vascular-endothelial growth factor (VEGF), a pro-angiogenic factor, correlates with an extremely poor prognosis in esophageal and gastric adenocarcinomas. *Ann Surg* 243 (2006) 334 - 340
52. Eckardt A: Neue Studien zum Mundhöhlenkarzinom – Therapiekonzepte oder Prognosefaktoren? *Mund Kiefer Gesichtschir* 5 (2001) 323-325

53. Effert P, Beniers AJ, Tamimi Y, Handt S, Jakse G: Expression of glucose transporter 1 (Glut-1) in cell lines and clinical specimens from humane prostate adenocarcinoma. *Anticancer Res* 24 (2004) 3057-3063
54. Eriksen JG, Overgaard J: Lack of prognostic and predictive value of CA IX in radiotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck with known modifiable hypoxia: an evaluation of the DAHANCA 5 study. *Radiother Oncol* 83 (2007) 383 -388
55. Faustino SES, Oliveira DT, Nonogaki S, Landman G, Carvalho AI, Kowalski LP: Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37 (2008) 372 – 378
56. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med* 9 (2003) 669 - 676
57. Fiedler W, Gehling U, Mende T, Hossfeld DK: Neoangiogenese und Tumorstadium. *Dt Arztebl* 98 (2001) A 1392 - 1394
58. Fillies T, Werkmeister R, van Diest PJ, Brandt B, Joos U, Burger H: HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer* 5 (2005) 84
59. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hutter VP, Kennedy BJ, Murphy GP, O'Sullivan B, Sobin LH: *AJCC Cancer Staging Manual*. (1997)
60. Folkman J: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29 [Suppl 16] (2002) 15 - 18
61. Fox S: Tumour angiogenesis and prognosis. *Histopathology* 30 (1997) 294 – 301
62. Freier K, Engel M, Lindel K, Flechtenmacher C, Mühling J, Hassfeld S, Hofele C: Neoadjuvant concurrent radiochemotherapy followed by surgery in advanced oral squamous cell carcinoma (OSCC): a retrospective analysis of 207 patients. *Oral Oncol* 44 (2008) 116 – 123
63. Frew IJ, Krek W: pVHL: A Multipurpose Adaptor Protein. *Sci Signal* 1 (2008) 30
64. Fröhlich M, Bernstein P, Metelmann HR, Mohner M: Zur Epidemiologie der Lippen- und Mundhöhlenkarzinome. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* 37 (1992) 1-3

65. Fukuzumi M, Hamakawa H, Onishi A, Sumida T, Tanioka H: Gene expression of GLUT isoforms and VHL in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 161 (2000) 133 - 140
66. Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, Zhen WK, Trask DK, Hoffmann HT: Presentation, treatment and outcome of oral cavity cancer: a National Cancer Data Base report. *Head Neck* 24, 2 (2002) 165-180
67. Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, Coia LR, Moldofsky PJ, Hartz WH, Broder GJ: Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14 (1988) 831 – 838
68. Gatenby RA, Gillies RJ: Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 891 - 899
69. Garavello W, Spreafico R, Gaini RM: Oral tongue cancer in young patients A matched analysis. *Oral Oncol* 43 (2997) 894 - 897
70. Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD, Gluckman JL: Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinico-pathologic correlation. *Head Neck* 19 (1997) 276 - 280
71. Harris AL: Hypoxia – a key regulatory Factor in tumor growth. *Nature Rev Cancer* 2 (2002) 38 - 47
72. Hasina R, Lingen MW: Angiogenesis in oral cancer. *J Dent Educ* 65 (2001) 1282 – 1290
73. Hausamen JE: Onkologie: Tumorchirurgie. *Mund Kiefer GesichtsChir* 4 (2000) S 142 – S 154
74. Helczynska K, Kronblad A, Jögi A, Nilsson E, Beckman S, Landberg G, Pahlman S: Hypoxia Promotes a Dedifferentiated Phenotype in Ductal Breast Carcinoma in Situ. *Cancer Res* 63 (2003) 1441 - 1444
75. Hemprich A, Müller R: Long-term results in treating squamous cell carcinoma of the lip, oral cavity and oropharynx. *Int J Oral Maxillofac Surg* 18 (1989) 39-42
76. Herold-Mende C, Andl T, Laemmler F, Reißer C, Mueller MM: Funktionelle Expression des VEGF-Rezeptors Flt-1 auf Plattenepithelkarzinomzellen. *HNO* 47 (1999) 706-711

77. Hicks LW, Loree TR, Garcia RI, Maamoun S, Marshall D, Orner JB, Bakamjian VY, Shedd DP: Squamous cell carcinoma of the floor of the mouth: a 20-year review. *Head Neck* 19 (1997) 400 – 405
78. Höckel M, Vaupel P: Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol* 28 [suppl 8] (2001) 36 - 41
79. Hoogsteen IJ, Marres HAM, Wijffels KIEM, Rijken PFJW, Peters JPW, van der Hoogen FJA, Oosterwijk E, van der Kogel A, Kaanders JHAM: Colonization of Carbonic Anhydrase and Cell Proliferation in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 97 – 106
80. Howaldt, HP, Reicherts M, Blecher C: Mundhöhlenkarzinom. *Onkologe* 6 (2000) 573 - 583
81. Huang LE, Bunn HF: Hypoxia-inducible Factor and Its Biomedical Relevance. *J Biol Chem* 278 (2003) 19575 - 19578
82. Hussain SA, Ganesan R, Reynolds G, Gross L, Stevens A, Pastorek J, Murray PG, Perunovic B, Anwar MS, Billingham L, James ND, Spoorer D, Poole CJ, Rea DW, Palmer DH: Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. *Br J Cancer* 15 (2007) 104 - 109
83. Hyckel P, Hoyer H, Epstude J, Mueller P, Schumann D, Müller EI, Magdefessel U: Überprüfung der prognostischen Wertigkeit biologischer Parameter anhand der entscheidenden prognoserelevanten Faktoren des TPI am Krankengut der Jenaer Klinik in den Jahren 1968 bis 1991. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 80, 7-8 (1992) 399-403
84. Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG: pVHL₁₉ is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 11661 - 11666
85. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Goldberg MA: Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 10595 - 10599
86. Inagi K, Takahashi H, Okamoto M, Nakayama M, Makoshi T, Nagai H: Treatment Effects in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Acta Otolaryngol Suppl* 547 (2001) 25 – 29

87. Isa AY, Ward TH, West CML, Slevin NJ, Homer JJ: Hypoxia in head and neck cancer. *Br J Radiol* 79 (2006) 791 - 798
88. Ito H, Duxbury M, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE: Glucose transporter-1 gene expression is associated with pancreatic cancer invasiveness and MMP-2 activity. *Surgery* 136 (2004) 548-556
89. Iwase M, Yoshida S, Uchida M, Takaoka S, Kurihara Y, Ito D, Hatori M, Shintani S: Enhanced susceptibility to apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells subjected to combined therapy with anticancer drugs and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Int J Oncol* 31 (2007) 1141 - 1147
90. Janssen HL, Haustermans KM, Balm AJ, Begg AC: Hypoxia in head and neck cancer: how much, how important? *Head Neck* (2005) 27 622 - 638
91. Jin S, DiPaola RS, Mathew R, White E: Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci* 120 (2007) 379 - 383
92. Joost HG, Thorens B: The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* (2001), 18: 247 – 256
93. Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schürmann A, Seino S, Thorens B: Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2002) 282: 974 – 976
94. Kaanders JHAN, Wijffels KIEM, Marres HAM, Ljungkvist ASE, Pop LAM, van der Hoogen FJA, de Wilde PCM, Bussink J, Raleigh JA, van der Kogel AJ: Pimonidazole Binding and Tumor Vascularity Predict for Treatment Outcome in Head and Neck Cancer. *V Cancer Res* 62 (2002) 7066 – 7074
95. Kaelin WR jr: The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: O₂-sensing and cancer. *Nature Rev Cancer* 8 (2008) 865 - 873
96. Kainins IK, Leonard AG, Sako K, Razack MS, Shedd DP: Correlation between Prognosis and Degree of Lymph Node Involvement in Carcinoma of the Oral Cavity. *Am J Surg* 134 (1977) 450 – 454
97. Kaluz S, Kaluzova M, Chrastina A, Olive PL, Pastoreková S, Pastorek J, Lerman MI, Stanbridge EJ: Lowered Oxygen Tension Induces Expression of the Hypoxia Marker MN/Carbonic Anhydrase IX in the Absence of Hypoxia-inducible Factor 1 α Stabilization: A Role for Phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Cancer Res* 62 (2002) 4469 – 4477

98. Kaplan E, Meier P: Non parametric estimation from incomplete observation. *J Am Statist Assoc* 53 (1958) 457
99. Kappler M, Taubert H, Holzhausen H-J, Reddemann R, Rot S, Becker A, Kuhnt T, Dellas K, Dunst J, Vordermark D, Hänsgen G, Bache M: Immunohistochemical Detection of HIF-1 α and CA IX in Advanced Head-and-Neck Cancer. *Strahlenther Onkol* 184 (2008) 393 - 398
100. Kato H, Takita J, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Masuda N, Fukuchi M, Manda R, Ojima H, Tsukada K, Kuwano H: Glut-1 Glucose transporter expression in esophageal squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness. *Anticancer Res* 22 (2002) 2635-2639
101. Kasahara M, Hinkle PC: Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem* 252 (1977) 7384-7390
102. Kelleher DK, Matthiensen U, Thews O, Vaupel P: Tumor Oxygenation in Anemic Rats: Effects of Erythropoietin Treatment Versus Red Blood Cell Transfusion. *Acta Oncol* 34 (1995) 379 - 384
103. Keski-Santti H, Atula T, Tikka J, Hollmen J, Makitie AA, Leivo I: Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol* 43 (2007) 1007 - 1013
104. Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, Matsutani N, Yasui W, Chayama K : Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 93 (2001) 662 - 666
105. Kim J-W, Gao P, Dang CH: Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastas Rev* (2007) 26 291 - 298
106. Kim SJ, Rabbani ZN, Dewhirst MW, Vujaskovic Z, Vollmer RT, Schreiber E-G, Oosterwijk E, Kelley MJ: Expression of HIF-1 α , CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 49 (2005) 325 - 335
107. Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Tsukamoto G, Matsumura T: Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 39 (2003) 391 -396
108. Kivela AJ, Parkkila S, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivela J, Parkkila AK, Bartosova M, Mucha V, Novak M, Waheed A, Sly WS, Rajeniemi H, Pastorekova S,

- Pastorek J: Expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor and tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII in normal and neoplastic colorectal mucosa. *World J Gastroenterol* 11 (2005) 2616 - 2625
109. Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG: Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 1 (2002) 237 - 246
 110. Konno H, Ishii G, Nagai K, Yoshida J, Nishimura M, Nara M, Fujii T, Murata Y, Miyamoto H, Ochiai A: Carbonic anhydrase IX expression is associated with tumor progression and poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* (2006) 54: 409 – 418
 111. Koukourakis MI, Bentzen SM, Giatromanolaki A, Wilson GD, Daley FM, Saunders MI, Dische S, Sivridis E, Harris AL: Endogenous Markers of Two Separate Hypoxia Response Pathways (hypoxia inducible factor 2 alpha and carbonic anhydrase 9) Are Associated With Radiotherapy Failure in Head and Neck Cancer Patients Recruited in the CHART Randomized Trial. *J Clin Oncol* (2006) 24: 727 – 735
 112. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, Gatter K, Harris AL: Hypoxia-Inducible Factor (HIF1A and HIF2A), Angiogenesis and Chemoradiotherapy Outcome of Squamous Cell Head-and-Neck Cancer. *Head Neck* 53 (2002) 1192 - 1202
 113. Krieg M, Haas R, Brauch H, Acker T, Flamme I, Plate KH: Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-1 α 2 under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* 19 (2000) 5435 – 5443
 114. Kuhnt T: Optimierung der Strahlentherapie von Tumoren im Kopf-Hals Bereich: Biologische und technische Entwicklungen. Habilitationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Med. Fak. 2007
 115. Kuhnt T, Mueller AC, Pelz T, Haensgen G, Bloching M, Koesling S, Schubert J, Dunst J: Impact of tumor control and presence of visible necrosis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy or radiochemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 131,11 (2005) 758-764
 116. Kunkel M, Forster GJ, Reichert TE, Kutzner J, Benz P, Bartenstein P, Wagner W: Radiation response non-invasively imaged by [18F]FDG-PET predicts local tumor

- control and survival in advanced oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 39 (2003a) 170 – 177
117. Kunkel M, Morgel M, Stockinger M, Jeong J-H, Fritz G, Lehr H-A, Whiteside TL: Overexpression of GLUT-1 is associated with resistance to radiotherapy and adverse prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol* (2007) 43 796 – 803
 118. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L: Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260 (1993) 1317 - 1320
 119. Lautner MHW: Rolle des Tumorphoxiemarkers Glut-1 in Ergänzung zu klinischen Parametern für prognostische Aussagen beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Med. Fak. 2007
 120. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E: Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 33 (1997) 302 – 312
 121. Lemaire F, Millon R, Young J, Cromer A, Wasylyk C, Schultz I, Muller D, Marchal P, Zhao C, Melle D, Bracco L, Abecasis J, Wasylyk B: Differential expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Br J Cancer* (2003) 89: 19430 – 1949
 122. Li S-H, Guo W, Ren G-X, Huang G, Chen T, Song S-L: Expression of Glut-1 in primary and recurrent head and neck squamous cell carcinomas, and compared with 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose accumulation in positron emission tomography. *Br J Oral Maxillofac Surg* 46 (2008) 180 - 186
 123. Li XG, Li NY, Liu TS, Zhang SY, Wang YX : Significance of VEGF expression and microvessel count in oral carcinoma. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 12 (2003) 123 - 126
 124. Liao D, Johnson RS: Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* (2007) 26 281 – 290
 125. Lin P-Y, Yu C-H, Wang J-T, Chen H-H, Cheng S-J, Kuo M Y-P, Chiang C-P: Expression of hypoxia-inducible factor 1 α is significantly associated with the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 37 (2008) 18 – 25
 126. Lin F, Shi J, Liu H, Zhang J, Zhang PL, Wang HL, Yang XJ, Schuerch C: Immunohistochemical detection of the von Hippel-Lindau gene product (pVHL) in

- human tissues and tumors: a useful marker for metastatic renal carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary and uterus. *Am J Clin Pathol* 129 (2008) 592 - 605
127. Lindskog S: Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharmacol Ther* (1997) 74 1 - 20
128. Lippmann SM, Spitz M, Trizna Z, Benner SE, Hong WK: Epidemiology, biology and chemoprevention of aerodigestive cancer. *Cancer* 74 [Suppl 9] (1994) 2719-2725
129. Ljungkvist AS, Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ: Dynamics of tumor hypoxia measured with bioreductive hypoxic cell markers. *Radiat Res* 167 (2007) 127 – 145
130. Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RC: Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg* 61 (2003) 751 – 758
131. Lordick F, Krauß J, Jäger D: Tumormarker und Biomarker bei Kopf-Hals-Tumoren. *HNO* 56 (2008) 881 - 885
132. Lothaire P, Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, Castro G, Awada A: Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: Promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck* 28, 3 (2006) 256-269
133. Lukakova S, Sørensen BS, Alsner J, Overgaard J, Horsman MR: The impact of hypoxia on the activity of lactate dehydrogenase in two different pre-clinical tumor models. *Acta Oncol* 47 (2008) 941 – 947
134. Luu VD, Fischer B, von Teichmann A, Boysen G, Mertz K, Zimmermann P, Moch H, Schraml P: Von-Hippel-Lindau-Gen-Mutationstypen. *Pathologie* 2008, im Druck
135. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, Jikko A, Furukawa S, Ishada T, Fuchihata H: Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumor progression and p53 gene status. *J Clin Pathol* 51 (1998) 771- 775
136. Martin-Granizo R, Roudriguez-Campo F, Naval L, Diaz Gonzalez FJ: Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients younger than 40 years. *Otolaryngol Head Neck Surg* 117 (1997) 268-275

137. Massano J, Regeteiro FS, Januário G, Ferreira A: Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102 (2006) 67 - 76
138. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G-W, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ: The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399 (1999) 271 – 275
139. Mellanen P, Minn H, Grénman R, Härkönen P: Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. *Int J Cancer* 56 (1994) 622 - 629
140. Metelmann HR: Onkologie: Chemotherapie und Radiochemotherapie bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. *Mund Kiefer GesichtsChir* 4 (2000) 155 – 159
141. Min J-U, Yang H, Ivan M, Gerler F, Kaelin jr. WGK, Pavletich NP: Structure of an HIF-1 α -pVHL Complex: Hydroxyproline Recognition in Signaling. *Science* 296 (2002) 1886 - 1889
142. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Misawa K, Araki K, Misawa Y, Ueda Y: Prognostic value of Glucose transporter 1 expression in patients with hypopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res* 22 (2002) 3489-3494
143. Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW: Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastas Rev* 26 (2007) 241 - 248
144. Mohamed KM, Le A, Duong H, Wu Y, Zhang Q, Messadi DV: Correlation between VEGF and HIF-1 α expression in human squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 76 (2004) 143 – 152
145. Mottram JA: A factor of importance in the radio sensitivity of tumours. *Br J Radiol* 9 (1936) 606 - 664
146. Moulder JE, Rockwell S: Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 5 (1987) 313 – 341
147. Mukhopadhyay D, Knebelmann B, Cohen HT, Ananth S, Sukhatme VP: The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene Product Interacts with Sp1 To Repress Vascular Endothelial Growth Factor Promotor Activity. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 5629 – 5639

148. Müller W, Schneider J, Bleckmann I: Untersuchungen zur Prognoserelevanz klinischer und pathohistologischer Parameter oraler Plattenepithelkarzinome. *Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir* 16 (1992) 86 - 88
149. Munoz-Guerra MF, Marazuela EG, Martin-Villar E, Quintanilla M, Gamallo C: Prognostic Significance of Intratumoral Lymphangiogenesis in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Cancer* 100 (2004) 553 - 560
150. Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A, Fischer MB, Steiner GE, Hollemann D, Gedlicka C, Saaristo A, Burian M: Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck* 25 (2003) 464 - 474
151. Niemela AM, Hynninen P, Mecklin JP, Kuopio T, Kokko A, Aaltonen L, Parkkila AK, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Ornoft TF, Kruhoffer M, Haapasalo H, Parkkila S, Kivela AJ: Carbonic Anhydrase IX is Highly Expressed in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 16 (2007) 1760 - 1766
152. Nógrádi A: The Role of Carbonic Anhydrases in Tumors. *Am J Pathol* 153 (1998) 1 -4
153. Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J: Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 41 (1996) 31 - 39
154. Nyhan MJ, O'Sullivan GC, McKenna SL: Role of the VHL (von Hippel-Lindau) gene in renal cancer: a multifunctional tumor suppressor. *Biochem Soc Trans* 36 (2008) 472 - 478
155. O-Charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Family Members in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Correlates with Lymph Node Metastasis. *Cancer* 92 (2001) 556 – 568
156. Odenwald A: Computergestützte individuelle Prognosestellung (CIP). Vergleich der vom CIP geschätzten 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit mit der tatsächlichen Überlebensdauer bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Med. Fak. 2007

157. Okada Y, Mataga I, Katagiri M, Ishii K: An analysis of cervical lymph nodes metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32 (2003) 284 – 288
158. Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Costa JP, Simones AL, Matteo MA, Zucoloto S: Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008, im Druck
159. Oliver RJ, Dearing J, Hindle I: Oral cancer in young adults: report of three cases and review of the literature. *Br Dent J* 188, 7 (2000) 362-365
160. Ordnung R, Reuther J, Weber W, Michel C: Beobachtungen zum Überleben von Patienten mit Mundhöhlenkarzinom in Abhängigkeit von Alter und Begleiterkrankungen. *Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie, Band XXXVII* (1992) 59-63
161. Ozcan A, Deveci MS, Oztas E, Dede M, Yenen MC, Korgun ET, Gunhan O: Prognostic value of Glut-1 expression in ovarian surface epithelial tumors: a morphometric study. *Anal Quant Cytol Histol* 27 (2005) 181-186
162. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94 (2001) 153 - 156
163. Palit V, Phillips RM, Puri R, Shah T, Bibby MC: Expression of HIF-1 alpha and GLUT-1 in human bladder cancer. *Oncol Rep* 14 (2005) 909 – 913
164. Pedersen MW, Holm S, Lund EL, Hojgaard L, Kristjansen PE: Coregulation of glucose uptake and vascular endothelial growth factor (VEGF) in two small-cell lung cancer (SCLC) sublines in vivo and in vitro. *Neoplasia* 3 (2001) 80 - 87
165. Pepper MS: Lymphangiogenesis and Tumor Metastasis: Myth or Reality? *Clin Cancer Res* 7 (2001) 462 - 468
166. Platz H, Fries R, Hudec M: Computergestützte individuelle Prognosestellung (CIP) bei Plattenepithelkarzinomen der Lippe, der Mundhöhle und des Oropharynx. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 16 (1992) 248 – 254
167. Platz H, Fries R, Hudec M, DÖSAK: Computergestützte individuelle Prognosestellung (CIP) bei Plattenepithelkarzinomen der Lippe, der Mundhöhle und des Oropharynx. Originalarbeit Linz und Wien, 1992

168. Popovtzer A, Shpitzer T, Bahar G, Marshak G, Ulanovski D, Feinmesser R: Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients. *Laryngoscope* 114, 5 (2004) 915-917
169. Pufe T, Harde V, Petersen W, Goldring MB, Tillmann B, Mentlein R: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces matrix metalloproteinase expression in immortalized chondrocytes. *J Pathol* 202 (2004) 367 – 374
170. Pugh CW, Ratcliffe PJ: Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine* 9 (2003) 677 - 684
171. Rankin EB, Giaccia AJ: The role of hypoxie-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 15 (2008) 678 - 685
172. Reißer C, Eichhorn K, Mende CH: Glukoseaufnahme maligner Kopf-Hals-Tumoren. *HNO Band* 47 (1999a) 712-717
173. Reißer C, Eichhorn K, Herold-Mende C, Born A, Bannasch P: Expression of facilitative glucose transport proteins during development of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 80 (1999b) 194 - 198
174. Remmele W, Stegner HE: Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe* 3 (1987) 138 - 140
175. Ribeiro KC, Kowalski LP, Latorre MR: Impact of comorbidity, symptoms and patients characteristics on the prognosis of oral carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126, 9 (2000) 1079-1085
176. Sandlund J, Oosterwijk E, Grankvist K, Oosterwijk-Wakka J, Ljungberg B, Rasmuson T: Prognostic impact of carbonic anhydrase IX expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int* 1000 (2007) 556 – 560
177. Sargeran K, Murtomaa H, Safavi SMR, Vehkalathi MM, Teronen O: Survival after diagnosis of cancer of the oral cavity. *Br J Oral Maxillofac Surg* 46 (2008) 187 – 191
178. Sasabe E, Zhou X, Li D, Oku N, Yamamoto T, Osaki T: The involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha in the susceptibilty to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 120 (2007) 268 – 277

179. Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Klein-Szanto A, Litwin S, Herlyn M: Vascular Endothelial Growth Factor is a Marker of Tumor Invasion and Metastasis in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 775 - 782
180. Schimming R: Tumorangiogenese beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle: Stellenwert, Prognoserelevanz und therapeutische Ansatzpunkte? Habilitation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2001
181. Schliephake H: Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer – a review. *Int J Oral Maxillofacial Surg* 32 (2003) 233-245
182. Schrader J, Brachvogel P, Schrader AJ, Tavassol F, Eckardt A: Selektive Halslymphknotenausräumung bei primär klinisch und histopathologisch metastasenfrem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. *HNO* 56 (2008) 901 - 907
183. Schütze A: persönliche Mitteilung, 2007
184. Seagroves T, Johnson RS: Two HIFs may better than one. *Cancer Cell* 1 (2002) 211 – 213
185. Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, Battistutti W, Hönigschnabl S: Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 32 (2003) 455 -460
186. Semmler MP, Driemel O, Staudenmaier R, Froelich K, Kleinsasser NH: Effekte von Nikotin unter Berücksichtigung der Tumorentstehung im Kopf-Hals-Bereich. *Mund Kiefer GesichtsChir* 10 (2006) 395-401
187. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse D, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF: Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12 (1993) 303 - 324
188. Shemirania B, Crowe DL: Hypoxic induction of HIF-1 α and VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines is mediated by stress activated protein kinases. *Oral Oncol* 38 (2002) 251 – 257
189. Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H : Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 40, 1 (2004) 13-20
190. Shklar G: Oral cancer: current status and future hope. *J Mass Dent Soc* 44, 2 (1995) 12-14

191. Siedek V, Zengel P, Berghaus A: Ursachen und Diagnostik der Xerostomie. Meist sind die Medikamente schuld. *ZM* 18 (2008) 56 - 60
192. Silvermann S: Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc* 132 Suppl (2001) 7-11
193. Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehülsing M, Eckel HE: Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol* 35 (1999) 583 - 589
194. Smith BD, Haffty BG: Molecular Markers as Prognostic Factors for Local Recurrence and Radioresistance in Head And Neck Squamous Cell Carcinoma. *Radiat Oncol Invest* 7 (1999) 125 – 144
195. Smith BD, Smith GL, Carter D, Sasaki CT, Haffty BG: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 18 (2000) 2046 - 2052
196. Smith BD, Smith GL, Carter D, Di Giovanna MP, Kasowitz KM, Sasaki CT, Haffty BG: Molecular marker expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127 (2001) 780 - 785
197. Stackhouse BL, Williams H, Berry P, Russell G, Thompson P, Winter JL, Kute T: Measurement of Glut-1-expression using tissue microarrays to determine a rare specific prognostic marker for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 93 (2005) 247-253
198. Stimson P, Schantz MD: Carcinogenesis, markers, staging, and prognosis of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 5 (1993) 483 – 490
199. Sowter HM, Raval R, Moore J, Ratcliffe PJ, Harris AL: Predominant Role of Hypoxia-Inducible Factor (Hif)-1 α versus Hif-2 α in Regulation of the Transcriptional Response to Hypoxia. *Cancer Res* 63 (2003) 6130 - 6134
200. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL: Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 26 (2007) 299 - 310
201. Takacova M, Barathova M, Hulikova A, Ohradanova A: Hypoxia-inducible expression of the mouse carbonic anhydrase IX demonstrated by new monoclonal antibodies. *Int J Oncol* 31 (2007) 1103 - 1110
202. Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, Oue N, Yasui W, Imai K, Nakachi K, Poellinger L, Nishiyama M: Hypoxia-inducible

- factor-1 alpha polymorphism associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis* 24 (2003) 1779 – 1783
203. Taubert H, pers. Mitteilung
 204. Teicher BA: Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 13 (1994) 139 – 168
 205. Theodoropoulos VE, Lazaris Ach, Sofras F, Gerzelis I, Tsoukala V, Ghikonti I, Manikas K, Kastriotis I: Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression correlates with angiogenesis and unfavourable prognosis in bladder cancer. *Eur Urol* 46 (2004) 200 - 208
 206. Tohma T, Okazumi S, Makino H, Cho A, Mochizuki R, Shuto K, Kudo H, Matsubara K, Gunji H, Matsubara H, Ochiai T: Overexpression of Glucose transporter 1 in esophageal squamous cell carcinomas: a marker for poor prognosis. *Dis Esophagus* 18 (2005) 185-189
 207. Thomlinson RH, Gray LH: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 9 (1955) 539 – 549
 208. Tian M, Zhang H, Nakasone Y, Mogi K, Endo K: Expression of Glut-1 and Glut-3 in untreated oral squamous cell carcinoma compared with FDG accumulation in a PET study. *Eur J Nucl Mol Imaging* 31 (2004) 5 - 12
 209. Tilstone C: Immunological markers to replace TNM staging? *Lancet Oncol* 7 (2006) 890
 210. Tischendorf L: Klinikbezogene retrospektive Studie zum Wandel von Prognose und prognostisch relevanten Faktoren operativ behandelter Mund-, Kiefer- und Gesichtstumoren zwischen 1948 und 1982. Dissertation B, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Med. Fak. 1990
 211. Trastour C, Benizri E, Ettore F, Ramaioli A, Chamorey E, Pouyssegur J, Berra E: HIF-1 α and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer* 120 (2007) 1451 – 1458
 212. Tripathy CB, Roy N: Meta-analysis of glutathione S-transferase M1 genotype and risk toward head and neck cancer. *Head Neck* 28/3 (2006) 217 – 224
 213. Trubiani O, Tripodi D, Delle Fratte T, Caputi S, Di Primio R: Human dental pulp vasculogenesis evaluated by CD 34 antigen expression and morphological arrangement. *J Dent Res* 82 (2003) 742-747

214. Uehara M, Sano K, Ikeda H, Sekine J, Irie A, Yokota T, Tobita T, Ohba S, Inokuchi T: Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 40 (2004) 321 – 325
215. van der Groep P, Bouter A, Menko FH, van der Wall E, van Diest PJ: High frequency of HIF-1 α overexpression in BRCA1 related breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008 in press
216. Van der Waal I: Tobacco and oral cancer and precancer. Meeting report: EU working group on Tobacco and oral health. *Oral Dis* 4 (1998) 52-53
217. Vaupel P, Mayer A: Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastas Rev* 26 (2007) 225 – 239
218. Vaupel P, Mayer A, Höckel M: Impact of Hemoglobin Levels on Tumor Oxygenation: the Higher, the Better? *Strahlenther Onkol* 182 (2006) 63 – 71
219. Vaupel P: Tumor Microenvironmental Physiology and Its Implications for Radiation Oncology. *Semin Radiat Oncol* 14 (2004) 198 - 206
220. Vaupel P, Kelleher DK, Höckel M: Oxygenation status of malignant tumors: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 28 [Suppl 8] (2001) 29 - 35
221. Veronesi U: *Surgical Oncology A European Handbook*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1989)
222. Vleugel MM; Greijer AE, Shvarts A, van der Groep P, van Berkel M, Aarbodem Y, van Tinteren H, Harris AL, van Diest PJ, van der Wall E: Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1 α expression in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 58 (2005) 172 - 177
223. Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic – helix – loop - helix – PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (1995) 5510 – 5514
224. Wang GL, Semenza GL: Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270 (1995) 1230 - 1237
225. Warburg O, Wind F, Negelein E: Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. *Klin Wochenschr* 5 (1926) 829 – 832
226. Warnakulasuriya S, Mak V, Moller H: Oral cancer survival in young people in South East England. *Oral Oncol* 43 (2007) 982 – 986

227. Wiesener MS, Münchenhagen PM, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwiertz A, Jürgensen JS, Gruber G, Maxwell PH, Löning SA, Frei U, Maher ER, Gröne H-J, Eckardt K-U: Constitutive Activation of Hypoxia-inducible Genes Related to Overexpression of Hypoxia-inducible Factor -1 α in Clear Cell Renal Carcinomas. *Cancer Res* 61 (2001) 5215 – 5222
228. Wijffels KIEM, Marres HAM, Peters JPW, Rijken PFJW, van der Kogel AJ, Kaanders JHAM: Tumor cell proliferation under hypoxic conditions in human head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 44 (2008) 335 - 344
229. Winter SC, Shah KA, Han C, Campo L, Turley H, Leek R, Corbridge RJ, Cox GJ, Harris AL: The relation between hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression with anemia and outcome in surgically treated head and neck cancer. *Cancer* 107 (2006) 757 - 766
230. Wittekind C, Tischoff I: Tumorklassifikationen. Aktuelle Aspekte und Probleme der Anwendung. *Pathologe* 6 (2004) 481 – 490
231. Wendt TG, Bank P: Prognostic Factors in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Onkologie* 25 (2002) 208 - 212
232. Wei W, Yu XD: Hypoxia-inducible factors: Crosstalk between their protein stability and protein degradation. *Cancer Lett* 257 (2007) 145 - 156
233. Winter SC, Buffa FM, Silva P, Miller C, Valentne HR, Turley H, Shah KA, Cox GJ, Corbridg RJ, Homer JJ, Musgrove B, Slevin N, Sloan P, Price P, West CML, Harris AL: Relation of Hypoxia Metagene Derived from Head and Neck Cancer to Prognosis of Multiple Cancers. *Cancer Res* 67 (2007) 3441 - 3449
234. Winter SC, Shah KA, Han C, Campo L, Turley H, Leek R, Corbridge RJ, Cox CJ, Harris AL: The Relation Between Hypoxia-Inducible Factor (HIF) -1 α and HIF-2 α Expression With Anemia and Outcome in Surgically Treated Head and Neck Cancer. *Cancer* 107 (2006) 757 – 766
235. Wong YK, Liu CJ, Kwan PC, Chao SY: Microvascular density and vascular endothelial growth factor immunoreactivity as predictors of regional lymph node metastasis from betel-associated oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 61 (2003) 1257 – 1262

236. Woolgar JA, Rogers S, West CR, Errington RD, Brown JS, Vaughan ED: Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol* 35, 3 (1999) 257-265
237. Wouters BG, Koritzinsky M: Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nature Rev Cancer* 8 (2008) 851 - 864
238. Wykoff CC, Beasley NJP, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL: Hypoxia-inducible Expression of Tumor-associated Carbonic Anhydrases. *Cancer Res* 60 (2000) 7075 – 7083
239. Yang W, Lin Z, Li L, Zhang G: Expression of VEGF, EGFR, p16 in lip cancers and oral squamous cell carcinomas and their clinic significance. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 37 (2002) 99 – 101
240. Yasuda M, Ogane N, Hayashi H, Kameda Y, Miyagi Y, Iida T, Mori Y, Tsukinoki K, Minematsu T, Osamura Y: Glucose transporter-1 expression in the thyroid gland. Clinicopathological significance for papillary carcinoma. *Oncology Reports* 14 (2005) 1499-1504
241. Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shirota T, Hatori M, Shintani S: Hypoxia induces resistance to 5-fluoruracil in oral cancer cells via G81) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol* (2008), in press
242. Zuniga FA, Shi GS, Haller JF, Rubashkin A, Flynn DR, Iserovich P, Fischbarg J: A Three-dimensional Model of the Human Facilitative Glucose Transporter GLUT-1. *J Biol Chem* 276 (2001) 44970 – 44975

8 Thesen

1. Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist eine der zehn häufigsten bösartigen Neoplasien des Menschen. In Deutschland ist jährlich von 6000 bis 8000 Neuerkrankungen auszugehen.
2. Trotz Fortschritten in der Diagnostik und Verbesserung der Therapieoptionen durch mikrochirurgische Techniken konnte die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit in den letzten Jahren nicht wesentlich verbessert werden. Sie beträgt nach wie vor nur etwa 40 bis 50%.
3. Die bewährten klinischen und histologischen Parameter wie die Tumorgröße, das Ausmaß von Lymphknotenmetastasen [TNM-System] und die histologische Differenzierung des Tumors [Grading] reichen allerdings nicht aus, um zu den einzelnen Patienten die Prognose und eine individuelle Therapie kalkulieren zu können.
4. Ein hypoxischer Status im Tumorgewebe scheint auch beim Mundhöhlenkarzinom eine weitaus größere als bisher berücksichtigte Rolle für die Aggressivität dieser Tumorentität zu spielen. So gilt es als gesichert, dass hypoxische Tumoren deutlich schlechter auf eine Bestrahlung ansprechen und ein ungünstiges Resultat einer eventuellen Chemotherapie bedingen.
5. Eine umfassende Datenbank mit relevanten klinischen und histopathologischen Parametern der Tumorkrankheit sowie der immunhistochemische Nachweis der hypoxie-assoziierten Proteine HIF-1 α , GLUT-1, pVHL und CA IX ermöglicht eine individuelle Prognosekalkulation.
6. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit aller inkludierten Patienten beträgt 62,4 %. Das Überleben ist signifikant abhängig von der Größe des Primärtumors (log rank-Test, $p = 0,0001$), der Anzahl von Lymphknotenmetastasen (log rank-Test, $p = 0,00001$) und dem Stadium der Tumorerkrankung (log rank-Test, $p = 0,0033$), nicht jedoch von der histopathologischen Differenzierung (log rank-Test, $p = 0,2116$).
7. Die Expression des Hypoxiemarkers HIF-1 α zeigt statistisch keinerlei signifikanten Zusammenhang mit dem Tumorstadium (χ^2 -Test, $p = 0,008$), dem Ausmaß von Lymphknotenmetastasen (χ^2 -Test, $p = 0,157$), dem Grading (χ^2 -Test, $p = 0,654$) und dem Stadium der Tumorerkrankung (χ^2 -Test, $p = 0,699$) oder der Entwicklung eines Rezidivs (χ^2 -Test, $p = 0,552$).

8. Die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α korreliert invers mit dem Überleben der Patienten: Niedrige Expressionen gehen mit Überlebensraten von 90 % und mehr einher, während bei einer HIF-1 α -Überexpression die 5-Jahres-überlebenswahrscheinlichkeit nur noch 20% beträgt ($p = 0,013$).
9. Auch bei multivariater Analyse verkürzt sich das Überleben in Abhängigkeit von der Expression von HIF-1 α . So beträgt das Überleben im Falle einer negativen oder geringen Expression von HIF-1 α 54 Monate, bei einer mäßigen bis starken Expression nur 35 Monate. Es findet sich ein 3,7-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens im Falle einer mäßigen bis starken Expression von HIF-1 α ($p = 0,01$).
10. Ebenfalls zur Prognosekalkulation beim Mundhöhlenkarzinom ist der Glukose-transporter GLUT-1 geeignet. Tumoren, die dieses Protein nicht oder nur schwach exprimieren, zeigen eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von gut 70%, im Falle einer mäßigen bis starken Expression von GLUT-1 sinkt das Überleben auf nur 45% (log rank-Test, $p = 0,0064$).
11. GLUT-1-mäßig bis stark exprimierende Karzinome haben ein 4,8-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens ($p=0,002$). GLUT-1 nicht exprimierende Karzinome zeigen ein Rezidivrisiko von 14,3 %. Rezidive entwickeln sich zu 65 % der Fälle, wenn GLUT-1 mäßig oder stark im Tumorgewebe exprimiert wird.
12. Hinsichtlich der Prognose ist die Überexpression sowohl von GLUT-1 als auch von HIF-1 α als ungünstig zu bewerten. Im Falle einer hohen Expression beider Proteine findet sich in der multivariaten Analyse mittels der Cox's-Regression (adj. nach Tumorgröße und Grading) ein 10-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens der Patienten ($p=0,001$).
13. Das Genprodukt des von Hippel-Lindau-Gens [pVHL] ist ein weiterer unabhängiger Prognosemarker beim Mundhöhlenkarzinom. Bei einer negativen oder geringen Expression beträgt das Überleben 69 % im Gegensatz zu nur 20 % im Falle einer mäßigen bis starken Expression. Die multivariate Cox's-Regressionsanalyse (adj. nach Tumorgröße und Grading) bestätigt ein 3,7-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens bei hoher Proteinexpression ($p = 0,014$).
14. Der prätherapeutische Hb-Wert eignet sich nicht zur Prognosekalkulation beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (log rank-Test, $p = 0,68$). Zusammenhänge zwischen dem Hb-Wert und der Expression hypoxie-relevanter Proteine bestehen

nicht [Hb/ HIF-1 α χ^2 -Test, $p = 0,958$; Hb/GLUT-1, χ^2 -Test, $p = 0,397$]. Ein Trend zur Signifikanz besteht bei der Expression von CA IX [Hb/CA IX χ^2 -Test, $p = 0,055$].

15. Die Koexpression der Proteine HIF-1 α und pVHL zeigt einen noch deutlicheren signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten. Negative oder schwache Expression beider Proteine bedingen ein Überleben von mehr als 80 %, während diese bei einer hochgradigen Expression beider Proteine auf nur noch gut 20 % sinkt. Es besteht ein 8,1-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens im Falle einer hohen Expression beider Proteine im Tumorgewebe ($p = 0,013$).
16. Anhand immunhistochemischer Nachweise für die vier Proteine HIF-1 α , GLUT-1, pVHL und CA IX lassen sich zwei Patientengruppen mit deutlich unterschiedlicher Überlebenswahrscheinlichkeit charakterisieren: 12 Patienten zeigen keine Expression dieser Proteine und haben eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 91,7 %. Weitere 21 Patienten, welche HIF-1 α , GLUT-1 mäßig bis stark, pVHL und CA IX variabel exprimieren, haben ein Überleben von nur noch 33 %. Letztere Patienten haben ein 14,8-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens ($p = 0,012$).
17. HIF-1 α , GLUT-1, pVHL und CA IX sollten die etablierten Parameter zwecks einer detaillierten Prognosekalkulation beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ergänzen. Es ist zu empfehlen, diese Proteine bereits zum Zeitpunkt der Diagnosesicherung durch eine Probeexzision mitzubestimmen.
18. Es kann folgende Therapiestratifizierung vorgeschlagen werden: Bei kleinen, gut bis mäßig differenzierten Karinomen [T₁N₀, G1-2] muss bei hoher Expression von HIF-1 α und GLUT-1 die Therapie hinsichtlich Neck dissection und postoperativer Radiatio/Chemotherapie erweitert werden. Im Gegensatz dazu könnte sich die Therapie bei gering differenzierten, lokal fortgeschrittenen Karzinomen [T₄N₀, G3] bei Vorliegen einer negativen Expression für HIF-1 α , GLUT-1, pVHL und CA IX auf die Tumorresektion inklusive Ausräumung der ersten Lymphknotenstation ohne adjuvante Radiatio beschränken.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Alexander Walter Eckert
Geburtsdatum	13.09.1968
Geburtsort	Dresden
Wohnort	06120 Halle (Saale), Türkisweg 34
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch
Familienstand	ledig
Eltern	Prof. Joachim Eckert, Hochschullehrer i.R.; geb. 10.01.1931, verst. 15.05.2005 Regine Eckert, geb. Görner, Lacktechnikerin, geb. 03.04.1935, verst. 02.07.2002

Schulbildung:

1975 – 1985	Polytechnische Oberschule „Talamt“, Halle (Saale)
1985 – 1987	Erweiterte Oberschule „Thomas Müntzer“, Halle (Saale)
03.07.1987	Abitur

Ausbildung:

1987 – 1988	Vorklinisches Jahr an der HNO-Klinik des Bezirkskrankenhauses Halle-Dölau
1988 – 1994	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1994 – 1996	Arzt im Praktikum an der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin- Luther-Universität Halle-Wittenberg
01.06.1996	Approbation als Arzt
1996 – 2000	Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
29.04.1997	Promotion zum Dr.med.
16.11.2000	Approbation als Zahnarzt
13.07.2004	Promotion zum Dr.med.dent.

Beruflicher Werdegang:

Seit 01.10.2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Weiterbildungsassistent an der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Seit Mai 2005	Strahlenschutzbeauftragter der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
30.05.2006	Facharzt für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
17.08.2006	Ernennung zum Oberarzt

Dr. Dr. Alexander Eckert

Halle/Saale, den 16.11.2008

10 Erklärungen

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich bisher keinen Habilitationsversuch unternommen habe und an keiner anderen Universität oder Fakultät ein Habilitationsverfahren im Gange ist.

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit allein und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen oder Arbeitsmittel angefertigt habe.

Dr. Dr. Alexander Eckert

Halle/Saale, den 16.11.2008

11 Danksagung

Für die Überlassung des hoch interessanten Themas, der mir jederzeit gewährten Unterstützung und die anregenden Diskussionen möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Schubert ganz herzlich bedanken.

Für die Möglichkeit, an den Paraffinblöcken der Mundhöhlenkarzinompatienten immunhistochemische Nachweise durchführen zu können, bin ich Herrn Univ.-Prof. Dr. S. Hauptmann, Direktor des Institutes für Pathologie, zu Dank verpflichtet.

Ganz herzlichen Dank auch an Herrn Prof. H. Taubert, Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, für die anregenden Diskussionen zum prognostischen Einfluss der einzelnen hypoxie-relevanten Proteine und seine Unterstützung bei statistischen Fragestellungen der Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. U. Bilkenroth, Institut für Pathologie Eisleben, für eine Unterstützung bei der immunhistochemischen Auswertung der Tumorgewebe.

Mein Dank gilt ferner Herrn OA Dr. Lautner, Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, für die praktischen Tipps zwecks Erstellung einer SPSS-Datenbank.

Den beiden Doktoranden, Frau Katharina Bolte und Herrn Andreas Schütze, danke ich für ihre fleißige Arbeit.

Letztlich möchte ich mich auch bei meiner Freundin Doreen für die mir entgegengebrachte Geduld und das Korrekturlesen bedanken.