

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. H. Dralle



Expression von CD97 und seines Liganden CD55 in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

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

von Tarek Mustafa

geboren am 22.02.1977 in Mosul

Verteidigungstermin: 03.07.2006

Gutachter:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Dralle
2. Univ.-Prof. Dr.Dr. J. Schubert
3. Univ.-Prof. Dr.Dr. K.-L. Gerlach

urn:nbn:de:gbv:3-000010616

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010616>]

Referat und bibliografische Beschreibung

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist eines der 10 häufigsten Malignome des Menschen. Trotz moderner Therapieverfahren, liegt die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate seit Jahrzehnten deutlich unter 50%. Kliniker und Pathologen fordern daher die Identifizierung neuer molekularer Dedifferenzierungsmarker, um nach Erstdiagnose und kurativ intendierter Primärtherapie, eine Tendenz zum Rezidiv frühzeitig zu erkennen. Beim Schilddrüsenkarzinom des Menschen wurde bereits der Dedifferenzierungsmarker CD97, ein Mitglied der EGF-7TM Familie, gut untersucht. CD55, ein Inhibitor des Komplementsystems, wurde als Ligand für CD97 identifiziert. Die Interaktion beider Proteine vermittelt zelluläre Adhäsion und könnte dadurch den Metastasierungsprozess maligner Zellen fördern. Bisher existieren keine Daten zur Expression von CD97 und CD55 in Mundhöhlenkarzinomen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von CD97/ CD55 in humanen Plattenepithelkarzinomgeweben (n= 78) sowie tumorfreien Kontrollgeweben auf Transkript- und Proteinebene zu untersuchen (Multiplex RT-PCR, Q-RT-PCR, Immunhistochemie). In Zellzuchtexperimenten wurde die CD97- und CD55-Expression in 3 Plattenepithelkarzinomzelllinien nach 72h Betulinsäurebehandlung (3µg/ml) untersucht (Q-RT-PCR, Immunzytochemie, Durchflusszytometrie). Unsere Analysen wiesen nach, dass CD97 und CD55 in Tumorgeweben signifikant stärker exprimiert wurden, als im tumorfreien Kontrollgewebe. Im Vergleich zu den nicht metastasierten pT1/2-Karzinomen mit G1/2-Grading, wurde CD97-mRNA und CD97-Protein in fortgeschrittenen und dedifferenzierten Karzinomen (pT3/4, N1/2, G3/4-Grading) signifikant stärker exprimiert. CD55 wurde, unabhängig vom Staging und Grading, in allen Tumorgeweben stark exprimiert. Betulinsäure inhibierte, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, die Expression von CD97 und CD55 in allen 3 Zelllinien signifikant.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass CD97 ein sensibler Marker der Dedifferenzierung in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle ist. CD97 korreliert mit schlechter Prognose und lymphogener Metastasierung. Obwohl CD55 alleine keine Markerfunktion besitzt, könnte die Interaktion mit CD97 den Metastasierungsprozess fördern. Betulinsäure hat sich in unseren Untersuchungen, als potenter Inhibitor der CD97- und CD55-Expression in Plattenepithelkarzinomzellen erwiesen.

Mustafa, Tarek: Expression von CD97 und seines Liganden CD55 in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., [69] Seiten, 2005.

Abstract

Introduction: The oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the sixth most common malignant tumor worldwide. No significant better progress has been achieved in the treatment of oral cancer during the last decades. The heterodimeric CD97 protein is an EGF-7TM family member and was identified as a dedifferentiation marker in thyroid carcinomas. The complement inactivator CD55 was identified as a ligand for CD97. Nothing is known about the expression of CD97 and CD55 in oral squamous cell carcinomas.

Material and Methods: Employing conventional total RNA extraction and UV-laser microdissection, CD97/ CD55 were investigated in oral squamous cell carcinomas (n= 78) by multiplex RT-PCR and quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR). Frozen sections were investigated by immunohistochemistry. The effects of 3µg/ml betulinic acid on the CD97/ CD55 expression in 3 OSCC cell lines were determined by Q-RT-PCR, immunocytochemistry and flow cytometry.

Results: Weak CD97 transcripts were expressed in normal mucosa. Basal epithelial cells revealed specific CD97 immunostaining. Strong CD97 transcripts were detected in pT3/4 and G3/4 OSCC tissues, whereas pT1/2 and G1/2 carcinomas revealed weak CD97 transcript levels. A weaker CD97 immunostaining was observed in pT1/2 and G1/2 tumors. pT3/4 tumors and G3/4 histotypes revealed intensive CD97 immunostaining. CD55 gene expression was low in normal mucosa. All carcinomas, irrespective of stage and grading, displayed strong CD55 immunostaining. Upon treatment with betulinic acid all cell lines responded with a significant down-regulation of CD97 and CD55.

Conclusion: We identified CD97 as a novel dedifferentiation marker in OSCC. By contrast, neither the staging nor the grading can be linked to the strong expression of CD55 in oral cancer. We suggest that the CD97-CD55 interaction facilitates adhesion and metastatic spread of dedifferentiated oral cancer cells. Despite the still unknown pathways, betulinic acid is a strong CD97/ CD55 inhibitor in oral squamous cell carcinomas.

Inhaltsverzeichnis

Referat und bibliografische Beschreibung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	V
Einleitung und Stand der Forschung	1
1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle	1
1.2 Die EGF-7TM Proteinfamilie	6
1.3 CD55	12
1.4 Betulinsäure	15
2 Zielstellung	17
3 Patienten, Material und Methoden	18
3.1 Patientengewebe	18
3.2 Plattenepithelkarzinomzelllinien	20
3.3 RNA-Präparation	22
3.4 Lasermikrodissektion	22
3.5 Reverse Transkription und PCR-Ansatz	23
3.6 Multiplex RT-PCR	24
3.7 Q-RT-PCR	26
3.8 Immunhistochemie und Immunzytochemie	27
3.9 Durchflusszytometrie	29
4 Ergebnisse	30
4.1 Multiplex RT-PCR	30
4.1.1 CD97-mRNA	30
4.1.2 CD55-mRNA	31
4.2 Q-RT-PCR	33
4.2.1 CD97-mRNA	33
4.2.2 CD55-mRNA	34
4.3 CD97- und CD55-Immunhistochemie	38
4.3.1 Normalgewebeproben	38
4.3.2 CD97-Proteinexpression in Mundhöhlenkarzinomen	40
4.3.3 CD97-Protein Auswertung	42
4.3.4 CD55-Proteinexpression in Mundhöhlenkarzinomen	43
4.3.5 CD55-Protein Auswertung	44

4.4	Einfluss von 3 µg/ml Betulinsäure.....	45
4.4.1	mRNA-Expression	45
4.4.2	Einfluss von Betulinsäure auf die Proteinexpression.....	45
4.5	Lokalisation von CD97 und CD55.....	46
4.5.1	CD97.....	46
4.5.2	CD55.....	48
5	Diskussion.....	49
6	Klinische Relevanz.....	55
7	Zusammenfassung	56
8	Literaturverzeichnis	58
9	Thesen	68
	Lebenslauf.....	70
	Selbständigkeitserklärung.....	71
	Eigene Publikationen in Fachjournalen.....	72
	Vorträge und Posterpräsentationen	72
	Danksagung	75

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

5FU	5-Fluorouracil
ABK	Avidin- Biotin- Komplex
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
ATC	Anaplastic Thyroid Carcinoma, Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
BHY	Plattenepithelkarzinomzelllinie, Grading 1
bp	base pairs, Basenpaare
BS	Betulinsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca	Carcinoma, Karzinom
Ca ²⁺	Kalziumion, Kalziumionen
Cal27	Plattenepithelkarzinomzelllinie, Grading 3
Cal33	Plattenepithelkarzinomzelllinie, Grading 2
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
Cyt C	Cytochrom-C
DAB	Diaminobenzidin
DAF	Decay Accelerating Factor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium-12 Faktoren
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy Ribonucleic Acid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiotreitol
EBV	Epstein- Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraazetessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-7TM	EGF- 7 Transmembrane
Fa.	Firma
Fas	Fibroblast Associated, CD95
FasL	Fibroblast Associated Ligand, CD95L
FCM	Flow Cytometry, Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMTC	Familial Medullary Thyroid Carcinoma, Familiäres MTC
FTC	Follicular Thyroid Carcinoma, Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
Gly	Glycin
GPCR	G- Protein Coupled Receptors
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin– Eosin, histologische Färbung
HIV	Human Immundeficiency Virus
HPV	Humanes Papillomavirus

IgG	Immunglobulin G
IH	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
K0	unstimulierte Zellen, Kontrollprobe
K+	Positivkontrolle
LPC	Laser Pressure Catapult
MAP	Mitogen Activated Protein
MEN 2a	Multiple Endokrine Neoplasie 2a
MEN 2b	Multiple Endokrine Neoplasie 2b
min	Minuten
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MMP	Matrix- Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MTC	Medullary Thyroid Carcinoma, Medulläres Schilddrüsenkarzinom
Mth	Methuselah
N	Normalgewebe
NFκB	Nuclear Transcription Factor- kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NI.	Nodus lymphaticus, Lymphknoten
OSCC	Oral Squamous Cell Carcinoma, Orales Plattenepithelkarzinom
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PET	Polyethylen
PMA	Phorbol 12- myristate- 13- acetat
PTC	Papillary Thyroid Carcinoma, Papilläres Schilddrüsenkarzinom
Q-RT-PCR	Quantitative-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
rpm	Revolution per Minute
RT	Reverse Transkription
SCR	Short Consensus Repeat
sec	Sekunden
Taq	Thermus aquaticus, thermophiles Bakterium
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TNM	Tumorformel der UICC
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TSH	Thyroidea Stimulierendes Hormon
TSNA	Tabakspezifische N-Nitrosamine
UICC	Union Internationale Contre le Cancer, Internationale Krebsgesellschaft
z.B.	zum Beispiel

Einleitung und Stand der Forschung

1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist der häufigste maligne Tumor des oberen Aerodigestivtraktes und gehört mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 10.000 Fällen in Deutschland zu den 10 häufigsten Malignomen (*Hemprich und Müller 1989, Lippman et al. 1994*). Die jährliche Mortalitätsrate wird in Deutschland bei Männern mit 6,3 auf 100.000 und bei Frauen mit 1,21 auf 100.000 angegeben (*La Vecchia et al. 2004*). Neuere Studien bestätigen, dass die Fallzahlen kontinuierlich ansteigen (*Robinson und Macfarlane 2003*). Aufgrund dieses Dilemmas suchen Kliniker und Pathologen nach Möglichkeiten, um Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle mit Hilfe molekularbiologischer Tumormarker spezifischer charakterisieren zu können. Hierbei sind schon jetzt und in der Zukunft Erweiterungen der Grundlagenkenntnisse zum Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle zu erwarten. Damit stehen den Klinikern wertvolle Ergänzungen der bisher vorliegenden Ergebnisse umfangreicher klinischer Studien zur Verfügung. Zusätzlich zu den bereits existierenden Prognosemarkern und Therapieprotokollen, könnten neue Tumormarker von hoher prognostischer Relevanz sein und völlig neue komplementäre Informationen für die Behandlung des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle bieten.

Plattenepithelkarzinome können sich auf der Basis oraler Präkanzerosen (z.B. Leukoplakieformen, Erythroplakie, oraler Lichen planus, submuköse Fibrose) oder unauffälliger Mundschleimhaut entwickeln (*Pindborg et al. 1993*). Die Artikel von *Van der Waal 1992* und *Reichart 2000, 2003* geben einen hervorragenden Überblick über die präkanzerösen Mundschleimhautveränderungen. Plattenepithelkarzinome befallen jeden Bereich der Mundhöhle, der Lippen und des Oropharynx (*Reichart 2001*). Am häufigsten sind Plattenepithelkarzinome im Bereich des Mundbodens lokalisiert, gefolgt vom unteren und oberen Alveolarfortsatz, Zungenkörper/ Zungengrund, Lippen, Wangenschleimhaut, Tonsillenregion, weichen und harten Gaumen. Klinisch stellt sich in den meisten Fällen ein Ulkus mit derbem Randwall dar. Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle wächst diffus infiltrierend, exophytisch oder ulzerierend (Abb.1 A- B).

Nach dem histologischen Aufbau können vier Differenzierungsgrade (G1 hochdifferenziert – G4 undifferenziert) definiert werden. Als pathohistologische Sonderformen des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle, sind das verruköse Karzinom, das spinozelluläre Karzinom und das lymphoepitheliale Karzinom bekannt. Die klinische und pathologische

Klassifizierung der Tumorgöße, des Lymphknotenbefalls und der Fernmetastasen erfolgt durch die TNM-Klassifikation der UICC. In den letzten Jahren ist häufig angemahnt worden, dass bestehende TNM-Staging aufgrund der Sonderstellung der pT4-Klassifikation für das Mundhöhlenkarzinom zu überarbeiten (*Howaldt et al. 1999, Hausamen 2000, Yokoo et al. 2002*).

Die Klassifizierung pT1- pT3 bezieht sich einzig und allein beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle auf die Tumorgöße. Der Status pT4 beschreibt aber nicht unbedingt ausgedehnte bzw. fortgeschrittene Karzinome, sondern ist auch bei einer bestehenden Infiltration von Nachbarstrukturen (Zungenkörper, Alveolarknochen) indiziert. So ist es oftmals der Fall, dass klinisch als T1 oder T2 imponierende Karzinome, vom Pathologen als pT4 eingestuft werden.

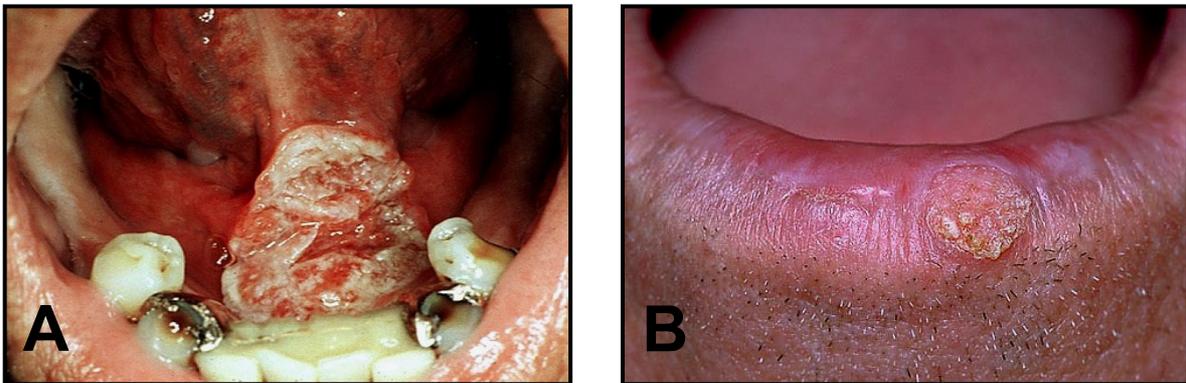


Abb.1: Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und der Lippe. **A-** Anteriores Mundbodenkarzinom, die Zunge infiltrierend (pT4). **B-** T1 Lippenkarzinom der Unterlippe stellt sich als kreisrundes Ulkus dar.

Mundhöhlenkarzinome metastasieren unabhängig von ihrem Sitz bevorzugt lymphogen und befallen die regionären Lymphknoten des Halses. Die Infiltration des jugulodigastrischen Markerlymphknotens (sentinel lymph node), ist ein Zeichen für die lymphogene Metastasierung in die Halsregion. Einige Patienten erkranken an einem Zweitmalignom gleichen Typs schlundabwärts. Neben regionären Lymphknotenmetastasen bilden maligne Tumore in einer Kaskade von Einzelschritten auch hämatogene Fernmetastasen. Beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle sind Fernmetastasen sehr selten und betreffen hauptsächlich die Lunge (*Howaldt et al. 2000*).

Ätiologie

Tabak und Alkohol sind die wichtigsten ätiologischen Faktoren für die Entstehung des Mundhöhlenkarzinoms (*Lippman et al. 1994, Howaldt et al. 2000, Llewellyn et al. 2001, 2003 Sasaki et al. 2005*). Tabakrauch und Kautabak enthalten tabakspezifische N-Nitrosamine (TSNA), die als ursächliche Agenzien bei der Entstehung des Mundhöhlenkarzinoms

betrachtet werden (*Reichart 2000*). Chronischer Alkoholabusus muss als zweitwichtigster Faktor der oralen Karzinogenese angesehen werden (*Howaldt et al. 2000, Llewellyn et al. 2003, Sasaki et al. 2005*). Der übermäßige Alkoholkonsum spielt aber allein keine primäre Rolle bei der Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen. Alkohol gilt als Kokarzinogen. Eine karzinogene Wirkung entfaltet sich somit erst, wenn Alkohol und Tabak synergistisch agieren (*Califano et al. 1996, Bray et al. 2000*). Man hat festgestellt, dass besonders hochprozentige Spirituosen das Epithel flächig schädigen und so das Eindringen von karzinogenen Giftstoffen aus dem Tabakrauch in die Mundhöhlenschleimhaut erleichtern.

Seit ca. 20 Jahren wird beobachtet, dass die Gruppe der Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen und einem Alter unter 45 Jahren, langsam aber stetig zunimmt. Epidemiologen prognostizieren, dass dies unweigerlich zu einer Verschiebung des Altersgipfels in Richtung des frühen 5. Lebensjahrzehnts führt (*Llewellyn et al. 2001, 2003, Sasaki et al. 2005*). *Llewellyn et al. 2003* suchten nach einer Erklärung für das ungewöhnlich frühe Auftreten von Mundhöhlenkarzinomen. Ein erster Denkansatz war, dass bei Patienten unter 45 Jahren die klassischen karzinogenen Noxen Alkohol und Tabak nicht lang genug auf das Mundhöhlenepithel wirken. Somit müssten weitere relevante Faktoren wie z.B. eine genetische Veranlagung, Drogenkonsum oder eine schlechte Mundhygiene stärker in Betracht gezogen werden (*Llewellyn et al. 2003*).

Im Rahmen der umfangreichen Studie von *Llewellyn et al. 2003*, wurden in Südostengland 116 Patienten der Altersgruppe unter 45 Jahren, die an einem Mundhöhlenkarzinom erkrankt waren, retrospektiv befragt. Nach Evaluierung der Untersuchungsergebnisse konnte festgestellt werden, dass 75% der weiblichen Patienten und 59% der männlichen Patienten, bereits Krebserkrankungen in der Verwandtschaft hatten. Ungefähr 2% aller Patienten unter 45 Jahren hatten ein Großelternanteil, das an einem Mundhöhlenkarzinom erkrankt war. Bei weiteren 2% der Befragten war ein Elternteil bereits an einem Mundhöhlenkarzinom erkrankt. Die Daten reichen aber nicht aus, um von einer erblichen Disposition beim oralen Plattenepithelkarzinom auszugehen. Nur 33% der Männer und 67% der Frauen suchten ihren Zahnarzt regelmäßig für Kontrolluntersuchungen auf. Lediglich 10% der Karzinompatienten bestätigten einen regulären Haschischkonsum (*Llewellyn et al. 2003*). Auch *Rosenblatt et al. 2004* kommen in ihrer Veröffentlichung zu dem Schluss, dass Haschischkonsum nicht mit einem erhöhten Mundhöhlenkarzinomrisiko einhergeht.

Neben den in der westlichen Welt bekannten Noxen Alkohol und Tabak, wurde in der Fachliteratur über weitere karzinogene Genussmittel aus dem südostasiatischen und nordafrikanischen Raum berichtet. In Südostasien, Taiwan und Nordafrika gilt der tranquillierende Betelnusssaft als karzinogene Agenz. Untersuchungen haben erwiesen,

dass Betelnussextrakt direkt auf das Mundhöhlenepithel wirkt und die Karzinogenese in Präkanzerosen und Mundschleimhautläsionen durch die Aktivierung von MMP's fördert (*Liu et al. 2005*). Ionisierende Strahlung, Vitamin A- Hypovitaminose, Eisenmangel, *Candida albicans* Infektionen, das Humane Papilloma Virus (HPV), das Epstein-Barr Virus (EBV), eine schlechte Mundhygiene, insuffiziente prothetische Restaurationen und eine Immunsuppression sind weitere, potentiell förderliche Faktoren für die Entwicklung von Mundhöhlenkarzinomen (*Gupta et al. 1982, Daftary et al. 1991, Paz et al. 1997, Reichart 2001, 2003, Nagpala und Das 2003*).

Die molekulare Grundlage für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, ist die Mutation verschiedener Tumorgene. Mutagene Agenzien rufen Veränderungen an Onkogenen und Tumorsuppressorgenen hervor. Die Aktivierung der Onkogene c-myc, c-erb oder ras kann die Überexpression der veränderten „funktionsdefekten“ Gene nach sich ziehen. Die Inhibition von Tumorsuppressorgenen wie z.B. p53 führt zu einer genetischen Instabilität, welche in Mutationen resultiert (*Levine 1993, 1997, Taylor et al. 1999*).

Die Mutation des p53-Gens ist bereits gut untersucht und man geht heute davon aus, dass sie ein frühes Ereignis in der Genese von Mundhöhlenkarzinomen ist (*Nagpala und Das 2003*). Des Weiteren wurden p53-Mutationen mit unterschiedlicher Häufigkeit in Plattenepithelkarzinomen gefunden (*Caamano et al. 1993*). In ca. 30- 70% aller untersuchten Gewebe, konnten Mutationen im p53-Gen nachgewiesen werden (*Wallace-Brodeur und Lowe 1993*). Hingegen berichten *Kropveld et al. 1999*, dass in weitestgehend allen Tumorproben p53-Mutationen festzustellen sind. Unabhängig von den Auffassungen über die Mutationshäufigkeit steht fest, dass im Zuge der Tumorprogression auch die p53-Mutationsrate im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle zunimmt.

Weitere Forschungsarbeiten konnten nachweisen, dass die erhöhte Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF κ B, die Proliferation der Krebszellen fördert und für die Tumorprogression mitverantwortlich ist (*Ikebe et al. 2004, Patel et al. 2004*).

Eine erhöhte Mitoserate ist notwendig für ein rasches Tumorwachstum. Das rapide Zellwachstum und die hohe Zellteilungshäufigkeit korrelieren mit der gesteigerten Expression von Zellzyklusregulatoren. So konnten Zellzyklusuntersuchungen eine signifikant erhöhte Expression des Zellzyklusproteins Cyclin D1 in Plattenepithelkarzinomen nachweisen und mit einer schlechten Prognose korrelieren (*Michalides et al. 1997, Schoelch et al. 1999, Koontongkaew et al. 2000*). Andererseits ist eine Herabregulation der Apoptose erforderlich. Die Regulation und Expression von Apoptoseproteinen in oralen Plattenepithelkarzinomen wird seit Jahren intensiv erforscht. Der gut untersuchte Fas- Rezeptor (CD95) ist in oralen

Plattenepithelkarzinomen in unterschiedlicher Stärke nachweisbar (*Muraki et al. 1997, Chen et al. 1999*). Mundhöhlenkarzinome können auch eine von Fas unabhängige Apoptoseregulation über das Bax/ Bcl2 System durchführen und einen phosphorylierten Fas-Rezeptor besitzen. Fas Ligand (CD95L) wird in nahezu allen Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle stark exprimiert. Die Inaktivierung von CD95, die Überexpression von CD95L und die daraus resultierende Resistenz gegenüber der T-Zell vermittelten Apoptose, sind Teil des immunprivilegierten Karzinomzellcharakters (*Gastman et al. 1999, Loro et al. 1999, Iwase et al. 2003, Fujita et al. 2004*).

Microarrayanalysen haben mehr als 100 mit dem Mundhöhlenkarzinom assoziierte Gene identifiziert. Deren diagnostische Relevanz ist noch weitestgehend ungeklärt und muss durch weitere Untersuchungen ermittelt werden (*Leethanakula et al. 2003*).

Bisher veröffentlichte Forschungsergebnisse belegen, dass Retinsäure, obwohl klinisch bisher fast nur empirisch verwendet, redifferenzierend auf präkanzeröse Läsionen der Mundschleimhaut wirken kann (*Klaassen und Braakhuis 2002, Driver et al. 2005*). In einigen Fällen wird auch von einer gegensätzlichen Retinsäurewirkung berichtet, die einerseits die Dedifferenzierung und somit die Plattenepithelkarzinogenese fördert. Es wird auch vermutet, dass bisher noch unerforschte Nebenwirkungen der Retinsäure, die Tumoraggressivität steigern können. So haben *Uchida et al. 2001* nachgewiesen, dass eine niedrig dosierte Retinsäurebehandlung die Soft-Agar-Invasion von Plattenepithelkarzinomzellen durch die verstärkte Expression von MMP2 und Cathepsin-L signifikant erhöht. Dieser tumorproliferative Effekt der Retinsäure soll zum Teil vom Expressionsprofil der Retinsäurerezeptoren in Karzinomzellen abhängig sein (*Uchida et al. 2001, Chakravarti et al. 2003*).

Therapie

Gemessen am Stand der Forschung anderer bösartiger Tumoren des Menschen (z.B. Kolonkarzinom) existieren heute kaum probate Chemotherapien, die standardmäßig zur Therapie des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle eingesetzt werden. Dominierend ist nach wie vor die chirurgische Intervention oder die Kombination aus Chirurgie und Radiotherapie (*Stell 1989, Vokes et al. 1993, Leemans et al. 1997, Shrivvers et al. 1997*). *Howaldt et al. 2000* postulieren, dass für kleine Mundhöhlenkarzinome mit pT1 Status eine alleinige Strahlentherapie unter Umständen ausreichend ist. Diese Behauptung lässt sich nicht durch Literaturdaten stützen und es existieren keine Multicenter Studien zu dieser Fragestellung.

Trotz modernster diagnostischer und therapeutischer Methoden, kam es in den letzten 3 Jahrzehnten zu keiner wesentlichen Verbesserung der Überlebensrate. Somit ist die prinzipielle Überlebenswahrscheinlichkeit aller Mundhöhlenkarzinompatienten von deutlich unter 50%, bezogen auf ein 5-jähriges Intervall, ein eher ernüchternder Wert (*Hausamen 2000*).

Das aggressive Therapiekonzept beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle begründet sich auf der oftmals schon im Frühstadium vorhandenen Infiltration von lebenswichtigen Nachbarstrukturen und dem Nachweis einer lymphogenen Metastasierung in die Halsregion. Die Heilungsaussichten lassen sich durch ein radikal-chirurgisches Vorgehen verbessern (*Bier et al. 1992, Schlums et al. 1992*). Auch wenn eine R0-Resektion aufgrund des geringen Tumorabstandes zu lebenswichtigen Leitungsbahnen des Kopf-Hals-Bereiches in vielen Fällen nicht mehr möglich ist, sollte die Komplettentfernung des Tumors das anzustrebende Operationsziel sein. Die Infiltration des jugulo-digastrischen Lymphknotens (N1. jugulo-digastricus), indiziert mit hoher Wahrscheinlichkeit eine bestehende lymphogene Metastasierung in die Halslymphknoten und erfordert die Durchführung einer Halsausräumung (Neck dissection). Im fortgeschrittenen Tumorstadium besteht die Notwendigkeit einer adjuvanten Radiotherapie. Heutzutage wird in der Radiotherapie mit Gesamtdosen von ca. 70Gy bestrahlt.

Auch wenn sich eine Chemotherapie nur langsam zu etablieren scheint, werden in klinischen Versuchsreihen Kombinationstherapien mit 5FU und Cisplatin getestet (*Andreadis et al. 2003*). Ziel der chemotherapeutischen Behandlung von Mundhöhlenkarzinomen soll neben der Verbesserung der Überlebensrate, auch die Transformation von inoperablen Tumoren in operierbare Karzinome sein. Das gleiche Ziel verfolgt die neoadjuvante Bestrahlung von großen Karzinomen der Mundhöhle (*Mohr et al. 1994*). Weitere Studien zur Optimierung und Standardisierung chemotherapeutischer Behandlungsprotokolle sind unbedingt nötig.

1.2 Die EGF-7TM Proteinfamilie

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms ist ein Meilenstein in der Genforschung. Sie stellt in vielerlei Hinsicht keinen Endpunkt dar, sondern bedeutet den Aufbruch in eine neue Ära der biomedizinischen Forschung mit ungeahnten Einblicken in das dynamische biomolekulare Zusammenwirken von DNA, RNA und Proteinen. Die Einordnung von Genen in Genfamilien, die auf einen gemeinsamen Vorfahren in der Evolution zurückgehen, sowie die korrespondierende Zuordnung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zu Proteinfamilien, ermöglichen erste Schritte zum Verständnis der Mechanismen, die Gen- und

Proteinstruktur in Funktionsmodule übersetzen. Die Erkenntnis, dass die mRNA für mehrere Proteinisotypen kodieren kann oder überhaupt nicht translatiert wird, macht zur Absicherung der Ergebnisse von mRNA-Analysen und zur Gewinnung eines umfassenden Bildes des zellulären Geschehens, eine Untersuchung der verschiedenen Proteinmoleküle mit allen ihren Isoformen notwendig. Schließlich sind es Proteine, die lebensnotwendige Funktionen einer Zelle vermitteln.

Einige Proteine besitzen alle strukturellen Voraussetzungen für die Hormonrezeptorfunktion. Rezeptorfähige Proteine können von malignen Zellen überexprimiert werden. In malignen Zellen können Rezeptorproteine für die Tumorprogression oder für die Ausbildung eines spezifischen Tumorphänotyps von entscheidender Bedeutung sein. Ausgehend von den durch die Rezeptorfunktion angesteuerten Transduktionskaskaden, werden vor allem apoptotische und antiapoptotische Prozesse reguliert, die Neoangiogenese gesteuert und die Expansion maligner Zellmassen gefördert. Vom funktionellen Gesichtspunkt her können Transmembranproteine nicht nur den hormonellen Signaltransfer regulieren, sondern auch durch die Interaktion mit proteinergeren Liganden, die Adhäsion an Zellen und extrazellulären Matrixstrukturen fördern. Aufgrund der Überexpression in oder auf Tumorzellen, können einige Proteine als Tumormarker fungieren.

EGF-7TM Proteine sind Rezeptoren und durchziehen die Zellmembran siebenmal. Im extrazellulären Anteil weisen EGF-7TM Proteine multiple EGF-ähnliche Domänen auf. Phylogenetisch gehören die Proteine der EGF-7TM Familie zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (*McKnight und Gordon 1998, Fredriksson et al. 2003*). Im transmembranösen Proteinabschnitt weisen EGF-7TM zusätzlich eine hohe Homologie mit Vertretern der Sekretin Rezeptorfamilie auf, zu denen auch der Kalzitonin- und der Glukagonrezeptor gehören (*Hamann et al. 1995, Hayflick 2000*). Untereinander sind sich die EGF-7TM Proteine strukturell sehr ähnlich. Die am besten untersuchten Vertreter der humanen EGF-7TM Proteine sind CD97 und sein Homolog EMR2 (*Hamann et al. 1995, Eichler et al. 1994, Gray et al. 1996, Lin et al. 2000*). EMR2 und CD97 unterscheiden sich innerhalb der EGF-Domänen in nur 3 Aminosäuren (*Lin et al. 2000*). Die für CD97 und EMR2 kodierenden Gene sind auf dem Chromosomen 19p31 in enger Nachbarschaft lokalisiert (*Hamann et al. 1995, Hamann et al. 1996, Lin et al. 2000, Kwakkenbos et al. 2004*). Diese Tatsache lässt ein gemeinsames Vorläufergen vermuten, aus dem sich durch Duplikation und „Exon Shuffling“ CD97, EMR2 und weitere Vertreter der EGF-7TM Vertreter generiert haben.

CD97

CD97 ist ein heterodimeres Protein aus 722 Aminosäuren und besitzt 8 potentielle Glykosylierungsstellen. Die Klonierung und Veröffentlichung der cDNA Sequenz für CD97 erfolgte im Jahre 1995 (*Hamann et al. 1995, Gray et al. 1996, McKnight und Gordon 1998, Kwakkenbos et al. 2004*). *Hamann et al. 1995* gingen zunächst von einem monomeren CD97 Protein aus. Aufgrund weiterführender Strukturanalysen durch *Gray et al. 1996* wurde diese Monomerthese, durch den Nachweis zweier löslicher Untereinheiten im Serum von Arthritispatienten, widerlegt. *Gray et al. 1996* beschrieben für CD97 eine heterodimere Struktur und identifizierten zwei CD97 Untereinheiten, CD97alpha (CD97 α) und CD97beta (CD97 β). Beide Untereinheiten müssen sich, noch bevor das Protein auf der Zelloberfläche exprimiert wird, miteinander non-kovalent binden. CD97 α repräsentiert den extrazellulären Proteinteil mit maximal 5 EGF-ähnlichen Domänen. Die Struktur von CD97 β , einem G-Protein gekoppelten Rezeptor, deutet auf eine potentielle Rezeptorfunktion von CD97 hin. Die dadurch resultierende G-Protein vermittelte Signaltransduktion könnte zum Anstieg von cAMP führen. Dies würde in der Mobilisation intrazellulärer Ca²⁺-Reservoirs resultieren, was wiederum Einfluss auf Funktion von Ionenkanälen und membranständigen Transportern haben müsste (*Stacey et al. 2000, 2001*).

Es existieren die 3 CD97-Isoformen *EGF (1,2,5)*, *EGF (1,2,3,5)* und *EGF (1,2,3,4,5)*, welche sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisbar sind und durch alternatives Spleißen entstehen (*Eichler 2000*). Die Isoformen unterscheiden sich in der Anzahl und Konfiguration ihrer EGF-ähnlichen Domänen (Abb.2). Innerhalb der EGF-Domänen wurden zwei Ca²⁺ bindende Stellen identifiziert. Die EGF-Domänen ermöglichen einerseits Proteininteraktionen, wobei gebundenes Ca²⁺ als stabilisierender Faktor wirkt (*Hamann et al. 1998*). Andererseits haben Genanalysen eine Integrin-Erkennungssequenz im extrazellulären Proteinanteil nachgewiesen. Diese Erkennungssequenz zeichnet sich durch ein Arg-Gly-Asp-Motiv aus und ist für extrazelluläre Matrixproteine typisch (*D'Souza et al. 1991, Hamann et al. 1995*). *Van Lier et al. 1996* schlussfolgerten daraus, dass CD97 neben einer möglichen Rezeptorfunktion, auch als Adhäsionsprotein von Bedeutung sein könnte.

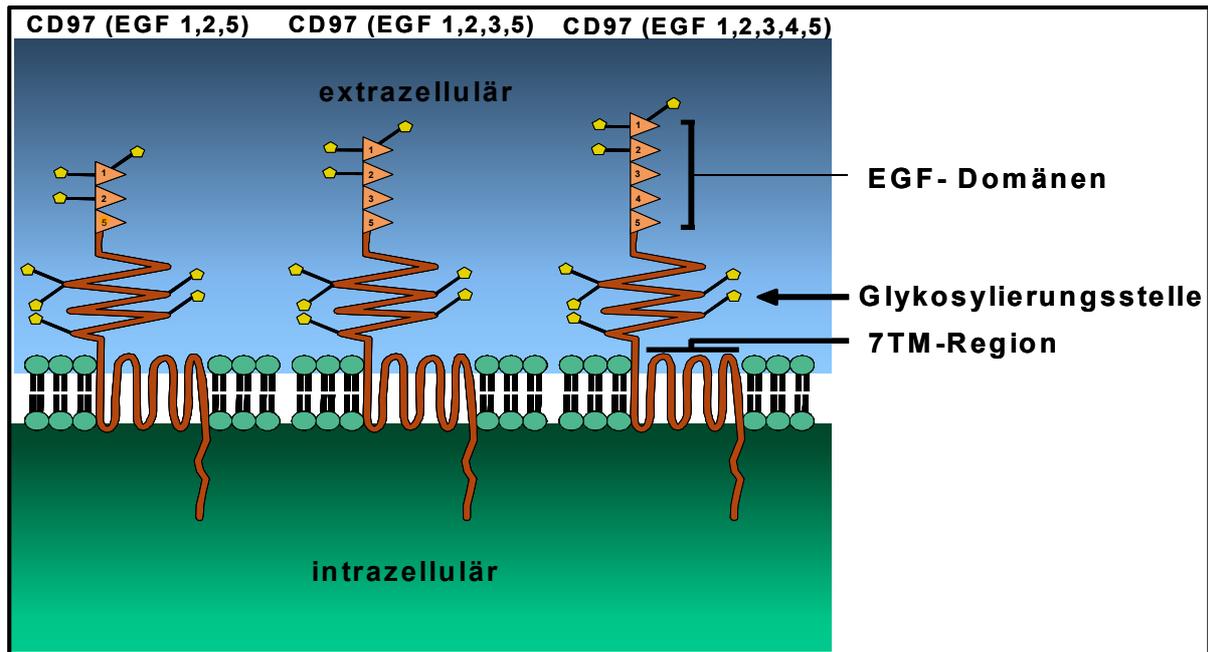


Abb.2: Schematische Darstellung der Isoformen CD97 (EGF 1,2,5), CD97 (EGF 1,2,3,5) und CD97 (EGF 1,2,3,4,5). Die potentiellen Glykosylierungsstellen sind gelb markiert. Das C-terminale Ende ragt in den Intrazellularraum. (modifiziert nach Hamann et al. 1998)

Für CD97 wurden drei zelluläre Liganden beschrieben, die mit unterschiedlichen Proteinabschnitten interagieren. CD55, der am besten beschriebene Ligand für CD97, bindet über sein SCR-Modul 1 mit den EGF-Domänen 1 und 2 (Hamann et al. 1996, 1998, Lea 2002). Chondroitinsulfat ist ein weiterer Ligand und ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Für die EGF-Domäne 4 konnte eine Interaktion mit Chondroitinsulfat nachgewiesen werden (Stacey et al. 2003). Die CD97-stalk Region kann auch mit Integrin $\alpha 5\beta 1$ interagieren (Wang et al. 2004).

CD97 wird auf T- und B-Lymphozyten, Leukozyten, Makrophagen und myelomonozytären Zellen des roten Knochenmarks exprimiert (Jaspars et al. 2001). Auf Lymphozyten wird eine charakteristische Überexpression von CD97 in einem zeitlichen Abstand von 5 – 6h nach deren Aktivierung festgestellt (Eichler et al. 1997). Die Studie von Gray et al. 1996 hat gezeigt, dass aktivierte Lymphozyten in Entzündungsgewebe CD97 stark exprimieren. Aufbauend auf diesen Daten, wurde CD97 im Rahmen von Entzündungsprozessen gezielter untersucht. Momentan liegen komplexe Daten zur Expression von CD97 in multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis vor (Hamann et al. 1999, Visser et al. 2002). Der überwiegende Teil der CD97-Forschung konzentriert sich momentan auf die Analyse der CD97-Expression in malignen Tumoren. Anhand der bisher veröffentlichten Forschungsergebnisse für CD97 in Karzinomen, definiert sich eine Markerfunktion mit klinischer und pathologischer Relevanz.

CD97 in Schilddrüsentumoren

CD97 wurde in benignen und malignen Schilddrüsengeweben und Schilddrüsenkarzinomzelllinien untersucht. Die deskriptive Forschungsarbeit von *Aust et al. 1997* wies für CD97 eine mögliche Rolle als Dedifferenzierungsmarker in non-medullären Schilddrüsenkarzinomen nach.

Anaplastische Karzinome der Schilddrüse (ATC) besitzen eine 5-Jahres-Überlebensrate von deutlich weniger als 5%. Gerade in diesen dedifferenzierten Karzinomen mit infauster Prognose wird CD97 signifikant stärker exprimiert als in „differenzierten“ follikulären (FTC) oder papillären (PTC) Schilddrüsenkarzinomen (*Aust et al. 1997, Hoang-Vu et al. 1999*).

Die Regulation von CD97 wurde von *Hoang-Vu et al. 1999* in der follikulären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 untersucht. FTC-133 wurde zuerst mit Retinsäure 24h vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Behandlung mit EGF, Insulin, TSH, Forskolin und PMA über einen Zeitraum von 72h. Als Kontrollgruppe dienten FTC-133 Zellen, die nur mit Wachstumsfaktoren ohne Retinsäurevorbehandlung stimuliert wurden. Die Stimulation mit EGF ohne Retinsäurevorbehandlung, führte zu einer deutlichen Steigerung der CD97-Expression auf mRNA und Proteinebene, wohingegen PMA die CD97-Expression signifikant verringerte. Insulin, TSH und Forskolin hatten keinen signifikanten Einfluss auf die CD97 Expression. PMA hatte auf die CD97-Expression in Retinsäure-vorbehandelten FTC-133 Zellen keinen Effekt. Die Behandlung der Zellen mit Retinsäure und anschließender EGF-Stimulation, führte nur zu einer sehr schwachen Steigerung der CD97- Expression. Aus dieser Tatsache ist zu schlussfolgern, dass Retinsäure einerseits die EGF-Wirkung in FTC-133 Zellen dämpft und die durch EGF induzierte CD97-Hochregulation signifikant inhibiert. Darauf aufbauend formulierte *Hoang-Vu et al. 1999* die Vermutung, dass CD97 über die Proteinkinase C-Kaskade reguliert wird.

Da sich die Forschungsarbeiten von *Aust et al. 1997* und *Hoang-Vu et al. 1999* nur auf non-medulläre Schilddrüsenkarzinome konzentrierten, untersuchten *Mustafa et al. 2004* die CD97 und CD55 Expression in humanen medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC). Die MTC leiten sich von den parafollikulären C-Zellen ab und sind aufgrund des hohen hämatogenen und lymphogenen Metastasierungspotentials äußerst aggressiv. Dedifferenzierte und sporadische MTC exprimierten CD97 signifikant stärker, als Kalzitinin produzierende, hochdifferenzierte MTC. Die hochmalignen MTC, die im Rahmen einer Multiplen Endokrinen Neoplasie 2b (MEN 2b) auftraten, exprimierten CD97 signifikant stärker als familiäre (FMTC) oder MEN 2a assoziierte MTC.

CD97 in Karzinomen des Gastrointestinaltraktes

Boltze et al. 2002 untersuchten die Expressionsunterschiede von CD97 in akuter und chronischer Pankreatitis sowie in Pankreaskarzinomgeweben. Differentialdiagnostisch ist es extrem schwierig zwischen chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom sicher zu unterscheiden. Aus diesem Grund wollten *Boltze et al. 2002* ein immunhistochemisches Protokoll entwerfen, mit dem man perioperativ die chronische Pankreatitis vom Pankreaskarzinom unterscheiden kann. In Pankreaskarzinomgeweben wurde CD97 signifikant stärker exprimiert als im normalen exokrinen Pankreas und chronischen Pankreatitisgeweben. Aggressive Karzinome, mit nachgewiesener lymphogener Metastasierung waren CD97- hochpositiv. Leider wurden in der Arbeit von *Boltze et al. 2002* keine klaren Aussagen zur Antikörperauswahl für die immunhistochemische CD97-Detektion gemacht. Für CD97 existieren heute verschiedene monoklonale Antikörper, unter anderem gegen die stalk-Region des Proteins (z.B. mem180) oder gegen die EGF-Domänen (z.B. Vim3).

Die Problematik der CD97-Detektion in Pankreaskarzinomen wurde auch von *Aust et al. 2002* erneut aufgegriffen. Zusätzlich präsentierten *Aust et al. 2002* Untersuchungsergebnisse zur CD97-Expression in Magen- und Oesophaguskarzinomen. In den Adenokarzinomen des Pankreas und des Magens wurde eine starke CD97-Expression nachgewiesen. An den Tumorfronten von Plattenepithelkarzinomen des Oesophagus, war CD97 signifikant stärker nachweisbar als in zentral gelegenen Tumorarealen. Im Vergleich zum gesunden Kontrollgewebe, war die CD97-Expression in allen untersuchten Karzinomgeweben signifikant stärker. Die Arbeit von *Aust et al. 2002* ist ein wichtiger Beitrag zur CD97-Forschung. Aus klinischer Sicht wäre die Publikation von *Aust et al. 2002* noch aussagekräftiger, wenn die pathologischen und klinischen Hintergrundinformationen zu den verwendeten Tumorgeweben präziser und tabellarisch dargelegt worden wären. Ohne diese detaillierte Auflistung und Darstellung, erscheinen die untersuchten gastrointestinalen Tumorgewebe zusammenhanglos.

Anknüpfend an diese Publikation wurden Untersuchungsergebnisse zur CD97-Expression im kolorektalen Karzinom veröffentlicht (*Steinert et al. 2002*). Das Kolonkarzinom ist eines der am besten untersuchten Malignome des Gastrointestinaltraktes und es liegen eine Reihe chemotherapeutischer Behandlungsprotokolle vor. Die Forschungsarbeit von *Steinert et al. 2002*, beschäftigt sich mit dem Einfluss von Buttersäure (0,5mmol/l- 50mmol/l), Wortmannin (0,01µmol/l- 1µmol/l) und TGF-β (0,01ng/ml- 1ng/ml) auf die Expression von CD97 in Kolonkarzinomzelllinien. Wortmannin, ein Inhibitor der Phosphoinositol-3-kinase, induzierte bei

einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ die Proliferation und dadurch eine schwache CD97-Hochregulation. Eine Buttersäurekonzentration von 5 mmol/l war am wirkungsvollsten und regulierte CD97 während des Stimulationszeitraums signifikant herab. Dies war zu erwarten, denn über die Antitumorwirkung von Buttersäure beim Kolonkarzinom wurde bereits in ähnlicher Weise berichtet (*Basson et al. 1996, Valezquez et al. 1996, Steinert et al. 2002*). Die Versuchsreihen mit TGF- β ergaben, dass ab einer TGF- β Konzentration von 0,1 ng/ml eine signifikante Herabregulation von CD97 in TGF- β sensitiven Kolonkarzinomzelllinien induziert wurde. Welche Mechanismen und Signalkaskaden mit der Inhibition von CD97 durch TGF- β einhergehen, konnten *Steinert et al. 2002* nicht klären. Für uns wäre es denkbar, dass Signalkaskaden via Smad oder die MAP-Kinase beteiligt sind.

Auch die beiden Arbeiten von *Liu et al. 2005* über die Expression von CD97 in Magenkarzinomen von chinesischen Patienten wiesen einen vom pT-Status abhängigen Expressionsgrad nach. In pT4-Magenkarzinomen wurde signifikant mehr CD97-Protein nachgewiesen als in pT1/2-Karzinomen. *Liu et al. 2005* zeigten, dass im Gegensatz zur Proteinanalytik, mit der RT-PCR keine signifikanten Unterschiede zwischen pT1/2- und pT3/4-Magenkarzinomen auf CD97-Transkriptebeine nachweisbar sind. Es ist durchaus möglich, dass *Liu et al. 2005* in Ihrer Publikation nicht bedacht hatten, dass die glatte Muskulatur des Magens CD97 stark exprimiert und es dadurch in der PCR-Auswertung zur Überlagerung verschiedener CD97-mRNA Expressionsprofile (gesunde Magenmuskulatur und Karzinomzellen) kommt. Mit Hilfe der Lasermikrodissektion hätten die Analysen präziser durchgeführt werden können.

1.3 CD55

CD55 (syn. Decay Accelerating Factor, DAF) ist ein ubiquitär vorkommendes Protein mit einem Gewicht von ca. 70 kDa, welches durch einen Glykosylphosphatidylinositolanker in der Zellmembran fixiert ist. Das CD55-Gen ist auf Chromosomen 1 lokalisiert. *Lea 2002* hat in einer Übersichtsarbeit erklärt, dass CD55 an der Regulation und Deaktivierung des Komplementsystems beteiligt ist. Dabei spielt der extrazelluläre Proteinanteil von CD55 mit seinen 4 SCR-Modulen (short consensus repeats) die entscheidende Rolle. SCR-Module sind Tryptophan- und Cystein-reiche Proteineinheiten, deren Strukturen noch nicht vollständig geklärt sind.

Die Inaktivierung des Komplementsystems durch CD55 begründet sich auf einer Hemmung der C3-Konvertasen durch die SCR-Module 2, 3 und 4. Dies verhindert wiederum die Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes (*Medof et al. 1984, Müller-Eberhard 1988, Lublin und Atkinson 1989, Lea 2002*).

Neben der Wirkung auf das Komplementsystem, kann CD55 auch als viraler und bakterieller Rezeptor wirken. Die Ankopplung von Viren oder Bakterien an CD55 fördert die Adhäsion und Invasion von pathogenen Erregern. Echoviren, Enteroviren und Coxsackieviren binden an CD55 mit unterschiedlichen Affinitäten (*Lea 2002*).

Accardo-Palumbo et al. 2000 konnte zeigen, dass die CD55-Expression auf Endothelzellen der Nabelschnurvene, durch die Glukosekonzentration im Kulturmedium regulierbar ist. Eine hohe Glucosekonzentration inhibierte die CD55-Expression in Endothelzellen signifikant. Maligne Zellen exprimieren CD55 stärker als gesunde Zellen und schützen sich dadurch vor der komplementvermittelten Lyse. Eine hohe CD55-Expression auf Kolonkarzinomzellen korreliert mit einer schlechten Prognose (*Durrant et al. 2003*). Vor kurzem wurden vielversprechende in vitro und in vivo Ergebnisse einer gegen CD55 gerichteten Behandlung mit dem Antikörper SC-1 beim Magenkarzinom veröffentlicht (*Hensel et al. 1999*). Ziel dieses Therapieansatzes ist die Apoptoseinduktion in Karzinomzellen. Erste Auswertungen dieser Studien belegen, dass diese Antikörpertherapie bevorzugt auf Karzinomzellen wirkt, da diese im Verhältnis zu gesunden Zellen eine sehr hohe CD55-Antigendichte aufweisen (*Spendlove et al. 1999*).

CD97-CD55 Interaktion

Anhand von Bindungsstudien zwischen Erythrozyten und CD97-Transfektantenzellen wurde festgestellt, dass CD97 spezifisch CD55 binden kann (Abb.3). Die Bindung von CD55 an CD97 ist Ca^{2+} abhängig (Hamann et al. 1996). Hamann et al. 1998 erkannten, dass durch EDTA diese Interaktion blockiert werden kann. Dies führte zu der Erkenntnis, dass die Ca^{2+} -Bindungsstellen der EGF-Domänen 2, 3, 4 und 5 für die Bindung mit CD55 von essentieller Wichtigkeit sind.

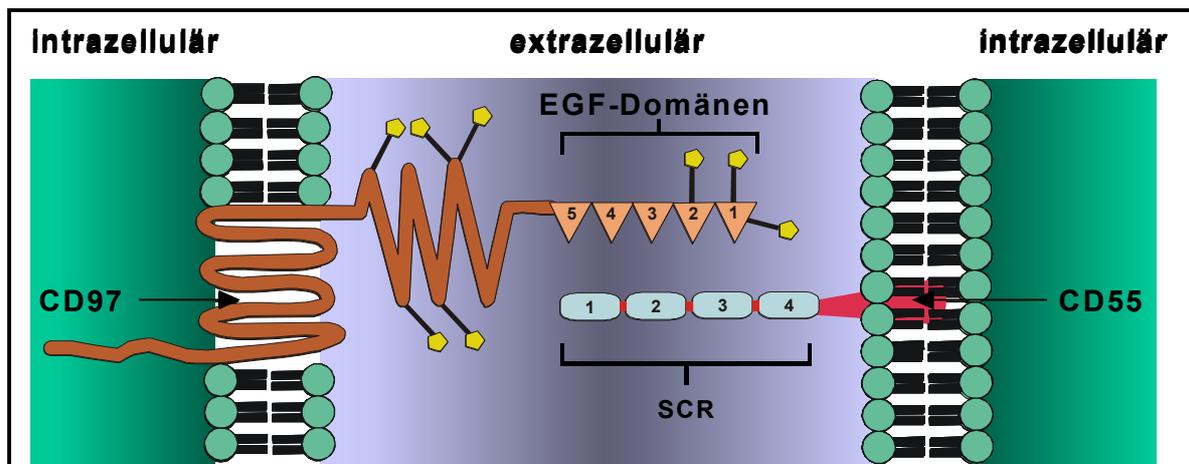


Abb.3: Schematische Darstellung der CD97- CD55 Interaktion. Eine Kopplung der EGF-ähnlichen Domänen von CD97, hier Isoform CD97 (EGF 1,2,3,4,5), an das SCR-1 Modul des CD55 ist Ca^{2+} abhängig und dient *in vitro* der Adhäsion. Die Glykosylierungsstellen sind gelb markiert.

Die EGF-Domänen des CD97 interagieren mit dem SCR-1 Modul des CD55. Um genau zu klären, welche EGF-Domänenkonfiguration für eine Interaktion notwendig ist, wurden mutierte cDNA-Varianten der kleinsten Isoform CD97 (EGF 1,2,5) generiert und auf COS-Zellen transient transfiziert. Dadurch konnten selektiv CD97-Formen generiert werden, die eine EGF-Domäne weniger besaßen (EGF 1,2; EGF 1,5; EGF 2,5). Die CD97-Mutanten konnten ohne die Ca^{2+} bindenden Domänen cbEGF 2,5 nicht mit CD55 interagieren (Hamann et al. 1998).

Das SCR-1 Modul des CD55 besitzt unterschiedliche Affinitäten zu den EGF-Domänen von CD97 (Hamann et al. 1998, Lea 2002). Die höchste Affinität besteht zwischen CD97 (EGF 1,2,5) und SCR-1. Es konnte bisher nicht geklärt werden, warum die CD97-Isoformen (EGF 1,2,3,5) und (EGF 1,2,3,4,5) eine geringere Affinität zu CD55 besitzen. Hamann et al. 1998 vermuten in Anlehnung an die Daten von Rao et al. 1995, dass die niedrige Affinität der

größeren CD97-Isoformen auf die Anzahl der EGF-Domänen zurückzuführen ist, die sich bei der Bindung an CD55 kompetitiv hemmen oder strukturell behindern können.

Die Untersuchungen von *Lin et al. 2001* haben gezeigt, dass Glykosylierungszustände auf die CD97- CD55 Interaktion keinen Einfluss haben. Dagegen postulierten *Wobus et al. 2004*, dass N-Glykosylierungszustände einen erheblichen Einfluss auf die Bindung der EGF-Domänen des CD97 an CD55 haben. Gegen die Schlussfolgerung von *Wobus et al. 2004* spricht, dass die Arbeitsgruppe keine Bindungsanalysen durchgeführt hat. Somit sind die Aussagen zur Bindungsaffinität der EGF-Domänen reine Vermutung.

Trotz der bisher veröffentlichten Forschungsergebnisse ist es ernüchternd, dass es bis heute keine Forschungsgruppe geschafft hat, die Interaktion von CD97 und CD55 in vivo nachzuweisen. Dadurch ist es noch immer höchstspekulativ, ob CD97 und CD55 tatsächlich in die Progression maligner oder entzündlicher Prozesse involviert sind (*Boulday et al. 2002, Mustafa et al. 2004, 2005*).

1.4 Betulinsäure

Im Rahmen der chemotherapeutischen Behandlung von Krebsleiden ist in den letzten Jahren ein deutlicher Trend zur Aquirierung von Naturstoffen zu verzeichnen. Eine viel versprechende Substanz mit nachgewiesener Antitumorwirkung ist Betulinsäure (BS), die zu den Triterpensäuren gehört und sich vom Alkohol Betulin ableitet (*Kim et al. 1997*). BS ist biologisch aktiv und hat eine nachgewiesene toxische Wirkung auf maligne neuroektodermale Zellen. *Pisha et al. 1995* und *Selzer et al. 2000* wiesen eine zytostatische Wirkung gegen maligne Melanomzellen nach. Die im Rahmen dieser Experimente mit malignen Melanomzellen verwendeten Konzentrationen von 1µg/ml- 10µg/ml, waren für gesunde Keratinozyten nicht toxisch. Weitere Veröffentlichungen zur Antitumorwirkung der BS belegen eine hohe toxische Aktivität gegen Neuroblastomzelllinien (*Schmidt et al. 1997, Fulda et al. 1997, Fulda und Debatin 2000*). Obwohl zuerst vermutet wurde, dass BS nur auf Tumorzellen neuroektodermaler Herkunft wirkt, konnten *Thurnher et al. 2003* einen antiproliferativen Effekt in Plattenepithelkarzinomzellen der Mundhöhle nachweisen. Die von *Thurnher et al. 2003* verwendeten Konzentrationen, orientierten sich weitestgehend an den publizierten Daten zur BS-Behandlung maligner Melanome. Konzentrationen von 1µg/ml- 8µg/ml führten bei Plattenepithelkarzinomzellen zur Aktivierung der Caspasen und zur Apoptose. Die Zelltodrate betrug bei einer Konzentration von 8µg/ml BS ca. 80% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Die genauen funktionellen Hintergründe des antiproliferativen Effektes und der Apoptoseinduktion durch BS in Tumorzellen sind noch völlig unklar. Bekannt ist, dass BS die Caspasen 3 und 8 aktiviert, direkt auf das Mitochondrium wirkt und CD95 oder p53 umgeht. Die apoptotischen Prozesse resultieren in einer Veränderung des Mitochondrienmembranpotentials, der Freisetzung von Cytochrom-C und in einer DNA Fragmentierung (*Fulda et al. 1998, Thurnher et al. 2003, Cichewicz und Kouzi 2004*).

Zwischen BS und dem Bax/ Bcl-2 System bestehen Wechselwirkungen. Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 werden in malignen Melanomzellen nach BS-Behandlung stark exprimiert. In Neuroblastomzellen hingegen, kommt es durch BS zu einer Hochregulation der proapoptotischen Proteine Bax/ Bcl-xs (*Thurnher et al. 2003*).

Im Gegensatz zum malignen Melanom, hat BS in Plattenepithelkarzinomzellen keinen Einfluss auf Mcl-1 und Bcl-2. Jedoch kommt es hier zu einer verminderten Expression von Bax (*Thurnher et al. 2003*).

Thurnher et al. 2003 deuteten die Inhibition von Bax/ Bcl-xs als kompensatorische Reaktion der Tumorzellen gegen die BS-vermittelte Apoptose. *Selzer et al. 2000* veröffentlichten die These, dass maligne Melanomzellen die durch BS induzierte Apoptose mittels Überexpression von Mcl-1 und Bcl-2 kompensieren. Diese Wechselwirkungen sind aber nicht auf alle Tumorzellmodelle übertragbar. Im Gegensatz zu Melanomzellen und Plattenepithelkarzinomzellen führt BS zur Hochregulation der proapoptotischen Proteine Bax/ Bcl-xs in Neuroblastomzellen.

In der hallischen Arbeitsgruppe um *Hoang-Vu* wurde erstmalig in einer Studie die CD97-Expression und Regulation in der medullären Schilddrüsenkarzinomzelllinie MTC-SK nach Behandlung mit Betulinsäure untersucht. Erste Untersuchungsergebnisse belegen, dass Betulinsäure in einer Konzentration von 3µg/ml, die CD97-mRNA und CD97-Protein Expression signifikant um mehr als 50% inhibiert (*Mustafa et al. 2004*).

Neben der Antitumorwirkung hemmt BS auch das Eindringen des HIV Typ 1 in die Zelle und ist ein Proteaseinhibitor. Des Weiteren stört BS die Vermehrung des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* in vitro. Ob diese Wirkung auch in vivo effektiv ist, wurde noch nicht geklärt (*Cichewicz und Kouzi 2004*).

2 Zielstellung

Ziel der Dissertation war es, CD97 und CD55 in humanen Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle nachzuweisen. Weiterhin sollte geklärt werden, ob CD97 auch in Mundhöhlenkarzinomen ein Dedifferenzierungsmarker ist. Mittels molekularbiologischer, immunhistochemischer und durchflusszytometrischer Untersuchungen sollte geklärt werden, ob niedrig differenzierte Plattenepithelkarzinome CD97 und CD55 stärker exprimieren als gut differenzierte Karzinome.

1. Werden CD97 und CD55 in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und in Normalgeweben exprimiert ?
2. Gibt es Unterschiede im Grad der Expression von CD97 und CD55 zwischen Normalgeweben und Karzinomgeweben?
3. Korreliert die Expression von CD97 und CD55 mit dem Grading oder Staging der Karzinome?
4. Hat Betulinsäure Einfluss auf die Expression von CD97 und CD55 in Mundhöhlenkarzinomzelllinien?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Patientengewebe

Die Untersuchungen wurden durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt. 78 Tumorgewebe (16 pT1, 18 pT2, 8 pT3, 36 pT4) stammen von Patienten, die aufgrund eines Mundhöhlenkarzinoms in der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie (Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Schubert) zwischen 1999 und 2004 operiert wurden. Alle Patienten wurden vom behandelnden Kieferchirurgen aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Untersuchung ihres Gewebes.

Der Altersdurchschnitt der männlichen Patienten lag bei 63 Jahren. Die weiblichen Patienten waren im Durchschnitt 70 Jahre alt. Im Untersuchungszeitraum erkrankten mehr Männer (n=52) als Frauen (n=26) (Tab.1). Keiner der Patienten war zum Zeitpunkt der Probenentnahme radiologisch oder chemotherapeutisch vorbehandelt worden.

Als Referenzproben für eine normale CD97/ CD55 Expression dienten drei Proben gesunder Mundschleimhaut, die im Rahmen von Weisheitszahnoperationen nach der Begradigung von Wundrändern gewonnen wurden. Des Weiteren wurden im Rahmen von Tumoroperationen zwei tumorfreie Proben der Glandula submandibularis und drei Halshautproben asserviert.

Alle Gewebeproben wurden während der Operation entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C zwischengelagert. Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden die gefrorenen Gewebeproben mit Tissue Tek[®] Einbettgel fixiert (Fa. Sakura, Niederlande) und auf der Schockgefriervorrichtung im Cryostat (Fa. Microm, Deutschland) auf -60°C abgekühlt (lückenlose Kühlkette). Von jedem Gewebe wurden 6 μm dünne Schnitte für die Immunhistochemie und 12 μm dünne Schnitte für die Lasermikrodissektion angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden bis zur Verwendung bei -80°C zwischengelagert. Ein histologischer Schnitt von jedem Gewebe wurde zu Kontrollzwecken mit HE angefärbt.

Die nachfolgende Tumorgewebetabelle gibt die pTNM, das Grading, das Geschlecht und das Alter zum Operationszeitpunkt für jeden einzelnen Patienten wieder (Tab.1).

Tab.1- 1: Plattenepithelkarzinomgewebe mit G1/2 Grading

Fall	Alter, Geschlecht	Tumorlokalisation	pTNM	Grading
1	59, männlich	Oberlippe	T1N0M0	G1
2	70, männlich	Oberkieferalveolarfortsatz	T1N0M0	G1
3	71, männlich	Unterlippe	T1N0M0	G1
4	55, männlich	weicher Gaumen	T1N0M0	G1
5	56, männlich	Oberlippe	T1N0M0	G1
6	58, männlich	Unterlippe	T1N0M0	G1
7	70, männlich	Oberlippe	T2N0M0	G1
8	79, männlich	Mundboden	T2N0M0	G1
9	64, männlich	Unterkieferalveolarfortsatz	T2N0M0	G1
10	57, männlich	Mundboden	T2N0M0	G1
11	58, männlich	harter Gaumen	T2N0M0	G1
12	87, männlich	Unterlippe	T3N0M0	G1
13	69, männlich	Unterkieferalveolarfortsatz	T4N0M0	G1
14	47, männlich	Mundboden	T4N0M0	G1
15	45, weiblich	harter Gaumen	T1N0M0	G1
16	59, weiblich	Unterlippe	T1N0M0	G1
17	64, weiblich	Unterkieferalveolarfortsatz	T1N0M0	G1
18	76, weiblich	Unterlippe	T1N0M0	G1
19	79, weiblich	Mundboden	T1N0M0	G1
20	47, weiblich	Oberkieferalveolarfortsatz	T2N0M0	G1
21	76, weiblich	Wangenschleimhaut	T2N0M0	G1
22	76, weiblich	harter Gaumen	T4N0M0	G1
23	92, weiblich	harter Gaumen	T4N1M0	G1
24	42, männlich	Mundboden	T1N0M0	G2
25	65, männlich	Gaumenbogen	T2N0M0	G2
26	87, männlich	Mundboden	T2N1M0	G2
27	71, männlich	Mundboden	T2N1M0	G2
28	65, männlich	Wangenschleimhaut	T3N1M0	G2
29	66, männlich	Wangenschleimhaut	T3N1M0	G2
30	73, männlich	Wangenschleimhaut	T3N1M0	G2
31	60, männlich	Mundboden	T3N1M0	G2
32	56, männlich	Mundboden	T3N1M0	G2
33	67, männlich	Mundboden	T3N1M0	G2
34	59, männlich	Mundboden	T4N0M0	G2
35	65, männlich	harter Gaumen	T4N0M0	G2
36	74, männlich	Wangenschleimhaut	T4N1M0	G2
37	54, männlich	Mundboden	T4N1M0	G2
38	65, männlich	Mundboden	T4N1M0	G2
39	56, männlich	Mundboden	T4N1M0	G2
40	73, männlich	Mundboden	T4N1M0	G2
41	52, männlich	Mundboden	T4N1M0	G2
42	89, männlich	Zungenrand	T4N1M0	G2
43	60, männlich	Mundboden	T4N2bM0	G2
44	49, männlich	Wangenschleimhaut	T4N2cM0	G2
45	51, männlich	Wangenschleimhaut	T4N2cM0	G2
46	68, männlich	Mundboden	T4N2M0	G2
47	39, weiblich	Mundboden	T1N0M0	G2
48	74, weiblich	Wangenschleimhaut	T2N0M0	G2
49	81, weiblich	Wangenschleimhaut	T2N0M0	G2
50	70, weiblich	Mundboden	T2N1M0	G2
51	81, weiblich	Mundboden	T2N1M0	G2
52	79, weiblich	Mundboden	T3N1M0	G2
53	75, weiblich	Zungenrand	T4N0M0	G2
54	52, weiblich	Zungenrand	T4N1M0	G2
55	71, weiblich	Mundboden	T4N1M0	G2
56	81, weiblich	weicher Gaumen	T4N1M0	G2

Tab.1- 2: Plattenepithelkarzinomgewebe mit G3/4 Grading

Fall	Alter, Geschlecht	Tumorlokalisation	pTNM	Grading
57	62, männlich	Zungenrand	T1N1M0	G3
58	57, männlich	Wangenschleimhaut	T2N1M0	G3
59	64, männlich	Mundboden	T2N1M0	G3
60	51, männlich	Zungenrand	T2N1M0	G3
61	43, männlich	Wangenschleimhaut	T4N1M0	G3
62	48, männlich	Oberlippe	T4N1M0	G3
63	66, männlich	Mundboden	T4N1M0	G3
64	77, männlich	weicher Gaumen	T4N1M1	G3
65	62, männlich	Mundboden	T4N2cM0	G3
66	77, männlich	Zungenrand	T4N2M0	G3
67	61, männlich	Zungenrand	T4N2M0	G3
68	49, männlich	Mundboden	T4N2M1	G3
69	67, männlich	Oropharynx	T4N2M1	G3
70	87, weiblich	Oberkieferalveolarfortsatz	T1N0M0	G3
71	87, weiblich	Wangenschleimhaut	T2N1M0	G3
72	54, weiblich	Mundboden	T4N1M0	G3
73	47, weiblich	Wangenschleimhaut	T4N1M0	G3
74	59, weiblich	Mundboden	T4N2bM0	G3
75	82, weiblich	Wangenschleimhaut	T4N2bM0	G3
76	77, weiblich	Zungenrand	T4N2bM1	G3
77	67, männlich	Mundboden	T1N2bM0	G4
78	63, männlich	Oropharynx	T4N2bM0	G4

3.2 Plattenepithelkarzinomzelllinien

Die Plattenepithelkarzinomzelllinien Cal27, Cal33 und BHY wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen (Tab.2). Die Karzinomzellen besitzen eine polygonale Zellform und bilden nach 4- 5 Tagen konfluierende Monolayer (Abb.4 A- C). In Anlehnung an bereits publizierte Fachartikel und Empfehlungen der DSMZ, züchteten wir alle 3 Zelllinien in DMEM-F12+ 10% FCS Kulturmedium an (*Gioanni et al. 1988, Kawamata et al. 1997, Uchida et al. 2001*).

Für Stimulationsexperimente wurden Kulturflaschen mit 1×10^6 Karzinomzellen beimpft. Nach Erreichen eines konfluenten Monolayers, wurde das Nährmedium gewechselt und mit DMEM-F12 ohne FCS für 24h ersetzt. Die Experimente wurden über einen Zeitraum von 72h durchgeführt.

Für die Stimationsversuche wurden 25mg BS in 100µl DMSO angelöst. Dieses „Anlösen“ ist aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der BA notwendig. Erst dann ist ein weiteres Lösen in Aqua bidest bis zur Endkonzentration möglich. Dadurch wurde der DMSO Gehalt vernachlässigbar gering und das schrittweise Lösen verhinderte eine Ausfällung der BS. Die geeignete BS-Konzentration 3µg/ml wurde in Anlehnung an bereits publizierte Daten von *Thurnher et al. 2003* ermittelt. Unsere Voruntersuchungen bestätigten, dass nach einer

Behandlung mit 3µg/ml mehr als 50% der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle überlebten. Bei höheren Konzentrationen wie z.B. 8µg/ml ging das zelluläre Überleben auf bis zu 15% zurück und die Zellen lösten sich innerhalb der ersten 24h vom Flaschenboden ab.

Nach jeweils 24h, 48h und 72h wurden die Zellen mit dem Zellschaber geerntet und die gesamt-RNA mit Trizol Reagent® (Fa. Gibco, München, Deutschland) extrahiert, aufgereinigt, vermessen und in cDNA transkribiert. Die mRNA-Expression von CD97 und CD55 wurde quantitativ untersucht (Q-RT-PCR).

Im Rahmen der immunzytochemischen Analyse entschieden wir uns für eine direkte Kultivierung der Zellen auf sterilisierten Superfrost Objektträgern.

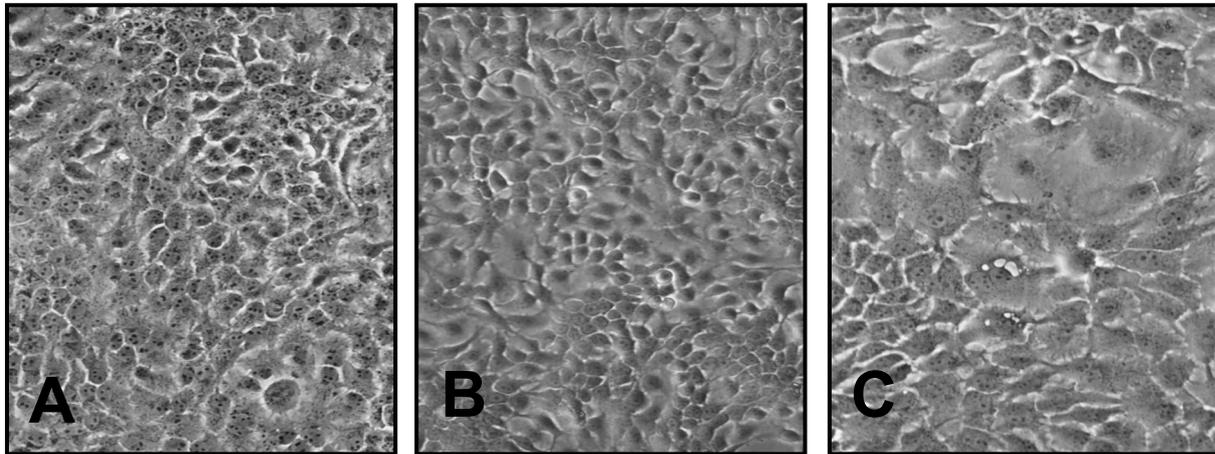


Abb.4: Plattenepithelkarzinomzelllinien **A-** BHY, **B-** Cal33 und **C-** Cal27 unter Kulturbedingungen mit DMEM-F12 + 10% FCS. Alle Zellen sind polygonal bis rundlich geformt und bilden einen Monolayer. BHY sind hochdifferenzierte Karzinomzellen (G1), die sich deutlich in der Größe von den mäßig differenzierten Cal33 (G2) und niedrig differenzierten Cal27 (G3) Zellen unterscheiden (Phasenkontrastmikroskopie x20).

Tab.2: Mundhöhlenkarzinomzelllinien

Zelllinie	Primärtumor und Grading	Kulturmedium	Herkunft
BHY	Oberkieferkarzinom, G1	DMEM-F12 + 10% FCS	DSMZ
Cal33	Zungenkarzinom, G2	DMEM-F12 + 10% FCS	
Cal27	Zungenkarzinom, G3	DMEM-F12 + 10% FCS	

3.3 RNA-Präparation

Die tiefgefrorenen Gewebe wurden im Dismembrator (Fa. Braun, Deutschland) unter sterilen Bedingungen pulverisiert und in ein steriles Eppendorf-Tube überführt. Durch Zugabe von Trizol Reagent® (Fa. Gibco, Deutschland) löste sich das Gewebepulver auf (ca. 200µl Trizol/ 100mg Gewebepulver). Anschließend erfolgte der Zusatz von 200µl Chloroform und die Mischung durch kräftige Schüttelbewegungen für 10sec. Nach einer Inkubationszeit von 5min wurden die Proben für 10min bei 12.000rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Überführung der obersten, klaren Flüssigkeitsphase in ein neues Probenröhrchen und Zusetzen von 500µl Isopropanol, kam es zur Fällungsreaktion. Die Ausfällung der gesamt-RNA lief für 10min bei Raumtemperatur ab. Diesem Arbeitsschritt schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 12.000rpm für 10min bei 4°C an. Dabei setzte sich das RNA-Pellet ab. In 75%igem Ethanol wurde das Pellet in zwei Reinigungsdurchläufen gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und je nach Größe in 20µl- 100µl RNAase freiem Wasser bei 60°C in ca. 10 min gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte am UV-1602® Photometer (Fa. Shimadzu, Japan) bei 260nm. Zur photometrischen Vermessung wurde 1µl der RNA in 100mM TrisHCL gelöst (1:100). Die Konzentrationswerte dienten der Berechnung des Volumens, in dem 1µg RNA enthalten sind, denn 1µg RNA sollte die Ausgangsmenge für die reverse Transkription sein. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die RNA-Proben bei -80°C zwischengelagert.

3.4 Lasermikrodissektion

Die Methode der UV-Laser gestützten Mikrodissektion eignet sich besonders für die berührungslose und kontaminationsfreie Isolation von gesunden und malignen Zellen eines histologischen Präparates zum Zwecke der Genexpressionanalyse (*Irié et al. 2004*). Der Einsatz eines gepulsten UV-Lasers basiert auf dem Prozess der ablativen Photodekompensation. Der UV-Laser kann Gewebeareale eines histologischen Präparates ohne Hitzekauterisierung fein ausschneiden und durch einen Energieimpuls Zellen vom Objektträger in einen Auffangbehälter katapultieren (Abb.5). Über die Kopplung des mikroskopischen Arbeitsprozesses an den Computer ist eine visuelle Kontrolle und genaue Steuerung des Dissektionsprozesses möglich. Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde die Lasermikrodissektion mit dem PALM® Laser Pressure Catapult (LPC) System® durchgeführt. Über die Software PalmRobo® 1.0 (Fa. Palm Microlaser®, Deutschland) wurde der UV-Laser gesteuert und alle prozessrelevanten Parameter eingestellt (*Schutze et al. 2000*). Diese präzise und sehr zeitaufwändige Methode der Lasermikrodissektion, wurde

bereits im Rahmen von Forschungsprojekten der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angewendet (*Mustafa et al. 2004, 2005*).

Unter RNAase freien Bedingungen wurden 12µm dünne Gefrierschnitte auf die Objektträger mit sterilisierter Polyethylenfolie aufgebracht (Fa. Palm Microlaser®, Deutschland). Alle Gewebeschnitte wurden mit HE angefärbt (Fa. SIGMA, Deutschland). Um die Gewinnung einer ausreichenden Menge an RNA sicherzustellen, wurden von mindestens 15 histologischen Serienschnitten eines Gewebes, Karzinomareale mit PE-Folie ausgeschnitten und katapultiert. Die Flakes wurden in einem mit 10µl DEPC-H₂O befeuchteten, sterilisierten Auffangkäppchen (Fa. Palm Microlaser®, Deutschland) aufgefangen und für 15min bei 12000rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von Trizol® (Fa. Gibco, Deutschland) wurde die RNA gemäß dem Herstellerprotokoll extrahiert.

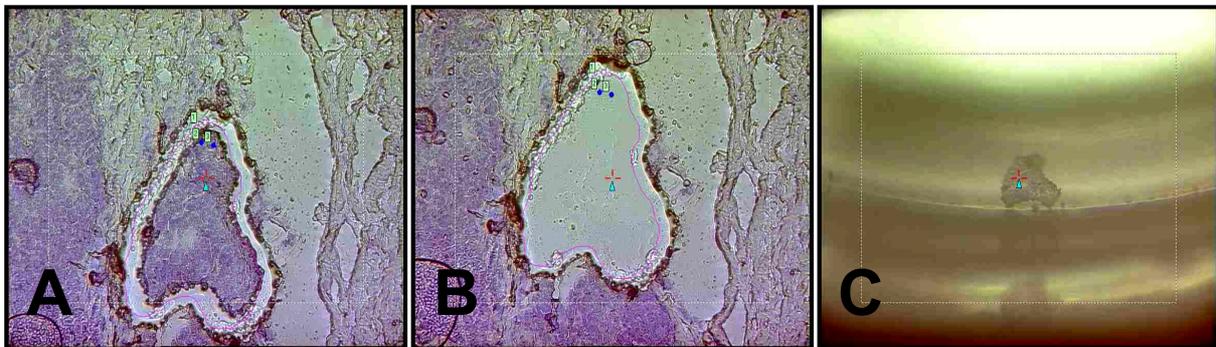


Abb.5: Methodikbeispiel Lasermikrodissektion. **A-** Das herzförmige Gewebeareal (Flake) wurde mit dem Laser entlang der interaktiv festgelegten Schnittlinie vom restlichen histologischen Präparat getrennt (x 20). **B-** Mit Hilfe eines Laserschusses, wird das Flake aus der Objektebene in ein Auffangkäppchen über dem Objektisch katapultiert. Kein Gewebe verbleibt im Dissektionsareal (x 20). **C-** Zu Kontrollzwecken kann die erfolgreiche Isolation und Vollständigkeit des Flakes im Auffangkäppchen betrachtet werden (x10).

3.5 Reverse Transkription und PCR-Ansatz

Die reverse Transkription (RT) wurde mit dem Superscript® II Kit (Fa. Invitrogen, Deutschland) durchgeführt. In 10µl DEPC-Wasser wurde 1µg RNA gelöst, bei 70°C für 3min im Thermocycler denaturiert und anschließend mit 15µl RT-Reagenz versetzt. Durch das im 25µl RT-Ansatz (15µl RT-Reagenz + 10µl RNA/ DEPC-H₂O) enthaltene Enzym Reverse Transkriptase (Superscript® II), wird das Umschreiben der RNA in die cDNA realisiert (Tab.3). Die RT Reaktion fand im Thermocycler (Fa. Biometra, Deutschland) statt. Die aus der RT-Reaktion hervorgegangene cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tab. 3: Zusammensetzung des RT- und PCR-Ansatzes

25 µl RT-Ansatz	25µl PCR-Ansatz
5,0µl 5 x RT-Puffer (Fa. Invitrogen, Deutschland)	2,5µl 10x PCR Puffer (Fa. Metabion, Deutschland)
1,0µl 12,5 mM dNTP-Mix (Fa. Invitex, Deutschland)	3µl 200µM dNTP-Mix (Fa. Invitex, Deutschland)
3,0µl 100 ng/µl Random Primer (Fa. Invitrogen, Deutschland)	0,25µl sense Primer (Fa. Metabion, Deutschland)
2,5µl 0,01M DTT (Fa. Invitrogen, Deutschland)	0,25µl antisense Primer (Fa. Metabion, Deutschland)
0,5µl RNasin 40U/ µl (Fa. Invitrogen, Deutschland)	0,2µl TaqGold Polymerase 5U/ µl (Fa. Invitrogen, Deutschland)
0,3µl Superscript® II 200U/ µl (Fa. Invitrogen, Deutschland)	2µl cDNA
2,7µl DEPC-H ₂ O (Fa. Invitrogen, Deutschland)	16,8µl gereinigtes Wasser
10µl denaturierte RNA/ DEPC-H ₂ O	

3.6 Multiplex RT-PCR

Im Rahmen der Promotion wurden ein 25µl PCR-Ansatz sowie eine Multiplex RT-PCR Methode genutzt, die sich in Forschungsarbeiten der hallischen Arbeitsgruppe bewährt hatten (*Mustafa et al. 2004, 2005*). Die Komponenten des 25µl PCR-Ansatzes (1 Probe) sind in Tab.3 aufgelistet. Durch die Multiplex RT-PCR konnten bis zu 15 Proben gleichzeitig untersucht werden. Als Normalisierungsmarker diente das house keeping gene β -actin. Unter Verwendung der TaqGold® Polymerase (Fa. Invitrogen, Deutschland) und des dNTP-Mix (Fa. Invitex, Deutschland) wurden die gesuchten Genabschnitte auf der cDNA mit spezifischen CD97 und CD55 Primern amplifiziert (Tab.4). Die Primer für CD97 (Amplifikat bei 442bp) und CD55 (Amplifikat bei 550bp) wurden in einer Konzentration von 10pMol verwendet. Für die CD97 Multiplex RT-PCR wurden die 5pMol β -actin Primer (Fa. Metabion, Deutschland) so gewählt, dass ein 608bp großes β -actin I Amplifikat entstand (Tab.4). Für die CD55 RT-PCR wurde ein β -actin Primerpaar (5pMol) gewählt, um ein größeres β -actin II Template von 802bp zu generieren. Dadurch wurde die saubere Auftrennung der Banden in der Gelelektrophorese gewährleistet (Tab.5).

Tab.4: Primer

Primer und Konzentration		Primersequenz		
CD97, 10pMol	sense	5'	ATC CTT CTC TCC TCA TTC TTC	3'
CD97, 10pMol	antisense	5'	GAT ACA CAG ACA CAG ATA AAA G	3'
β -actin I, 5pMol	sense	5'	GTT GGT GGA GCG ATT TGT CTG G	3'
β -actin I, 5pMol	antisense	5'	AGG GCA GGG ACT TAA TCA ACG C	3'
CD55, 10pMol	sense	5'	TCA GAG CAC AGA TAC CCA G	3'
CD55, 10pMol	antisense	5'	ACA GCC GCC TAA GTC AC	3'
β -actin II, 5pMol	Sense	5'	ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG	3'
β -actin II, 5pMol	antisense	5'	CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC	3'

Als Positivkontrolle für CD97 wurde die Kolonkarzinomzelllinie Caco verwendet, die sehr stark CD97-mRNA exprimiert. Für CD55 diente humanes Tonsillitisgewebe als Positivkontrolle. Nach Ablauf der PCR Reaktion wurden die Proben mit 5µl Stopplösung versetzt. Von jeder Probe wurden 20µl auf ein 1%iges Agarosegel (Fa. PeqLab, Deutschland) aufgetragen. Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurde dem Gel Ethidiumbromid zugefügt. Die Elektrophorese in 1x TBE-Puffer dauerte bei einer Stromstärke von 55mA ungefähr 120min.

Tab.5: Amplifikatgröße, Annealingtemperatur und Zyklenzahl

Amplifikat	Amplifikatgröße	Annealingtemperatur	Zyklenzahl
CD97	442bp	67°C	35
β-actin I	608bp	67°C	35
CD55	550bp	64°C	30
β-actin II	802bp	64°C	30

Das für den Multiplex RT-PCR Prozess genutzte Programm wurde im Thermocycler abgespeichert und ist in der einprogrammierten Abfolge in der nachstehenden Tabelle aufgelistet (Tab.6).

Tab.6: Tabellarisches Multiplex RT-PCR Programmprotokoll für CD97 und CD55

CD97/ β-actin I	Zeit		Programmschritt
1.	10	min	95°C
2.	1	min	94°C
3.	1	min	Annealingtemperatur 65°C
4.	1	min	72°C (Wiederholung der Schritte 2 bis 4, 35 Zyklen)
5.	10	min	72°C
6.	max. 24	h	Kühlagerung im Thermocycler bei 6°C
CD55/ β-actin II			
1.	10	min	95°C
2.	1	min	94°C
3.	1	min	Annealingtemperatur 60°C
4.	1	min	72°C (Wiederholung der Schritte 2 bis 4, 30 Zyklen)
5.	10	min	72°C
6.	max. 24	h	Kühlagerung im Thermocycler bei 6°C

Die Agarosegele der RT-PCR wurden an der Kodak Image Station® 440CF gescannt und gespeichert (Fa. Eastman Kodak, USA). Die Auswertung der Banden erfolgte durch Analyse der Grauintensität mit der Software Digital Science 1D 3.0.2® (Fa. Eastman Kodak, USA). Alle Probenbanden wurden auf die Grauintensität des β-actin I bzw. β-actin II Templates

normalisiert. Die Banden der Positivkontrollen Caco und Tonsillitisgewebe wurden als Referenzexpression (100%) definiert und mit den Banden der Gewebeproben verglichen (Tab.7).

Tab.7: PCR-Auswertungsparameter

	Expressionsgrad	Verhältnis zur Positivkontrolle K+
-	keine Expression	< 25% der Intensität
+	schwache Expression	25- 50% der Intensität
++	mäßige Expression	> 50- 75% der Intensität
+++	hohe Expression	> 75% der Intensität

3.7 Q-RT-PCR

Mit Hilfe der Q-RT-PCR wurden die mRNA-Expressionslevel in den mikrodisezierten Gewebearealen und in den mit Betulinsäure behandelten Karzinomzelllinien untersucht. Die Q-RT-PCR wurde in einem Rotorgene RG2000[®] Thermozykler (Fa. LTF, Deutschland) am Institut für Medizinische Immunologie (Direktorin: Univ.- Prof. Dr. Seliger) durchgeführt. Für die Q-RT-PCR wurden 1,5µl cDNA sowie spezifische 0,5pMol CD97 und 0,5pMol CD55 Primer verwendet. Zur Fluoreszenzmarkierung der Doppelstränge wurde 0,5µl SybrGreen[®] (Fa. LTF, Deutschland) zugegeben, welches direkt mit der DNA interkaliert. Die Fluoreszenzintensität wurde mittels Laserdensitometrie vermessen. Basierend auf dem Fluoreszenzwert der Positivkontrolle und der Vermessung der SybrGreen[®] Fluoreszenz im entstehenden Amplifikat, konnten quantitative Aussagen zur Transkript-Expression formuliert werden. Fluoreszenzintensitäten unter 25% des Referenzwertes der Positivkontrolle wurden als negativ eingestuft (Tab.7).

Die Fluoreszenzintensität der SybrGreen[®] Färbung wurde nach jedem Elongationsschritt bei 82°C, durch die Rotorgene Software 4.4[®] gemessen. Zur Kontrolle des Reaktionsvorganges wurde eine Negativprobe „non template control“ (Aqua bidest) in jedem Q-RT-PCR Prozess mitgeführt. Die relative Quantifizierung (comparative quantitation mode, rel. zur Kontrolle) erfolgte mit der Rotorgene Software 4.4[®]. Die Reinheit der Amplifikate wurde mittels Schmelzkurve und Agarosegelelektrophorese überprüft.

Die Signifikanz der Q-RT-PCR Ergebnisse wurde über den t-Test und nach Mann-Whitney mit SigmaPlot 8.0[®] und SPSS 11.0[®] (Fa. SPSS, USA) ermittelt. Die p-Werte sind in Box Plot Diagrammen aufgetragen (Abb.8 und Abb.9).

3.8 Immunhistochemie und Immunzytochemie

Das immunhistochemische Arbeitsprotokoll wurde bereits im Rahmen der Publikationen von *Mustafa et al. 2004, 2005* vorgestellt. Die Gewebeschnitte und die Karzinomzellen wurden auf Superfrost Plus® Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgebracht und nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (LSAB-Kit®, DAKO, USA) mit monoklonalen CD97 und CD55 Antikörpern immunhistochemisch für 1h bei 37°C inkubiert (*Mustafa et al. 2004, 2005*). Für den immunhistochemischen Nachweis der Antigene kamen die in Tab.8 aufgeführten monoklonalen Primärantikörper zur Anwendung (Tab.8).

Tab.8: Monoklonale Antikörper. Klon, Ig-Subklasse und spezifische Verdünnung für die Immunhistochemie (IH) und die Durchflusszytometrie (FCM).

Antikörper/ Klon	Ig-Subklasse	Verdünnung	Vertrieb
anti human CD97/ mem180	IgG1	1:100 IH, 1:100 FCM	Fa. Biermann, Deutschland
anti human CD55/ 143- 30	IgG1	1:150 IH, 1:20 FCM	Fa. BD Biosciences, Deutschland

Um alle Schnitte einer standardisierten immunhistochemischen Reaktion auszusetzen, wurden die Objektträger in Cover Plate® Kapillarspalthalterungen (Fa. Dako, USA) fixiert. Der ca. 100µm breite kapilläre Spalt zwischen Cover Plate® und histologischem Schnitt gewährleistet den gleichmäßigen Durchfluss der Reagenzien. Eine Austrocknung des Präparates ist während des Färbeprozesses praktisch nicht möglich. Die Markierung des Primärantikörper-Sekundärantikörper-Komplexes erfolgte mit DAB (Liquid-DAB-Substrate-Chromogen System®, Fa. DAKO, USA). Der Farbstoff Hämalaun diente als Gegenfärbung (Fa. Merck, Deutschland). Die immunhistologischen Präparate wurden mit Aquatex® (Fa. Merck, Deutschland) und Deckgläsern fixiert und 24h ausgehärtet.

Am Axioplan 2® Lichtmikroskop (Fa. Zeiss, Deutschland) erfolgte die digitale Fotografie der Immunfärbungen mit der Axio Cam® (Fa. Zeiss, Deutschland). Am Lasermikrodissektor wurde jedes immunhistochemisch gefärbte Präparat mit der PalmRobo 1.0® Software planimetrisch vermessen. Die Software ermöglicht die präzise Umrandung und Berechnung der gesamten Schnittfläche. Innerhalb des markierten Bereiches können immunhistochemisch gefärbte Flächenareale (DAB-Färbung) oder einzelne Zellkörper vermessen werden. Das Verhältnis aus angefärbten Bereichen zur Gesamtschnittfläche gibt letztlich Aufschluss über die Proteinexpression im Gewebeabschnitt. Diese Auswertungsmethode wurde bereits publiziert (*Mustafa et al. 2004, 2005*). Die Auswertung der Flächenmessungen in µm² erfolgte mit SigmaPlot 8.0® (Fa. SPSS, USA).

Die Signifikanzen wurden in Box Plot Diagrammen unter Angabe der p-Werte aufgetragen (Abb.13 und Abb.15).

Die nachfolgende Tabelle gibt Aufschluss über die Arbeitsschrittabfolge bei der immunhistochemischen Färbung (Tab. 9).

Tab. 9: Immunhistochemisches Protokoll.

Immunhistochemische Arbeitsschritte	
1.	Fixierung in kaltem Methanol mit 3% H ₂ O ₂ (4:1) bei 4°C für 20min
2.	3 x Waschen mit PBS, Fixierung der Objektträger in Cover Plates (Fa. DAKO, USA)
3.	Inkubation mit Blockserum: normales Schweineserum (Fa. DAKO, USA) 1:5 mit PBS + 1% BSA (Fa. DAKO, USA) für 5min
4.	Inkubation mit monoklonalen Primärantikörper für 60min bei 37°C (Tab.8)
5.	Abkühlen auf Raumtemperatur und 3x Waschen mit PBS
6.	Inkubation mit biotinyliertem Brückenantikörper (anti-Kaninchen, anti-Maus, anti-Ziege Immunglobulin, Fa. DAKO®, USA) für 30min
7.	Waschen mit PBS
8.	Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase für 30min
9.	Waschen mit PBS
10.	Substratreaktion, Substrat-Chromogen-Lösung (Fa. DAKO, USA) für 10min
11.	Waschen mit Aqua bidest
12.	3min Gegenfärbung mit Hämalaun (Fa. Merck, Deutschland) danach 3min Spülen mit Leitungswasser
13.	Eindecken der Objektträger mit Aquatex® (Fa. Merck, Deutschland), 24h Trocknen

Der Grad der Immunfärbung wurde in vier Gruppen eingeteilt (Tab.10).

Tab.10: Beurteilung des Immunfärbung.

Expressionsgrad	DAB- Braunfärbung
keine Expression	< 25% der umrandeten Gesamtschnittfläche
niedrige Expression	> 25%- 50% der umrandeten Gesamtschnittfläche
mäßige Expression	> 50%- 75% der umrandeten Gesamtschnittfläche
hohe Expression	> 75%- 100% der umrandeten Gesamtschnittfläche

3.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FCM, Flow Cytometry) eignet sich für die Analyse einzelner fluoreszenzmarkierter Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Die Methode beruht auf dem Funktionsprinzip der quantitativen Fluorochromierung und der hydrodynamischen Fokussierung.

Die im Rahmen der Promotionsarbeit untersuchten Plattenepithelkarzinomzellen wurden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) fluoreszenzmarkierten CD97 (1:100) und CD55 (1:20) Antikörpern angefärbt (Tab.8). Das Emissionsmaximum für FITC liegt bei 515nm und für PE bei 580nm. Die Durchflusszytometrie der stimulierten und unstimulierten Plattenepithelkarzinomzellen erfolgte mit dem FACScan[®] Durchflusszytometer (Fa. Becton Dickinson, Deutschland) in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Astrid Kehlen vom Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität. Die Zellen wurden nach 24h, 48h und 72h Stimulation vom Kulturflaschenboden mit Trypsin abgelöst und zweimal in PBS gewaschen. Nach dem Festlegen einer Grenze zur Eigenfluoreszenz (Isotyp) erfolgte die Auswertung. Von jeweils 10.000 behandelten Zellen wurde das Vorwärtsstreulicht, das Seitwärtsstreulicht sowie die Fluoreszenz 1 (FITC, grün) und die Fluoreszenz 2 (PE, rot) gemessen. Aufgrund der Fluoreszenzanregung des FITC bzw. PE Farbstoffs, emittierte jede Karzinomzelle ein Lichtsignal proportional zur gebundenen Fluorochrommenge. Die Lichtemission wird in einem Photomultiplier verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die Analyse der Messergebnisse erfolgte mit der Lysis-II-Software[®] (Becton Dickinson, Deutschland). Im Histogramm wurde die relative Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl visualisiert, aufgetragen und eine Verteilungskurve (mean fluorescence) erstellt.

Die Expressionsergebnisse wurden in SigmaPlot 8.0[®] verarbeitet und als Balkendiagramme grafisch dargestellt (Abb.17). Die Signifikanz wurde mit dem t-Test und nach Mann-Whitney in Zusammenarbeit mit Dr. Carsten Sekulla von der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Multiplex RT-PCR

4.1.1 CD97-mRNA

Die Multiplex RT-PCR Untersuchungen wurden an allen 78 Mundhöhlenkarzinomgeweben und 3 Kontrollgeweben gesunder Mundschleimhaut durchgeführt. In allen untersuchten Gewebeproben wurde CD97-mRNA nachgewiesen (Abb.6). In gesunder Mundschleimhaut waren sehr schwache CD97-Transkripte nachweisbar. Ausgedehnte Karzinome mit pT3/4-Status exprimierten CD97-mRNA deutlich stärker als pT1-Karzinome. CD97-mRNA war mäßig bis stark in pT2-Karzinomen detektierbar (Tab.11).

Hochdifferenzierte G1-Karzinome exprimierten CD97-mRNA schwach bis mäßig. Im Unterschied zu den G1-Karzinomen ließ sich in G2-Karzinomen CD97-mRNA mäßig bis stark nachweisen. Niedrig differenzierte G3- und undifferenzierte G4-Karzinome exprimierten CD97-mRNA am stärksten und zeigten dementsprechend starke Banden (Tab.12).

Karzinome mit pN0-Status exprimierten CD97-mRNA signifikant schwächer ($p < 0,05$) als Mundhöhlenkarzinome mit Lymphknotenmetastasen (pN1/2). Im Rahmen der Multiplex RT-PCR Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der CD97-mRNA Expression zwischen Karzinomen mit N1 oder N2 Status festgestellt werden (Tab.13).

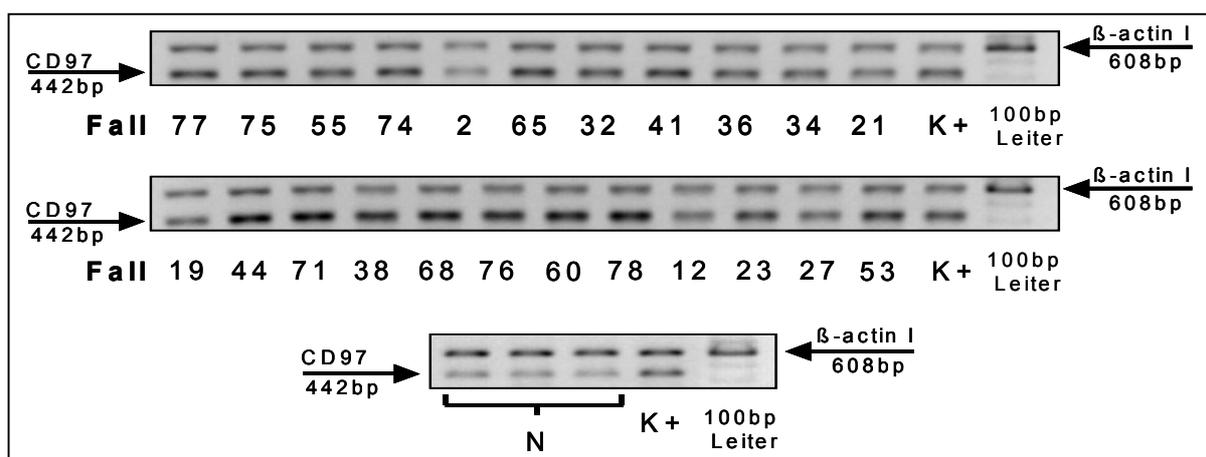


Abb.6: CD97-mRNA Expression in Karzinomen und gesunder Mundschleimhaut (N). Die Banden des β -actin I bei 608bp dienen als interne Kontrolle. Große Karzinome (z.B. Nr.75) oder undifferenzierte Karzinome (Nr.77 und 78) exprimierten CD97-mRNA deutlich stärker als kleine oder gut differenzierte Karzinome (z.B. Nr.2 und Nr.12). In normaler Mundschleimhaut wurden schwache CD97-Transkripte detektiert.

Tab.11: CD97-mRNA Expression im Verhältnis zum T-Status. In pT3- und pT4-Karzinomen waren starke CD97-Transkripte nachweisbar. (signifikant = grau hinterlegt)

Expressionsgrad	T1 (n=16)	T2 (n=18)	T3 (n=8)	T4 (n=36)
-	-	-	-	-
+	9	4	-	2
++	5	8	2	5
+++	2	6	6	29

Tab.12: CD97-mRNA Expression im Verhältnis zum Grading. G1-Mundhöhlenkarzinome exprimierten CD97-mRNA schwach bis mäßig. In den meisten G2-, G3- und allen G4-Karzinomen wurde CD97-mRNA stark exprimiert. (signifikant = grau hinterlegt)

Expressionsgrad	G1 (n=23)	G2 (n=33)	G3 (n=20)	G4 (n=2)
-	-	-	-	-
+	12	3	-	-
++	9	10	1	-
+++	2	20	19	2

Tab.13: CD97-mRNA Expression im Verhältnis zum N-Status. Mundhöhlenkarzinome ohne Lymphknotenmetastasen (N0) exprimierten CD97-mRNA schwach und mäßig. In lymphogen metastasierten Karzinomen (pN1/2) wurden CD97-Transkripte überwiegend stark exprimiert. (signifikant = grau hinterlegt)

Expressionsgrad	N0 (n= 31)	N1/2 (n= 47)
-	-	-
+	15	-
++	14	6
+++	1	41

4.1.2 CD55-mRNA

CD55-mRNA wurde in allen Mundhöhlenkarzinomen exprimiert. In den untersuchten normalen Mundhöhlenschleimhautgeweben waren schwache CD55-Transkripte nachweisbar. In 56 von 78 Karzinomgeweben war eine vom pT-, pN- und G-Status unabhängig starke CD55-mRNA Expression detektierbar (Tab.14- Tab.16).

Der nachfolgend abgebildete Multiplex RT-PCR Blot verdeutlicht, dass sich die β -actin II Banden bei 802bp ausreichend weit von den CD55 Banden bei 550bp elektrophoretisch getrennt haben. Des Weiteren belegen die β -actin II Banden, dass alle Proben gleichmäßig aufgetragen wurden (Abb.7).

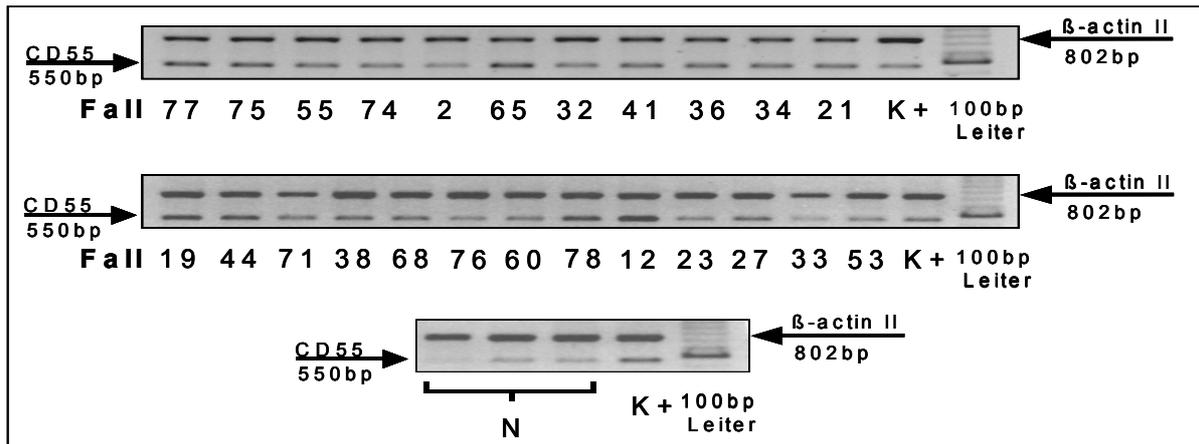


Abb.7: Multiplex RT-PCR für CD55. Expression in Karzinomgeweben, gesunder Mundschleimhaut (N) und Positivkontrolle (K+). Die meisten Karzinomproben, exprimierten CD55-mRNA stark. Dabei konnte weder die pT noch das Grading mit der CD55-mRNA Expression korreliert werden. In gesunder Mundschleimhaut waren sehr schwache CD55-Transkripte nachweisbar.

Tab.14: CD55-mRNA im Verhältnis zum T-Status. CD55-mRNA wurde in 56 von 78 Mundhöhlenkarzinomen, unabhängig vom T-Status, stark exprimiert.

Expressionsgrad	T1 (n=16)	T2 (n=18)	T3 (n=8)	T4 (n=36)
-	-	-	-	-
+	2	-	-	-
++	2	3	2	3
+++	12	15	6	33

Tab.15: CD55-mRNA im Verhältnis zum Grading. In der Gruppe der G1-Karzinome waren alle Expressionsgrade vertreten. 7 G2-Karzinome exprimierten CD55-mRNA mäßig. In den meisten G2-Karzinomen wurde eine starke CD55-mRNA Expression nachgewiesen. Die CD55-mRNA Expression war in G3- und G4-Karzinomen stark.

Expressionsgrad	G1 (n=23)	G2 (n=33)	G3 (n=20)	G4 (n=2)
-	-	-	-	-
+	2	-	-	-
++	3	7	-	-
+++	18	26	20	2

Tab.16: CD55-mRNA im Verhältnis zum Lymphknotenstatus. CD55-mRNA wurde unabhängig vom N-Status in den meisten Karzinomen stark exprimiert.

Expressionsgrad	N0 (n=31)	N1/ 2 (n=47)
-	-	-
+	2	-
++	4	6
+++	25	41

4.2 Q-RT-PCR

4.2.1 CD97-mRNA

Die Ergebnisse der Q-RT-PCR für CD97-mRNA sind in Tab.17 aufgelistet. CD97-Transkripte wurden in benignen Zellarealen signifikant schwächer als in angrenzenden Karzinomzellen exprimiert. Karzinome mit pT3/4-Status exprimierten CD97-mRNA signifikant stärker als Karzinome mit pT1/2-Status ($p < 0,05$). In Karzinomen ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) wurde signifikant weniger CD97-mRNA detektiert, als in Mundhöhlenkarzinomen mit pN1/2-Status ($p < 0,05$). Ein deutlicher Unterschied in der Expression von CD97-mRNA fand sich auch nach Auswertung des Gradings. So exprimierten G1-Karzinome CD97-mRNA signifikant schwächer als G3/4-Karzinome ($p < 0,05$). In G2-Karzinomen variierte die CD97-mRNA Expression zwischen mäßig bis stark. Es konnten keine alters- und geschlechtsspezifischen Unterschiede in der CD97-mRNA Expression festgestellt werden. Die nachfolgenden Box Plot Diagramme verdeutlichen, unter Angabe der p-Werte, die unterschiedlichen CD97-Expressionslevel in Abhängigkeit von pT, pN und Grading (Abb.8 A- D).

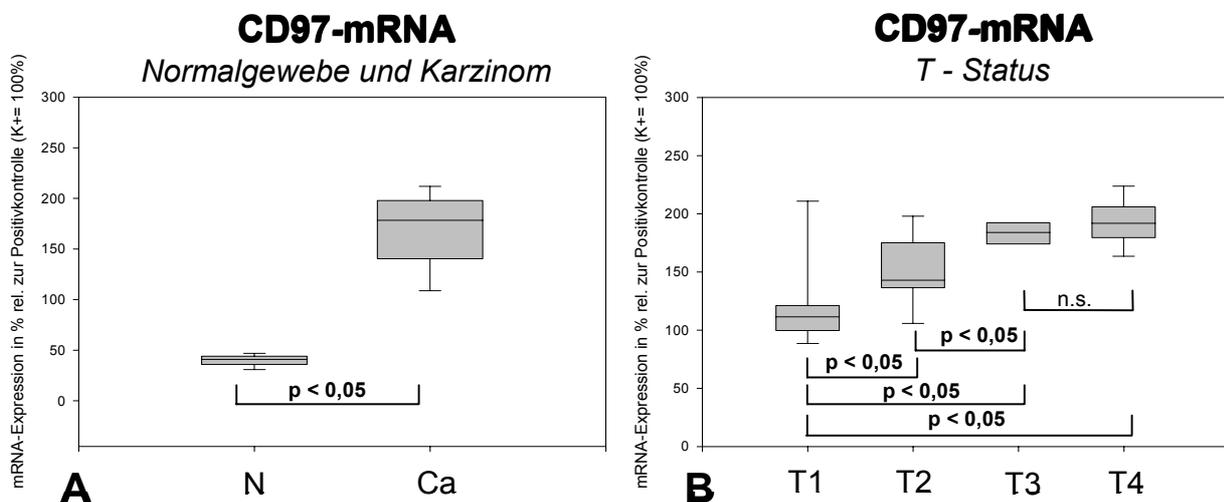


Abb.8 A- B: Box Plot der quantitativen CD97-mRNA Analyse. **A-** Signifikanter Unterschied zwischen Normalgewebe (N) und Plattenepithelkarzinomen (Ca). Die mRNA-Expression ist im Karzinomgewebe deutlich höher. **B-** Starker Expressionsunterschied zwischen T1- und T4-Karzinomen. Die Expressionslevel der T3- und T4-Karzinome unterscheiden sich nicht signifikant.

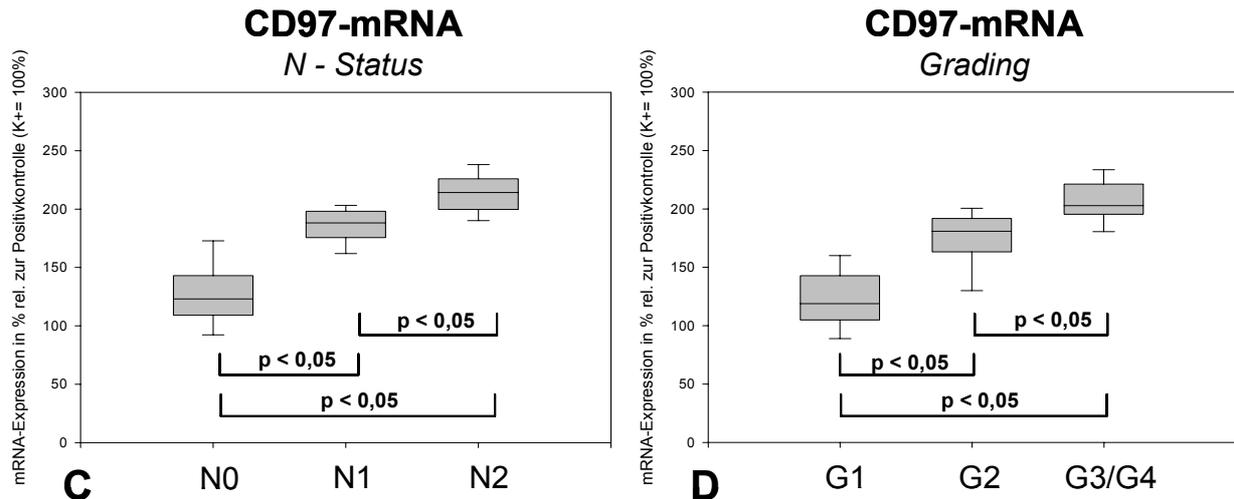


Abb.8 C- D: Box Plot der quantitativen CD97-mRNA Analyse. **C-** Karzinome mit N0-Status exprimierten signifikant weniger CD97-mRNA als Karzinome mit N1- oder N2-Status. Karzinome mit N2-Status exprimierten signifikant mehr CD97-mRNA als N1-Karzinome. **D-** Karzinome mit G3/4-Grading zeigten die höchsten Transkriptwerte. G1-Karzinome exprimierten CD97-mRNA signifikant schwächer als Karzinome mit G2-Grading.

4.2.2 CD55-mRNA

Die Ergebnisse der Q-RT-PCR für CD55-mRNA sind in Tab.17 dargestellt. CD55-mRNA wurde in allen untersuchten Proben exprimiert. Die im Normalgewebe analysierte CD55-mRNA zeigte im Unterschied zur CD97-mRNA im Normalgewebe ein deutlich variables Expressionslevel. Die niedrigsten CD55-mRNA Werte im Normalgewebe lagen unter 25% und wurden als negativ eingestuft (z.B. Fälle 9, 15 und 27). Der höchste CD55-Expressionswert im Normalgewebe lag bei 76% (Fall 45).

In allen Karzinomgeweben war die CD55-mRNA Expression signifikant höher als im gesunden Gewebe. CD55-mRNA wurde in allen Karzinomen, unabhängig vom pTNM-Status oder dem Grading, stark exprimiert. Auch bei der CD55-mRNA Expression konnte keine Abhängigkeit vom Alter oder Geschlecht der Patienten festgestellt werden. Die Box Plot Diagramme verdeutlichen diese Ergebnisse (Abb.9 A- D).

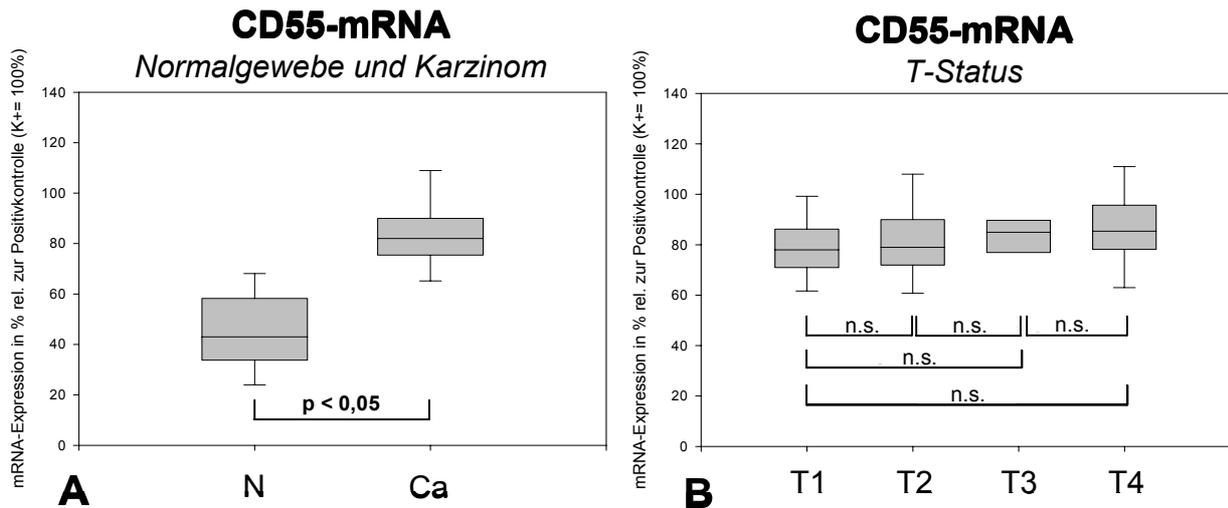


Abb.9 A- B: Box Plot der quantitativen CD55-mRNA Analyse. **A-** CD55-mRNA wurde im Normalgewebe signifikant weniger exprimiert als in den untersuchten Karzinomen. **B-** Die CD55-mRNA Expression ist unabhängig vom T-Status in allen untersuchten Karzinomgeweben hoch. Zwischen den einzelnen T-Stadien bestehen bezüglich der CD55-mRNA Expression keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

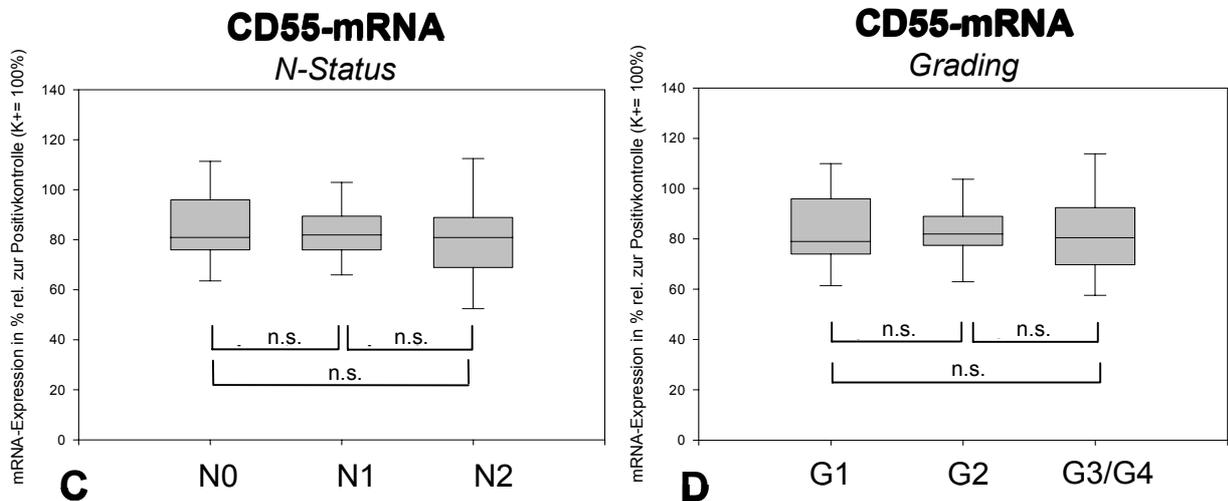


Abb.9 C- D: Box Plot der quantitativen CD55-mRNA Analyse. **C-** Anhand der CD55-mRNA Expression sind keine Rückschlüsse auf den N-Status möglich ($p > 0,05$). **D-** Des Weiteren korreliert die CD55-mRNA Expression nicht mit einem spezifischen Grading (G1/2, G3/4). CD55-mRNA wurde in allen Karzinomgeweben, unabhängig vom Differenzierungsgrad mäßig bis stark exprimiert.

Tab.17- 1: Ergebnisse der Q-RT-PCR und der Immunhistochemie für G1-Karzinome. (negative Expression= grau hinterlegt).

Fall	pTNM	Grading	N CD97-mRNA in %	N CD55-mRNA in %	Ca CD97-mRNA in %	Ca CD55-mRNA in %	Ca CD97-Protein in %	Ca CD55-Protein in %
1	T1N0M0	G1	39	38	109	74	43	64
2	T1N0M0	G1	41	24	93	84	27	71
3	T1N0M0	G1	41	34	81	78	34	99
4	T1N0M0	G1	39	33	98	96	31	64
5	T1N0M0	G1	36	36	109	61	28	75
6	T1N0M0	G1	45	36	92	62	26	69
7	T2N0M0	G1	42	19	87	93	31	89
8	T2N0M0	G1	41	26	143	57	58	60
9	T2N0M0	G1	43	34	129	75	36	68
10	T2N0M0	G1	40	42	143	79	29	79
11	T2N0M0	G1	33	65	139	132	61	76
12	T3N0M0	G1	40	67	153	112	49	66
13	T4N0M0	G1	47	41	168	79	69	70
14	T4N0M0	G1	12	24	143	84	31	81
15	T1N0M0	G1	42	19	105	77	27	91
16	T1N0M0	G1	38	41	111	90	29	89
17	T1N0M0	G1	45	34	119	70	32	66
18	T1N0M0	G1	34	53	122	78	30	87
19	T1N0M0	G1	42	51	112	107	35	60
20	T2N0M0	G1	34	27	108	102	55	90
21	T2N0M0	G1	45	50	139	71	52	83
22	T4N0M0	G1	36	49	149	82	66	79
23	T4N1M0	G1	42	65	165	97	70	81

Tab.17- 2: Ergebnisse der Q-RT-PCR und der Immunhistochemie für G2-Karzinome. (negative Expression= grau hinterlegt).

Fall	pTNM	Grading	N CD97-mRNA in %	N CD55-mRNA in %	Ca CD97-mRNA in %	Ca CD55-mRNA in %	Ca CD97-Protein in %	Ca CD55-Protein in %
24	T1N0M0	G2	9	59	114	78	34	65
25	T2N0M0	G2	33	67	141	76	54	79
26	T2N1M0	G2	42	48	161	79	56	57
27	T2N1M0	G2	47	17	176	87	67	87
28	T3N1M0	G2	40	44	187	90	67	70
29	T3N1M0	G2	41	27	199	77	79	72
30	T3N1M0	G2	39	46	181	89	67	69
31	T3N1M0	G2	43	21	188	66	60	91
32	T3N1M0	G2	45	43	172	77	67	91
33	T3N1M0	G2	38	32	181	88	82	73
34	T4N0M0	G2	39	48	164	81	55	89
35	T4N0M0	G2	44	66	179	133	53	69
36	T4N1M0	G2	42	67	192	89	63	84
37	T4N1M0	G2	33	50	167	87	76	87
38	T4N1M0	G2	44	56	186	79	79	86
39	T4N1M0	G2	39	37	163	78	86	80
40	T4N1M0	G2	45	47	189	88	90	82
41	T4N1M0	G2	41	51	198	79	70	82
42	T4N1M0	G2	48	69	182	81	67	68
43	T4N2M0	G2	37	45	202	79	92	82
44	T4N2M0	G2	47	31	192	49	68	88
45	T4N2M0	G2	44	76	224	89	87	94
46	T4N2M0	G2	39	51	189	67	77	84
47	T1N0M0	G2	47	22	114	87	32	59
48	T2N0M0	G2	38	66	142	86	33	89
49	T2N0M0	G2	44	31	123	96	55	70
50	T2N1M0	G2	47	47	148	61	76	91
51	T2N1M0	G2	47	41	175	60	66	87
52	T3N1M0	G2	42	37	194	82	83	88
53	T4N0M0	G2	31	74	174	109	67	78
54	T4N1M0	G2	39	68	211	92	81	59
55	T4N1M0	G2	48	69	184	109	88	67
56	T4N1M0	G2	41	67	192	84	83	92

Tab.17- 3: Ergebnisse der Q-RT-PCR und der Immunhistochemie bei G3/4-Karzinomen. (negative Expression= grau hinterlegt).

Fall	pTNM	Grading	N CD97-mRNA in %	N CD55-mRNA in %	Ca CD97-mRNA in %	Ca CD55-mRNA in %	Ca CD97-Protein in %	Ca CD55-Protein in %
57	T1N1M0	G3	44	40	198	68	66	69
58	T2N1M0	G3	48	38	187	73	83	87
59	T2N1M0	G3	28	35	159	66	79	94
60	T2N1M0	G3	42	23	199	75	91	93
61	T4N1M0	G3	11	78	197	107	81	97
62	T4N1M0	G3	41	73	203	91	95	62
63	T4N1M0	G3	45	60	199	132	88	67
64	T4N1M0	G3	44	43	211	97	90	79
65	T4N2M0	G3	36	40	223	54	94	87
66	T4N2M0	G3	31	30	204	38	92	91
67	T4N2M0	G3	47	65	221	109	91	89
68	T4N2M1	G3	49	69	207	78	94	93
69	T4N2M1	G3	39	52	191	89	89	88
70	T1N0M0	G3	47	33	178	79	58	84
71	T2N1M0	G3	36	41	198	82	80	67
72	T4N1M0	G3	42	33	192	69	88	61
73	T4N1M0	G3	36	42	203	78	93	68
74	T4N2M0	G3	31	49	235	116	91	90
75	T4N2M0	G3	33	55	224	88	96	66
76	T4N2M1	G3	45	35	203	70	89	78
77	T1N2M0	G4	34	58	241	83	77	71
78	T4N2M0	G4	22	29	231	87	94	88

4.3 CD97- und CD55-Immunhistochemie

4.3.1 Normalgewebeproben

Mundschleimhaut und Glandula submandibularis

Die CD97-Immunfärbung hatte im Stratum basale ihre höchste Intensität. Auch im Stratum spinosum wurden vereinzelt CD97-positive Zellnester gefunden (Abb.10 A). CD55 wurde in allen epithelialen Zellen stark exprimiert. Gefäßendothel und subepitheliale Bindegewebszellen waren positiv gefärbt (Abb.10 B). Die Drüsenazini und Ausführungsgänge der Glandula submandibularis zeigten eine starke CD97- und CD55-Immunfärbung (Abb.10 C– D). Besonders die basalen Anteile der Azini waren intensiv mit DAB gefärbt. Eine schwache immunhistochemische Anfärbung für CD55 wurde auch im Speicheldrüsenstroma detektiert.

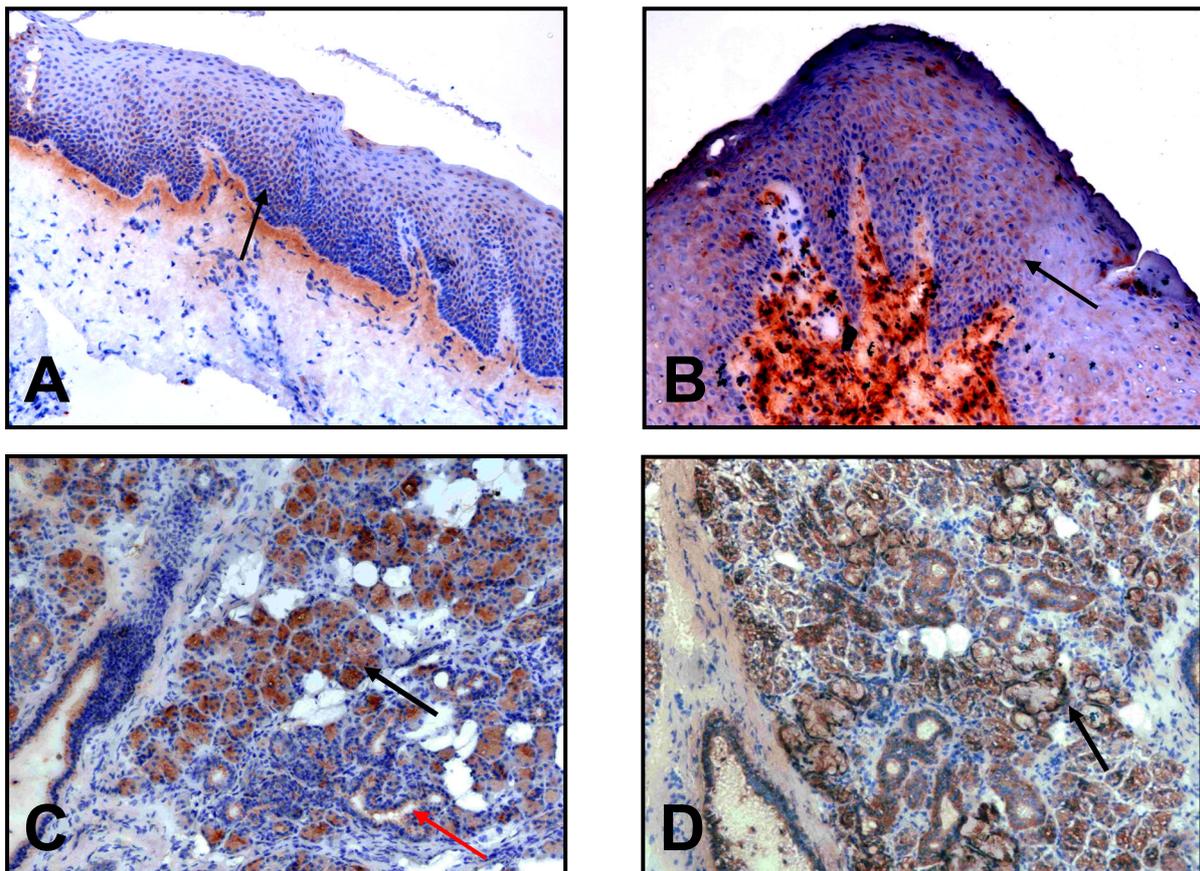


Abb.10 A- D: CD97- und CD55-Immunhistochemie an Normalgeweben: **A-** CD97 ist im stratum basale und stratum spinosum zu detektieren (↑). **B-** CD55 ist in allen Epithelschichten (↑) und im subepithelialen Bindegewebe nachweisbar. **C-** CD97 ist in den Azini (↑) und Gangepithelien (↑) der Glandula submandibularis nachweisbar. Das interstitielle Bindegewebe ist negativ. **D-** CD55 wird in der Glandula submandibularis exprimiert. Die Basalmembran ist um die mukösen Drüsenanteile (↑) stark gefärbt (Abb. A- D x10).

Haut

In gesunder Haut zeigte sich eine deutliche CD97-Immunfärbung im Bereich des Stratum basale (Abb.11 A). Einzelne Zellen im Stratum germinativum und Stratum spinosum waren ebenfalls mit DAB angefärbt. Auch in Talgdrüsen und Schweißdrüsen wurde CD97 nachgewiesen (Abb.11 C). Haarfollikelzellen und Haarbalgzellen waren ebenfalls positiv gefärbt. Die glatten Muskelzellen (M. erector pili) zeigten eine starke CD97-Immunfärbung (Abb.11 C). In CD97-positiven Zellen war eine diffus-zytoplasmatische und membranständige DAB-Anfärbung sichtbar. CD55 wurde in allen Epithelschichten der Haut detektiert (Abb.11 B). Haarfollikel, Talgdrüsen, Schweißdrüsen und Bindegewebe waren positiv angefärbt. Im Gegensatz zur CD97-Immunhistochemie waren die basalen Talgdrüsenzellen nur schwach angefärbt (Abb.11 D).

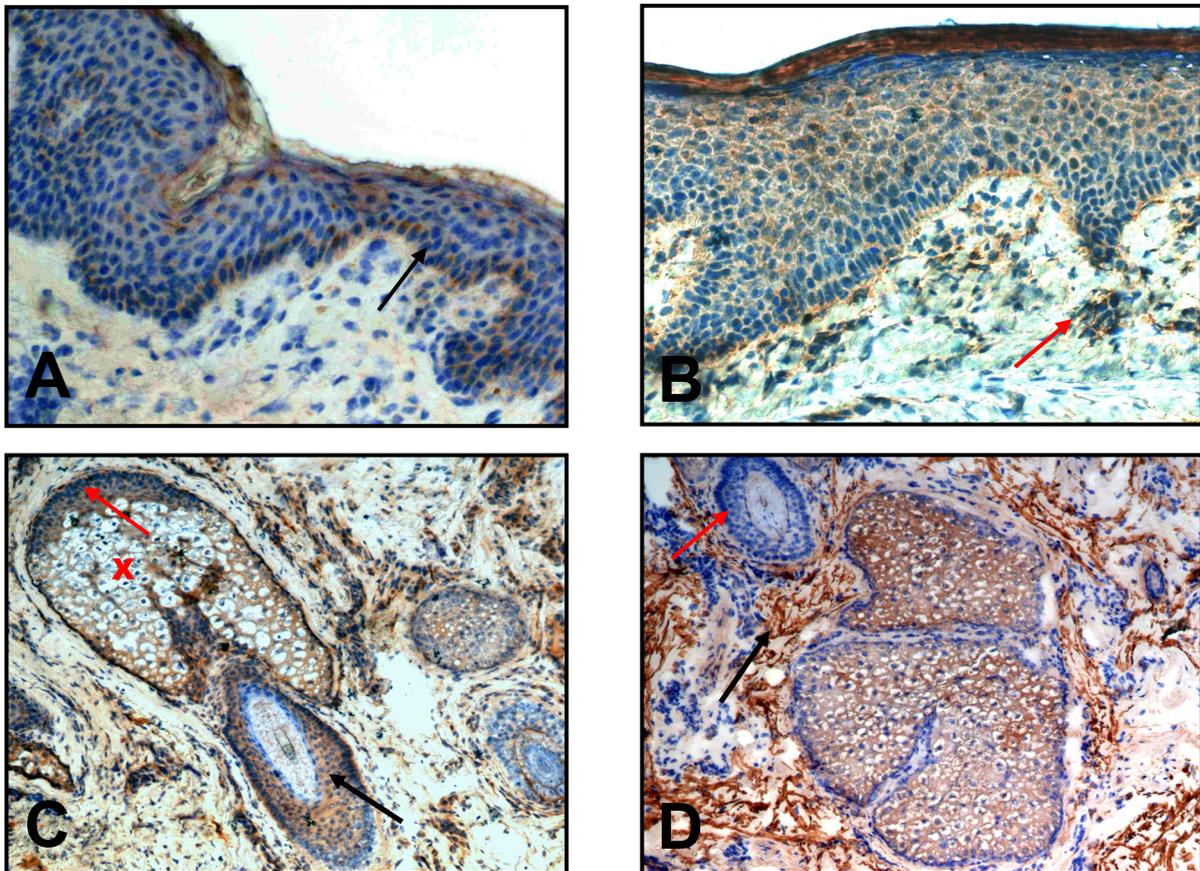


Abb.11 A- D: CD97 und CD55 in Normalgeweben: **A-** CD97 wird im Stratum basale und im Stratum spinosum der Haut exprimiert (↑). Das darunter liegende Bindegewebe ist negativ. **B-** CD55 ist in allen Epithelschichten der Haut detektierbar. Besonders stark ist die Anfärbung im Stratum corneum. Die im Corium gelegenen Bindegewebszellen sind auch CD55-positiv (↑). (Abb.11 A- B x20) **C-** CD97 ist in Haarfollikeln (↑) nachweisbar. Die basalen Talgdrüsenzellen sind stark CD97-positiv (↑). Die apoptotischen und verfetteten Zellkörper im Zentrum der Drüse sind deutlich schwächer gefärbt (x). **D-** Die CD55 Immunfärbung ist in allen Talgdrüsenzellen und im Bindegewebe nachweisbar (↑). Die Haarfollikel sind schwach positiv oder negativ gefärbt (↑). (Abb.11 C- D x10)

4.3.2 CD97-Proteinexpression in Mundhöhlenkarzinomen

Beispiele für die CD97-Immunhistochemie von Plattenepithelkarzinomen sind in den Abb. 12 A- F abgebildet.

pT1-Karzinome

Von den 16 pT1-Mundhöhlenkarzinomen zeigten 13, davon 11 G1 und 2 G2, eine schwache CD97-Immunfärbung (25%- 50%). In 2 pT1-Tumoren (G3, Fälle 57 und 70) wurde die Immunfärbung als mäßig eingestuft (50%- 75%) und 1 pT1-Karzinom (G4, Fall 77) war stark positiv (77%) gefärbt. Die Immunfärbung war membranständig und diffus-zytoplasmatisch lokalisierbar (Abb.12 A). Die in den Tumor eingewanderten Lymphozyten und Plasmazellen waren ebenfalls positiv gefärbt (Abb.12 A). Auffällig war, dass die Immunreaktivität der G1-Karzinome im peripheren Bereich der Karzinomzellnester lokalisiert war und an die epithelial-basale CD97-Expression in gesunder Mundschleimhaut erinnerte (Abb.12 B). Im verhorrenden Zentrum war die Immunfärbung schwach oder negativ (Abb.12 D).

pT2-Karzinome

In den 18 pT2-Karzinomen wurde CD97 signifikant stärker exprimiert als in pT1-Karzinomen ($p < 0,05$). Unter den 18 pT2-Karzinomen waren 5 schwach, 8 mäßig und 5 stark immunhistochemisch angefärbt. pT2-Karzinome mit einem G3 Grading oder Lymphknotenmetastasen wiesen deutlich mehr angefärbte Karzinomzellen auf, als G1-Karzinome mit pN0 Status.

pT3-Karzinome

Von den 8 pT3-Karzinomen, wurde ein Karzinom als G1 und 7 Karzinome als G2 eingestuft. Das G1-Karzinom exprimierte CD97 schwach (Fall 12). In 4 Karzinomen mit G2-Grading und Lymphknotenmetastasen konnte eine mäßige CD97-Immunfärbung nachgewiesen werden. In 3 weiteren lymphogen metastasierten G2-Karzinomen konnte eine starke CD97 Immunfärbung festgestellt werden (Abb.12 D).

pT4-Karzinome

Die pT4-Karzinome stellten den größten Anteil der untersuchten Gewebe dar. Von 4 Karzinomen mit G1-Grading waren 3 Proben mäßig und 1 Probe schwach immunhistochemisch angefärbt. In 10 G2-Karzinomen war die Immunfärbung stark. Eine mäßige Expression zeigte sich in 8 G2-Karzinomen. Eine starke braune DAB-Färbung wurde in allen G3/4-Karzinomen gefunden (Abb.12 E- F). Besonders intensive Immunfärbungen wiesen die Karzinomgewebe von Patienten mit Fernmetastasen auf.

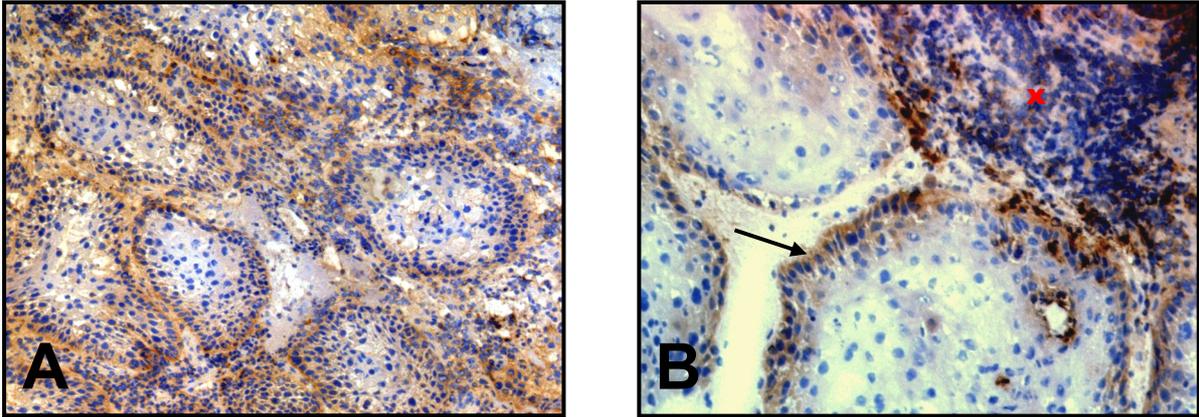


Abb.12 A- B: CD97-Immunhistochemie. **A-** Hochdifferenziertes Karzinom (Fall Nr. 13) mit positiv gefärbten Lymphozyten und positiven basalen Tumorzellen (x10). **B-** Basal gelegene Karzinomzellen (↑) und das lymphozytäre Infiltrat (x) exprimieren CD97. Im zentralen Anteil der Tumorkluster ist keine Immunfärbung nachweisbar (x40).

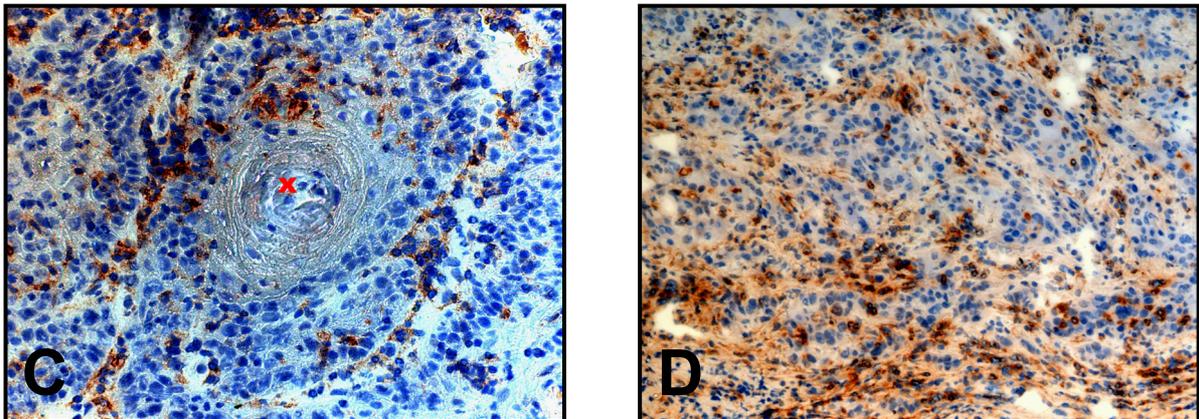


Abb.12 C- D: CD97-Immunhistochemie. **C-** Hornperle (x), um die sich nur vereinzelt CD97 exprimierende Karzinomzellen gruppieren (x40). **D-** CD97 Immunfärbung in einem mäßig differenzierten Karzinom. Die Immunfärbung ist mäßig und es fehlt eine basale DAB-Färbung wie sie für G1-Karzinome typisch wäre. Die in das Stroma eingewanderten Entzündungszellen sind stark positiv (x10).

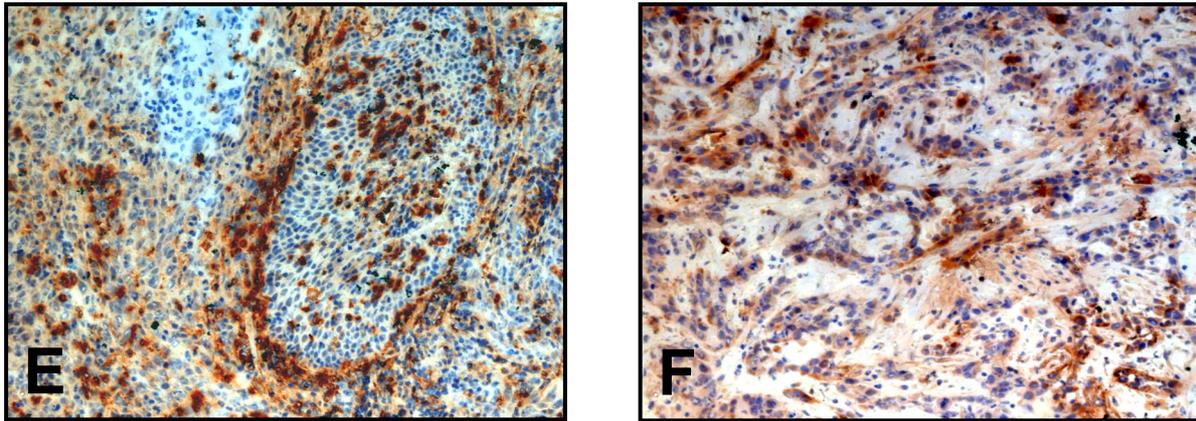


Abb.12 E- F: Starke CD97-Immunfärbung im G3/4-Karzinomen. **E-** Im Bereich um den Karzinomcluster (G3-Karzinom), ist eine intensive DAB-Färbung sichtbar (↑). Die Karzinomzellen exprimieren CD97 unterschiedlich stark (x10). **F-** G4-Karzinom mit diffus-starker CD97-Expression in den trabekulär verlaufenden Karzinomzellen (x10).

4.3.3 CD97-Protein Auswertung

Die grafische Darstellung der Ergebnisse der CD97-Immunhistochemie unter Angabe der p-Werte erfolgte mittels Box Plot (Abb.13 A- D). Die Auswertung der elektronischen Flächenberechnung ergab Prozentwerte, die mit dem Grading und Staging der Karzinome verglichen wurden. Karzinome mit pT3- oder pT4-Status exprimieren signifikant mehr CD97 als kleine pT1-Karzinome. Eine Zwischenstellung wird von pT2-Karzinome eingenommen, da der Unterschied in der CD97-Expression gegenüber den pT3- und pT4-Karzinomen nicht signifikant ist ($p > 0,05$).

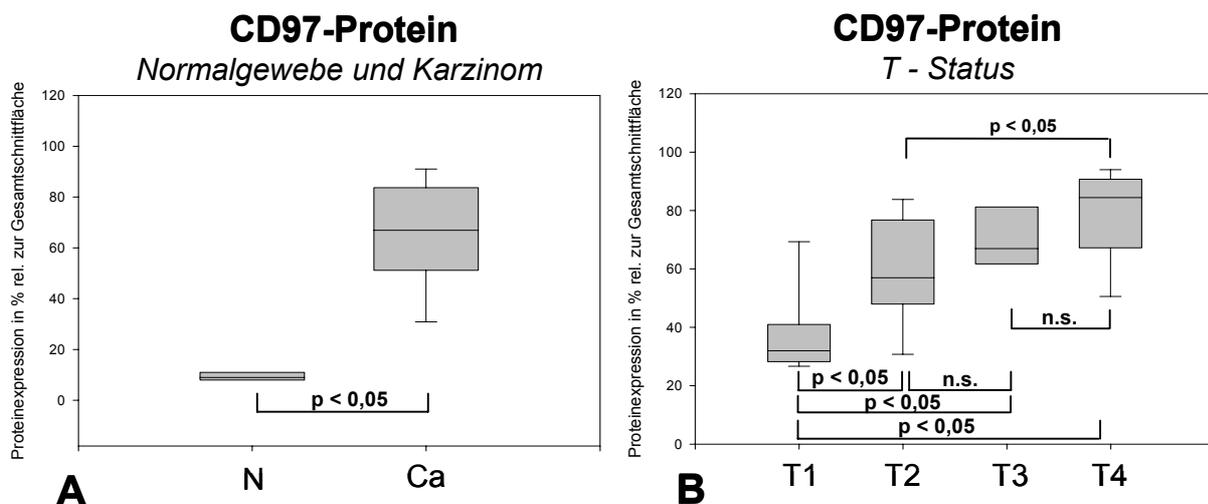


Abb.13 A- B: Box Plot der CD97-Proteinexpression. **A-** Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen der Proteinexpression in Normalgeweben (N) und Karzinomen (Ca). **B-** CD97 wird signifikant stärker in pT3/4-Karzinomen exprimiert als in pT1/2-Karzinomen.

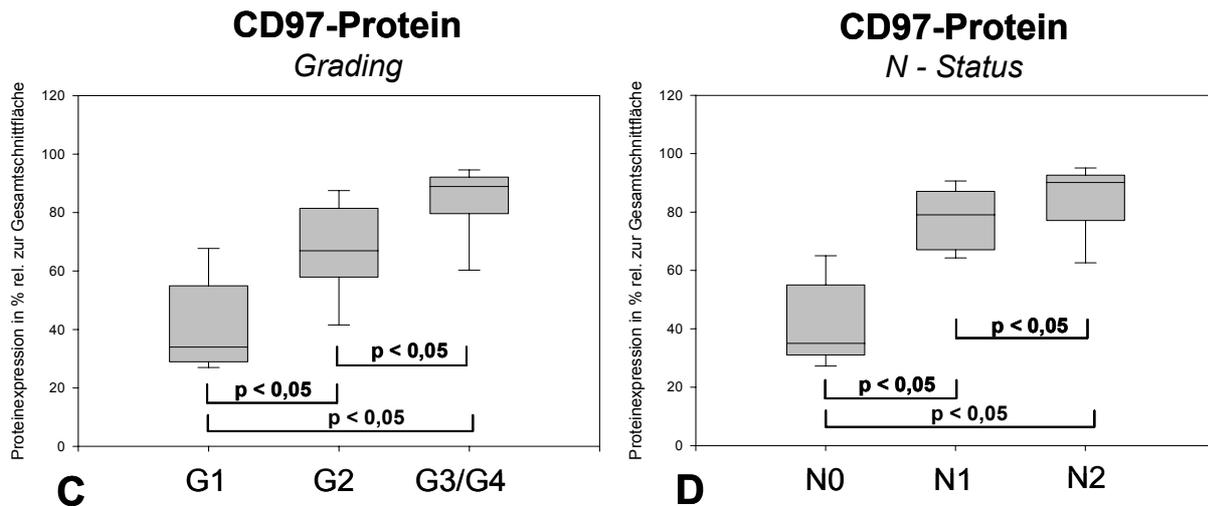


Abb.13 C- D: Box Plot der CD97-Proteinexpression. **C-** G3/4-Karzinome exprimierten CD97 signifikant stärker als G1/2-Karzinome. **D-** In lymphogen metastasierten Karzinomen (N1/2) war die CD97-Immunfärbung deutlich stärker als in N0-Karzinomen.

4.3.4 CD55-Proteinexpression in Mundhöhlenkarzinomen

CD55 wurde in allen Mundhöhlenkarzinomgeweben stark exprimiert (Abb.14 A- B). Im Gegensatz zu CD97 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Immunfärbung der pT1/2- und pT3/4-Karzinomen festgestellt werden. Des Weiteren war die Immunfärbung unabhängig vom Grading, in allen Karzinomen als stark einzustufen. Lediglich Karzinome mit einem pN2-Status hatten eine signifikant stärkere CD55-Proteinexpression als pN0-Karzinome.

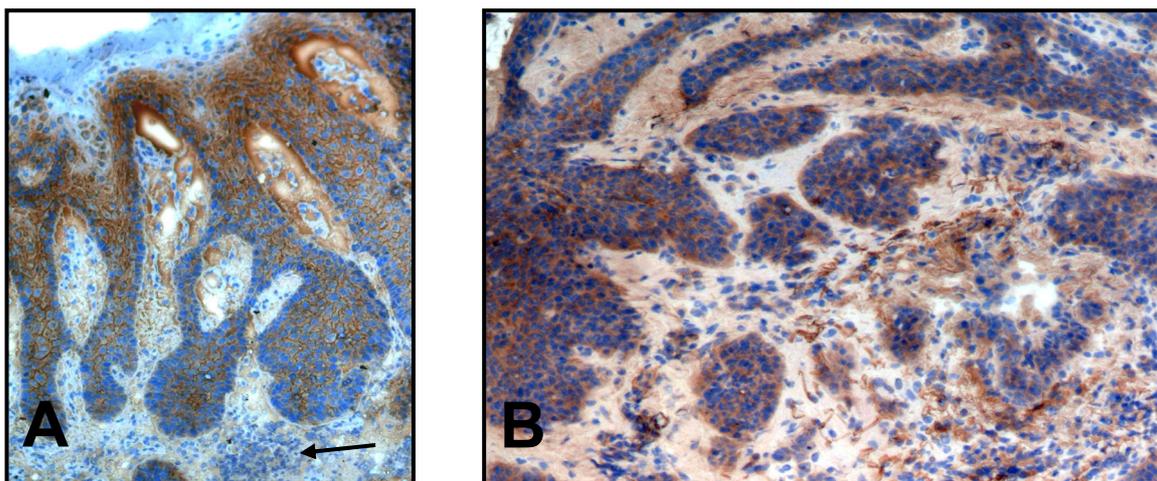


Abb.14 A- B: CD55-Immunhistochemie. **A-** Plattenepithelkarzinom pT1. Die Tumorzellen exprimieren CD55 viel stärker als normales Mundhöhlenepithel. Subepitheliale Lymphozyten (↑) exprimieren CD55 schwach (x10). **B-** Die trabekulären Karzinomstränge exprimieren CD55 stark (x10).

4.3.5 CD55-Protein Auswertung

Die Ergebnisse der laserplanimetrischen Flächenberechnung der positiv gefärbten CD55-Areale, sind nachfolgend in Box Plot Diagrammen dargestellt (Abb.15 A- D). Der jeweilige Prozentwert für den Anteil der gefärbten Zellareale pro Gesamtschnittfläche wurde mit dem Grading und Staging ins Verhältnis gesetzt. Die p-Werte sind im Diagramm aufgetragen.

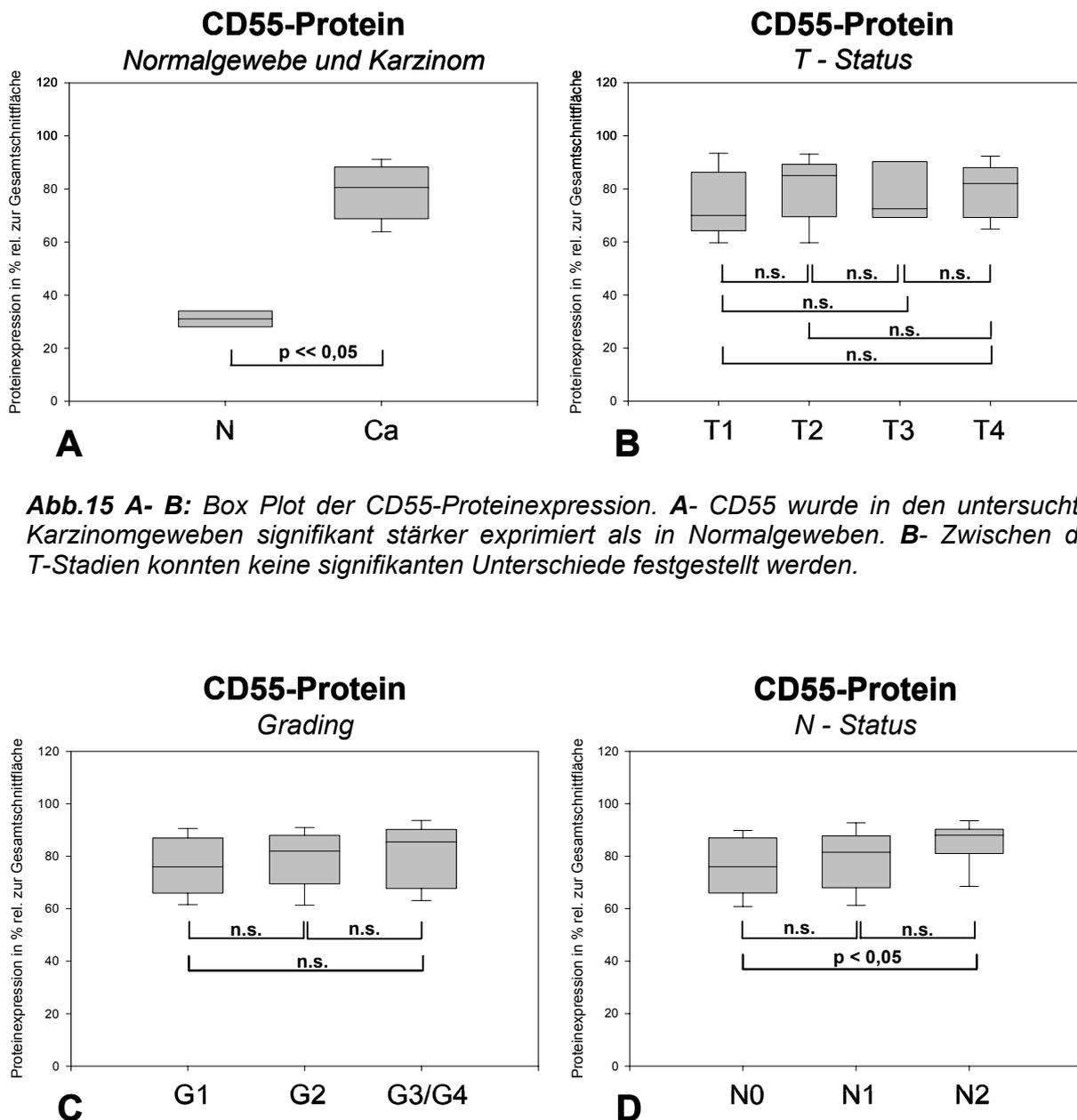


Abb.15 A- B: Box Plot der CD55-Proteinexpression. **A-** CD55 wurde in den untersuchten Karzinomgeweben signifikant stärker exprimiert als in Normalgeweben. **B-** Zwischen den T-Stadien konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Abb.15 C- D: Box Plot der CD55-Proteinexpression. **C-** Zwischen den Differenzierungsgraden bestand kein signifikanter Unterschied in der Expression von CD55. **D-** Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen N0- und N1-Karzinomen sowie zwischen N1- und N2-Karzinomen ermittelt werden. N2-Karzinome exprimierten jedoch signifikant mehr CD55-Protein als N0- Karzinome ($p < 0,05$).

4.4 Einfluss von 3 µg/ml Betulinsäure

4.4.1 mRNA-Expression

Die Q-RT-PCR Analyse der Zelllinien Cal27, Cal33 und BHY bestätigten die inhibitorische Wirkung von 3µg/ml BS auf die CD97-Transkription. In allen 3 Zelllinien betrug die CD97-Transkriptlevel weniger als 50% der unstimulierten Kontrolle. Wie die grafische Darstellung zeigt, wurde die signifikante Herabregulation ($p < 0,05$) von CD97-mRNA und eine um 46%-52% verringerte CD55-mRNA Expression in allen 3 Zelllinien nachgewiesen (Abb.16)

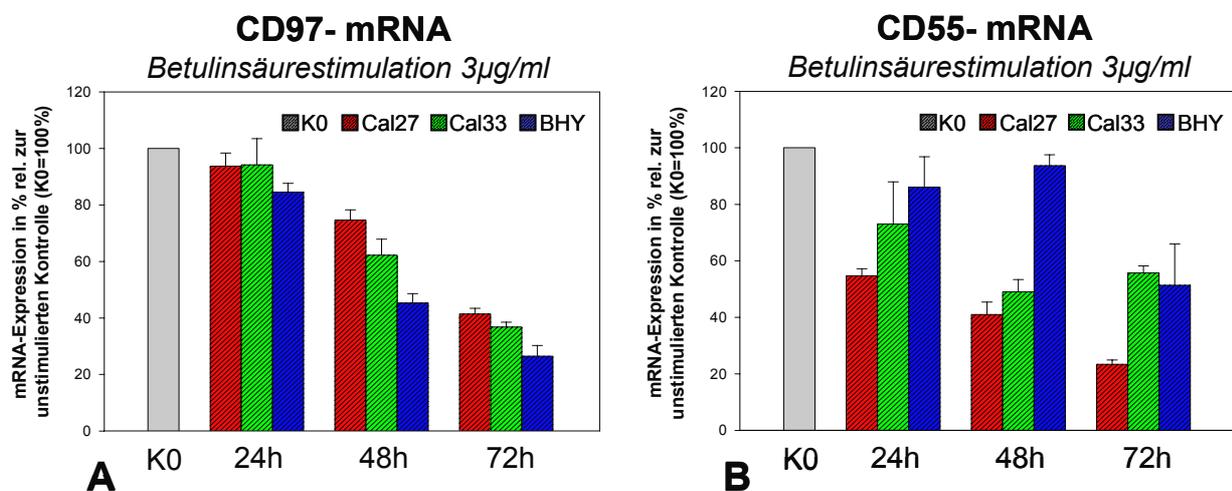


Abb.16 A- B: Ergebnisse der Q-RT-PCR. **A-** Unter dem Einfluss von BS geht die CD97-mRNA Expression in allen 3 Zelllinien signifikant zurück. In den für 72h behandelten BHY Zellen wird CD97-mRNA am deutlichsten herabreguliert. **B-** CD55-mRNA wird in Cal27 und Cal33 nach 24h, 48h und 72h herabreguliert. BS hat den stärksten Effekt in Cal27, denn die CD55-mRNA Expression beträgt nach 72h weniger als 30%. CD55-mRNA war in BHY Zellen erst nach 72h deutlich vermindert.

4.4.2 Einfluss von Betulinsäure auf die Proteinexpression

Anhand der Durchflusszytometrie wurde festgestellt, dass BS die CD97-Proteinexpression in allen stimulierten Zelllinien um mehr als 50% signifikant inhibierte. Die CD55-Proteinexpression war deutlich um mehr als 40% in allen behandelten Zellen verringert. Die CD55-Proteinexpression der Zelllinie BHY stieg nach 48h leicht über den 24h Wert an, war aber trotzdem niedriger als die unstimulierte Kontrolle K0.

In Abb.17 sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie für CD97 und CD55 dargestellt.

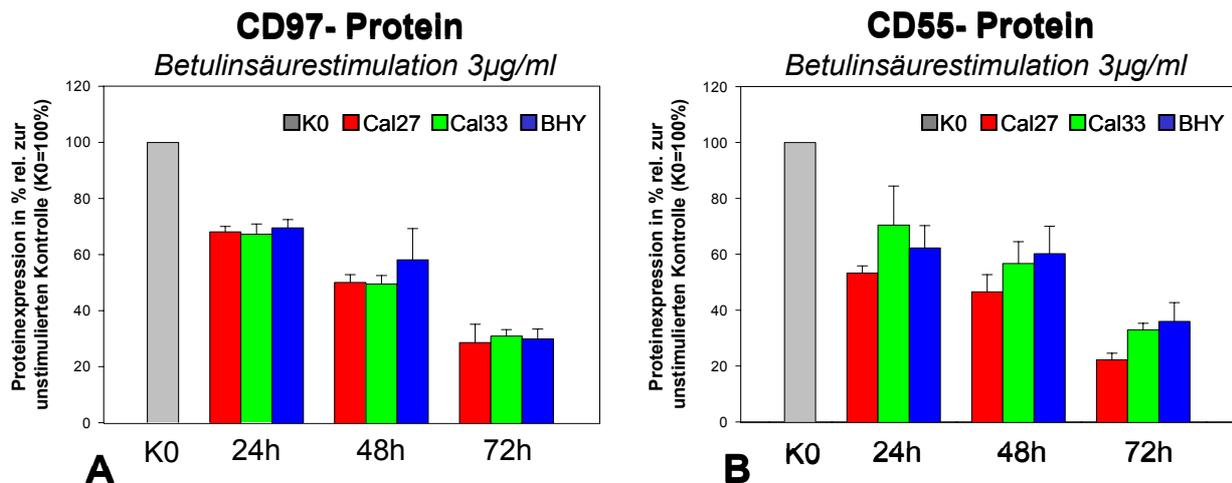


Abb.17 A- B: FCM-Ergebnisse. In allen 3 Zelllinien wird durch BS die CD55- und CD97-Proteinexpression herabreguliert. **A-** Bereits nach 24h ist die CD97-Expression in allen Zelllinien um mehr als 20% vermindert. Nach 72h ist die CD97-Expression um mehr als 60% in allen 3 Zelllinien signifikant reduziert ($p < 0,05$). **B-** BS inhibierte die CD55-Expression in Cal27 Zellen am stärksten. In der mäßig differenzierten Cal33 Zelllinie und den hochdifferenzierten BHY Karzinomzellen ist die Wirkung der Betulinsäure nach 24h und 48h nicht so effektiv wie in Cal27 Zellen. Erst nach 72h fällt auch in Cal33 und BHY das CD55-Expressionslevel unter 40% der unstimulierten Kontrollen.

4.5 Lokalisation von CD97 und CD55

4.5.1 CD97

Die mit BS (3µg/ml) behandelten Zellen unterschieden sich in der immunzytochemischen CD97-Anfärbung von den unstimulierten K0-Zellen (Abb.18). Die Zellmembran und das Zytoplasma der unstimulierten Karzinomzellen waren CD97-positiv. Im Gegensatz dazu war das Zytoplasma der behandelten Zellen diffus schwach angefärbt. Nach 24h Stunden, 48h und 72h war CD97 nur noch im Zytoplasmabereich um den Zellkern nachweisbar. Der mit DAB gefärbte Bereich schrumpfte, von einer das Zytoplasma markierenden diffusen Immunfärbung, auf ein schmales zirkumnukleäres Areal. Eine membranständige CD97-Anfärbung war nach BS-Behandlung nicht mehr sichtbar. Während der Behandlung veränderten sich die Zellen morphologisch nicht.

In Abb.18 sind die immunzytochemischen Ergebnisse nach Behandlung mit BS exemplarisch dargestellt.

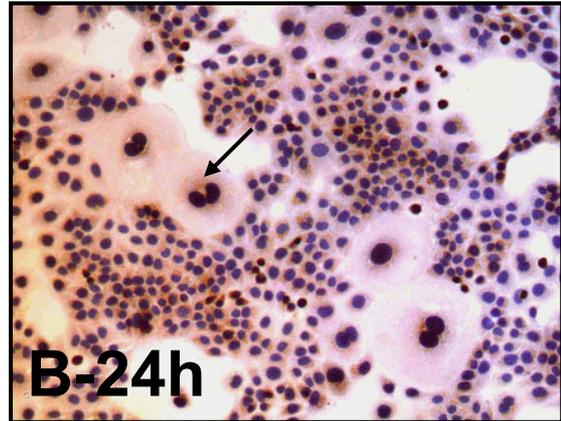
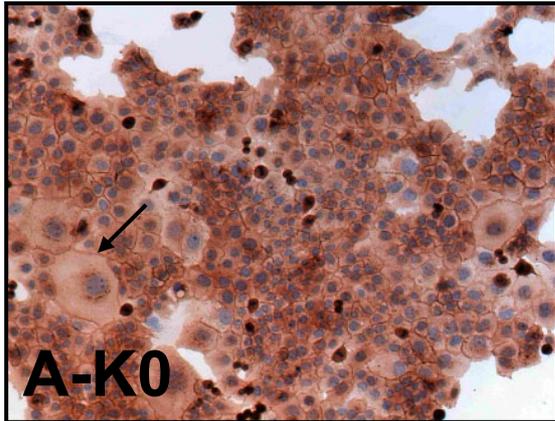


Abb.18 A- B: CD97-Immunzytochemie: **A-** CD97 ist im Zellmembranbereich (↑) und im Zytoplasma unstimulierter Cal27 Zellen (K0) nachweisbar. **B-** Nach 24h BS-Behandlung, ist keine DAB-Färbung im Bereich der Zellgrenzen mehr sichtbar. Die zytoplasmatische Anfärbung konzentriert sich auf den zirkumnukleären Bereich (↑) und ist insgesamt deutlich schwächer als in den unbehandelten Zellen. (Abb.18 A- B x20)

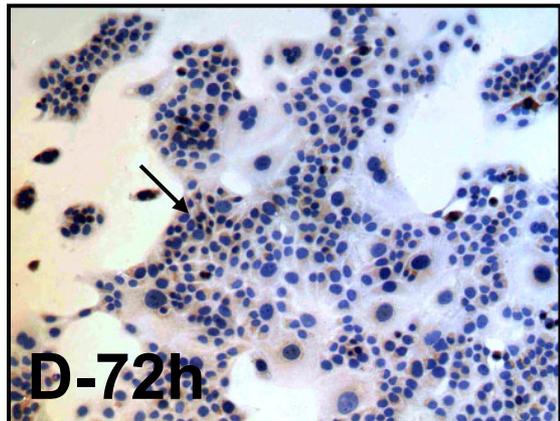
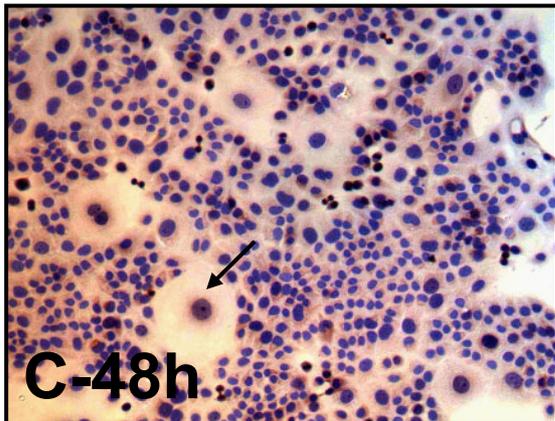


Abb.18 C- D: CD97-Immunzytochemie: **C-** Im Vergleich zu Abb.18 A, deutliche schwächere CD97-Immunfärbung in Cal27 Zellen nach 48h Stimulation mit BS. CD97 ist lediglich im Zytoplasmabereich um den Zellkern zu detektieren (↑). Die Membranfärbung ist nicht mehr sichtbar. **D-** Nach 72h Behandlung mit Betulinsäure ist CD97 nur noch in wenigen Cal27 Zellen nachweisbar (↑). (Abb.18 C- D x20)

4.5.2 CD55

CD55 wurde von allen unstimulierten Karzinomzellen (K0) stark exprimiert (Abb.19 A). Die angefärbten Zellen zeigten eine intensive DAB-Anfärbung im Zytoplasma und an der Zellmembran. In den stimulierten Karzinomzellen, lies sich eine CD55-Immunfärbung nach 24h, 48h und 72h Stimulation nur noch schwach im Zytoplasma nachweisen (Abb.19 B- D) Unter dem Einfluss von 3µg/ml BS kam es nicht zu lichtmikroskopisch sichtbaren zellmorphologischen Veränderungen.

Nachfolgend sind immunzytochemische Abbildungen mit CD55-Anfärbung nach Behandlung mit Betulinsäure exemplarisch dargestellt (Abb.19 A- D).

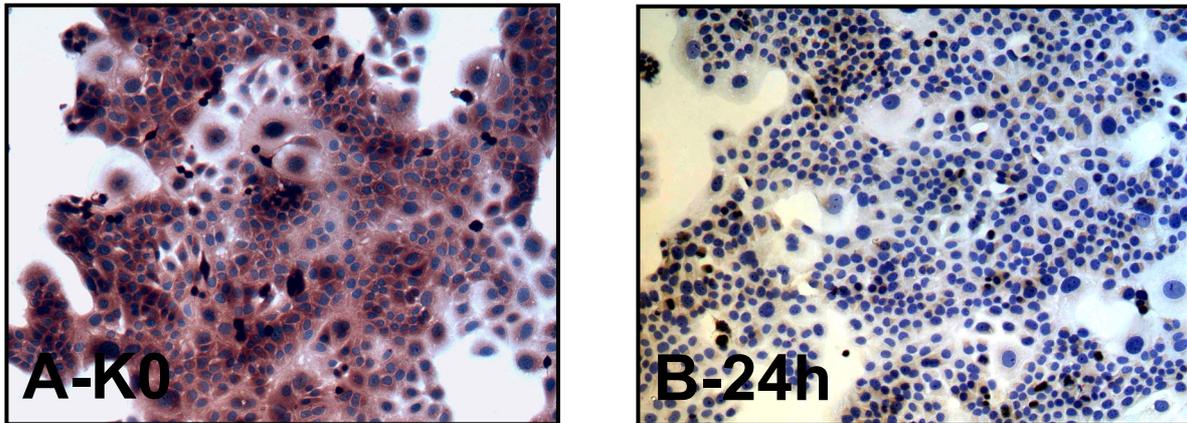


Abb.19 A- B: CD55-Immunzytochemie: **A-** Die CD55-Immunfärbung ist in unbehandelten Cal27 Zellen sehr intensiv. Die DAB-Färbung ist diffus zytoplasmatisch und reicht bis an die Zellgrenzen der Tumorzellen. **B-** Bereits nach 24h ist eine starke Abnahme der CD55-Immunfärbung sichtbar. Die DAB-Färbung ist nur noch schwach zytoplasmatisch ausgeprägt.

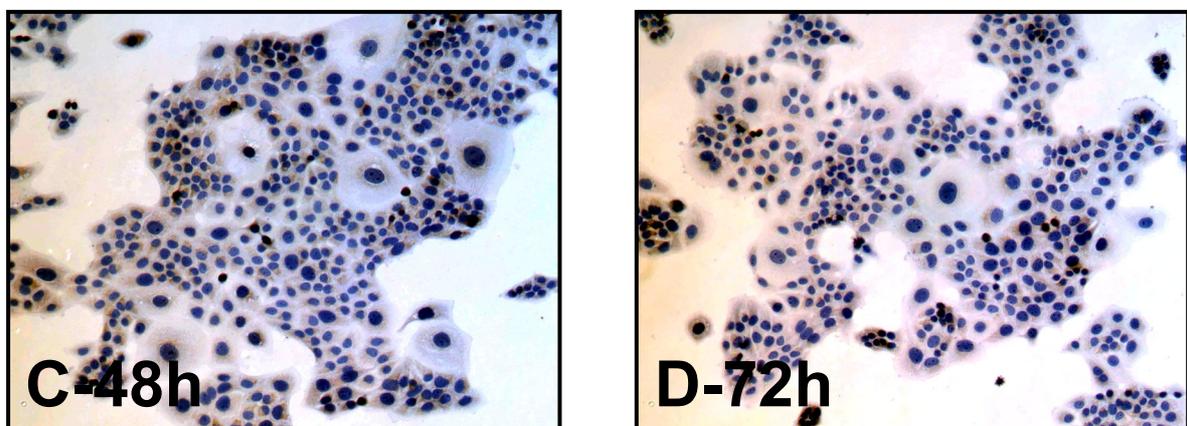


Abb.19 C-D: CD55-Immunzytochemie: **C-** Nach 48h Behandlung mit BS wird CD55 insgesamt nur schwach exprimiert. **D-** Die Intensität der immunzytochemischen Färbung auf CD55 bleibt auch nach 72h schwach. Nur vereinzelte Zellen zeigen eine deutlich DAB-Färbung.

5 Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen, dass CD97 in niedrig differenzierten Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle am stärksten exprimiert wird. Bezüglich der Expression in dedifferenzierten Karzinomen ergeben sich deutliche Parallelen zu bereits vorliegenden Erkenntnissen über die CD97-Expression in Karzinomen der Schilddrüse und des Gastrointestinaltraktes. CD97 wird in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen und dedifferenzierten Kolonkarzinomen stark exprimiert. Im Gegensatz dazu, exprimieren die hochdifferenzierten papillären oder follikulären Schilddrüsenkarzinome deutlich weniger CD97. Bei den Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle exprimierten die hochdifferenzierten Karzinome CD97-mRNA deutlich schwächer als die schlecht differenzierten G3- oder undifferenzierten G4-Karzinome. Dedifferenzierte Plattenepithelkarzinome waren deutlich stärker immunhistochemisch auf CD97 angefärbt als differenzierte Karzinome.

Aufgrund früherer CD97-Forschungen ist bereits bekannt, dass Schilddrüsenadenome (benigne) oder die Struma colloidales macro et micro folliculares CD97 nur auf Transkriptebene exprimieren. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse stellten *Aust et al. 1997*, *Hoang-Vu et al. 1999* und *Düren 2002* fest, dass CD97 entlang einer Dedifferenzierungskaskade, quasi vom benignen Adenom hin zum Karzinom, zunehmend stärker und im malignen Stadium letztlich auch auf Proteinebene exprimiert wird.

Beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle wäre, in Anlehnung an die CD97-Schilddrüsenforschung, eine Kaskade mit signifikanter Steigerung der CD97-Expression vom pT1 zum pT4 denkbar. Die Tumorgröße, der Lymphknotenstatus und das Grading spielen dabei eine entscheidende Rolle. So konnte festgestellt werden, dass die CD97-mRNA Expression mit dem pT- und pN-Status des Plattenepithelkarzinoms einhergeht. CD97 wurde von pT3/4-Karzinomen am stärksten exprimiert. Lymphogen metastasierte Karzinome exprimierten signifikant mehr CD97 als Tumore mit N0-Status ($p < 0,05$). Die schlechte Prognose, die von pT3- und pT4-Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle ausgeht, wurde bereits mehrfach in der Fachliteratur beschrieben (*Jones 1994*, *Woolgar et al. 1995*, *Sieczka et al. 2001* und *Eckardt et al. 2004*). Anhand unserer Daten können wir belegen, dass Plattenepithelkarzinome mit Status pT3/4-CD97 stark exprimieren. Da fortgeschrittene Karzinome eine riesige Tumorzellmasse darstellen, können mehrere Histotypen nebeneinander im gleichen Tumor existieren. Histologisch lässt sich der aggressivste Tumoranteil und der schlechteste Differenzierungsgrad im Bereich der Tumordinvasionsfront nachweisen (*Carter 1993*, *Ito et al. 2003*). Im Zuge der Tumorproliferation kommt es

bevorzugt zur Expansion der frontnahen Plattenepithelkarzinomanteile, die wie am Beispiel des Oesophaguskarzinoms stark CD97 exprimieren (*Aust et al. 2002*).

Die im Rahmen der Promotion erarbeiteten Daten haben deutlich gezeigt, dass in den prognostisch günstigeren Lippenkarzinomen CD97-mRNA schwächer exprimiert wird, als in Mundboden- oder Oropharynxkarzinomen. Die gute Prognose für Patienten mit Lippenkarzinomen wurde bereits in der Fachliteratur beschrieben. *Baatenburg de Jong et al. 2001* untersuchten 1396 Patienten und gaben die wahrscheinliche 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit Lippenkarzinomen mit ca. 71% an. Im Gegensatz dazu, steht die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit Mundbodenkarzinomen von 35% und mit Oropharynxkarzinomen von 36% (*Baatenburg de Jong et al. 2001*).

Die Auswertung der CD97-Immunhistochemie unterstützt die These, dass CD97 ein Dedifferenzierungsmarker beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist. Unsere Vermutung basiert einerseits auf der spezifischen Proteinverteilung in gesunden Geweben und andererseits auf dem Expressionsmuster in Plattenepithelkarzinomen.

Im Gegensatz zur Arbeit von *Jaspars et al. 2001* über die Gewebeverteilung von CD97, fanden wir eine neue und bisher unbeschriebene CD97-Expression in gesunden Geweben der Kopf-Hals-Region. Diese Diskrepanz zu *Jaspars et al. 2001* ist durch die Verwendung des neuen Antikörpers mem180 zu erklären, der sein Epitop an der stalk-Region des CD97 besitzt. Dieser Antikörper wurde von *Jaspars et al. 2001* nicht verwendet. In tumorfreier Mundschleimhaut, Oberhaut und in der Glandula submandibularis konnten wir CD97 erstmalig nachweisen. Innerhalb des Mundschleimhautepithels war CD97 im Stratum basale und Stratum spinosum nachweisbar. CD97 wurde auch in Haarfollikeln, Talg- und Schweißdrüsen detektiert.

Die Schlussfolgerung aus diesen völlig neuen Erkenntnissen ist, dass CD97 in den proliferativen Prozess der Epidermis involviert sein muss. In der Mundschleimhaut und der Oberhaut läuft in einem kontrollierten Kompartiment der Zyklus von Proliferation, Differenzierung und Zelltod ab. Basierend auf den gewonnenen Daten lässt sich vermuten, dass CD97 Teil eines embryonalen Expressionsprofils epithelialer Progenitorzellen sein könnte und deshalb in der Proliferationszone des Epithels am stärksten exprimiert wird. CD97 wurde bereits im Gangepithel des normalen Pankreas von *Aust et al. 2002* nachgewiesen. *Aust et al. 2002* wiesen auch auf die mögliche CD97-Expression in pankreatischen Progenitorzellen hin, welche im Gangepithel vermutet werden. Da zu dieser Thematik momentan noch keine weiteren Ergebnisse vorliegen, bleibt es vorerst eine Vermutung, ob CD97 zum Expressionsprofil pankreatischer Progenitorzellen gehört.

Aust et al. 2002 und *Steinert et al. 2002* berichteten, dass Oesophaguskarzinomzellen und Kolonkarzinomzellen in der Nähe der Invasionsfront CD97 stark exprimierten. In unseren Untersuchungen wurden ebenfalls starke CD97-Immunfärbungen im Bereich der Invasionsfront des Karzinoms und in Tumorzellnestern identifiziert.

Als Resultat der Karzinogenese sind Karzinomzellen immortalisiert und damit praktisch unbegrenzt teilungsfähig. Die Vermittlung von zellulärer Immortalität kann auch von GPCR ausgehen. Das in der Fruchtfliege *Drosophila* nachgewiesene Methuselah Protein (Mth) ist dem CD97 strukturell ähnlich und gehört zur Untergruppe B der GPCR. Mutationen im Mth-Gen führen zu einer Lebensverlängerung von bis zu 35% und zu einer Resistenz gegenüber oxidativem Stress bei Fruchtfliegen. Obwohl es höchst spekulativ ist, wäre eine ähnliche „lebensverlängernde“ Funktion auch für CD97 denkbar, obwohl beide Rezeptoren im extrazellulären Proteinanteil wesentliche Unterschiede aufweisen. *West et al. 2001* haben in ihrer Publikation zur Struktur der Methuselah-Ektodomäne, CD97 und Methuselah verglichen und die morphologischen Unterschiede und phylogenetische Gemeinsamkeiten beschrieben. Methuselah verfügt nicht über extrazelluläre EGF-ähnliche Domänen, sondern nur über einzelne potentielle Bindungsstellen. Auch wenn CD97 und Methuselah im extrazellulären Abschnitt Unterschiede aufweisen, ist CD97 möglicherweise auch mit lebenslanger Zellteilungsfähigkeit assoziiert.

In den von uns untersuchten Normalgeweben, lassen sich CD97-positive Zellen nur in proliferativen Epithelschichten lokalisieren. So belegen unsere Daten, dass CD97 in der Basalzellschicht der Mundschleimhaut und der Oberhaut exprimiert wird. Die immunhistochemischen Färbungen von Hautschnitten, und besonders die CD97-Anfärbung in holokrinen Talgdrüsen ist bezüglich des besonderen Sekretionstyps interessant. Holokrine Drüsenzellen gehen nach der Synthese des fetthaltigen Sekrets zugrunde. Noch bevor die Drüsenzellen ihr Talgsekret (Sebum) durch Zerplatzen entleeren, kommt es zur Kernpyknose und Apoptose. Deshalb müssen neue Drüsenzellen aus den basalen, abgeflachten und undifferenzierten Vorläuferzellen nachgebildet werden. Anhand dieses Faktes sind für uns zwei wichtige Schlussfolgerungen ableitbar. Einerseits ist klar ersichtlich, dass CD97 in normalen Zellen exprimiert wird, die eine lebenslange Teilungsfähigkeit besitzen und die Zellmauserung unterhalten. Andererseits, wird CD97 in differenzierungsfähigen Zellen (z.B. Basalzellen) stärker exprimiert, als in differenzierten Zellen.

Zusammen mit den vorliegenden Daten zur Expression von CD97 in Normalgeweben und der von *Aust et al. 2002* veröffentlichten These, dass im Drüsengangepithel des Pankreas CD97-positive Progenitorzellen existieren sollen, lassen sich Parallelen zu Karzinomzellen

konstruieren, denn auch maligne Zellen sind immortalisiert und unbegrenzt teilungsfähig. Es ist durchaus möglich, dass CD97 zu dieser Immortalisierung und Antiapoptose beiträgt.

Obwohl die für eine CD97-CD55 Interaktion notwendigen Bindungsstellen und Affinitäten *in vitro* beschrieben wurden, existieren nach wie vor keine *in vivo* Erkenntnisse, ob diese Interaktion tatsächlich für die Adhäsion von Plattenepithelkarzinomzellen und die Progression des Metastasierungsprozesses funktionell relevant ist. Unsere vorliegenden Daten zeigen, dass CD55 in Plattenepithelkarzinomen ubiquitär stark exprimiert wird. Im Gegensatz dazu, unterliegt CD97 einem vom Grading und Staging abhängigen Expressionsgrad. Dadurch reguliert sich höchstwahrscheinlich die Interaktion mit CD55. Bereits in der Veröffentlichung zur Expression von CD97 und CD55 in medullären Schilddrüsenkarzinomen schlussfolgerten wir, dass CD97 die regulierende Komponente in der Proteininteraktion mit CD55 sein muss (*Mustafa et al. 2004*). *Li et al. 2001* und *Aust et al. 2002* gingen davon aus, dass CD55 von Endothelzellen und Karzinomzellen in die extrazelluläre Matrix abgegeben wird. Dies soll für die Karzinominvasion und -expansion förderlich sein. Den CD97-exprimierenden Zellen könnte dadurch die Invasion in die extrazelluläre Matrix erleichtert werden. In unseren Untersuchungen haben wir eine schwache bis mäßige CD55-Färbung im extrazellulären Matrixkompartiment der Gewebeproben nachgewiesen und konnten die Ergebnisse von *Aust et al. 2002* anhand unseres Tumorgutes und der untersuchten Gewebe nicht bestätigen.

Innovative Therapieansätze beim Magen- und Kolonkarzinom konzentrieren sich unter anderem auf die gezielte Ausschaltung von CD55 mit monoklonalen Antikörpern. Aufgrund der hohen CD55-Proteindichte von 10^5 - 10^6 pro Karzinomzelle, bindet der CD55-Antikörper mit hoher Affinität zuerst an Karzinomzellen und führt zur Apoptose, ohne dass eine Interaktion mit normalen Zellen stattfindet. *Spendlove et al. 1999* erklären diese spezifische Wirkung mit der Tatsache, dass die CD55-Proteindichte auf gesunden Zellen mit 10^3 - 10^4 CD55-Molekülen/ Zelloberfläche wesentlich geringer ist. Da es bislang nicht zu einer Schädigung gesunder Zellen gekommen ist, wäre ein CD55-Antikörpertherapieprotokoll somit auch beim Mundhöhlenkarzinom denkbar.

Unabhängig von der Interaktion mit CD97, kann CD55 auch als bakterieller Rezeptor fungieren. Über Adhesine können Bakterien an die SCR-Module 2- 4 ankoppeln (*Lea 2002*). Die Mundhöhle ist mit Bakterien reich besiedelt (*Mager et al. 2003*). Inwieweit die SCR-Module des CD55 für eine Adhäsion von Bakterienspezies verantwortlich sind, wurde bisher noch nicht geklärt. Bakterien könnten als Markerkeime dienen, wenn sie bevorzugt pathologisch veränderte Epithelien besiedeln. Ein bekannter Markerkeim in der Gastroenterologie ist *Helicobacter pylori*, der für die Entstehung von Magengeschwüren und

Magenkarzinomen mitverantwortlich ist. Die Frage, ob es eine malignomspezifische Bakterienflora in der Mundhöhle gibt und welche dieser Keime eine Markerfunktion besitzen könnten, ist noch nicht geklärt worden. Durch eine nachweisbare spezifische Keimbesiedlung, wäre es vielleicht möglich mittelschwere oder hochgradige Epitheldysplasien oder in situ Karzinome (Tis) differentialdiagnostisch von gesunder Mundschleimhaut, einfachen Leukoplakien und simplen Entzündungszuständen ohne Probeexzision abzugrenzen. Nach wie vor ist aber die Probeexzision das Mittel der Wahl bei der diagnostischen Abklärung einer möglichen präkanzerösen oder bereits malignen Epithelveränderung.

Die erst vor kurzem veröffentlichte Arbeit von *Wang et al. 2004*, hat für CD97 α eine möglicherweise völlig neue Funktion aufgedeckt. CD97 α soll durch die Interaktion mit Integrinen die Angiogeneese im in vivo Experiment fördern. Die Daten wurden aber nicht anhand von Tumorzelllinien erhoben. Hier müssen in Zukunft unbedingt weitere Untersuchungen erfolgen, um eine mögliche Funktion von CD97 α als potentieller Mitinitiator der Angiogeneese in malignen Zellen zu beschreiben. Vielleicht sind dadurch relevante therapeutische Ansatzpunkte zu erwarten, um die Neoangiogeneese im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle gezielt zu inhibieren.

Wir konnten zeigen, dass BS die Expression von CD97 und CD55 in Plattenepithelkarzinomzellen auf mRNA- und Proteinebene signifikant inhibiert. Immunzytochemisch lies sich der Verlust einer CD97- und CD55-Membranfärbung darstellen. Nach 72h waren beide Proteine nur noch im Zytoplasma lokalisierbar. Diese Daten bestätigen die Inhibition von CD97 und CD55 durch BS. Andererseits, geben die immunzytochemischen Daten Aufschluss über die Proteinverteilung nach Behandlung mit BS. Wahrscheinlich inhibiert BS nicht nur die Transkription, sondern durch eine bisher unbekannte Funktion auch die Translation. Dies könnte erklären, warum eine zytoplasmatische CD97-Fraktion im zirkumnukleären Bereich auch nach Stimulation mit BS nachweisbar ist. Weiterhin wäre eine Blockierung der Bildung des heterodimeren Proteins theoretisch möglich, so dass membrangebundenes CD97 nicht mehr nachweisbar ist. Das zytoplasmatische CD97 α ist aber noch detektierbar und wird durch die braune DAB-Färbung des Zytoplasmas markiert.

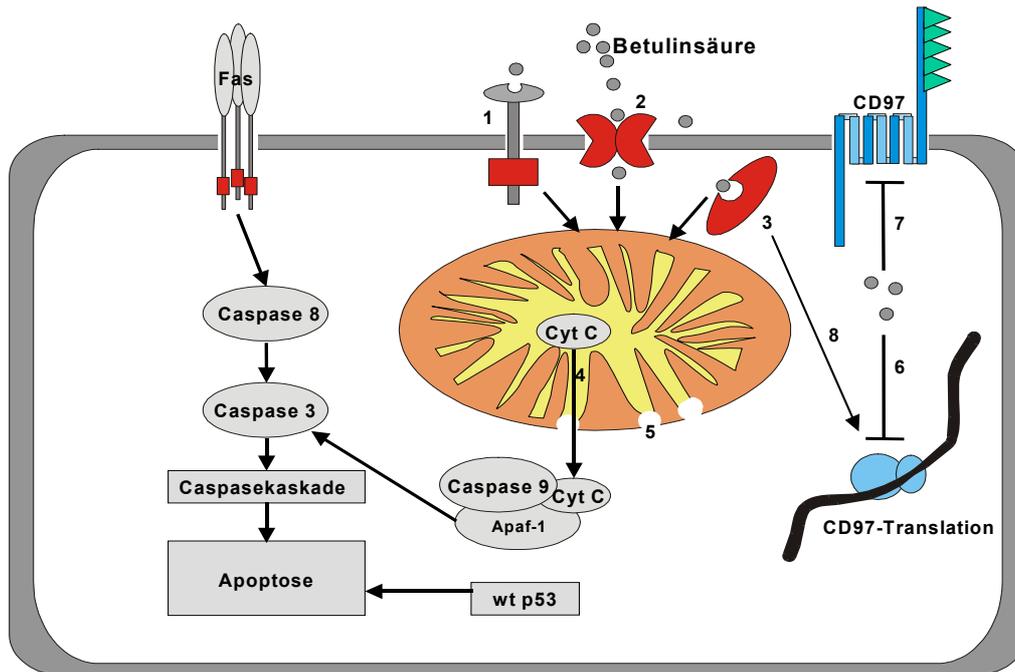


Abb.20: Apoptoseinduktion und hypothetische CD97-Hemmung durch Betulinsäure. Ob spezifische extrazelluläre Rezeptoren (1), Kanäle (2) oder intrazelluläre Rezeptoren (3) existieren, ist bisher nicht bekannt. Eine Diffusion durch die Zellmembran ist denkbar. Betulinsäure wirkt direkt auf das Mitochondrium und führt zum Austritt von Cytochrom-C (4) durch Perforation der Mitochondrienmembran (5). Es existieren keine Kenntnisse darüber, ob eine Interaktion mit einem Betulinsäurerezeptor für die CD97 Inhibition verantwortlich ist. Freie oder an einen Rezeptor gebundene Betulinsäure (8) könnte die CD97-Expression durch Störung der Translation (6) inhibieren. Posttranslational könnte die Fusionsstörung der beiden Proteinuntereinheiten CD97 α und CD97 β die Integration des Proteins in die Zellmembran hemmen (7). Unter Umgehung des Fas-Rezeptors induziert BS eine Aktivierung der Caspasekaskade und der Apoptose. (modifiziert nach Thurnher et al. 2003)

Aufgrund der CD97-Inhibition lassen die Ergebnisse vermuten, dass BS ähnlich wie in Melanomzellen, die Redifferenzierung der Plattenepithelkarzinomzellen fördert. Thurnher et al. 2003 vermuteten, dass BS an extrazelluläre oder intrazelluläre Rezeptoren bindet. Auch die Aufnahme von BS durch Ionenkanäle oder die einfache Diffusion durch die Doppellipidmembran ist aufgrund der lipophilen Grundstruktur plausibel. Über die daraus resultierenden Signalwege wird ein apoptotisches Signal zum Mitochondrium übermittelt (Abb.20). Für BS wurde auch eine redifferenzierende Wirkung von Salti et al. 2001 beschrieben. BS verhinderte auch die Dedifferenzierung von UV-bestrahlten Melanozyten. Wahrscheinlich besitzt BS eine Scavengerfunktion, welche die nach UV-Bestrahlung auftretende DNA-Fragmentierungen in Melanozyten signifikant herabsetzt. Inwieweit BS redifferenzierend auf Leukoplakien wirkt, wurde bisher nicht geklärt. Hier könnten sich in Zukunft therapeutisch relevante Ansatzpunkte ergeben.

Durch die Inhibition von CD97 und CD55 durch BS könnte auch die Adhäsion von Tumorzellen an CD55-positive Oberflächen blockiert werden. Des Weiteren wären Tumorzellen durch die Hemmung der CD55-Expression nicht mehr in der Lage, das Komplementsystem effektiv zu umgehen.

6 Klinische Relevanz

Die Therapieergebnisse fortgeschrittener Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle haben sich in den letzten Jahrzehnten trotz moderner mikrochirurgischer und rekonstruktiver Therapiemethoden, sowie interdisziplinärer Behandlungskonzepte nur partiell verbessert. Nach kurativ intendierter Primärtherapie stellen Lymphknotenmetastasen und lokale Rezidive ein nach wie vor schwer zu bewältigendes therapeutisches Problem dar. Um eine Rezidivwahrscheinlichkeit oder eine bereits vorliegende Metastasierung des Primärtumor besser verifizieren zu können, besteht eine Notwendigkeit für den Einsatz neuer biologischer Dedifferenzierungsmarker wie z.B. CD97. Nach Erstdiagnose des Tumors könnten mit Hilfe von CD97, diagnostisch relevante Zusatzinformationen gewonnen werden. Eine hohe CD97-Expression des Tumors deutet auf eine starke Tendenz zur Metastasierung und damit auch zum Rezidiv hin.

Der immunhistochemische Nachweis des Dedifferenzierungsmarkers CD97 am Biopsiematerial, deutet auf eine möglicherweise bereits bestehende lymphonodale Ausbreitung hin. CD97 könnte ein Marker sein, der je nach Expressionsstärke auf ein hohes oder niedriges Metastasierungspotential hinweist. Die Immunhistochemie mit monoklonalen CD97-Antikörpern wäre eine Ergänzung zu den bisherigen histopathologischen Diagnoseverfahren und hilfreich bei der Therapieplanung für T1-Karzinome der Mundhöhle. Besonders bei Karzinomen der Kategorie T1 könnte eine hohe CD97-Expression auf eine bereits erfolgte (okkulte) Metastasierung hinweisen. Dies wiederum würde zur Entscheidungsfindung beitragen, ob ein alleiniges chirurgisches Herangehen oder eine kombinierte Therapie aus Chirurgie und Bestrahlung indiziert ist.

Weitere Untersuchungen an noch mehr Gewebeproben sind unbedingt notwendig, um die vorliegenden Forschungsdaten statistisch zu kräftigen.

CD55 besitzt nach unseren Untersuchungen keine Markerfunktion und ist deshalb primär nicht nützlich, einen malignen Prozess in der Mundhöhle prognostisch abzuklären. Als Ziel einer monoklonalen Antikörpertherapie hat sich CD55 in klinischen Versuchen beim

Magenkarzinom bewährt. Für uns ist es denkbar, dass in näherer Zukunft neue Therapieansätze mit monoklonalen CD55-Antikörpern auch beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle etabliert werden. Existierende Therapieprotokolle aus Arbeitsgruppen, die bereits CD55-Antikörper therapeutisch einsetzen, könnten in modifizierter Weise auch beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle angewendet werden. Aufgrund der Lokalisation in der Mundhöhle, wäre in Zukunft für Plattenepithelkarzinome auch eine lokale Therapie mit Antikörpern denkbar.

Unsere Forschungsergebnisse haben erwiesen, dass Betulinsäure auch eine Antitumorwirkung in oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien hat. Die vorliegenden Ergebnisse lassen aber nur Aussagen zur Betulinsäurewirkung in vitro zu. Ob Betulinsäure auch in vivo eine Antitumorwirkung beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle entwickelt, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. Ein großes Manko der Betulinsäure ist nach wie vor die lipophile Grundstruktur und die damit verbundene schlechte Löslichkeit in H₂O. Um zukünftig gezielter auf einen klinischen Einsatz der Betulinsäure hinarbeiten zu können, müssen chemische und technische Wege gefunden werden, um die Löslichkeit in Wasser und Körperflüssigkeiten zu optimieren.

7 Zusammenfassung

Der Nachweis neuer prognoserelevanter Dedifferenzierungsmarker ist eine Hauptaufgabe der modernen Tumorbologie. CD97 ist das am meisten untersuchte Protein der EGF-7TM Proteinfamilie und wurde bereits als Dedifferenzierungsmarker beim non-medullären und medullären Schilddrüsenkarzinom klassifiziert. Die vom Differenzierungsgrad abhängige Expression von CD97 in Schilddrüsenkarzinomen kann deutlich zwischen differenzierten und undifferenzierten Karzinomen unterscheiden. Weitere Forschungsergebnisse haben CD97 im gesunden Gastrointestinaltrakt und in gastrointestinalen Karzinomen nachgewiesen. CD97 wird in Oesophaguskarzinomen, Magenkarzinomen und Kolonkarzinomen deutlich stärker exprimiert als in den entsprechenden gesunden Kontrollgeweben.

Für CD97 wurde CD55 (DAF) als Ligand identifiziert. Obwohl die Funktion von CD97 noch gänzlich unbekannt ist, kann die Interaktion mit CD55 Adhäsion vermitteln. Diese adhäsive Interaktion existiert zwischen Lymphozyten und CD55 präsentierenden Oberflächen in vitro. Eine in vivo Interaktion ist noch immer hypothetisch.

In Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle wurde CD97 bisher noch nicht untersucht. Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde CD97 als ein spezifisches Produkt in Plattenepithelkarzinomgeweben und Plattenepithelkarzinomzelllinien nachgewiesen. In der normalen Mundschleimhaut wird CD97 nur in der Basalzellschicht exprimiert. Hochdifferenzierte Plattenepithelkarzinome exprimieren CD97 auf transkriptionaler und translationaler Ebene signifikant niedriger, als schlecht differenzierte oder undifferenzierte Karzinome der Mundhöhle. pT1/2-Karzinome ohne Lymphknotenmetastasen hatten eine deutlich schwächere CD97-Expression als fortgeschrittene, metastasierte pT3/4-Karzinome. Die CD97-Expression korrelierte mit der Metastasierung eines Karzinoms. Das ubiquitär exprimierte CD55 ist in Plattenepithelkarzinomen generell hochreguliert und dient der Komplementinaktivierung.

Betulinsäure inhibiert die CD97- und CD55-Expression auf mRNA- und Proteinebene in Plattenepithelkarzinomzellen über einen Zeitraum von 72h signifikant ($p < 0,05$). Diese inhibitorische Funktion der Betulinsäure wurde bisher noch nicht beschrieben. Die Aufnahme in die Zelle und die intrazellulären Signalkaskaden, die für die CD97- und CD55-Inhibition verantwortlich wären, sind noch völlig ungeklärt. Aufgrund der fehlenden toxischen Wirkung auf normale Zellen, ist Betulinsäure ein hochinteressanter Naturstoff mit Antitumorpotential beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CD97 ein Dedifferenzierungsmarker beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist. CD97 ist Teil des Expressionsprofils oraler Plattenepithelkarzinome und korreliert mit schlechter Prognose und lymphogener Metastasierung. Im deutlichen Gegensatz dazu, wird CD97 nur in der Basalzellschicht der gesunden Mundschleimhaut exprimiert. Die Interaktion mit CD55 könnte die Adhäsion der Karzinomzellen an extrazellulärer Matrix vermitteln und somit für den Metastasierungsprozess förderlich sein. Die vorliegenden Daten ergänzen die bereits von mehreren Forschungsgruppen publizierten Daten zur CD97-Expression im Verdauungstrakt des Menschen.

8 Literaturverzeichnis

- 1 **Accardo-Palumbo A, Triolo G, Colonna-Romano G, Potestio M, Carbone M, Ferrante A, Giardina E, Caimi G, Triolo G.**
Glucose- induced loss of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane regulators of complement activation (CD59, CD55) by in vitro cultured human umbilical vein endothelial cells.
Diabetologia. 2000 Aug; 43(8): 1039- 1047.
- 2 **Andreadis C, Vahtsevanos K, Sidiras T, Thomaidis I, Antoniadis K, Mouratidou D.**
5-Fluorouracil and cisplatin in the treatment of advanced oral cancer.
Oral Oncology. 2003 Jun; 39(4): 380– 385.
- 3 **Aust G, Eichler W, Laue S, Lehmann I, Heldin NE, Lotz O, Scherbaum WA, Dralle H, Hoang-Vu C.**
CD97: a dedifferentiation marker in human thyroid carcinomas.
Cancer Res. 1997 May; 57(9): 1798- 806.
- 4 **Aust G, Steinert M, Schutz A, Boltze C, Wahlbuhl M, Hamann J, Wobus M.**
CD97, but not its closely related EGF-TM7 family member EMR2, is expressed on gastric, pancreatic, and esophageal carcinomas.
Am J Clin Pathol. 2002 Nov; 118(5): 699- 707.
- 5 **Baatenburg de Jong RJ, Hermans J, Molenaar J, Briaire JJ, le Cessie S.**
Prediction of survival in patients with head and neck cancer.
Head and Neck. 2001 Sep; 23(9): 718- 724.
- 6 **Basson MD, Turowski GA, Rashid Z, Hong F, Madri JA.**
Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate.
Dig Dis Sci. 1996 Oct; 41(10): 1989– 93.
- 7 **Bier J, Howaldt HP, Pitz H.**
IV. DÖSAK-Therapie Studie. Prospektive, randomisierte, klinische Studie für Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle: “Radikale Neck dissection versus konservative Neck dissection”.
in: Schwenzer N, Pfeifer G (Hrsg.) Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie, Bd 37. Thieme, Stuttgart New York, S 108– 110, 1992.
- 8 **Boltze C, Schneider-Stock R, Aust G, Mawrin C, Dralle H, Roessner A, Hoang-Vu C.**
CD97, CD95 and Fas-L clearly discriminate between chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma in perioperative evaluation of cryocut sections.
Pathol Int. 2002 Feb; 52(2): 83- 8.
- 9 **Boulday, G., Hamann, J., Souillou, J.P., Charreau, B.**
CD97-decay accelerating factor interaction is not involved in leukocyte adhesion to endothelial cells.
Transplantation. 2002 Feb; 73(3): 429– 436.
- 10 **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. 1993 Oct; 53(19): 4477– 80.
- 11 **Bray I, Brennan P, Boffetta P.**
Projections of alcohol- and tobacco- related cancer mortality in central Europe. *Int J Cancer.* 2000 Jul; 87(1): 122- 128.
- 12 **Caamano J, Zhang SY, Rosvold EA, Bauer B, Klien-Szanto JP.**
p53 Alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines.
Am J Pathol. 1993 Apr; 142(4): 1131– 9.

- 13 Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D.**
Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization.
Cancer Res. 1996 Jun; 56(11): 2488- 92.
- 14 Carter RL.**
Pathology of squamous carcinomas of the head and neck.
Current Opinion Oncol. 1993 May; 5(3): 491- 5.
- 15 Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, Kumar Shukla N, Ralhan R.**
Retinoic acid receptor alpha as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma.
Int J Cancer. 2003 Feb; 103(4): 544- 9.
- 16 Chen Q, Samaranyake LP, Zhen X, Luo G, Nie M, Li B.**
Up-regulation of Fas ligand and down-regulation of Fas expression in oral carcinogenesis.
Oral Oncol. 1999 Nov; 35(6): 548- 53.
- 17 Cichewicz RH, Kouzi SA.**
Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection.
Med Res Rev. 2004 Jan; 24(1): 90- 114.
- 18 D'Souza SE, Ginsberg MH, Plow EF.**
Arginylglycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif.
Trends Biochem Sci.1991 Jul; 16(7): 246- 50.
- 19 Daftary DK, Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Mehta FS, Pindborg JJ.**
Risk factors and risk markers for oral cancer in high incidence areas of the world.
in: Johnson NW, (Hrsg). Oral Cancer, Bd 2. Cambridge, Cambridge University Press, S 29–63, 1991.
- 20 Driver M, Upadhyay UD, Shapshay SM, Wang Z.**
Laser-assisted low- dose retinoid acid in oral cancer chemoprevention.
Laryngoscope. 2005 Feb; 115(2):283- 6.
- 21 Düren, C.**
Expression von Fas, Fas Ligand und CD97 im Schilddrüsenadenom und Struma nodosa.
Halle, Martin-Luther-Universität, Med. Fak., Diss., 56 Seiten, 2001.
- 22 Durrant LG, Chapman MA, Buckley DJ, Spendlove I, Robins RA, Armitage NC.**
Enhanced expression of the complement regulatory protein CD55 predicts a poor prognosis in colorectal cancer patients.
Cancer Immunol Immunother. 2003 Oct; 52(10):638- 42.
- 23 Eckardt A, Barth E, Janssen S, Wegener G.**
Tumorrezidive im Mund- Kiefer- und Gesichtsbereich.
Mund Kiefer Gesichtschir. 2004 Jul; 8(4): 217- 222.
- 24 Eichler W.**
CD97 isoform expression in leukocytes.
J Leukoc Biol. 2000 Oct; 68(4): 561- 7.
- 25 Eichler, W., Aust, G., Hamann, D.**
Characterization of an early activation-dependent antigen on lymphocytes defined by the monoclonal antibody BL-Ac(F2).
Scand J Immunol. 1994 Jan; 39(1): 111- 115.
- 26 Eichler W, Hamann J, Aust G.**
Expression characteristics of the human CD97 antigen.
Tissue Antigens. 1997 Nov; 50(5): 429- 38.
- 27 Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB.**
The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.
Mol Pharmacol. 2003 Jun; 63(6): 1256- 72.

- 28 Fujita M, Goto K, Yoshida K, Okamura H, Morimoto H, Kito S, Fukuda J, Haneji T.**
Okadaic acid stimulates expression of Fas receptor and Fas ligand by activation of nuclear factor kappa-B in human oral squamous carcinoma cells.
Oral Oncology. 2004 Feb; 40(2) : 199- 206.
- 29 Fulda S, Debatin KM.**
Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors.
Med Pediatr Oncol. 2000 Dec; 35(6): 616– 618.
- 30 Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nunez G, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM.**
Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors.
Cancer Res. 1997 Nov; 57(21): 4956- 64.
- 31 Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, Krammer PH, Kroemer G, Peter ME, Debatin KM.**
Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid.
J Biol Chem. 1998 Dec; 273(18): 33942- 8.
- 32 Gastman BR, Atarshi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H, Whiteside TL.**
Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes.
Cancer Res. 1999 Oct; 59(20): 5356- 64.
- 33 Gioanni J , Fischel JL, Lambert JC, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E, Ettore F, Formento P, Chauvel P, Lalanne CM, Courdi A.**
Two new tumour cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment.
Eur J Cancer Clin Oncol. 1988 Sep; 24(9): 1445- 55.
- 34 Gray JX, Haino M, Roth MJ, Maguire JE, Jensen PN, Yarme A, Stetler-Stevenson MA, Siebenlist U, Kelly K.**
CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation.
J Immunol. 1996 Dec; 157(12): 5438- 47.
- 35 Gupta PC, Pindborg JJ, Mehta FS.**
Comparison of carcinogenicity of betel quid with and without tobacco: an epidemiologic review.
Ecol Dis. 1982; 1(4): 213- 9.
- 36 Hamann J, Eichler W, Hamann D, Kerstens HM, Poddighe PJ, Hoovers JM, Hartmann E, Strauss M, van Lier RA.**
Expression cloning and chromosomal mapping of the leukocyte activation antigen CD97, a new seven-span transmembrane molecule of the secretion receptor superfamily with an unusual extracellular domain.
J Immunol. 1995 Aug; 155(4): 1942- 50.
- 37 Hamann J, Hartmann E, van Lier RA .**
Structure of the human CD97 gene: exon shuffling has generated a new type of seven-span transmembrane molecule related to the secretin receptor superfamily.
Genomics. 1996 Feb; 32(1): 144- 7.
- 38 Hamann J, Stortelers C, Kiss-Toth E, Vogel B, Eichler W, van Lier RA.**
Characterization of the CD55 (DAF)-binding site on the seven-span transmembrane receptor CD97.
Eur J Immunol. 1998 May; 28(5): 1701- 7.
- 39 Hamann J, Wishaupt JO, van Lier RA, Smeets TJ, Breedveld FC, Tak PP.**
Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue.
Arthritis Rheum. 1999 Apr; 42(4): 650- 8.

- 40 Hamann J, Vogel B, van Schijndel GM, van Lier RA.**
The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF).
J Exp Med. 1996 Sep; 184(3):1185-9.
- 41 Hausamen EJ.**
Tumorchirurgie
Mund Kiefer Gesichtschir. 2000 May; 4 Suppl 1: 142- 154.
- 42 Hayflick JS.**
A family of heptahelical receptors with adhesion-like domains: a marriage between two super families.
J Recept Signal Transduct Res. 2000 May- Aug; 20(2-3): 119- 31.
- 43 Hemprich A, Müller R.**
Long-term results in treating squamous cell carcinoma of the lip, oral cavity, and oropharynx.
Int J Oral Maxillofac Surg. 1989 Feb; 18(1): 39-42.
- 44 Hensel F, Hermann R, Schubert C, Abe N, Schmidt K, Franke A, Shevchenko A, Mann M, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP.**
Characterization of Glycosylphosphatidylinositol-linked Molecule CD55/ Decay accelerating Factor as the Receptor for Antibody SC-1-induced Apoptosis1
Cancer Research. 1999 Oct; 59(20): 5299- 5306.
- 45 Hoang-Vu C, Bull K, Schwarz I, Krause G, Schmutzler C, Aust G, Köhrle J, Dralle H.**
Regulation of CD97 protein in thyroid carcinoma.
J Clin Endocrinol Metab. 1999 Mar; 84(3): 1104- 9.
- 46 Howaldt HP, Kainz M, Euler B, Vorast H.**
Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity.
J Craniomaxillofac Surg. 1999 Oct; 27(5): 275- 288.
- 47 Howaldt HP, Reicherts M, Blecher CH.**
Mundhöhlenkarzinom- Ergebnisse zu Befundung und Therapie im DÖSAK-Tumorregister im Auftrag des Deutsch- Österreichisch- Schweizerischen Arbeitskreises für Tumore im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK).
Onkologe. 2000; 6: 573- 583.
- 48 Irié T, Aida T, Tachikawa T.**
Gene expression profiling of oral squamous cell carcinoma using laser microdissection and cDNA microarray
Med Electron Microsc. 2004 Jun; 37(2): 89- 96.
- 49 Ikebe T, Nakayama H, Shinohara M, Shirasuna K.**
NF-kappaB involvement in tumor-stroma interaction of squamous cell carcinoma.
Oral Oncol. 2004 Nov; 40(10): 1048- 56.
- 50 Ito M, Izumi N, Cheng J, Sakai H, Shingaki S, Nakajima T, Oda K, Saku T.**
Jaw bone remodeling at the invasion front of gingival squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med. 2003 Jan; 32(1): 10- 7.
- 51 Iwase M, Watanabe H, Kondo G, Ohashi M, Nagumo M.**
Enhanced susceptibility of oral squamous cell carcinoma cell lines to fas mediated apoptosis by Cisplatin and 5- Fluorouracil.
Int J Cancer. 2003 Sep; 106 (4): 619- 625.
- 52 Jaspars LH, Vos W, Aust G, Van Lier RA, Hamann J.**
Tissue distribution of the human CD97 EGF-TM7 receptor.
Tissue Antigens. 2001 Apr; 57 (4): 325- 31.
- 53 Jones AS.**
Prognosis in mouth cancer: tumour factors.
Eur J Cancer B Oral Oncol. 1994 Jan; 30B(1): 8- 15.

- 54 Kawamata H, Nakashiro K, Uchida D, Harada K, Yoshida H, Sato M.**
Possible contribution of active MMP2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L to bone invasion of newly established human oral-squamous –cancer cell lines.
Int J Cancer. 1997 Jan; 70(1): 120- 127.
- 55 Kim D., Chen Z., Nguyen T., Pezzuto J. M., Qiu S., Lu Z-Z.**
A concise semi- synthetic approach to betulinic acid from betulin.
Synth Commun. 1997; 27: 1607– 1612.
- 56 Klaassen I, Braakhuis BJM.**
Anticancer activity and mechanism of action of retinoids in oral and pharyngeal cancer.
Oral Oncology. 2002 Sep; 38(6): 532- 542
- 57 Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, Leelakriangsak M, Amornphimoltham P.**
Alterations of p53, pRb, cyclin D1 and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas.
Oral Oncology. 2000 Jul; 36(4): 334- 339.
- 58 Kropveld A, Rozemuller EH, Leppers FG, Scheidel KC, de Weger RA, Koole R, Hordijk GJ, Slootweg PJ, Tilanus MG.**
Sequencing analysis of RNA and DNA of exons 1 through 11 shows p53 gene alterations to be present in almost 100% of head and neck squamous cell cancers.
Lab Invest. 1999 Mar; 79(3): 347– 53.
- 59 Kwakkenbos MJ, Kop EN, Stacey M, Matmati M, Gordon S, Lin HH, Hamann J.**
The EGF-TM7 family: a postgenomic view.
Immunogenetics. 2004 Jan; 55(10): 655- 66. Review.
- 60 La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Levi F.**
Trends in oral cancer mortality in Europe.
Oral Oncology. 2004 Apr; 40(4): 433- 439.
- 61 Lea S.**
Interactions of CD55 with non-complement ligands.
Biochem Soc Trans. 2002 Nov; 30(Pt 6): 1014- 9. Review.
- 62 Leemans CR, Chiesa F, Tradati N, Snow GB.**
Messages from completed randomized trials in head and neck cancer.
Eur J Surg Oncol. 1997 Dec; 23(6): 469- 476.
- 63 Leethanakula C, Knezevic V, Patel V, Amornphimoltham P, Gillespie J, Shillitoe EJ, Emko P, Park MH, Emmert-Buck MR, Strausberg RL, Krizman DB, Gutkind JS.**
Gene discovery in oral squamous cell carcinoma through the Head and Neck Cancer Genome Anatomy Project: confirmation by microarray analysis.
Oral Oncology. 2003 Apr; 39(3): 248- 258.
- 64 Levine AJ.**
Tumor suppressor genes.
Annu Rev Biochem. 1993; 62: 623- 51.
- 65 Levine AJ.**
p53, The cellular gatekeeper for growth and division.
Cell. 1997 Feb; 88(3): 323- 31.
- 66 Li L, Spendlove I, Morgan J, Durrant LG.**
CD55 is over-expressed in the tumour environment.
Br J Cancer. 2001 Jan; 84(1): 80- 86.
- 67 Lin HH, Stacey M, Hamann J, Gordon S, McKnight AJ.**
Human EMR2, a novel EGF-TM7 molecule on chromosome 19p13.1, is closely related to CD97.
Genomics. 2000 Jul; 67(2): 188- 200.

- 68 Lin HH, Stacey M, Saxby C, Knott V, Chaudhry Y, Evans D, Gordon S, McKnight AJ, Handford P, Lea S.**
Molecular analysis of the epidermal growth factor-like short consensus repeat domain-mediated protein-protein interactions: dissection of the CD97-CD55 complex. *J Biol Chem.* 2001 Jun; 276(26): 24160- 9.
- 69 Liu SY, Lin MH, Yang SC, Huang GC, Chang L, Chang S, Yen CY, Chiang WF, Lee CH, Kuo YY, Liu YC.**
Areca quid chewing enhances the expression of salivary matrix metalloproteinase-9. *J Formos Med Assoc.* 2005 Feb;104(2): 113- 9.
- 70 Liu Y, Chen L, Peng S, Chen Z, Gimm O, Finke R, Hoang-Vu C.**
The expression of CD97EGF and its ligand CD55 on marginal epithelium is related to higher stage and depth of tumor invasion of gastric carcinomas. *Oncol Rep.* 2005 Dec; 14(6): 1413- 20.
- 71 Liu Y, Chen L, Peng SY, Chen ZX, Hoang-Vu C.**
Role of CD97(stalk) and CD55 as molecular markers for prognosis and therapy of gastric carcinoma patients. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005 Sep; 6(9): 913- 8.
- 72 Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S.**
Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncology.* 2003 Feb; 39(2): 106- 114.
- 73 Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya S.**
Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity– a comprehensive literature review. *Oral Oncology.* 2001 Jul; 37(5): 401- 418.
- 74 Loro LL, Vintermyr OK, Liavaag PG, Jonsson R, Johannessen AC.**
Oral squamous cell carcinoma is associated with decreased bcl-2/bax expression ratio and increased apoptosis. *Human Pathol.* 1999 Sep; 30(9): 1097- 1105.
- 75 Lublin DM, Atkinson JP.**
Decay accelerating factor: biochemistry, molecular biology and function. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7: 35– 58.
- 76 Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS.**
Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol.* 2003 Jul; 30(7): 644- 654.
- 77 McKnight AJ, Gordon S.**
The EGF-TM7 family: unusual structures at the leukocyte surface. *J Leukoc Biol.* 1998 Mar; 63(3): 271- 80. Review.
- 78 Medof ME, Kinoshita T, Nussenzweig V.**
Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. *J. Exp. Med.* 1984 Nov; 160(5): 1558- 1578.
- 79 Michalides RJ, van Veelan NM, Kristel PM, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, Balm AJ.**
Overexpression of cyclin D1 indicates of poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997 May; 123(5): 497- 502.
- 80 Mohr C, Bohndorf W, Härle F.**
Präoperative Radio-Chemotherapie versus alleinige Radikaloperation fortgeschrittener Mundhöhlenkarzinome. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir.* 1994; 18: 5- 12.
- 81 Müller-Eberhard HJ.**
Molecular organisation and function of the complement system. *Annu. Rev. Biochem.* 1988; 57: 321- 347.

- 82 Muraki Y, Yoshioka C, Fukuda J, Haneji T, Kobayashi N.**
Immunohistochemical detection of Fas antigen in oral epithelia.
J Oral Pathol Med. 1997 Feb; 26(2): 57- 62.
- 83 Mustafa T, Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Kehlen A, Schmutzler C, Koehrlé J, Gimm O, Dralle H, Hoang-Vu C.**
Expression of CD97 and CD55 in human medullary thyroid carcinomas.
Int J Oncol. 2004 Feb; 24(2): 285- 94.
- 84 Mustafa T, Chen Z, Gimm O, Dralle H, Hoang-Vu C.**
Betulinic Acid is an effective inhibitor of CD97 in the medullary thyroid carcinoma cell line MTC-SK.
Posterpräsentation, Congress of the American Association of Cancer Research, Orlando, USA, 2004.
- 85 Mustafa T, Eckert A, Klonisch T, Kehlen A, Maurer P, Klintschar M, Erhuma M, Zschoyan R, Gimm O, Dralle H, Schubert J, Hoang-Vu C.**
Expression of the Epidermal Growth Factor Seven-Transmembrane Member CD97 Correlates with Grading and Staging in Human Oral Squamous Cell Carcinomas
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Jan; 14(1): 108- 119.
- 86 Nagpala JK, Das BR.**
Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management.
Oral Oncology. 2003 Apr; 39(3): 213- 221.
- 87 Patel A, Miller L, Ahmed K, Ondrey F.**
NF-Kappa-B downregulation strategies in head and neck cancer treatment.
Otolaryngol Head Neck Surg. 2004 Sep; 131(3): 288- 95.
- 88 Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP.**
Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer: an association of HPV-16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring.
Cancer. 1997 Feb; 79(1): 595- 604.
- 89 Pindborg JJ, Renstrup G, Poulsen HE, Silverman S Jr.**
Studies in oral leukoplakias. V. Clinical and histologic signs of malignancy.
Acta Odontol Scand. 1963 Nov; 21: 407- 14.
- 90 Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell AC, Beecher CWW, Fong HHS, Kinghorn AD, Brown DM, Wani MC, Wall ME, Hieken TJ, Das Gupta TK, Pezzuto JM.**
Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis.
Nat Med. 1995 Oct; 1(10): 1046- 1051.
- 91 Rao Z, Handford P, Mayhew M, Knott V, Brownlee GG, Stuart D.**
The structure of a Ca²⁺- binding epidermal growth factor-like domain: its role in protein-protein interactions.
Cell. 1995 Jul; 82(1): 131- 141.
- 92 Reichart PA.**
Primärprävention des Mundhöhlenkarzinoms und oraler Präkanzerosen.
Mund Kiefer Gesichtschir. 2000 Nov; 4(6) :357- 364.
- 93 Reichart PA.**
Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures.
Clin Oral Invest. 2001 Dec; 5(4): 207- 213.
- 94 Reichart PA.**
Orale präkanzeröse Konditionen- eine Übersicht.
Mund Kiefer Gesichtschir. 2003 Jul; 7(4): 201- 207.
- 95 Robinson KL, Macfarlane GJ.**
Oropharyngeal cancer incidence and mortality in Scotland: are rates still increasing?
Oral Oncology. 2003 Jan; 39(1): 31- 36.
- 96 Rosenblatt KA, Daling JR, Chen C, Sherman KJ, Schwartz SM.**
Marijuana use and risk of oral squamous cell carcinoma.
Cancer Res. 2004 Jun; 64(11): 4049- 54.

- 97 Salti GI, Kichina JV, Das Gupta TK, Uddin S, Bratescu L, Pezzuto JM, Mehta RG, Constantinou AI.**
Betulinic acid reduces ultraviolet-C-induced DNA breakage in congenital melanocyte naeval cells: Evidence for a potential role as a chemopreventive agent.
Melanoma Res. 2001 Apr; 11(2): 99- 104.
- 98 Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM.**
Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age.
J Oral Pathol Med. 2005 Mar; 34(3): 129- 33.
- 99 Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Ng IO, McMillan A, Ziober BL, Le QT, Silverman S, Fu KK.**
Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma.
Oral Oncology. 1999 May; 35(3): 333- 342.
- 100 Schlums D, Zlowodzki J, Bier J.**
Radikale Neck dissection versus konservative Neck dissection. Eine statistische Auswertung der Literaturdaten. In: Schwenzer N, Pfeifer G (Hrsg.) Fortschritte der Kiefer und Gesichtschirurgie. Bd 37. Thieme, Stuttgart 1992, (S. 104- 108).
- 101 Selzer E, Pimentel E, Wacheck V, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B, Kodym R.**
Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells.
J Invest Dermatol. 2000 May; 114(5): 935- 940.
- 102 Schmidt ML, Kuzmanoff KL, Ling-Indeck L, Pezzuto JM.**
Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines.
Eur J Cancer. 1997 Oct; 33(12): 2007- 2010.
- 103 Schutze K, Lahr G, Burgemeister R.**
The force of focused light in different areas of cell and molecular biology.
J Mol Med. 2000; 78(7): B21.
- 104 Schrijvers D, Lefebvre JL, Vermorcken JB.**
Ongoing trials in patients with head and neck cancer.
Eur J Surg Oncol. 1997 Dec; 23(6): 476- 485.
- 105 Shingaki S, Suzuki I, Nakajima T, Kawasaki T.**
Evaluation of histopathologic parameters in predicting cervical lymph node metastasis of oral and oropharyngeal carcinomas.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1988 Dec; 66(6): 683- 8.
- 106 Sieczka E, Datta R, Singh A, Loree T, Rigual N, Orner J, Hicks W.**
Cancer of the buccal mucosa: are margins and T-stage accurate predictors of local control?
Am J Otolaryngol. 2001 Nov-Dec; 22(6): 395- 9.
- 107 Spendlove I, Li L, Carmichael J, Durrant LG.**
Decay accelerating factor (CD55): a target for cancer vaccines?
Cancer Res. 1999 May; 59(10): 2282- 2286.
- 108 Stacey M, Lin H-H, Gordon S, McKnight AJ.**
LNB-TM7, a group of seven- transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors.
Trends Biochem Sci. 2000 Jun; 25(6): 284- 9.
- 109 Stacey M, Lin HH, Hilyard KL, Gordon S, McKnight AJ.**
Human epidermal growth factor (EGF) module-containing mucin-like hormone receptor 3 is a new member of the EGF-TM7 family that recognizes a ligand on human macrophages and activated neutrophils.
J Biol Chem. 2001 Jun; 276(22): 18863- 70.
- 110 Stacey M, Chang GW, Davies JQ, Kwakkenbos MJ, Sanderson RD, Hamann J, Gordon S, Lin HH.**
The epidermal growth factor like domains of the human EMR2 receptor mediate cell attachment through chondroitin sulfate glycosaminoglycans.
Blood. 2003 Oct; 102(8): 2916- 24.

- 111 Steinert M, Wobus M, Boltze C, Schutz A, Wahlbuhl M, Hamann J, Aust G.**
Expression and regulation of CD97 in colorectal carcinoma cell lines and tumor tissues.
Am J Pathol. 2002 Nov; 161(5): 1657- 67.
- 112 Stell PM.**
Survival times in end-stage head and neck cancer.
Eur J Surg Oncol. 1989 Oct; 15(5): 407- 410.
- 113 Taylor D, Koch WM, Zahurak M, Shan K, Sidransky D, Westra WH.**
Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations.
Hum Pathol. 1999 Oct; 30(10): 1221- 5.
- 114 Thurnher D, Turhani D, Pelzmann M, Wannemacher B, Knerer B, Formanek M, Wacheck V, Selzer E.**
Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells.
Head Neck. 2003 Sep; 25(9): 732- 40.
- 115 Uchida D, Kawamata H, Nakashiro K, Omotehara F, Hino S, Hoque MO, Begum NM, Yoshida H, Sato M, Fujimori T.**
Low-dose retinoid acid enhances in vitro invasiveness of human oral squamous-cell-carcinoma cell lines.
Br J Cancer. 2001 Jul; 85(1): 122- 8.
- 116 Van der Waal I.**
Oral precancerous lesions—present knowledge.
Deut Zahnärztl Z .1992; 47: 860- 4.
- 117 van Lier RA, Eichler W, Hamann J.**
Sevenspan transmembrane molecules: novel receptors involved in leukocyte adhesion.
Immunol Lett. 1996 Dec; 54(2-3): 185- 7. Review.
- 118 Velazquez OC, Zhou D, Seto RW, Jabbar A, Choi J, Lederer HM, Rombeau JL.**
In vivo crypt surface hyperproliferation is decreased by butyrate and increased by deoxycholate in normal rat colon: associated in vivo effects on c-Fos and c-Jun expression.
J Parenter Enteral Nutr. 1996 Jul- Aug; 20(4): 243- 50.
- 119 Visser L, de Vos AF, Hamann J, Melief MJ, van Meurs M, van Lier RA, Laman JD, Hintzen RQ.**
Expression of the EGF-TM7 receptor CD97 and its ligand CD55 (DAF) in multiple sclerosis.
J Neuroimmunol. 2002 Nov; 132(1-2): 156- 63.
- 120 Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippmann SM, Hong WK.**
Head and neck cancer.
N Engl J Med. 1993 Jan; 328(3): 184- 194.
- 121 Wallace-Brodeur RR, Lowe SW.**
Clinical implications of p53 mutations.
Cell Mol Life Sci. 1999 Jan; 55(1): 64- 75.
- 122 Wang T, Ward Y, Tian L, Lake R, Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Kelly K.**
CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counter receptors on endothelial cells.
Blood. 2005 Apr 1;105(7): 2836- 44.
- 123 West AP Jr, Llamas LL, Snow PM, Benzer S, Bjorkman PJ.**
Crystal structure of the ectodomain of Methuselah, a Drosophila G protein-coupled receptor associated with extended lifespan.
PNAS. 2001 Mar; 98(7): 3744- 3749.
- 124 Wobus M, Vogel B, Schmucking E, Hamann J, Aust G.**
N-glycosylation of CD97 within the EGF domains is crucial for epitope accessibility in normal and malignant cells as well as CD55 ligand binding.
Int J Cancer. 2004 Dec;112(5): 815- 22.

- 125 Woolgar JA, Scott J, Vaughan ED, Brown JS, West CR, Rogers S.**
Survival, metastasis and recurrence of oral cancer in relation to pathological features.
Ann R Coll Surg Engl. 1995 Sep; 77(5): 325- 331.
- 126 Yokoo S, Umeda M, Komatsubara H, Shibuya Y, Komori T.**
Evaluation of T-classifications of upper gingival and hard palate carcinomas - a
proposition for new criterion of T4.
Oral Oncology. 2002 Jun; 38(4): 378- 382.

9 Thesen

1. CD97 und sein Ligand CD55 wurden in den 78 untersuchten Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle auf mRNA- und Proteinebene signifikant stärker exprimiert, als in tumorfreier Mundschleimhaut.
2. Mittels semiquantitativer und quantitativer RT-PCR ist in Plattenepithelkarzinomen mit pT3/4-Status (n= 44) eine signifikant höhere CD97-mRNA Expression detektierbar als in pT1/2-Karzinomen (n= 34).
3. Lymphogen metastasierte pN1/2-Plattenepithelkarzinome (n= 47) exprimieren signifikant mehr CD97-mRNA als Karzinome mit pN0-Status (n= 31).
4. Schlecht differenzierte und undifferenzierte Plattenepithelkarzinome (G3/4, n= 22) weisen signifikant stärkere CD97-Transkriptlevel auf als gut und mäßig differenzierte Karzinome (G1/2, n= 56).
5. Die immunhistochemischen Untersuchungen an Gefrierschnitten haben erwiesen, dass dedifferenzierte und fortgeschrittene Plattenepithelkarzinome (pT3/4, G3/4), CD97 signifikant stärker exprimieren, als pT1/2-Karzinome mit gutem oder mäßigem Differenzierungsgrad (G1/2).
6. In lymphogen metastasierten pN1/2-Karzinomen (n= 47) ließ sich CD97-Protein signifikant stärker immunhistochemisch nachweisen als in Karzinomen mit pN0-Status (n= 31).
7. CD55-mRNA und CD55-Protein wurden in allen Karzinomen (n= 78), unabhängig vom Staging und Grading stark exprimiert. pN2-Karzinome (n= 14) exprimierten CD55-Protein signifikant stärker als pN0-Karzinome (n= 31).
8. Betulinsäure ist ein effektiver Inhibitor der CD97- und CD55-Expression. Mit Betulinsäure behandelte Plattenepithelkarzinomzellen exprimieren signifikant weniger CD97 und CD55. Betulinsäure wirkt schneller und stärker in niedrig differenzierten Karzinomzellen als in hochdifferenzierten Zelllinien.
9. Q-RT-PCR Analysen und durchflusszytometrische Messungen haben die Betulinsäurewirkung bestätigt.

10. Immunzytochemische Untersuchungen auf CD97 und CD55 haben in mit Betulinsäure behandelten Zellen, eine deutliche Reduktion der membranständigen Proteindistribution nachgewiesen.
11. Mit Betulinsäure behandelte Plattenepithelkarzinomzellen exprimieren vermutlich nur noch die zytoplasmatisch lokalisierbare CD97- und CD55-Proform.
12. CD97 ist ein Dedifferenzierungsmarker im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und unterliegt einem vom pTNM und Grading abhängigen Expressionsprofil.
13. CD55 wird unabhängig vom Tumorstatus und Histotyp, ubiquitär stark in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle exprimiert.
14. Unsere immunhistochemischen Untersuchungen an Normalgeweben, haben CD97 erstmalig in der Haut und Hautanhangsgebilden sowie in der Glandula submandibularis nachgewiesen.

Lebenslauf

Name	Tarek Mustafa
Geburtsdatum, -ort	22.02.1977, Mosul/ Irak
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Eltern	Prof. Dr. Arafa Mustafa, Pensionär Monika Mustafa, geb. Macheit, Lehrerin
Familienstand	verheiratet mit Wenke Stanarius, keine Kinder
Schulbildung	
1983 - 1991	16. Polytechnische Oberschule in Halle
1991 - 1995	Albert-Schweitzer-Gymnasium Halle
Mai 1995	Abitur
Studium	
1995 - 2001	Studium der Zahnheilkunde an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit 01/2002	Zahnärztliche Approbation

Wissenschaftlicher Werdegang

2002 - 2005	Doktorand and der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
04/2002 - 03/2003	Stipendiat der Graduiertenförderung des Landes Sachsen- Anhalt

Beruflicher Werdegang

04/2003 – 09/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg
09/2003 – 05/2005	Zahnärztliche Tätigkeit in Großbritannien
seit 06/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Selbständigkeitserklärung

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Universität Halle erkläre ich hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Frühere Promotionsversuche bestehen nicht. Die vorliegende Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Teilergebnisse der Promotionsarbeit und Analysemethoden wurden publiziert und auf Kongressen vorgestellt. Auf den nachfolgenden Seiten sind eigene Publikationen in Fachjournalen, Vorträge und Posterpräsentationen aufgelistet.

Tarek Mustafa

Halle, den 20.12.2005

Eigene Publikationen in Fachjournalen

- 1 Ahrens S, **Mustafa T**, Ernst A, Schubert J, Hoang-Vu C.
RNA-Gewinnung aus Pulpazellen.
ZMK. 2001, 17:756-760.
- 2 **Mustafa T**, Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Kehlen A, Schmutzler C, Koehrlé J, Gimm O, Dralle H, Hoang-Vu C.
Expression of CD97 and CD55 in human medullary thyroid carcinomas.
Int J of Oncol. 2004; 24:285-94.
- 3 Chen Z, **Mustafa T**, Trojanowicz B, Brauckhoff M, Gimm O, Schmutzler C, Köhrlé J, Holzhausen HJ, Kehlen A, Klonisch T, Finke R, Dralle H, Hoang-Vu C.
CD82 and CD63 in thyroid carcinomas.
Int J Mol Med. 2004; 14:517-527.
- 4 **Mustafa T**, Eckert A, Klonisch T, Kehlen A, Maurer P, Klintschar M, Erhuma M, Zschoyan R, Gimm O, Dralle H, Schubert J, Hoang-Vu C.
Expression of the Epidermal Growth Factor Seven-Transmembrane Member CD97 Correlates with Grading and Staging in Human Oral Squamous Cell Carcinomas
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14:108-119.
- 5 Klonisch T, **Mustafa T**, Bialek J, Radestock Y, Fiebig B, Holzhausen HJ, Dralle H, Cuong Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S.
Human medullary thyroid carcinoma (MTC): a source and potential target for relaxin-like hormones.
Ann N Y Acad Sci. 2005; 1041:449-461.

Vorträge und Posterpräsentationen

- 1 **Mustafa T**.
Heparanase is expressed in thyroid carcinomas.
Vortrag. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung, Berlin, 6.12.2002.
- 2 **Mustafa T**.
Die EGF-7TM-Familie in Medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC).
Vortrag. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung, Berlin, 7.12.2002.
- 3 Klejmann C, **Mustafa T**, Weber E, Dralle H, Hoang- Vu C.
Procathepsin-L expression in non-neoplastic thyroid, benign thyroid goiter and thyroid carcinomas.
Poster. Mitteldeutscher Chirurgenkongress, Leipzig, 2002.
- 4 Erhuma M, **Mustafa T**, Hoang- Vu C, Kehlen A.
CD10 and CD13 in pancreatic cancer.
Poster. Mitteldeutscher Chirurgenkongress, Leipzig, 2002.

- 5** **Mustafa T**, Dralle H, Eckert AW, Hoang- Vu C, Klonisch T.
CD97 expression in oral squamous cell carcinoma.
Poster. Tagung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 2002.
- 6** Chen Z, **Mustafa T**, Hoang- Vu C, Klonisch T.
IGFI, IGF-IRalpha and IGFBP3 expression in medullary thyroid carcinomas.
Poster. Tagung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 2002.
- 7** Leder S, **Mustafa T**, Gimm O, Hoang- Vu C, Dralle H, Klonisch T.
CD97 and its three isoforms in gastric ulcer and gastric cancer.
Poster. Tagung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 2002.
- 8** Hombach- Klonisch S, **Mustafa T**, Pyka J, Klonisch T.
Relaxin like factors in the thyroid.
Poster. Tagung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 2002.
- 9** **Mustafa T**.
CD55 expression in medullary thyroid carcinomas.
Vortrag. Internationale Chirurgentage, München, 2003.
- 10** Klonisch T, Kehlen A, **Mustafa T**, Hsueh AJW, Weber E, Dralle H, Fischer B, Hoang- Vu C, Hombach- Klonisch S.
Relaxin Receptors in the human thyroid.
Poster. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Köln, 2003.
- 11** Klonisch T, Hombach- Klonisch S, **Mustafa T**, Weber E, Kehlen A, Dralle H, Hoang- Vu C, Holzhausen HJ.
Human medullary thyroid carcinoma are target tissues of the relaxin hormone family.
Poster. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Köln 2003.
- 12** **Mustafa T**, Eckert AW, Klonisch T, Kehlen A, Schubert J, Dralle H, Seyfert H, Hoang- Vu C.
Expression of CD97 and EMR2 in Oral Squamous Cell Carcinomas.
Vortrag. Jahreskongress der „International Association of Dental Research (IADR)“, Göteborg, Schweden, 2003.
Abstrakt in: J Dent Res. 2003; 82 (Spec Iss. B).
- 13** Ahrens S, **Mustafa T**, Boehm B, Reichert S, Hoang- Vu C.
Expression of IGF1, IGFBP3 and IGF-1Ralpha in Human Wisdom Teeth.
Poster. Jahreskongress der „International Association of Dental Research (IADR)“, Göteborg, Schweden, 2003.
Abstrakt in: J Dent Res. 2003; 82 (Spec Iss. B).
- 14** **Mustafa T**, Reichert S, Weber E, Hoang- Vu C.
Expression of Cathepsin L in Human Chronic Periodontitis
Poster. Kongress „Europerio IV“, Berlin, 2003.
Abstrakt in: J Clin Periodontol. 2003; Suppl. 4, Vol. 30.
- 15** Trojanowicz B, Chen Z, **Mustafa T**, Dralle H, Finke R, Hoang- Vu C.
Expression of two ARE directed proteins – AUF1 and HuR in FTC 133
Poster. Jahrestagung der Deutschen Endokrinologischen Gesellschaft, Dresden, 2004.
Abstrakt in: Exp and Clin Endocrinol Diabetes. 2004. 112: 28. (Suppl.).

- 16** Chen Z, Trojanowicz B, **Mustafa T**, Zschoyan R, Brauckhoff M, Gimm O, Dralle H, Hoang- Vu C.
Effects of CD82-siRNA in thyroid carcinoma cell line FTC-133
Poster. Jahrestagung der Deutschen Endokrinologischen Gesellschaft, Dresden, 2004.
Abstrakt in: Exp and Clin Endocrinol Diabetes. 2004. 112: 29. (Suppl.).
- 17** Pyka J, **Mustafa T**, Hombach- Klonisch S, Dralle H, Hoang- Vu C, Klonisch T.
Expression of proEGF in the human thyroid.
Poster. Kongress der „International Association of Endocrine Surgeons“, Uppsala, Schweden, 2004.
- 18** Chen Z, **Mustafa T**, Erhuma M, Hombach- Klonisch S, Nguyen TP, Brauckhoff M, Dralle H, Hoang- Vu C.
CD82: a novel metastasis suppressor gene in human thyroid carcinoma.
Poster. Kongress der „International Association of Endocrine Surgeons“, Uppsala, Schweden, 2004.
- 19** Winkler A, Trojanowicz B, Hammje K, **Mustafa T**, Chen Z, Finke R, Dralle H, Hoang-Vu C.
Retinoid Acid induces post-translational modifications of alpha-enolase in the thyroid cell line FTC-133.
Poster. Kongress der „International Association of Endocrine Surgeons“, Uppsala, Schweden, 2004.
- 20** Trojanowicz B, Chen Z, Brodauf L, Lüftenegger C, **Mustafa T**, Finke R, Dralle H, Hoang- Vu C.
AUF-1 expression in the thyroid.
Poster. Kongress der „International Association of Endocrine Surgeons“, Uppsala, Schweden, 2004.

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Henning Dralle für die Bereitstellung des Themas und der exzellenten Forschungsmöglichkeiten.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Dr. Johannes Schubert für die Koordinierung der klinischen Arbeit in der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie und die stets gewährte Diskussionsbereitschaft danken.

Dem Leiter der Arbeitsgruppe für Experimentelle Chirurgie und Onkologie, PD Dr. Cuong Hoang-Vu, gebührt mein Dank für die genossene Förderung und die intensive wissenschaftliche Betreuung.

Für die umfassende Unterstützung bei der Laborarbeit und der Auswertung der Versuchsergebnisse in der Arbeitsgruppe für Experimentelle Chirurgie und Onkologie, bedanke ich mich sehr bei Kathrin Hammje, Christel Sauer und Dr. Carsten Sekulla.

Prof. Dr. Thomas Klonisch, Dr. Astrid Kehlen, Prof. John Giunta und Dr. Dr. Alexander Eckert danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Für die interessanten wissenschaftlichen Anregungen und gewährte Diskussionsbereitschaft danke ich meinen Kollegen Dr. Stefan Ahrens und PD Dr. Michael Klintschar

Für die liebevolle Unterstützung möchte ich meinen Eltern, meiner Frau Wenke sowie meinen Freunden Henry und Christian danken.

Ich bedanke mich bei der Jürgen-Manchot-Stiftung (ehemals Pinguin-Stiftung, Düsseldorf) und der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt für die Unterstützung durch Stipendien.