

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

An der Hals-Nasen-Ohren Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier)

**Vergleichende Analyse des Angiogenese- und Metastasierungsverhaltens
basaloid-squamöser Plattenepithelkarzinome gegenüber herkömmlichen
Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs**

Isabelle Jessica Veronika Ayx

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier
2. Priv.-Doz. Dr. Th. Stark

Die Dissertation wurde am 05.03.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.01.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Verzeichnis der Abkürzungen	1
2. Einleitung	2
2.1 Epidemiologie	2
2.2 Ätiologie	3
2.3 Prognose	4
2.4 Angiogenese	5
3. Fragestellung	10
4. Material und Methoden	10
4.1 Material	10
4.2 Patientenauswahl	13
4.3 Methoden	14
4.3.1 Hämatoxylin - Eosin Färbung	14
4.3.2 Tissue Micro Array	14
4.3.3 Immunhistochemie	16
4.3.4 RNA Isolation	19
4.3.5 cDNA Synthese	20
4.3.6 RT ² Profiler™ PCR Array: Human Angiogenese	21
5. Ergebnis	24
5.1 MMP2 und 9	24
5.2 TIMP2	27
5.3 PLAU	29
5.4 IL8	31
5.5 TGFβ1	33
5.6 FGF2	35
5.7 ITGB3	37
5.8 CXCL9	39
5.9 Thrombospondin 1	41
5.10 Zusammenfassung der Ergebnisse	43

6. Diskussion	44
7. Zusammenfassung	50
8. Literaturverzeichnis	52

1. Verzeichnis der Abkürzungen

Ang 1	-	Angiopoietin 1
BCC	-	basal cell carcinoma
bFGF	-	basic fibroblast growth factor
BSCC	-	basaloid squamous cell carcinoma
CXCL9	-	Chemokine Ligand 9
COX 2	-	Cyclooxygenase 2
ECM	-	Extrazelluläre Matrix
ESCC	-	esophageal squamous cell carcinoma
GAPDH	-	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HNSCC	-	Head and neck squamous cell carcinoma
IL 8	-	Interleukin 8
ITGβ3	-	Integrin beta 3
MMP	-	Matrixmetalloproteinase
NO	-	Stickstoffmonoxid
PAI 1	-	Plasminogen activator inhibitor 1
PDGF	-	Platelet derivated growth factor
PECAM	-	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PLAU	-	urokinase-type plasminogen activator (u-PA)
qPCR	-	Real Time- Polymerase Chain Reaction
rcf	-	relative centrifugal force
TGFβ1	-	Tumor Growth Factor β1
TIMP	-	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase
Tris	-	Trishydroxymethylaminomethan
TSBP 1	-	Thrombospondin 1
VE-Cadherin	-	Vascular Endothelial- Cadherin
VEGF	-	Vascular endothelial growth factor

2. Einleitung

2.1 Epidemiologie

In der Todesursachenstatistik der Bundesrepublik Deutschland stehen maligne Erkrankungen an zweiter Stelle nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts stehen in Deutschland Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens bei Männern an fünfter Stelle (3,9%), bei Frauen an 16. Stelle (1,6%). Die Erkrankungsrate für Frauen wird auf 5,9 und für Männer auf 19,1 beziffert (Robert-Koch-Institut, 2012). Während bei Männern die Inzidenz der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome (HNSCC) im Laufe der letzten Jahre zurückgegangen ist, beobachtete das Robert-Koch-Institut eine Zunahme der Inzidenz bei Frauen bis Ende der 90er Jahre und danach eine Stagnierung. Das Durchschnittsalter der Erkrankten lag zwischen 60 und 70 Jahren. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Männern in Deutschland bei 36 bis 45%, bei Frauen bei 50 bis 63% (Robert-Koch-Institut, 2012). Pro 100.000 Personen sterben europaweit 7,4 Männer und 1,7 Frauen am HNSCC. Die erwartete Überlebensrate variiert jedoch in Abhängigkeit der Lokalisation, der Tumorgöße und der möglichen lokoregionären Metastasen und der Fernmetastasen stark. Insbesondere der Lymphknotenstatus bestimmt die Überlebensrate nachhaltig. Johnson et al. zeigten bereits 1985, dass die Überlebenschance bei positivem Lymphknotenstatus um 50 % im Vergleich zu negativem Lymphknotenstatus abnimmt.

Entwicklungsländer haben eine höhere Prävalenz an Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches als Industriestaaten. Weltweit steht das HNSCC bei Männern an fünfter Stelle, doch in Entwicklungsländern (z.B. Iran, Indien, Pakistan) stellt es die häufigste Krebsdiagnose dar (Basu et al., 2008). Dies wurde auf eine erhöhte Aussetzung von verschiedensten, noch nicht ausreichend geklärten Noxen zurückgeführt.

Das HNSCC wurde vor allem in der Zunge, dem Larynx und dem Hypopharynx beobachtet. Weitere Fälle des HNSCC wurden im Ösophagus, der Lunge, dem Anus und dem Urogenitaltrakt beschrieben (Brainard und Hart, 1998; Brambilla et al., 1992; Chetty, Serra und Hsieh, 2005; Cubilla et al., 1998; Saltarelli et al., 1995; Sarbia et al., 1997; Vakar-Lopez und Abrams, 2000).

Das basaloid squamöse Plattenepithelkarzinom (BSCC) stellt eine seltene Sonderform des HNSCC dar und wurde erstmals 1986 von Wain et al. an zehn Fällen beschrieben. Sie definierten das BSCC anhand seines mikroskopischen Erscheinungsbildes. Die untersuchten

BSCC zeigten solide Gruppen von Zellen in einer lobulären, mukosanahen Konfiguration. Ferner ließen sich kleine, gedrängte Zellen mit wenig Zytoplasma und hyperchromatischen Kernen darstellen. Schmale zystische Räume, die muzinähnliches Material enthalten, waren ein weiteres Kriterium für die Diagnose BSCC. Wain et al. vermuteten, dass das BSCC von einer totipotenten Stammzelle in der Basalschicht der Schleimhaut abstamme. Die WHO definierte 2005 das BSCC als eine aggressive Variante des squamösen Plattenepithelkarzinoms, bestehend aus einem basaloiden und einem squamösen Anteil (Cardesa et al, 2005). Für BSCC wurde eine „Prädilektion“ für den oberen Aerodigestivtrakt angegeben, wenngleich keine Studien vorlagen, die ausreichende Fallzahlen einschlossen, um die Hypothese abschließend zu klären (Banks et al., 1992; Wain et al., 1986).

2.2 Ätiologie

Wie bei vielen anderen malignen Erkrankungen sind die genauen Ursachen noch nicht hinreichend bekannt, die die Entstehung von HNSCC und BSCC unterhalten. Es gibt eine Reihe von Risikofaktoren, die das Auftreten eines HNSCC begünstigen. Nikotin (Boyle et al., 2010) und Alkohol (Zygianni et al., 2011) gelten als wichtigste Risikofaktoren für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms des oberen Aerodigestivtraktes. Hierbei nahm das Erkrankungsrisiko bei Rauchern um das zwei- bis vierfache und bei regelmäßigem Alkoholkonsum um das sechs- bis 15-fache zu. Bei gleichzeitigem Konsum hatten diese beiden Gesellschaftsdrogen eine potenzierende Wirkung. Dabei wurde die gesamte Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes geschädigt, so dass neben einem lokalisierten Tumorwachstum auch ein disseminiertes Auftreten (sog. Feldkanzerisierung) vorzufinden war (Esser et al., 2000). Außer den Gesellschaftsdrogen Nikotin und Alkohol konnten humane Papillomaviren in der Ätiopathogenese von oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden. Hierbei waren von den mehr als 70 HPV-Typen vor allem die high risk Varianten HPV 16, 18 und 33 von Bedeutung. Eine Assoziation zu einer HPV-Infektion konnte hier in bis zu 54,3% der untersuchten Patienten nachgewiesen werden (Cruz et al., 1996).

Auch für das BSCC wurde ein Zusammenhang mit dem HPV Virus vermutet. Begum und Westra (2008) konnten anhand einer p16 Immunhistochemie sowie HPV 16 in situ Hybridisierung einen positiven HPV-Status bei insgesamt 34% der BSCC Patienten detektieren. Auffallend war vor allem die hohe Prävalenz von HPV 16 bei Oropharynx Tumoren (76% positiver HPV Status). Obwohl ein positiver HPV 16 Status einen

eigenständigen Risikofaktor bei der Entstehung des HNSCC darstellte, zeigte sich bei diesen Patienten eine bessere Prognose (Begum und Westra, 2008; Tribius et al., 2011). Dies wurde auch in einer Studie von Ang et al. (2010) bestätigt, die eine bessere Überlebensrate bei HPV positiven Patienten beschrieben (82,4% versus 57,1%). Diese Studie stützte sich auf eine p16-Immunhistochemie als Surrogatparameter der vermeintlichen HPV-Infektion. Unlängst forderte die überwiegende Zahl der Forschergruppen die Kombination aus p16 Immunhistochemie und HPV in situ Hybridisierung oder PCR, da p16 aufgrund seiner niedrigen Spezifität auch oft in HPV negativen Tumoren überexprimiert wird (Gao und Chen, 2010). Dem HPV-Status als eigenständigen Risikofaktor dürfte in Zukunft noch mehr Bedeutung zukommen, da Hocking et al. (2011) eine Zunahme der HPV Fälle beobachteten. Darüber hinaus bleibt die Bedeutung der HPV-Vakzinierung junger Frauen zur Vorbeugung von Zervixkarzinomen für die Entstehung des Oropharynx-Karzinoms abzuwarten. Neben den oben angeführten Risikofaktoren werden eine unzureichende Mundhygiene und ein geringer Verzehr von Obst und Gemüse als zusätzliche Risikofaktoren diskutiert (Robert-Koch-Institut, Krebs in Deutschland, 2012). Barth et al. (1997) stellten die tumor-protective Wirkung von Früchten und Gemüse durch ihren hohen Gehalt an Antioxidantien (beta-carotin, Vitamin C und E) fest und bezeichneten sie als Chemoprävention. Sie zeigten, dass eine vermehrte Zufuhr von beta-carotin, Vitamin C und E mit einem verminderten Anstieg von Zellkinetik Parametern einherging.

2.3 Prognose

Die Prognose eines Patienten ist abhängig von dem Fortschritt des Tumors. Dieser kann anhand der TNM-Klassifikation beurteilt werden. Hierbei galt für Plattenepithelkarzinome des Oropharynx (TNM Klassifikation maligner Tumoren, 2010):

T- Tumorstadium

T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung	
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung	
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis	
T4	T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer
	T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

N- Regionäre Lymphknoten

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	
N1	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung	
N2	Metastase(n)	wie nachfolgend beschrieben:
	N2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
	N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
	N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung	

M- Fernmetastasen

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Das aggressive Verhalten des BSCC wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine starke Assoziation mit einem hohen Rezidivrisiko, Lymphknotenmetastasen sowie Fernmetastasen in Lunge und Leber wurde beschrieben (Banks et al., 1992; Campman, Gandour-Edwards und Sykes, 1994; Coppola et al., 1993; Ferlito, 1993; Luna et al., 1990; Wain et al., 1986). Die frühe Metastasierung ging hierbei mit einer deutlich schlechteren Prognose einher. Aufgrund des positiven Lymphknotenstatus lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Stadium vor (Altavilla et al. 1999; de Sampaio Goes et al., 2004). Einige Autoren sahen daher, bezogen auf das Tumorstadium, die Prognose im Vergleich mit squamösen Plattenepithelkarzinomen als nicht signifikant schlechter an (de Sampaio Goes et al., 2004). Andere Autoren hingegen betonten, dass eine verminderte mittlere Überlebensdauer beim BSCC im Vergleich zum HNSCC angenommen werden muss (Wain et al., 1986). Bis dato waren allerdings nicht genügend BSCC Fälle bekannt, um eine eindeutige Prognose zu stellen.

2.4 Angiogenese

Angiogenese wird als Bildung von neuen Blutgefäßen aus bereits bestehenden definiert, zum Beispiel bei Wundheilung und Tumorwachstum im Erwachsenenalter. Im Gegensatz hierzu steht die Vaskulogenese, die Bildung von Blutgefäßen im Embryo aus neuen Endothelzellen.

Neue Gefäße im Erwachsenen entstehen hauptsächlich durch Angiogenese. Im physiologischen Zustand herrscht ein Gleichgewicht zwischen Angiogenese stimulierenden Faktoren und Angiogenese hemmenden Faktoren. Im Falle einer akuten Wundheilung können sich Endothelzellen erneut teilen, so dass der Reparationsvorgang beschleunigt wird. Kommt es jedoch im Rahmen einer chronischen Entzündung oder eines Tumorwachstums zu einem Überangebot an Angiogenese stimulierenden Faktoren, so gerät das Gleichgewicht außer Kontrolle und es kommt zu einer pathologischen Angiogenese. Dies wird als angiogenetischer Switch bezeichnet. Zu den Angiogenese stimulierenden Faktoren zählen VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basal fibroblast growth factor), Interleukin 8, EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), TGF α/β (tumor growth factor) und Angiopoietin. Bekannte hemmende Substanzen sind Angiostatin, Endostatin und Interferone (Carmeliet und Jain, 2000; Cines et al., 1998; Huang et al., 2011).

Schon vor 100 Jahren machte E. Goldman (1907) die Beobachtung, dass Tumore im Zusammenhang mit der Angiogenese stehen. 1971 fand Folkman heraus, dass Tumorwachstum und Metastaseverhalten von der Angiogenese abhängig sind und damit durch Angiogenese hemmende Substanzen ein Fortschreiten des Tumorwachstums verhindert werden könnte (Folkman, 1971; Folkman und Beckner, 2000).

Tumorgefäße entstehen entweder sprießend aus bereits bestehenden Gefäßen oder durch Intussuszeption (Carmeliet, 2000). Vorläuferendothelzellen aus der Gefäßwand können ebenfalls zur Tumorangiogenese beitragen (Carmeliet, 2000; Carmeliet und Jain, 2000).

Die Angiogenese beginnt mit einer Vasodilatation und Permeabilitätserhöhung des bestehenden Gefäßes durch VEGF. Hierdurch kommt es zu einem Austritt von Plasmaproteinen aus dem Gefäß in das umgebende Gewebe, so dass ein provisorisches Gerüst für auswandernde Endothelzellen entsteht. Die Permeabilitätserhöhung durch Fenestration der Gefäßwand wird durch verschiedene Faktoren, wie PECAM 1, VE-cadherin und Src Kinasen, verursacht. Diese Moleküle spielen eine große Rolle in der Zelladhäsion, Leukozytenmigration und Angiogenese. Da eine erhöhte Permeabilität auch einen erheblichen Schaden auslösen kann, wirkt Angiopoietin 1 als Inhibitor. Damit Endothelzellen aus ihrem Zellverband austreten können, müssen die Interzellulärkontakte gelockert werden. Angiopoietin 2 und Proteinasen lösen die Basalmembran und die interstitielle Matrix auf. Stimulierend auf die Endothelzellmigration wirken unter anderem VEGF, Angiopoietin 1, bFGF und der Zellmatrix-Rezeptor $\alpha\beta 3$ -integrin. Da sich die Zellen meist in einer Art Schnur anordnen, wird erst im Anschluss ein Lumen gebildet, vor allem ausgelöst durch Ang 1 in Kombination mit VEGF. Thrombospondin gilt als Hemmstoff der Lumenausbildung. Da

Gefäße, die lediglich aus einer Endothelschicht bestehen, nicht ausreichend funktionsfähig sind, werden durch PDGF-BB Muskelzellen rekrutiert, die sich an die Endothelzellen anlagern und mittels Stimulation via TGF- β 1 und Ang1/Tie2 in einem Zellverband stabilisiert werden (Cines et al., 1998). Die Erhaltung des neuen Gefäßes ist abhängig vom Überleben der Endothelzelle. Begünstigt wird das Überleben durch VEGF, Ang1 und $\alpha\beta$ 3-integrin. Beim Erwachsenen hat sich eine Überlebenszeit von mehreren Jahren gezeigt (Carmeliet, 2000).

Kürzlich wurden mehrere Moleküle (PAI-1, NO, COX2, TSP2) im Zusammenhang mit der Tumorangiogenese erforscht. Bis dato sind die Mechanismen dieser Moleküle in diesem Zusammenhang nur wenig bekannt. Es hat sich allerdings gezeigt, dass Tumorgefäße ein besonderes abnormales Gefäßbild zeigen. Ihnen fehlen u. a. schützende Mechanismen, die normale Gefäße während des Wachstums erhalten. Die Gefäßinnenwand besteht auch nicht aus einer homogenen Schicht Endothelzellen, sondern stellt ein Mosaik aus Endothelzellen und Tumorzellen dar. Bisher ist nicht geklärt, wie dieses Mosaik zustande kommt. Durch ausgeprägte Fenestrierungen und eine diskontinuierliche Basalmembran entsteht ein undichtes Gefäß. Das Ausmaß an Permeabilität variiert in den verschiedenen Tumorarten. Hierbei wird eine Überexpression von Ang1 und Unterexpression von VEGF bei wenig permeablen sowie eine Überexpression von Ang2 bei stark permeablen Gefäßen angenommen (Carmeliet und Jain, 2000). Durch ein mögliches Ungleichgewicht an VEGF und Angiopoietin kommt es häufig zu desorganisierten, dilatierten Gefäßen. Diese sind durch ungleiche Durchmesser und häufige Shunts gekennzeichnet. Folglich entsteht ein variabler Blutfluss, der zu hypoxischen Tumorarealen führen kann. Dies reduziert auch die medikamentöse Wirksamkeit gängiger Zytostatika (Carmeliet und Jain, 2000).

IL8 ist ein Peptidhormon, das unter anderem von Endothelzellen produziert wird. Seine Rolle in der Angiogenese gestaltet sich in der Bildung von Mikrovesikeln in Tumoren. Diese Mikrovesikel beeinflussen sowohl die Metastasenbildung als auch die Tumorprognose. Eine hohe IL 8 Expression korreliert mit fortgeschrittenem Tumorstadium sowie mit einer erhöhten Neovaskularisation. Bedingt durch den positiven Effekt auf Tumorwachstum, Metastasenbildung und Tumorprogression, zeigt sich IL8 als einer der wichtigsten Angiogenese stimulierenden Faktoren (Liao et al.; 2010). Im Zusammenhang mit der Tumorprogression wurde auch Thrombospondin 1 diskutiert. Thrombospondin 1 interagiert mit verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren und reguliert einige zelluläre Prozesse, wie zum Beispiel Proliferation, Differenzierung und Zellbindung, besonders aber die Zellmigration. Diese Zellmigration erlaubt den Endothelzellen in das umgebende extrazelluläre Gewebe auszuwandern und somit eine Gefäßneubildung auszulösen. Der positive Effekt auf die

Zellproliferation hat hierbei nur eine untergeordnete Rolle (Staniszewska et al., 2007). Jedoch zeigt sich, dass Thrombospondin 1 bei Beginn des Tumorwachstums durch direkten Einfluss auf das Zellüberleben und die Zellmigration sowie durch Beeinflussung der Bioverfügbarkeit von VEGF einen negativen Effekt auf die Angiogenese und die Tumorprogression hat. Durch die längere Exposition von Thrombospondin 1 auf den Tumor kommt es aber zu einer Hypoxie und einer Zunahme von pro-angiogenetischen Faktoren. Dies, sowie die bereits beschriebene Wirkung von Thrombospondin 1 selbst auf die Zellmigration, führen zu einem pro-angiogenetischen Effekt von Thrombospondin 1 auf den Tumor (Kazerounian, Yee und Lawler, 2008). Auch die Matrixmetalloproteinasen erleichtern die Zellmigration. Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 (MMP2 und 9) sind Proteinase, die die extrazelluläre Matrix umbauen. Eine Überexpression führt zu einem Zusammenbruch der extrazellulären Matrix, da sie eine Schlüsselrolle durch eine Degradierung von Kollagen Typ IV (ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix [ECM]) spielen. Dieser Prozess äußert sich bei Tumoren in einer Tumorprogression und erleichterten Metastasenbildung. Wenn man die beiden Matrixmetalloproteinasen getrennt voneinander betrachtet, zeigt sich, dass MMP2 vor allem für eine Degradation der ECM verantwortlich ist, während MMP9 mit der Tumorgöße positiv korreliert. Als Gegenregulator zu den MMPs bildet die Zelle TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinase). Eine Überexpression von TIMP1 und 2 senkt das Risiko der Metastasenbildung und des Tumorwachstums. Bei einer kombinierten Überexpression von MMPs und TIMPs geht man von dem Versuch der Zelle aus, das Gleichgewicht wiederherzustellen (Zhang et al., 2009a).

Eine Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen wird unter anderem durch PLAU katalysiert. PLAU (= uPA = Urokinase type plasminogen activator) ist eine Serinprotease, die in Tumoren überexprimiert vorliegt. PLAU katalysiert den Umbau von Plasminogen zu Plasmin. Aktiviertes Plasmin spielt eine Rolle bei der Proteolyse und Aktivierung von MMP und verschiedenen Wachstumsfaktoren, die wichtig für die Zelladhäsion, Zellmigration und Proliferation sowie für die Angiogenese sind. Eine Hemmung von PLAU führt zu einer Senkung von pro-angiogenetischen Faktoren, wie Angiogenin und Angiopoietin 1. Dieser Effekt ist in der Tumorthherapie von Nutzen, zeigt aber auch deutlich die wichtige Rolle von PLAU in der Angiogenese (Raghu et al., 2010). bFGF (basic fibroblast growth factor) ist ein Mitglied der Heparin-bindenden Wachstumsfaktor-Familie. Aktiviert durch Heparinsulfat degrading enzymes (Vlodavsky et al., 2000) stimuliert es die Bildung von neuen Blutvesikeln (Jung et al., 2010). Außerdem stimuliert es die Mitose von Gefäßendothelzellen und ist als wichtiges Molekül bei der pathologischen Angiogenese beschrieben worden (Lee et al.,

2010). Eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von Tumoren durch bFGF durch den FGF- Rezeptor 1 beschrieb Chen (Chen, Chao und Yang, 1995). Im Vergleich zu bFGF präsentiert sich das biologische Verhalten von CXCL9 als konzentrationsabhängig. CXCL9 gehört zu der Chemokin Familie und wirkt als IFN γ stimulierter T-Zell Aktivator (Gasperini et al., 1999). Studien haben gezeigt, dass eine niedrige Konzentration von CXCL9 mit einer Chemotaxis, während höhere Konzentrationen dieses Moleküls mit einer spontanen Migration von Melanomzellen sowie mit einer Durchbrechung der Endothelzellbarriere in malignen Melanomen einhergeht (Amatschek et al., 2011).

TGF β 1 (transforming growth factor β 1) ist ein Zytokin, das Tumorzellen zur Proliferation anregt und die Umwandlung der Zelle in einen invasiven Phänotyp unterstützt. Dies zeigt sich durch eine epitheliale in mesenchymale Transition (EMT). Hierbei kommt es in der Zelle zu einer Zunahme von mesenchymalen Molekülen und einer Abnahme von E-cadherin. Die EMT erleichtert Invasion und Metastasenbildung. Dies wird auch durch die Regulation der Bestandteile der extrazellulären Matrix durch TGF β 1 sowie durch andere unterstützende Prozesse wie Proteolyse gefördert. Es ist allerdings wichtig zu bemerken, dass TGF β 1 erst in späten Tumorstadien die Metastasenbildung und Angiogenese unterstützt. Zu Beginn wirkt es noch als Tumorsuppressor (Perera et al., 2010). Ebenfalls pro-angiogenetisch wirkt Integrin β 3. Dies ist ein Mitglied der Integrin-Familie, die durch Zelloberflächenrezeptoren die Zellmatrix und Zell zu Zell Adhäsion kontrollieren. Noch ist es unklar, durch welche genauen molekularen Mechanismen Integrin β 3 als Regulator für Tumorwachstum und Invasion wirkt. Sicher ist jedoch, dass Integrine über Zellbewegung pro-angiogenetisch wirken (Wu et al., 2009). Bereits in früheren Studien zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Überexpression von Integrienen und Metastasenbildung sowie Tumorinvasion (Albelda et al., 1990).

3. Fragestellung

Wain et al. beschrieben 1986 erstmals das basaloid squamöse Plattenepithelkarzinom (BSCC). Klinisch wird das BSCC als aggressive Variante herkömmlicher HNSCC angenommen, wenngleich weder prospektiv randomisierte Studien noch retrospektive Kohortenstudien in ausreichender Fallzahl vorliegen, die diese Hypothese hinreichend untermauern. In vielen Fällen wurde eine frühe lymphogene, zum Teil auch hämatogene Metastasierung beobachtet. Die molekulare Grundlage dieses biologisch aggressiven Verhaltens ist nicht geklärt. Die vorliegende Arbeit untersucht das Angiogenese- und Metastasierungsverhalten des BSCC im Vergleich zum HNSCC. Es konnte ein Probenkollektiv von 35 Patienten mit BSCC zusammengetragen werden, welchem Proben von HNSCC Patienten gegenübergestellt wurden, die hinsichtlich des UICC-Stadiums entsprachen. Mittels Immunhistochemie und quantitativer PCR wurden die Angiogenese-assoziierten Gene MMP2 und 9, TIMP2, bFGF, IL8, CXCL9, TSP1, ITGB3, TGF β 1 und PLAU untersucht. Hierdurch sollte die Frage geklärt werden, ob das klinisch vermeintlich aggressivere Verhalten der BSCC durch diese Tumor-begünstigenden Moleküle molekular unterhalten wird.

4. Material und Methoden

4.1 Material

Häufig verwendete Lösungen und Reagenzien

- Antikörper

- Chemokin Ligand 9 (USBiological, Swampscott, Massachusetts, USA)
- Thrombospondin 1 (USBiological)
- Matrixmetalloproteinase 2 (EPITOMICS, Burlingame, CA, USA)
- Matrixmetalloproteinase 9 (EPITOMICS)
- Tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (IMGENEX, San Diego, CA, USA)
- Transforming Growth Factor β 1 (USBiological)
- Urokinase Plasminogen Activator (USBiological)

- Integrin beta 3 (IMGENEX)
 - Basic fibroblast growth factor (USBiological)
 - Interleukin 8 (USBiological)
- Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
 - Goat Serum Normal (Dako, Glostrup, Denmark)
 - Citrat-Puffer (pH 6,0)
 - 4,2 g Zitronensäuremonohydrat (Merck KGoA, Darmstadt, Deutschland)
 - ad 2l dH₂O
 - 4mmol/l Natronlauge ad pH 6 (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
 - TBS-Puffer
 - 20mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 150mM NaCl
 - Dako REAL™ Antibody Diluent (Dako)
 - Dako REAL™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako)
 - Ethanol >99,8%, 96%, 70% (Carl Roth GmbH & Co KG)
 - Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co KG)
 - 20 % SDS Roti® Stock (Carl Roth GmbH & Co KG)
 - 30 % Wasserstoffperoxid (Merck KGoA)
 - Xylol (Carl Roth GmbH & Co KG)
 - Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland)
 - Hämatoxylin-/Eosin-Färbung (HE)
 - a) Hämalun-Lösung nach Mayer 1g Hämatoxylin (Merck KGoA)
 - 0,2g Natriumjodat
 - 50g Kalialun
 - 50g Chloralhydrat
 - 1g kristalline Zitronensäure
 - ad 1l dH₂O

b) Eosinlösung 10g Eosin (Merck KGoA)

- ad 1l dH₂O

- Carrier RNA (Qiagen Micro Kit, Hilden, Germany)
- High Pure FFPE RNA Micro Kit (Roche, Mannheim, Deutschland)
- RT² FFPE PreAMP cDNA Synthesis Kit (SABiosciences™, Frederick, MD, USA)
- RT² qPCR Master Mix (SABiosciences™)

Verwendete Geräte

- BioRad® CFX96 Real Time System (Biorad, Hercules, CA, USA)
- Feinwaage (Scaltec, Göttingen, Deutschland)
- Mikroskop Leica DMI6000B (Leica, Wetzlar, Deutschland)
- Nanodrop 1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
- pH-Meter 766 Calimatic (Knick, Mering, Deutschland)
- Rotierer (RCT Basic, IKA Labor Technik, Staufen, Deutschland)
- Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Westbury, New York, USA)
- Tissue-Micro-Array-System (feinmechanisch hergestelltes System, freundlicher Weise vom Pathologischen Institut des Klinikum Rechts der Isar der TUM zur Verfügung gestellt)
- Vortexer (MS2 Minishaker IKA®, Staufen, Deutschland)
- Wärmeschrank (Binder, Tuttingen, Deutschland)
- Zentrifuge 5430 R (Eppendorf AG)

4.2 Patientenauswahl

In der Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München wurde von Januar 2001 bis August 2009 bei 37 Patienten ein BSCC des oberen Aerodigestivtraktes gesichert. Das in Paraffin gebettete Operationsmaterial wurde uns vom Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Die BSCC wurden entsprechend der TNM Klassifikation und dem Grading-System beurteilt. Jedem BSCC wurde ein Vergleichspartner herkömmlicher HNSCC mit entsprechender Tumorlokalisierung und UICC-Tumorstadium zugeordnet. Sofern verfügbar, erfolgte ferner eine Gegenüberstellung mit HNSCC gleichen TNM-Stadiums, jedoch unterschiedlichen Gradings. Für 35 BSCC lag das Probenmaterial in ausreichender Qualität und Quantität vor, so dass es immunhistochemisch analysiert werden konnte. Die Gruppe der 17 Oropharynx-Karzinome stellte hierbei die größte Untergruppe dar, so dass für diese quantitative PCR-Untersuchungen durchgeführt werden konnten (Tabelle 01).

Lokalisation	UICC-Klassifikation	Anzahl
CUP		3
Sinusal		4
	UICCII	1
	UICCIII	1
	UICCIIVa	2
Oropharynx		17
	UICCIIVa	14
	UICCIIVb	1
	UICCIIVc	2
Hypopharynx		3
	UICCIII	2
	UICCIIVa	1
Larynx		6
	UICCIIVa	6
Mundhöhle		4
	UICCII	1
	UICCIIVa	3

Tab.01: Anzahl an BSCC-Fällen entsprechend ihrer Lokalisation und ihres UICC-Stadiums

4.3.Methoden

4.3.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung diente der mikroskopischen Beurteilung der paraffin-gebetteten Patientenproben. Für jede Patientenprobe wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 3µm Schnitte hergestellt. Diese Schnitte wurden auf einen Objektträger überführt und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Nach dem Trocknen wurden sie in Xylol entparaffiniert und durch die absteigende Alkoholreihe (99,8%iges, 96%iges, 70%iges Ethanol für je 25 Sekunden) in ein wässriges Milieu überführt. Danach folgte ein Waschvorgang in dH₂O für 25 Sekunden. Nachfolgend ruhten die Schnitte für jeweils drei Minuten in zwei mit Hämatoxylinlösung gefüllten Küvetten. Nach zwei zweiminütigen Waschvorgängen in dH₂O schloss sich eine zweiminütige Lagerung in der Eosinlösung an. Zur Fixierung erfolgte nun eine aufsteigende Alkoholreihe (30sec 96%iges Ethanol, zweimal 25sec 96%iges Ethanol, zweimal zwei Minuten Isopropanol, zweimal zwei Minuten Xylol). Schließlich wurden die Objektträger einzeln aus dem Xylol entnommen und mittels Eukitt und Deckblatt verschlossen. Nach einer 10 minütigen Lagerung im Trockenschrank bei 65°C konnten die Schnitte beurteilt werden.

4.3.2 Tissue-Micro-Array

Der Tissue-Micro-Array (TMA) wurde verwendet, um verschiedene Gewebeproben auf einem Paraffinblock zu vereinigen. Der TMA ermöglichte, sämtliche auf ihm eingebrachten Proben in einem Versuchsansatz zu untersuchen. Hierdurch ließen sich Arbeitsaufwand, Arbeitskosten, Probenmenge und versuchsbezogene Varianz wesentlich reduzieren. Zunächst wurden für jede Patientenprobe repräsentative Schnitte einer 2µm Schichtdicke angefertigt. In der nachfolgenden Hämatoxylin-Eosin-Färbung (siehe 4.3.1) wurden Tumoreale identifiziert und das korrespondierende Areal des Paraffinblocks markiert. Anschließend wurde der unbehandelte Paraffin-Block in das TMA-System eingespannt. Das TMA-System bestand aus einem verschiebbaren Gerätekörper, der zwei Halterungen für Stanzen unterschiedlichen Durchmessers aufwies (Abb. 01). Dies machte es möglich, einen Gewebezylinder der kleineren Stanze in den durch die erste, größere Stanze vorbereiteten Hohlraum einzuführen, ohne dabei den Gerätekörper bewegen zu müssen. Der Gerätekörper ließ sich durch zwei Räder mit Millimetermarkierungen in der vertikalen und horizontalen Ebene verschieben. Somit konnte der leere Paraffinblock fest am Boden des Gerätes befestigt werden, während der Gerätekörper mit den Stanzen beweglich war. Der Gewebeblock wurde

auf einer mobilen Platte zum Stanzen auf den befestigten Leerblock gestellt. Dies ermöglichte ein beliebiges Austauschen des Gewebeblocks, während der Leerblock fest mit dem Gerät verbunden war. Der Stanzvorgang bestand immer aus zwei aufeinander folgenden Schritten. Zuerst wurde mit einer stärkeren Stanze ein Loch in den Leerblock gestanzt und der entnommene Paraffinzylinder verworfen. Dann wurde mit einer kleineren Stanze ein Zylinder aus dem Gewebeblock gestanzt und in den Hohlraum des Leerblocks überführt. Unterschiedliche Zylinderhöhen wurden schließlich mit Paraffin aufgefüllt. Mit Hilfe dieser Technik ließen sich 117 Proben auf einen Paraffinblock der Größe 4cm x 2,6cm erstellen (Abb. 02). Zur späteren mikroskopischen Orientierung wurde „neutrales“ histologisches Material (z.B. Uterusgewebe) als Markierung und Randbegrenzung ebenfalls in den TMA eingebracht (Abb. 03). Damit reduzierte sich die Zahl gleichzeitig analysierbarer Proben auf 54. Die fertigen TMA wurden abschließend bei 37°C über Nacht erwärmt, um ein möglichst gutes Verschmelzen der Gewebezylinder mit dem Paraffinblock zu gewährleisten.



Abb. 01: TMA-System

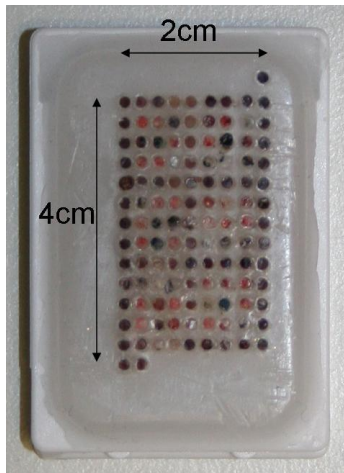


Abb. 02: TMA

M	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
	R				R				R				R	
	R				R				R				R	
	R				R				R				R	
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
	R				R				R				R	
	R				R				R				R	
	R				R				R				R	M
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	M

Abb. 03: Schematische Darstellung der Belegung eines TMA. Die Markierungen (M) dienen der Ausrichtung des Arrays, die Randbegrenzung (R) grenzt die einzelnen Probenareale voneinander ab.

4.3.3 Immunhistochemie

Das Prinzip der indirekten immunhistochemischen Färbung beinhaltet zwei verschiedene Antikörper-Schritte. Zuerst band der Primärantikörper spezifisch an das zu untersuchende Protein. An den Fc-Teil des Primärantikörpers band der biotinylierte Sekundärantikörper und das Peroxidase-konjugierte Avidin an das Biotin des Sekundärantikörpers an. Das Chromogen DAB wurde unter der enzymatischen Wirkung der Peroxidase umgesetzt und präzipitiert (Abb.04).

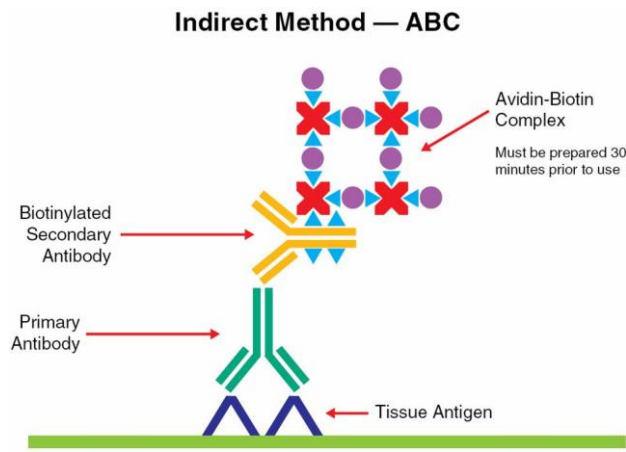


Abb. 04: Darstellung der Immunhistochemie durch die Immunochemistry Laboratory by DAKO Corporation

Vorbereitung der TMA:

Mit Hilfe des Schlittenmikrotoms wurde eine Serie von mindestens vier 3µm dicken Schnitten aus einem gekühlten Paraffinblock hergestellt. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgezogen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Entsprechend des Versuchablaufs der HE-Färbung erfolgte das Entparaffinieren. Entgegen des weiteren Vorgehens in der HE-Färbung war es erforderlich, Reste des noch bestehenden Paraffinnetzes aufzuspalten, um die spezifische Bindung des primären Antikörpers zu ermöglichen. Hierzu wurden die Schnitte für sieben Minuten in kochenden Citrat-Puffer getaucht und anschließend für fünf Minuten in TBS-Puffer bei Raumtemperatur überführt.

Färbung:

Die endogene Peroxidase wurde durch 15-minütiges Eintauchen in 3%iges H₂O₂ (180ml dH₂O, 20ml 30%iges H₂O₂) inaktiviert. Daran schloss sich eine 15-minütige Waschreihe in TBS-Puffer an, wobei nach jeweils fünf Minuten der Puffer erneuert wurde. Es folgte der Avidin-/Biotin-Block mittels des Blocking Kits von Vektor. Dazu musste nach 15 Minuten Wartezeit bei Raumtemperatur die aufgebrauchte Avidin-Lösung von den Schnitten entfernt werden und es schloss sich ein fünfminütiger Waschschrift mit TBS-Puffer an. Entsprechend der Behandlung des Avidin-Blocks folgte der Biotin-Block, jedoch ohne Waschschrift nach der 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig von dem Objektträger abgeklopft und die Objektträger in Feuchtkammern eingesetzt. Hieran schloss sich die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 200µl/Probe Normal Goat Serum (4:200 in TBS-Puffer) an. Daraufhin wurden 200µl der jeweiligen Antikörperverdünnung (Tabelle 02) auf jeden Objektträger pipettiert und in der Feuchtkammer liegend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Objektträger dreimal mit TBS-Puffer sorgfältig für fünf Minuten gewaschen und im Anschluss mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (je fünf Minuten) in TBS-Puffer entfernt. Darauf folgte das Benetzen der Schnitte mit Streptavidin-Peroxidase und ein Inkubieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach drei erneuten Waschschrritten für fünf Minuten in TBS-Puffer erfolgte die zweiminütige Färbereaktion mit 200µl DAB/Schnitt (20µl DAB in 1ml HRP-Substrat) bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte 10 Minuten (Raumtemperatur) in TBS-Puffer gewaschen.

Nach dem letzten Waschdurchgang setzte man den gefüllten Objektträgerhalter für fünf Minuten in eine Küvette mit Haemalaun, um die Gegenfärbung zu starten, und differenzierte die Schnitte danach für 10 Minuten unter fließendem Wasser.

An die Differenzierung schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe an (2min in dH₂O, 2min in 70%igem Ethanol, 2min 96%igem Ethanol, zweimal 2min in Isopropanol und dreimal 2min in Xylol). Die gefärbten Präparate wurden mit Eukitt eingedeckt.

Antikörper	Verdünnung in TBS
MMP2	1:100
MMP9	1:100
TIMP2	1:100
Thrombospondin 1	1:100
ITGB3	1:250
PLAU	1:800
bFGF	1:100
IL8	1:250
TGFβ1	1:100
CXCL9	1:100

Tab.02: Verdünnungsverhältnisse der verschiedenen Antikörper im Rahmen der Immunhistochemie

4.3.4 RNA Isolation (High Pure FFPE RNA Micro Kit)

Für die RNA-Isolation aus FFPE wurden für jede Probe drei separate Versuchsansätze angefertigt und am Ende gepoolt, so dass eine möglichst hohe RNA-Konzentration in Lösung war.

Aus jedem eisgekühlten Gewebeblock wurden je drei 10µm Schnitte angefertigt und anschließend markierte Tumorareale mikro-disseziert.

Die RNA Isolation begann mit dem *Entparaffinieren* der Schnitte. Hierzu wurden zu jeder Probe 800µl Xylol gegeben und gevortext. Danach wurde zu jeder Probe 400µl 98%iges Ethanol hinzugefügt und die Mischung erneut gevortext. Die Proben wurden nachfolgend für vier Minuten bei Raumtemperatur mit 18000g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und jede Probe mit 1ml 98%igem Ethanol gevortext. Nach erneuter Zentrifugation (18000g, 4min, RT) und Verwerfung des Überstandes wurden die Proben in den Thermomixer überführt und bei 55°C getrocknet.

Zur *Lyse* des Gewebes wurden die getrockneten Proben aus dem Thermomixer entnommen und je 100µl Gewebe-Lysispuffer (im Kit enthalten) hinzugegeben. Nachfolgend wurden 16µl 10% SDS und 40µl Proteinase K eingemischt. Die Proben wurden im Thermomixer platziert und bei 55°C und 450rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Eppendorf-Gefäße aus dem Thermomixer entnommen und ggf. Restgewebe mit 10µl Proteinase K im Thermomixer (55°C, 450rpm, 60min) nachverdaut.

Der *Lyse* folgte das *Waschen und Eluieren*. Hierfür wurde das Lysat mit 325µl Bindepuffer und 325µl 96%igem Ethanol vermischt. Jede Probe wurde nun einzeln auf einen High Pure Filter gegeben und bei Raumtemperatur mit 6800g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Zentrifugation mit 18000g wiederholt. 500µl Waschpuffer I (im Kit enthalten) wurden vorsichtig auf den High Pure Filter gegeben. Die Proben wurden bei Raumtemperatur mit 6800g für 15 Sekunden zentrifugiert, der dabei entstandene Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde mit 500µl Waschpuffer II (im Kit enthalten) unter gleichen Bedingungen (15sec, 6800g, RT) wiederholt und der Durchlauf verworfen. Als letzten Waschschrift wurden 300µl Waschpuffer II auf den High Pure Filter gegeben und anschließend bei Raumtemperatur mit 6800g für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Daraufhin wurden die Proben mit 18000g und Raumtemperatur für zwei Minuten „trocken“-zentrifugiert. Anschließend wurden die High Pure Filter in neue Eppendorf-Gefäße überführt. 90µl Elutionspuffer (im Kit vorhanden) wurden vorsichtig auf den High Pure Filter gegeben und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben für eine Minute mit 6800g und Raumtemperatur zentrifugiert, die High

Pure Filter verworfen und das Eluat für den *DNA Verdau* mit 10µl DNase Inkubationspuffer und 1µl DNase I (beides im Kit enthalten) versetzt und bei 37°C für 45 Minuten inkubiert.

An den Vorgang des *DNA Verdau*s schloss sich eine erneute *Lyse* an. Hierfür wurden die Proben mit 20µl Gewebe-Lysispuffer, 18µl 10% SDS und 40µl Proteinase K sukzessive vermischt und bei 55°C für eine Stunde inkubiert.

Es erfolgte der Schritt *Waschen und Eluieren* in dem gleichen Ablauf wie oben beschrieben, wengleich die RNA mit 100 µl Elutionspuffer auf den High Pure Filter eluiert wurde.

Wurde die RNA sofort weiterbearbeitet schloss sich an das *Waschen und Eluieren* die *Aufreinigung* als letzten Schritt an. Hierfür wurden zu jeder Probe 250 µl 98 % Ethanol, 10 µl 3M NaAcetat und 1,5 µl Carrier RNA (Qiagen Micro Kit) hinzu gemischt. Diese Gemische mussten für eine Stunde bei -20°C im Gefrierfach inkubieren. Daraufhin wurden die Proben für 10 Minuten bei 13000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, so dass nur noch das Pellet übrig blieb. Diese wurden mit 1000µl 70%igem Ethanol gelöst und bei 18000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, woraufhin der Überstand verworfen wurde. Die Pellets trockneten bei geöffnetem Eppendorf-Gefäß bei Raumtemperatur für 10 Minuten.

Da für jeden Patienten drei Versuchsansätze existierten, wurden die einzelnen Pellets mit 20 µl RNase freiem Wasser in einem Eppendorf-Gefäß gepoolt.

Bestimmung der RNA-Konzentration

Mittels des Nanodrops1000 wurde zunächst ein Leerwert mit 1µl RNase freiem Wasser bestimmt. Daraufhin wurde 1µl der gut durchmischten Probe auf den Messsensor des Nanodrop 1000 gegeben und so photometrisch die RNA-Konzentration bestimmt. Für jeden Patienten wurden drei Messungen durchgeführt und die Messwerte gemittelt. Die Probe wurde als hinreichend rein angenommen, wenn der Quotient der Absorptionswerte von 260/280nm zwischen 1,8 und 2,2 bzw. von 260/230nm >1,7 lag.

4.3.5 cDNA Synthese (RT² FFPE PreAMP cDNA Synthesis Kit)

Die cDNA diente als Substrat für die nachfolgende quantitative RT-PCR (qPCR). Für die cDNA- Synthese wurde das für 1µg RNA erforderliche Volumen mit 2µl GE-Puffer vermischt und mit RNase-freiem Wasser auf 10µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde bei 37°C für 15 Minuten im Thermomixer inkubiert. Danach mussten die Eppendorf Gefäße unverzüglich auf Eis gelagert werden. Während der Inkubationszeit konnte der RT Master Mix für die RT Reaktion in ein Eppendorf Gefäß pipettiert werden.

RT Master Mix:

Komponente:	Volumen:
BC3-Puffer	4 µl
RE-Puffer	1 µl
RI-Puffer	1 µl
P2-Puffer	1 µl
RNase-freies Wasser	3 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Zu jedem RNA-Gemisch wurde jeweils 10µl des RT Master Mix hinzugefügt. Dies musste kurz gevortext werden, um anschließend für 30 Minuten bei 37°C und für 5 Minuten bei 95°C im Thermomixer inkubiert zu werden. Nach dieser Inkubationszeit wurde zu jeder Probe 91µl RNase-freies Wasser eingemischt.

4.3.6 RT² Profiler™ PCR Array: Human Angiogenese

Um eine quantitative Aussage über die Menge der eingesetzten cDNA zu erhalten, wurde die quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) verwendet. Hierzu musste durch eine PCR die zuvor transkribierte cDNA-Menge amplifiziert werden. Während jedes PCR Zyklus fand eine Fluoreszenzmessung statt. Die Fluoreszenz stieg proportional mit der zunehmenden cDNA Menge an, da an jedes Nukleotid der cDNA-Sequenz sich nur ein fluoreszierendes Nukleotid anlagern kann. Aufgrund dieses proportionalen Anstiegs konnte am Ende des Laufes (40 Zyklen) eine Aussage über die Menge der vorhandenen cDNA gemacht werden. In den hier durchgeführten Versuchen wurde eine 2-Schritt-PCR verwendet (Abb.05).

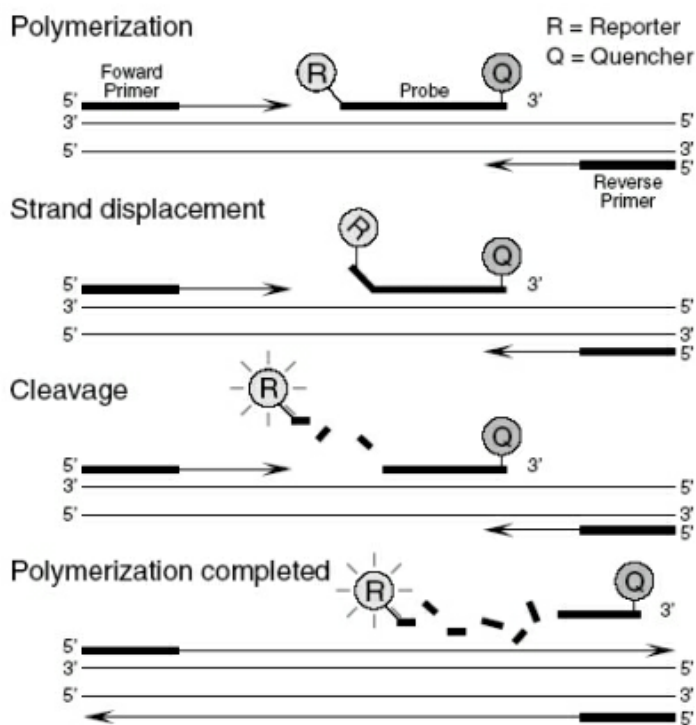


Abb.05: Schema der RT-PCR aus Applied Biosystems

Auf der Basis des Human Angiogenese RT² ProfilerTM PCR Arrays wurden aus 84 Schlüsselgenen Custom-Arrays mit 14 Genen der humanen Angiogenese von SABioscience bezogen (Tab.03). Angiogenese-bezogene Gene, Haushaltsgene und interne Versuchskontrollen wurden in Triplets vorgelegt. Um eine Verunreinigung auszuschließen, musste bei den Non-template-controls (NTC) die cDNA durch RNase-freies Wasser ausgetauscht werden.

Primer Name	Primer Sequenz
GAPDH	Von SABioscience geschützt
MMP2	Von SABioscience geschützt
MMP9	Von SABioscience geschützt
TIMP1	Von SABioscience geschützt
Thrombospondin 1	Von SABioscience geschützt
ITGB3	Von SABioscience geschützt
PLAU	Von SABioscience geschützt
bFGF	Von SABioscience geschützt

IL8	Von SABioscience geschützt
TGFβ1	Von SABioscience geschützt
CXCL9	Von SABioscience geschützt

Tab.03: Primersequenzen

Komponente	Vol. / Wel
2X SABiosciences RT ² qPCR Master Mix	12,5 µl
RNase-freies Wasser	11,5 µl
cDNA	1,0 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl

Die vollständig beladene und versiegelte 96-well Platte konnte kurz abzentrifugiert werden und es erfolgte die qRT-PCR im Bio-rad CFX96.

Hierbei durchlief die Probe folgende Schritte:

Funktion	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Aktivierung der HortStart Taq DNA Polymerase	95 °C	10 min	1
Anlagerung der Nukleotide an die Primer:			40
1. Denaturieren	95 °C	15 sec	
2. Annealing	55 °C	30 sec	
3. Fluoreszenzmessung			
4. Extension	72 °C	30 sec	

Auswertung der RT-PCR:

Die Rohdaten der RT-PCR zeigten den Zyklus an, in dem das Gen erstmals durch die Fluoreszenz detektiert werden konnte. Je früher das Gen detektiert wurde, desto höher war der ursprüngliche DNA-Gehalt. Um eine relative Aussage über den Unterschied zwischen den Genen zweier Vergleichspartner zu erhalten, wurde die Differenz zwischen dem Zyklus des Haushaltgens GAPDH und des Ziel-Gens bei beiden Partnern gebildet (=dCt). Die Differenz zwischen den dCt Werten für das gesuchte Gen bei BSCC und den herkömmlichen HNSCC

konnte nun ermittelt werden (=ddCt). Diese Differenz gab an, wie viele Zyklen das Gen des BSCC später/früher als das Gen des HNSCC (standardisiert an einem Haushaltsgen GAPDH) detektiert wurde. Da es sich bei der RT-PCR um eine Verdopplungsreihe der DNA handelte, musste dieser Schritt in die Auswertung mit einberechnet werden:

Relativer DNA Unterschied = $2^{\text{hoch } (-\text{ddCt})}$

Als hinreichend signifikant wurde ein Unterschied des Faktors 2,5 gewertet.

5. Ergebnis

5.1 MMP2 und MMP9

Für die einzelnen Tumorkolonisationen zeigte sich eine kräftige Expression der Metalloproteinase 2. Für das Gesamtkollektiv der HNSCC konnte für 24 Proben (69%) eine Protein-Expression zwischen 71 und 100% der Tumorzellen nachgewiesen werden. In weiteren neun Proben (26%) wurden 41-70% der Tumorzellen angefärbt. Für lediglich zwei Proben (6%) konnten keine bis 10% der Tumorzellen gefärbt werden. Für die Mehrzahl dieser Proben zeigte sich hierbei eine mäßige bis starke Färbintensität. Demgegenüber zeigte das Gesamtkollektiv der BSCC eine MMP2-Expression von 71-100% bei 17 Fällen (49%). Auch bei BSCC konnte eine starke Färbintensität beobachtet werden. Bezogen auf die Gruppe der Oropharynx-Karzinome entsprach die MMP2-Proteinexpression jener des Gesamtkollektivs. 76% der HNSCC-Oropharynx-Karzinome zeigte eine MMP2-Expression mit vorwiegend starker Expression. Demgegenüber konnte in der Gruppe der oropharyngealen BSCC nur bei fünf Patienten (29%) eine Tumorzellfärbung von 71% oder mehr detektiert werden (Tab. 04, Abb. 06a und b). Auch für MMP9 gelang der immunhistochemische Nachweis von 71-100% der Tumorzellen in 25 Fällen (71%) des HNSCC-Gesamtkollektivs. Entsprechende Ergebnisse zeigten sich für 31% des BSCC-Gesamtkollektivs. Wie bereits für die MMP2-Färbung, konnte für die Gruppe der HNSCC-Oropharynx-Karzinome das Ergebnis des Gesamtkollektivs bestätigt werden, wohingegen die BSCC-Oropharynx-Gruppe keine vermehrte MMP9-Expression zeigte (Tab. 05, Abb. 06c und d). Die Ergebnisse der Immunhistochemie konnten in der qPCR bestätigt werden, wenngleich für MMP2 mit einem 2,07-fachen Expressionswert kein signifikantes Niveau erzielt werden konnte (Diagramm 01).

MMP2	HNSCC		BSCC	
	Gesamtkollektiv	Oropharynx	Gesamtkollektiv	Oropharynx
Negativ	1	1	3	3
1-10%	1 +	1 +	0 +	0 +
	0 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
11-40%	0 +	0 +	2 +	2 +
	0 ++	0 ++	3 ++	3 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
41-70%	2 +	1 +	0 +	0 +
	0 ++	0 ++	2 ++	1 ++
	7 +++	1 +++	8 +++	3 +++
71-99 %	2 +	2 +	0 +	0 +
	1 ++	1 ++	3 ++	1 ++
	2 +++	0 +++	4 +++	4 +++
100%	0 +	0 +	1 +	0 +
	11 ++	4 ++	2 ++	0 ++
	8 +++	6 +++	7 +++	0 +++

Tab. 04: MMP2 in der Gesamtpopulation und im Oropharynx. Anteil an positiv angefärbten Tumorzellen; Färbungsintensität schwach (+), mittel (++), stark (+++)

MMP9	HNSCC		BSCC	
	Gesamtkollektiv	Oropharynx	Gesamtkollektiv	Oropharynx
Negativ	0	0	0	0
1-10%	0 +	0 +	3 +	1 +
	0 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	4 +++	1 +++
11-40%	1 +	1 +	0 +	0 +
	1 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
41-70%	0 +	0 +	2 +	2 +
	4 ++	2 ++	8 ++	4 ++
	4 +++	2 +++	7 +++	4 +++
71-99 %	1 +	1 +	0 +	0 +
	6 ++	6 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	3 +++	3 +++
100%	0 +	0 +	1 +	0 +
	9 ++	5 ++	6 ++	2 ++
	9 +++	0 +++	1 +++	0 +++

Tab. 05: MMP9 in der Gesamtpopulation und im Oropharynx. Anteil an positiv angefärbten Tumorzellen; Färbungsintensität schwach (+), mittel (++), stark (+++)

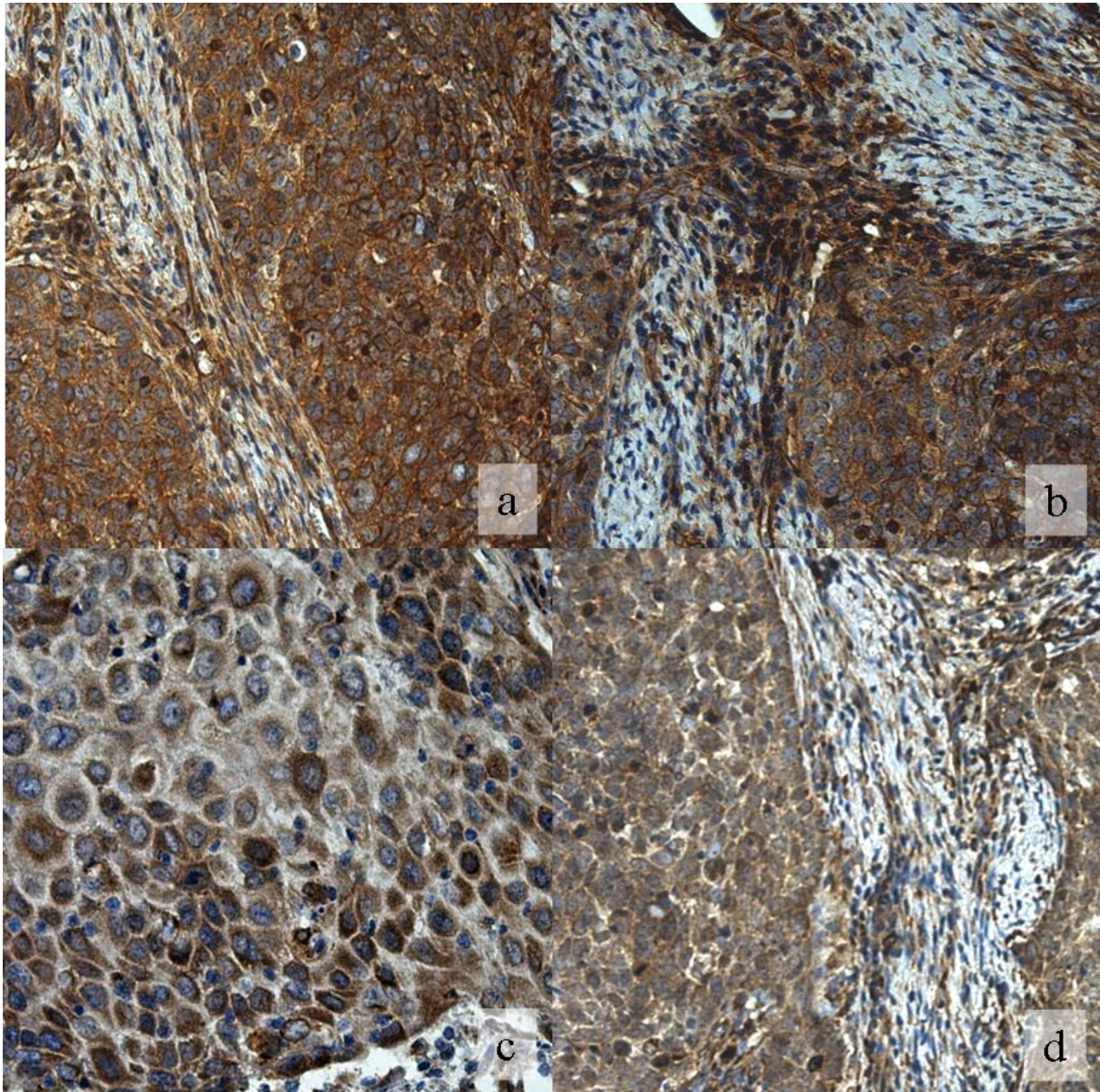


Abb. 06: MMP2 im Gesamtkollektiv der HNSCC (a) und BSCC (b) sowie MMP9 in HNSCC-Oropharynx-Tumoren (c) und BSCC-Oropharynx-Tumoren (d). 20- und 40-fache Vergrößerung

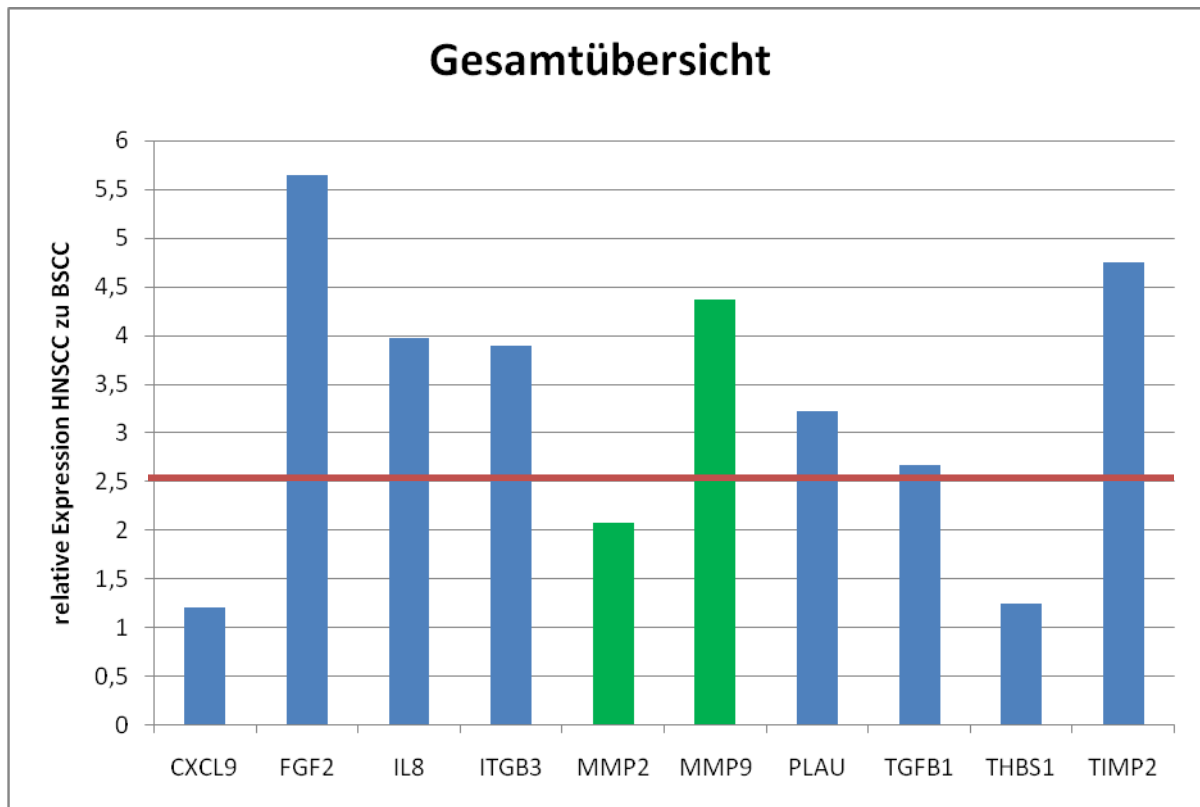


Diagramm 01: MMP2 und MMP 9 Expression

5.2 TIMP 2

Entgegen der Ergebnisse für die Metalloproteinase konnte weder in den HNSCC- und BSCC-Gesamtkollektiven, noch in den Untergruppen der Oropharynxkarzinome ein entsprechend hohes Expressionsmuster nachgewiesen werden. Sieben Patienten (20%) des HNSCC-Gesamtkollektivs zeigten eine TIMP2-Färbung in 71-100% der Tumorzellen, in weiteren 14 Proben (40%) färbten sich 11-70% der Zellen und 14 Proben (40%) waren negativ bzw. nur vereinzelt immunhistochemisch gefärbt. Eine ähnliche Verteilung konnte für das BSCC-Gesamtkollektiv visualisiert werden, jedoch zeigten hier nur drei Patienten (9%) eine Färbung von 71-100% der Tumorzellen (Tab. 06, Abb. 07a und b). Auf RNA-Ebene wurde TIMP2 im BSCC deutlich später detektiert, mit einem relativen Unterschied von 4,76 im Vergleich zu BSCC (Diagramm 02).

TIMP2	HNSCC		BSCC	
	Gesamtkollektiv	Oropharynx	Gesamtkollektiv	Oropharynx
Negativ	5	2	13	3
1-10%	9+	8+	1+	1+
	0++	0++	2++	2++
	0+++	0+++	0+++	0+++
11-40%	0+	0+	0+	0+
	7++	4++	6++	3++
	0+++	0+++	0+++	0+++
41-70%	7+	1+	10+	5+
	0++	0++	0++	0++
	0+++	0+++	0+++	0+++
71-99%	2+	1+	2+	2+
	0++	0++	0++	0++
	0+++	0+++	0+++	0+++
100%	5+	1+	1+	1+
	0++	0++	0++	0++
	0+++	0+++	0+++	0+++

Tab.06: TIMP 2 in der Gesamtpopulation und im Oropharynx. Anteil an positiv angefärbten Tumorzellen; Färbungsintensität schwach (+), mittel (++), stark (+++)

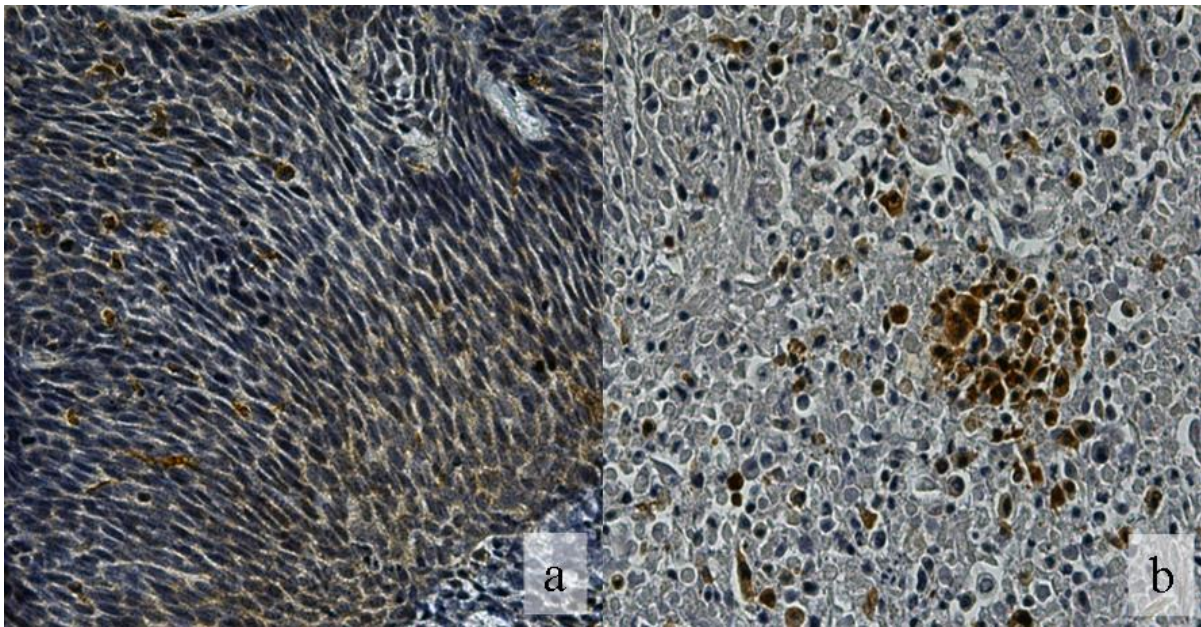


Abb. 07: TIMP2 im Gesamtkollektiv der HNSCC (a) und BSCC (b), 20-fache Vergrößerung

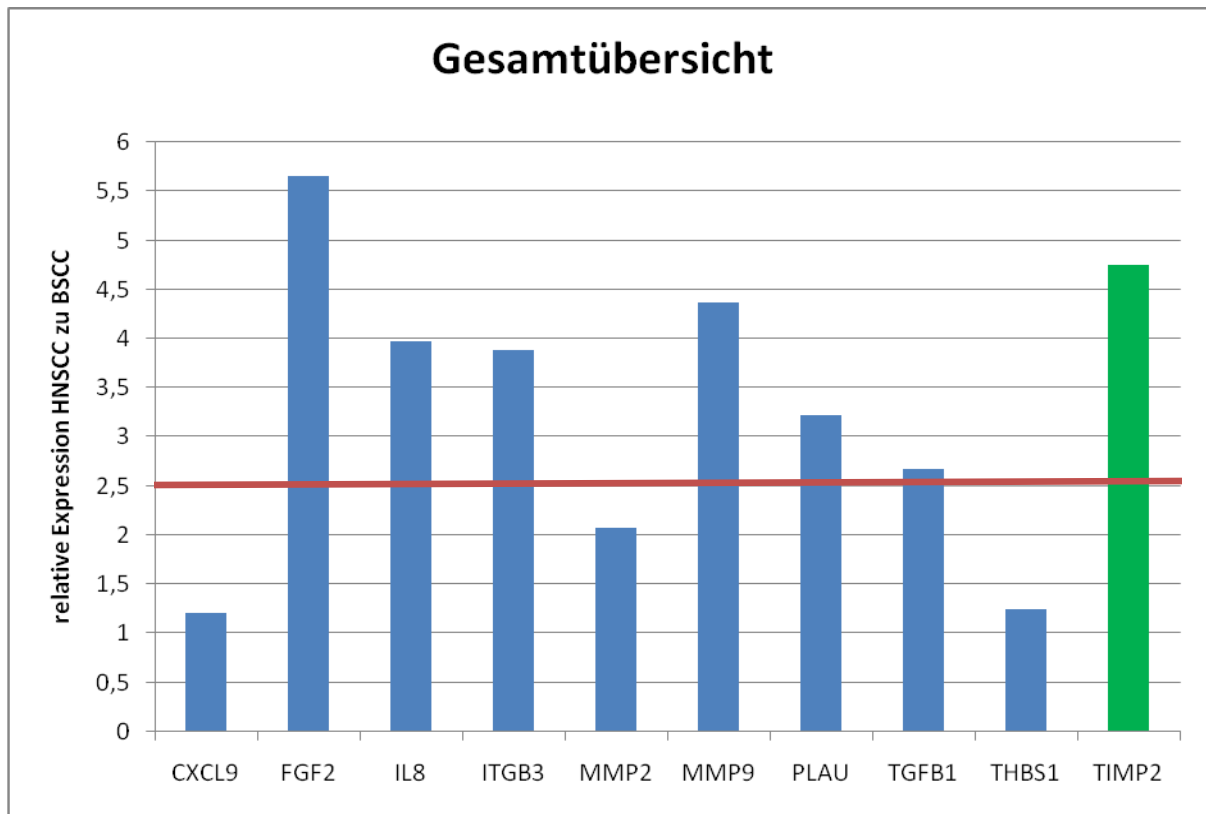


Diagramm 02: TIMP 2 Expression

5.3 PLAU

Ähnlich der immunhistochemischen Färbungen für TIMP2 zeigte auch die Immunhistochemie mit PLAU keine einheitliche Verteilung des Expressionsmusters. In 22 Proben (63%) des HNSCC-Gesamtkollektivs wurden 71-100% der Tumorzellen positiv gefärbt. Hierbei zeigten sich vor allem mäßige und starke Färbeintensitäten. Für die übrigen 37% des HNSCC-Gesamtkollektivs zeigte sich eine fehlende bis geringe Färbung der Tumorzellen. In der Gruppe des BSCC-Gesamtkollektivs waren 71-100% der Tumorzellen in 40% der Proben gefärbt. Auch hier überwog eine starke Färbeintensität. Entgegen des HNSCC-Gesamtkollektivs waren 18 BSCC Proben (51%) nicht oder nur in einzelnen Tumorzellen PLAU positiv. Für die Gruppe der Oropharynx Tumore verdeutlichte sich die Tendenz, die im Gesamtkollektiv beschrieben wurde. In 53% der HNSCC-Oropharynx-Tumore konnten 71-100% der Tumorzellen PLAU positiv gefärbt werden, demgegenüber zeigten BSCC Oropharynx-Tumore in 41% der Proben eine Färbung von 71-100%. Die marginal verstärkte Expression in den HNSCC konnte auch in der qPCR für Oropharynx-Tumore nachgewiesen werden. Mit einer Felddifferenz von 3,23 war PLAU in HNSCC stärker exprimiert als in BSCC (Tab. 07, Abb. 08a bis d, Diagramm 03).

	HNSCC		BSCC	
	Gesamtkollektiv	Oropharynx	Gesamtkollektiv	Oropharynx
Negativ	2	0	10	4
1-10%	2+	1+	0+	0+
	0++	0++	0++	0++
	0+++	0+++	0+++	0+++
11-40%	2+	2+	8+	4+
	1++	1++	0++	0++
	0+++	0+++	0+++	0+++
41-70%	6+	4+	2+	2+
	0++	0++	1++	0++
	0+++	0+++	0+++	0+++
71-99%	0+	0+	0+	0+
	7++	3++	5++	4++
	0+++	0+++	0+++	0+++
100%	7+	3+	0+	0+
	4++	3++	0++	0++
	4+++	0+++	9+++	3+++

Tab.07: PLAU in der Gesamtpopulation und im Oropharynx. Anteil an positiv angefärbten Tumorzellen; Färbungsintensität schwach (+), mittel (++), stark (+++)

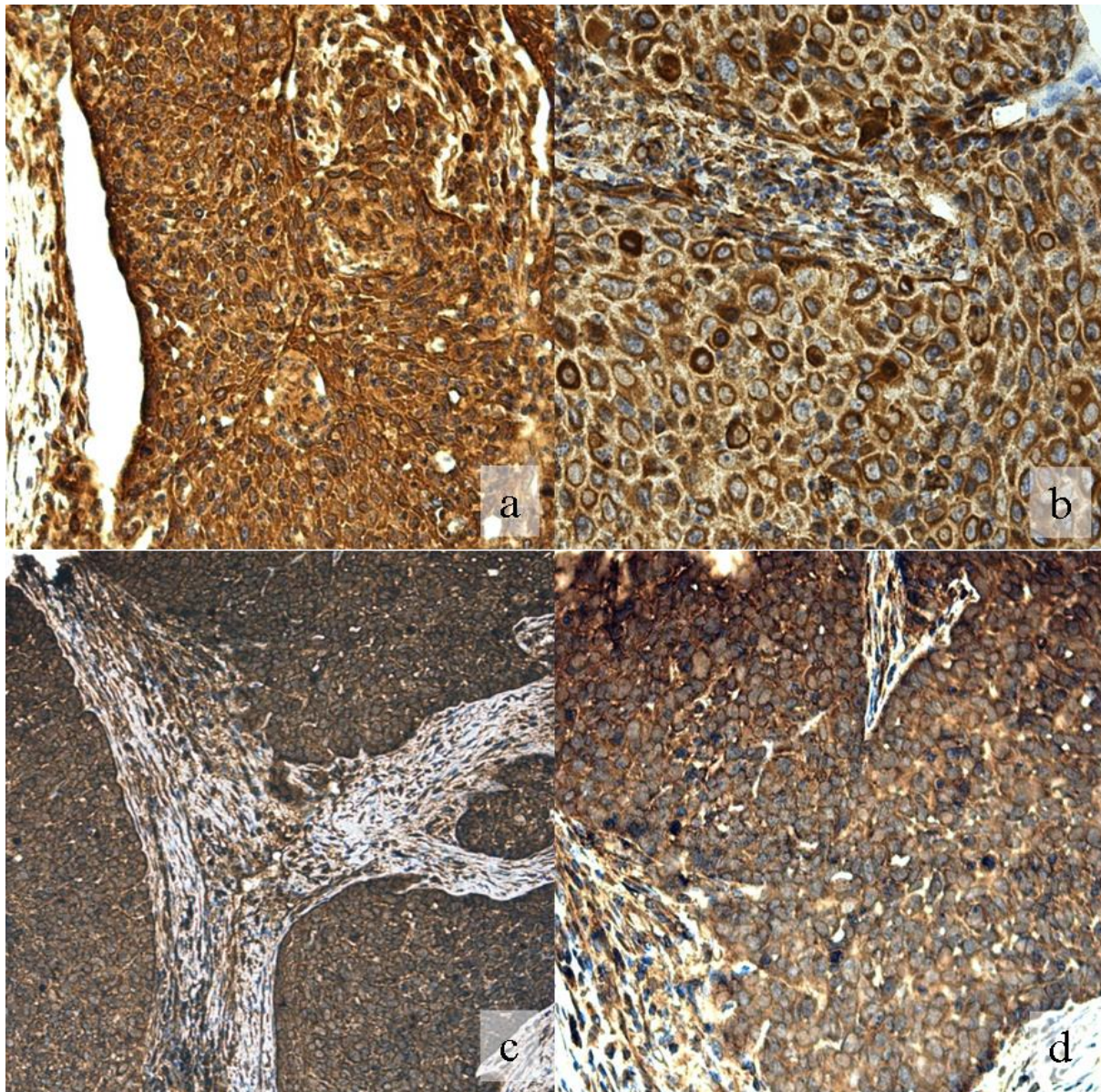


Abb. 08: PLAU im Gesamtkollektiv der HNSCC (a, b) und BSCC (c, d). 20- und 40-fache Vergrößerung

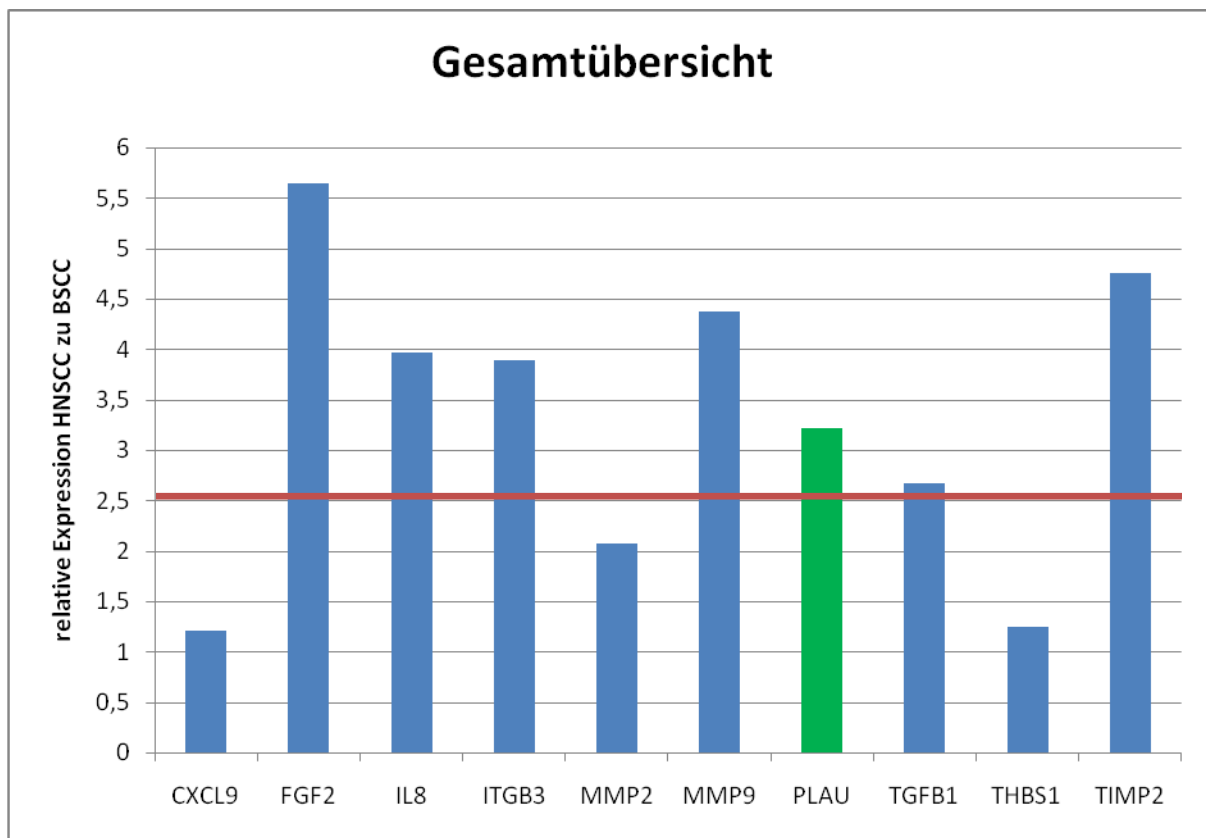


Diagramm 03: PLAU Expression

5.4 IL 8

In der immunhistochemischen Färbung für IL8 erschien im HNSCC-Gesamtkollektiv bei 17 Proben (49%) eine Anfärbung von 71-100% der Tumorzellen. Hierbei überwog eine mäßige Färbeintensität. Die übrigen Proben zeigten einen positiven immunhistochemischen Nachweis von 1-70% der Tumorzellen. Demgegenüber konnte im BSCC-Gesamtkollektiv nur in zwei Proben (6%) eine Färbung von 71-100% der Tumorzellen nachgewiesen werden. Der Großteil des Kollektivs (71%) zeigte eine Färbung von 0-40%. Dieses Verteilungsmuster verdeutlichte sich insbesondere in der oropharyngealen Subgruppe. Hier zeigten 11 Proben (65%) der herkömmlichen HNSCC eine Färbung von 71-100% der Tumorzellen, wohingegen dies in nur einem BSCC-Oropharynx-Karzinom gelang. Diese Ergebnisse wurden in der qPCR bestätigt. Mittels der qPCR konnte der relative IL8 Gehalt in HNSCC 3,97-fach höherer bestimmt werden als im BSCC (Tab. 08, Abb. 09a bis d, Diagramm 04).

IL8	HNSCC		BSCC	
	Gesamtkollektiv	Oropharynx	Gesamtkollektiv	Oropharynx
Negativ	0	0	7	3
1-10%	8 +	2 +	3 +	3 +
	0 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
11-40%	2 +	1 +	7 +	1 +
	0 ++	0 ++	8 ++	5 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
41-70%	0 +	0 +	2 +	1 +
	8 ++	3 ++	4 ++	3 ++
	0 +++	0 +++	2 +++	0 +++
71-99 %	0 +	0 +	1 +	1 +
	11 ++	6 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
100%	2 +	1 +	0 +	0 +
	4 ++	4 ++	1 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++

Tab.08: IL8 in der Gesamtpopulation und im Oropharynx. Anteil an positiv angefärbten Tumorzellen; Färbungsintensität schwach (+), mittel (++), stark (+++)

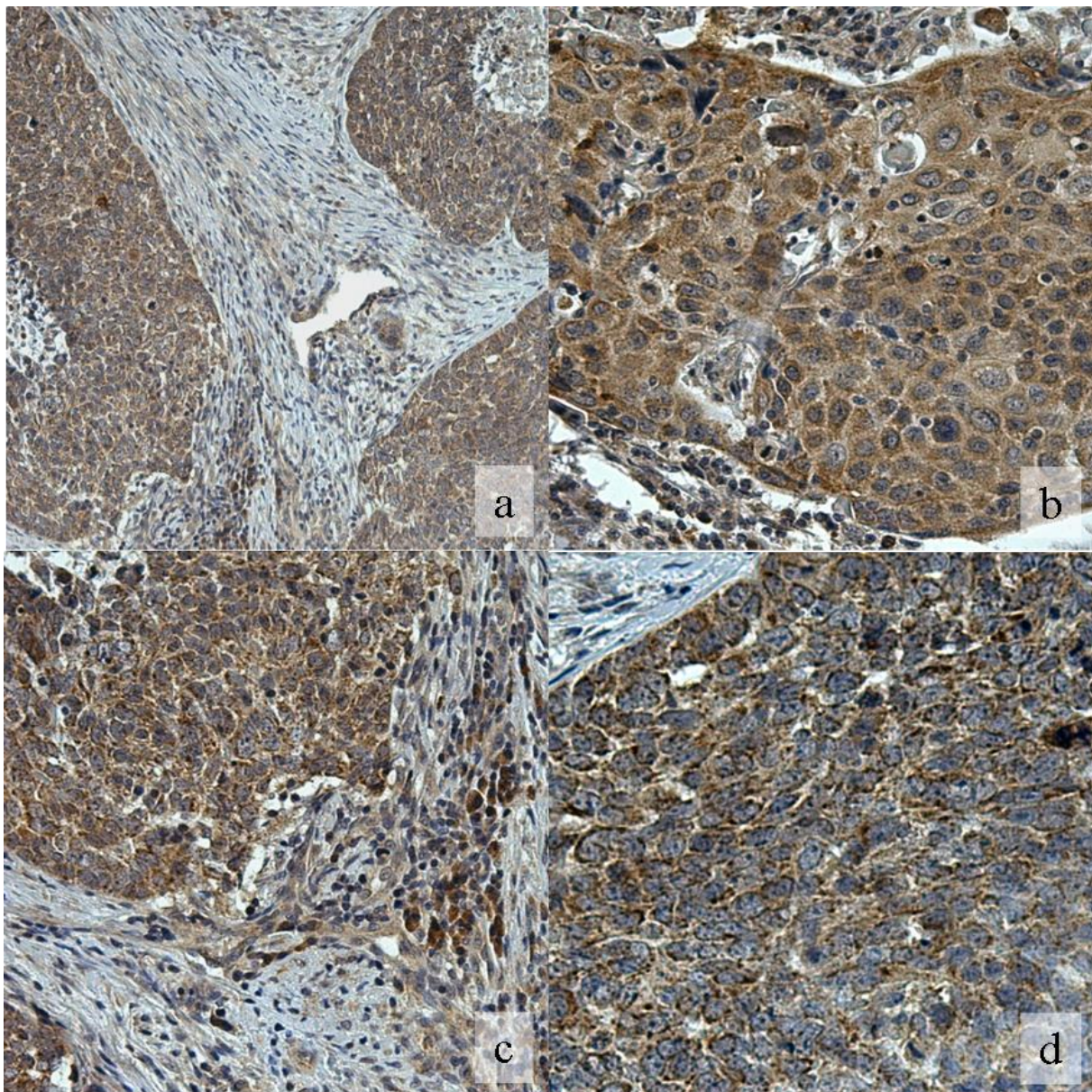


Abb. 09: IL 8 im Gesamtkollektiv der HNSCC (a, b) und BSCC (c, d). 20- und 40- fache Vergrößerung

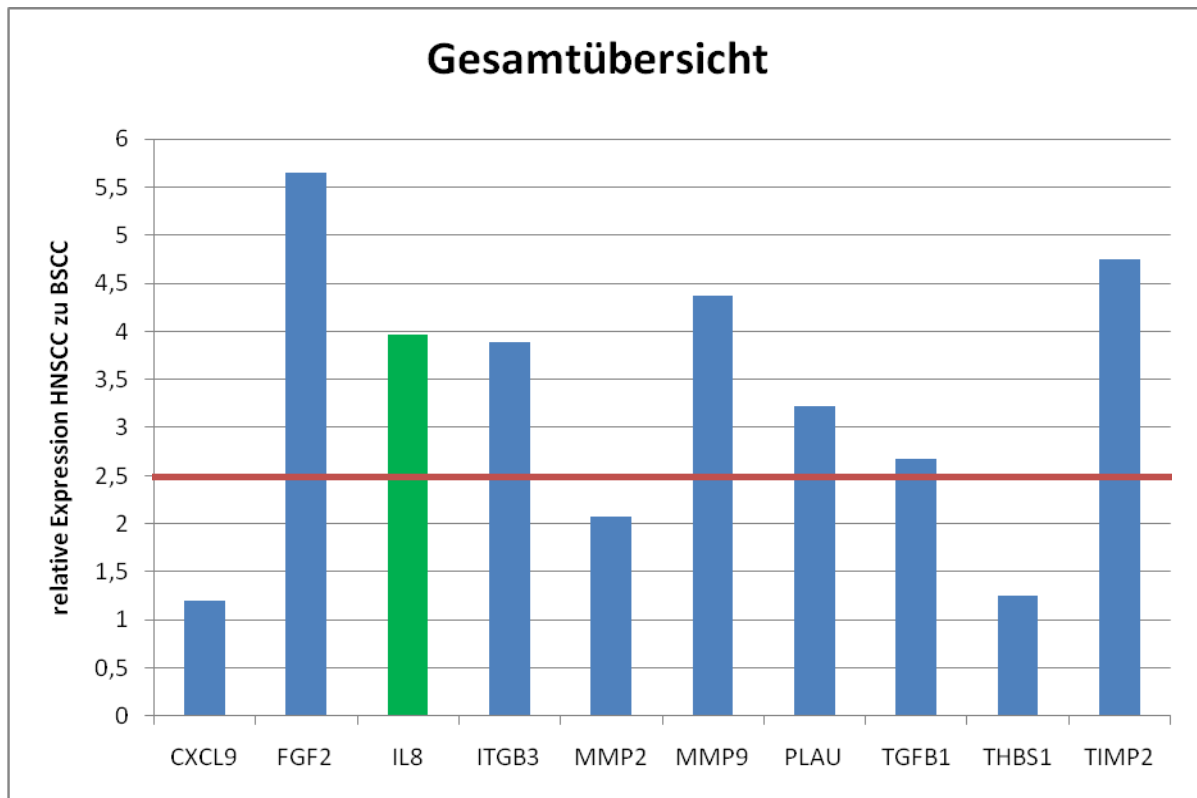


Diagramm 04: IL 8 Expression

5.5 TGFβ 1

Ähnlich der bereits zuvor untersuchten Zielproteine, konnte auch für TGFβ1 eine vermehrte Expression in den HNSCC nachgewiesen werden. Das Gesamtkollektiv zeigte hierbei in 13 Proben (37%) eine Anfärbung der Tumorzellen von 71-100%. Allerdings zeigten auch 17 Proben (49%) eine schwache TGFβ1-Expression. Demgegenüber ließ sich im BSCC-Gesamtkollektiv eine TGFβ1-Expression von 71-100% der Tumorzellen in 4 Proben (11%) darstellen. In 71% der Proben erschien eine fehlende bis schwache Expression. Bezogen auf die Oropharynx-Subgruppe zeigte sich für HNSCC wie BSCC ein schwaches Expressionsmuster. Bei den HNSCC zeigten 11 Proben (65%) eine schwache Expression, in BSCC 10 Proben (59%) diese Verteilung. Dementsprechend wurde die stärkere Expression der HNSCC vor allem durch Lokalisationen außerhalb des Oropharynx getragen. In der qPCR bestätigte sich der marginale Expressionsunterschied zugunsten der HNSCC mit einer Felddifferenz von 2,68 gegenüber den BSCC (Tab. 09, Abb. 10a bis d, Diagramm 05).

TGFβ1	HNSCC		BSCC	
	Gesamtkollektiv	Oropharynx	Gesamtkollektiv	Oropharynx
Negativ	8	3	17	6
1-10%	9+	8+	2+	2+
	0++	0++	0++	0++
	0+++	0+++	0+++	0+++
11-40%	0+	0+	6+	2+
	0++	0++	0++	0++
	0+++	0+++	0+++	0+++
41-70%	1+	1+	5+	3+
	0++	0++	1++	1++
	4+++	1+++	0+++	0+++
71-99%	1+	1+	0+	0+
	0++	0++	2++	1++
	0+++	0+++	1+++	1+++
100%	4+	1+	0+	0+
	0++	0++	0++	0++
	8+++	2+++	1+++	1+++

Tab.09: TGFβ1 in der Gesamtpopulation und im Oropharynx. Anteil an positiv angefärbten Tumorzellen; Färbungsintensität schwach (+), mittel (++), stark (+++)

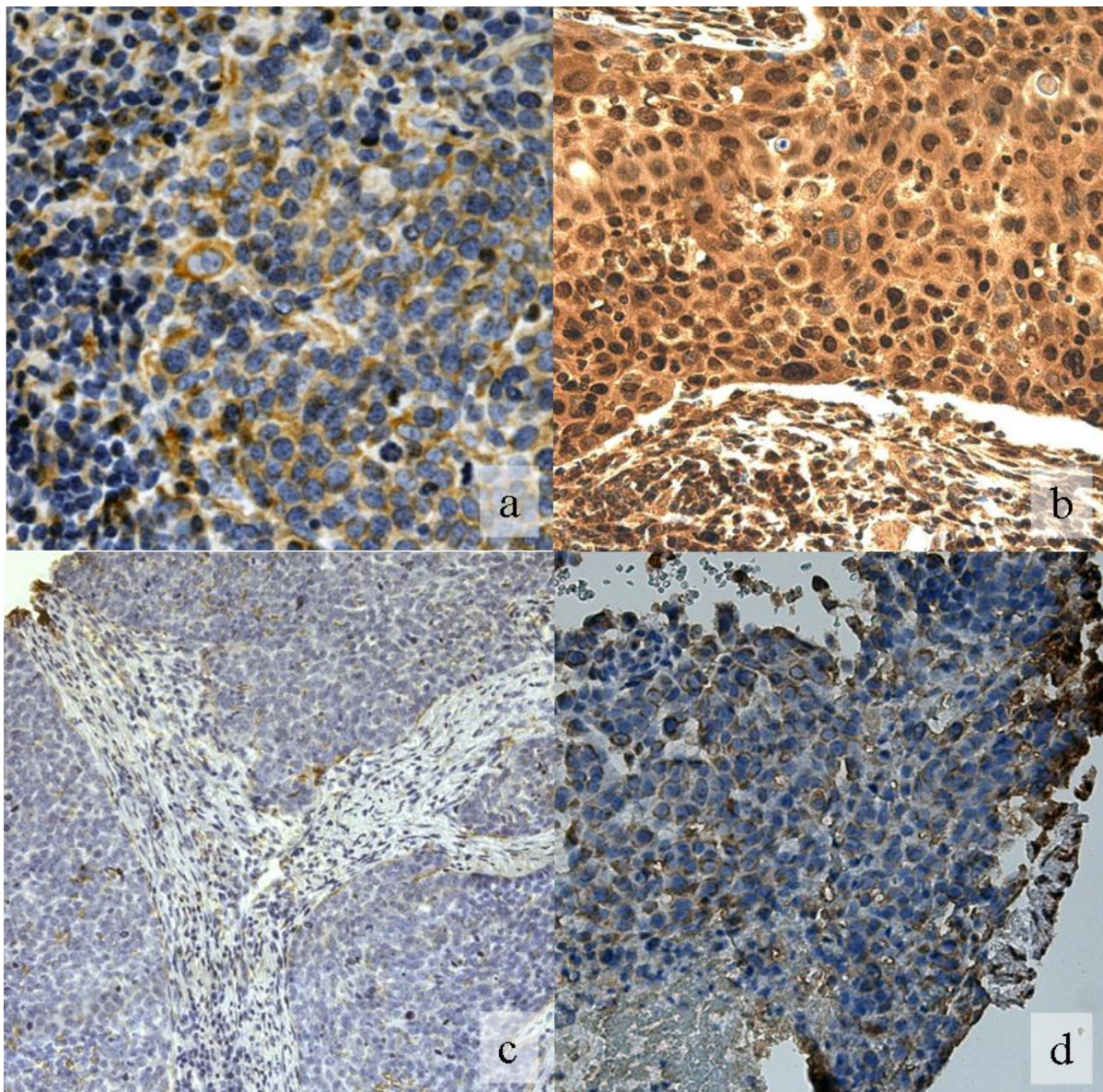


Abb. 10: TGFβ1 im Gesamtkollektiv der HNSCC (a, b) und BSCC (c, d) in unterschiedlichen Expressionsstärken. 20- und 40-fache Vergrößerung

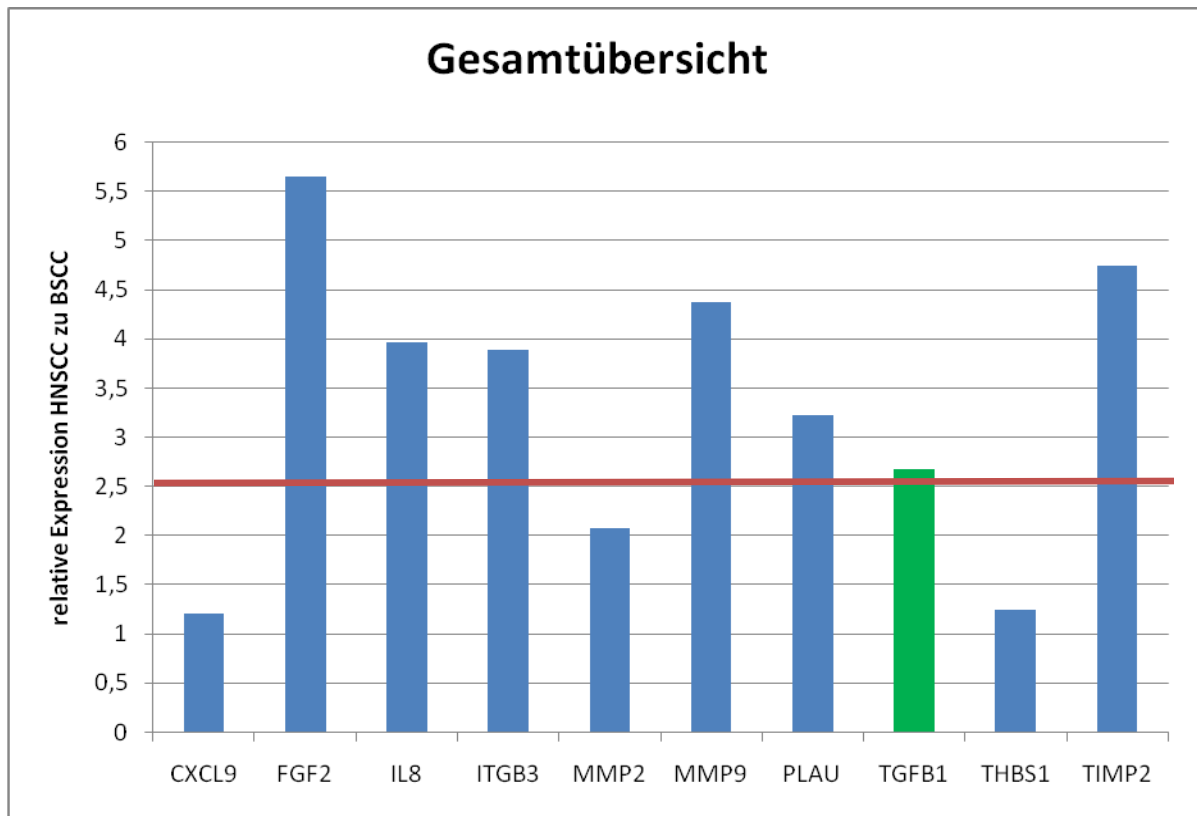


Diagramm 05: TGFB1

5.6 FGF2 (=bFGF)

Immunhistochemisch zeigte sich für bFGF ein schwaches Expressionsmuster für alle gewählten Untergruppen. Im Gesamtkollektiv der HNSCC wurden 31 Proben (89%), im Gesamtkollektiv der BSCC 27 Proben (77%), bei HNSCC-Oropharynx-Karzinomen 14 Proben (82%) und bei BSCC-Oropharynx-Karzinomen 13 Proben (76%) nachgewiesen, die eine fehlende bFGF-Expression oder Färbung von maximal 10% der Tumorzellen aufwiesen. Hierbei zeigte sich eine schwache bis mäßige Färbeintensität. Demgegenüber detektierte die qPCR eine 5,66-fache Überexpression der HNSCC im Vergleich zum BSCC Patientenkollektiv (Tab. 10, Abb. 11a und b, Diagramm 06).

bFGF	HNSCC		BSCC	
	Gesamtkollektiv	Oropharynx	Gesamtkollektiv	Oropharynx
Negativ	12	3	16	6
1-10%	12 +	10 +	11 +	7 +
	7 ++	1 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
11-40%	3 +	1 +	5 +	0 +
	0 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
41-70%	0 +	0 +	0 +	0 +
	1 ++	1 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	1 +++	1 +++
71-99 %	1 +	1 +	1 +	1 +
	0 ++	0 ++	2 ++	2 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
100%	0 +	0 +	0 +	0 +
	0 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++

Tab.10: bFGF in der Gesamtpopulation und im Oropharynx. Anteil an positiv angefärbten Tumorzellen; Färbungsintensität schwach (+), mittel (++), stark (+++)

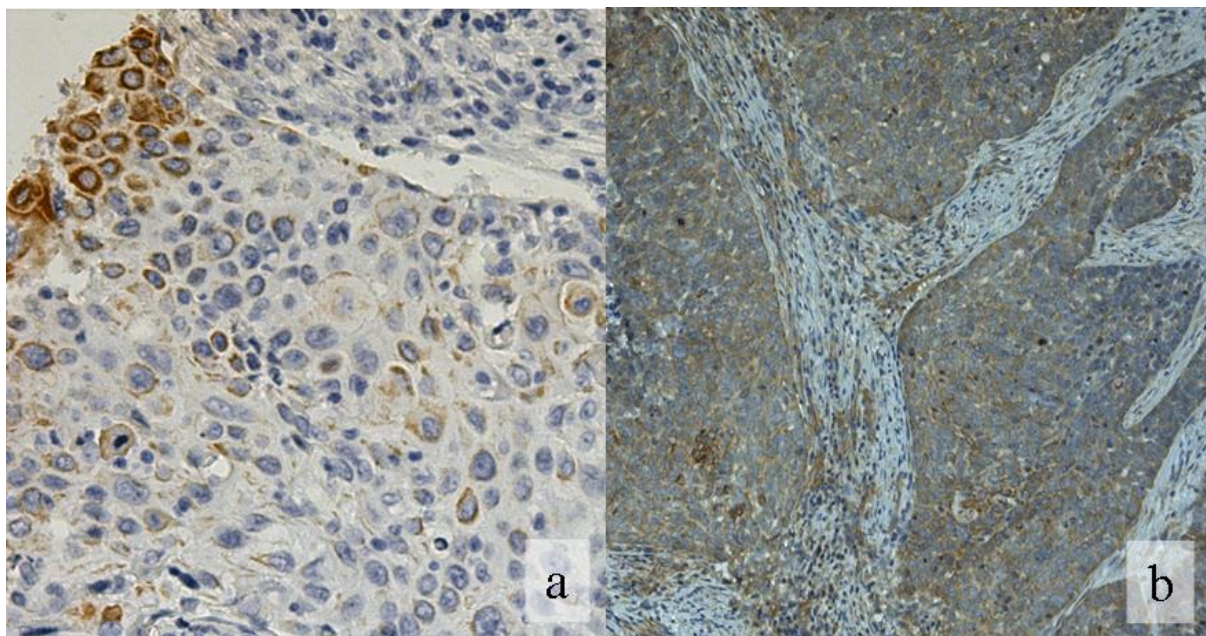


Abb.11: bFGF im Gesamtkollektiv der HNSCC (a) und BSCC (b). 20- und 40-fache Vergrößerung

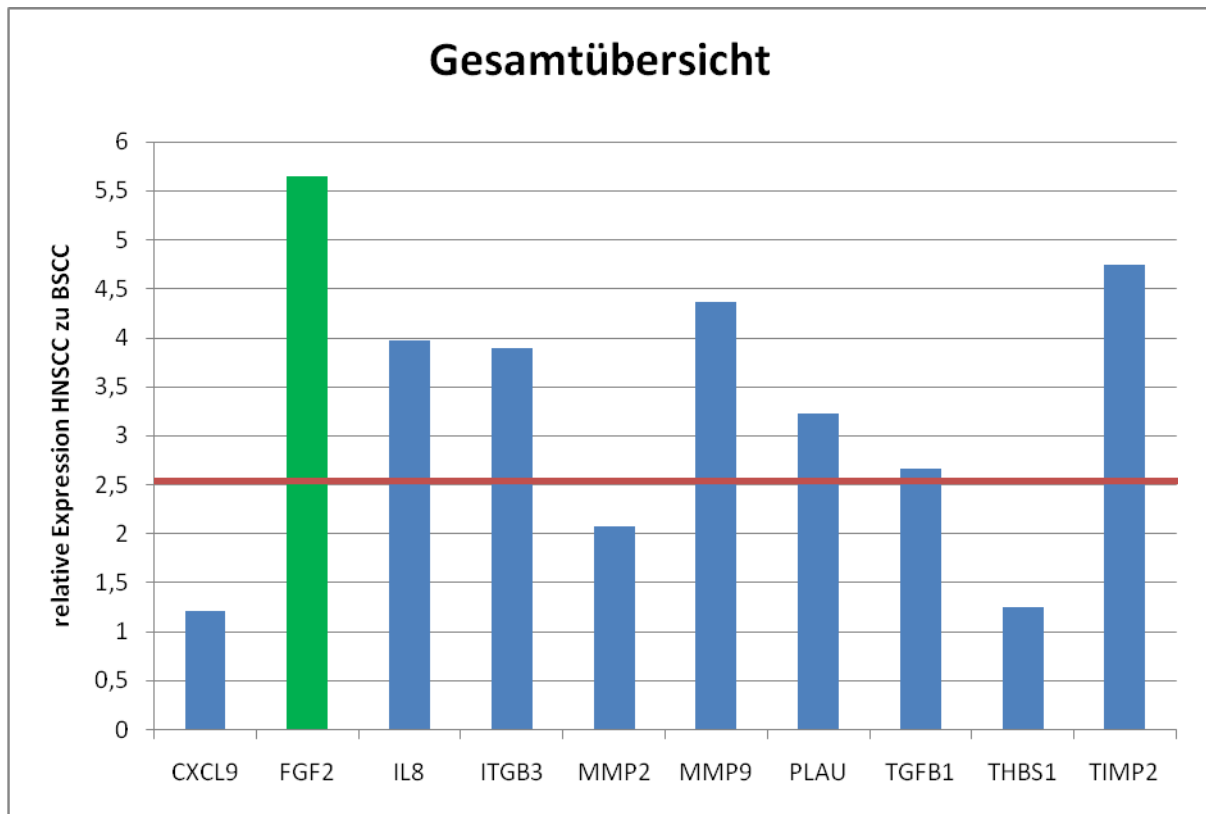


Diagramm 06: bFGF Expression

5.7 ITGB3

Ähnlich des immunhistochemischen Nachweises von bFGF, konnte auch für ITGB3 eine nur schwache Expression nachgewiesen werden. Im Gesamtkollektiv der HNSCC gelang der ITGB3-Expressionsnachweis in bis zu 10% der Tumorzellen je Probe in 26 Fällen (74%). Im Gesamtkollektiv der BSCC zeigte sich eine Proteinoxpression bis maximal 10% der Tumorzellen in 21 Proben (60%). Entgegen der HNSCC (3 Proben, 9%) konnten jedoch 10 Proben der BSCC Population identifiziert werden, bei denen 71-100% der Tumorzellen ITGB3 positiv waren. Hierbei zeigte sich eine schwache bis mäßige Färbeintensität. Die Selektion der Oropharynx-Untergruppe verdeutlichte, dass die vermehrte ITGB3-Expression von Tumoren anderer Lokalisation getragen wurde. Für oropharyngeale BSCC zeigte sich noch in vier Proben (24%) eine ITGB3-Expression in 71-100% der Tumorzellen. Für oropharyngeale HNSCC konnte ein Expressionsverhalten ermittelt werden, dass jenem des Gesamtkollektivs entsprach. In 13 Proben (76%) wurde eine fehlende bis schwache ITGB3-Expression nachgewiesen. Demgegenüber wurde in der qPCR eine 3,89-fache Überexpression zugunsten der HNSCC nachgewiesen (Tab. 11, Abb. 12a und b, Diagramm 07).

ITGB3	HNSCC		BSCC	
	Gesamtkollektiv	Oropharynx	Gesamtkollektiv	Oropharynx
Negativ	18	9	18	8
1-10%	8+	4+	3+	3+
	0++	0++	0++	0++
	0+++	0+++	0+++	0+++
11-40%	0+	0+	0+	0+
	0++	0++	0++	0++
	0+++	0+++	0+++	0+++
41-70%	3+	1+	2+	1+
	3++	1++	2++	1++
	0+++	0+++	0+++	0+++
71-99%	0+	0+	6+	3+
	1++	1++	3++	1++
	0+++	0+++	0+++	0+++
100%	1+	0+	1+	0+
	1++	1++	0++	0++
	0+++	0+++	0+++	0+++

Tab.11: ITGB3 in der Gesamtpopulation und im Oropharynx. Anteil an positiv angefärbten Tumorzellen; Färbungsintensität schwach (+), mittel (++), stark (+++)

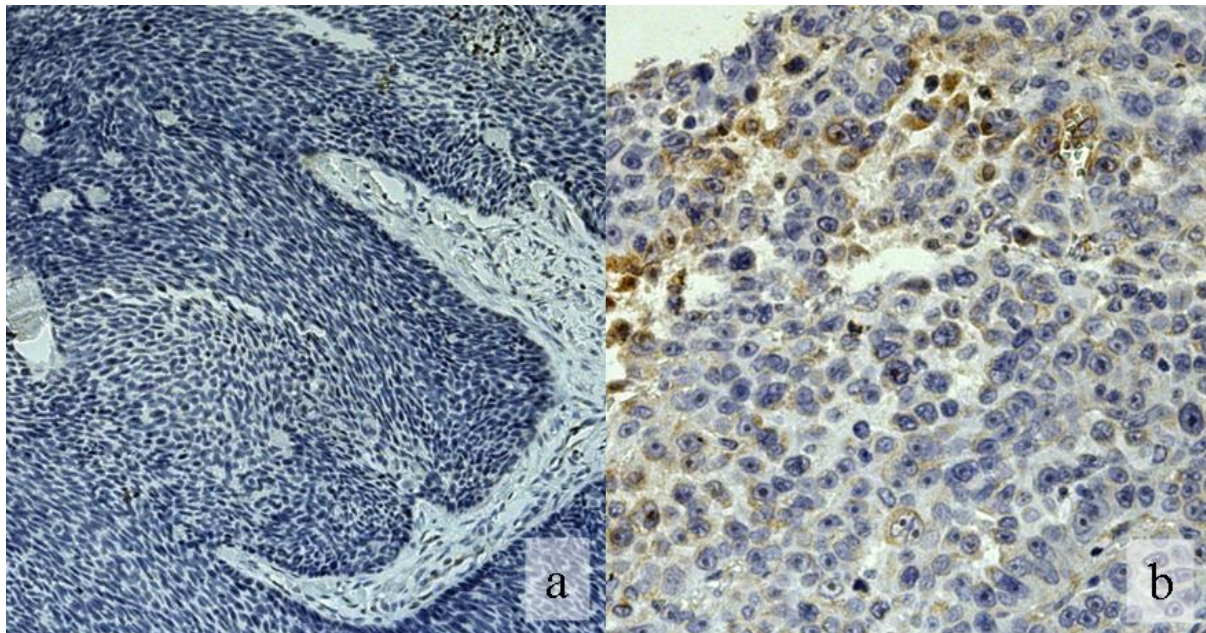


Abb.12: ITGB3 im Gesamtkollektiv der HNSCC (a) und BSCC (b). 20- und 40-fache Vergrößerung

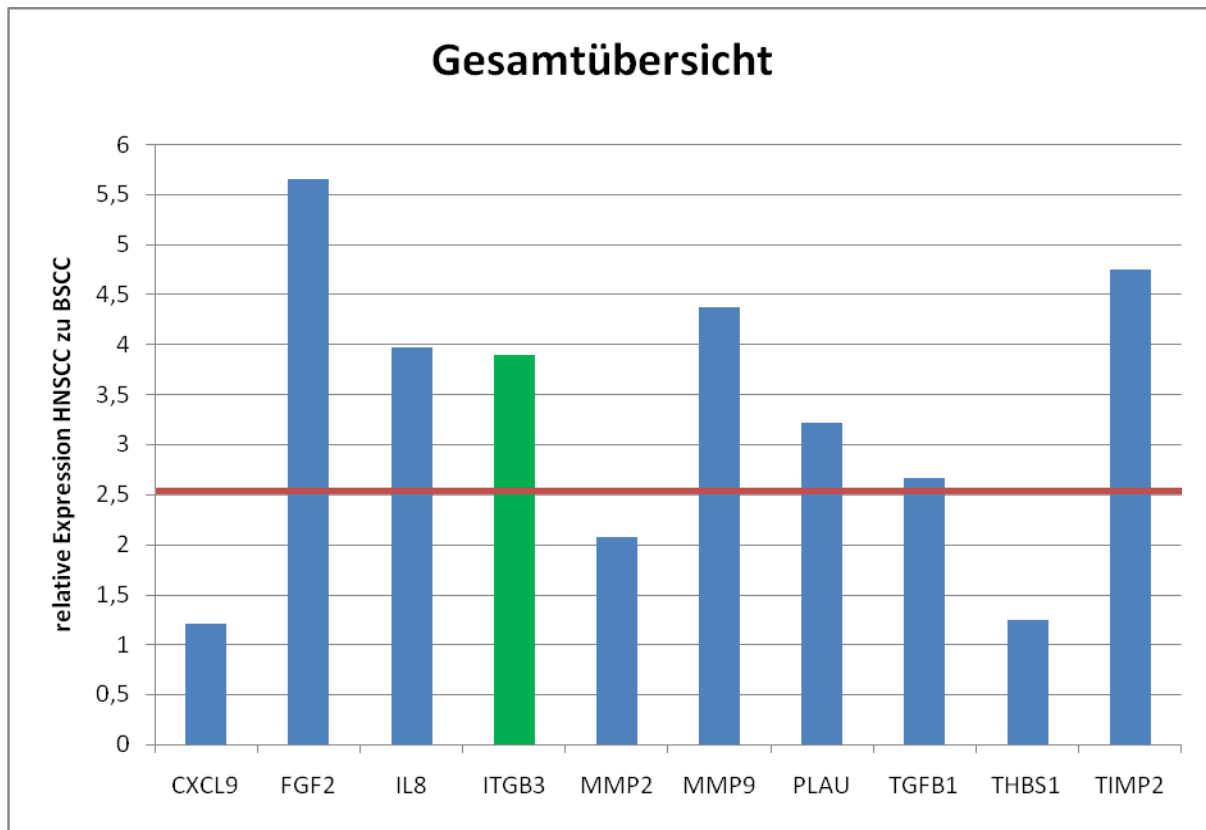


Diagramm 07: ITGB Expression

5.8 CXCL 9

Im Vergleich zur bFGF Färbung erschien die CXCL9-Färbung deutlich intensiver. Bei Betrachtung der Gesamtpopulation erschienen 24 HNSCC Fälle (69%) mit einer Positivität von über 70% der Tumorzellen, während 31 BSCC Fälle (89%) mit einer identischen Positivität identifiziert werden konnten. Es zeigte sich eine überwiegend mäßige bis starke Färbeintensität. Bezogen auf die oropharyngealen Untergruppen zeigte sich ein ähnliches Bild. Die HNSCC zeigten in 10 Fällen (59%) eine Expression von mehr als 70% der Tumorzellen, die BSCC bei 13 Fällen (76%), jedoch überwogen die HNSCC Fälle mit einer Anfärbung von 100% der Tumorzellen (29% HNSCC, 12% BSCC). Insgesamt ließ sich kein signifikantes unterschiedliches Expressionsmuster der einzelnen Gruppen ermitteln. Mittels der qPCR wurde CXCL9 im BSCC im Mittel 1,21-fach später detektiert als in der HNSCC Vergleichsgruppe. Dieses Ergebnis konnte nicht als signifikant gewertet werden (Tab. 12., Abb. 13a und b, Diagramm 08).

CXCL9	HNSCC		BSCC	
	Gesamtkollektiv	Oropharynx	Gesamtkollektiv	Oropharynx
Negativ	0	0	0	0
1-10%	0 +	0 +	0 +	0 +
	0 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
11-40%	0 +	0 +	1 +	1 +
	0 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
41-70%	4 +	2 +	0 +	0 +
	7 ++	5 ++	2 ++	2 ++
	0 +++	0 +++	1 +++	1 +++
71-99 %	0 +	0 +	0 +	0 +
	5 ++	5 ++	4 ++	3 ++
	1 +++	0 +++	9 +++	8 +++
100%	0 +	0 +	0 +	0 +
	2 ++	2 ++	8 ++	1 ++
	16 +++	3 +++	10 +++	1 +++

Tab.12: CXCL9 in der Gesamtpopulation und im Oropharynx. Anteil an positiv angefärbten Tumorzellen; Färbungsintensität schwach (+), mittel (++), stark (+++)

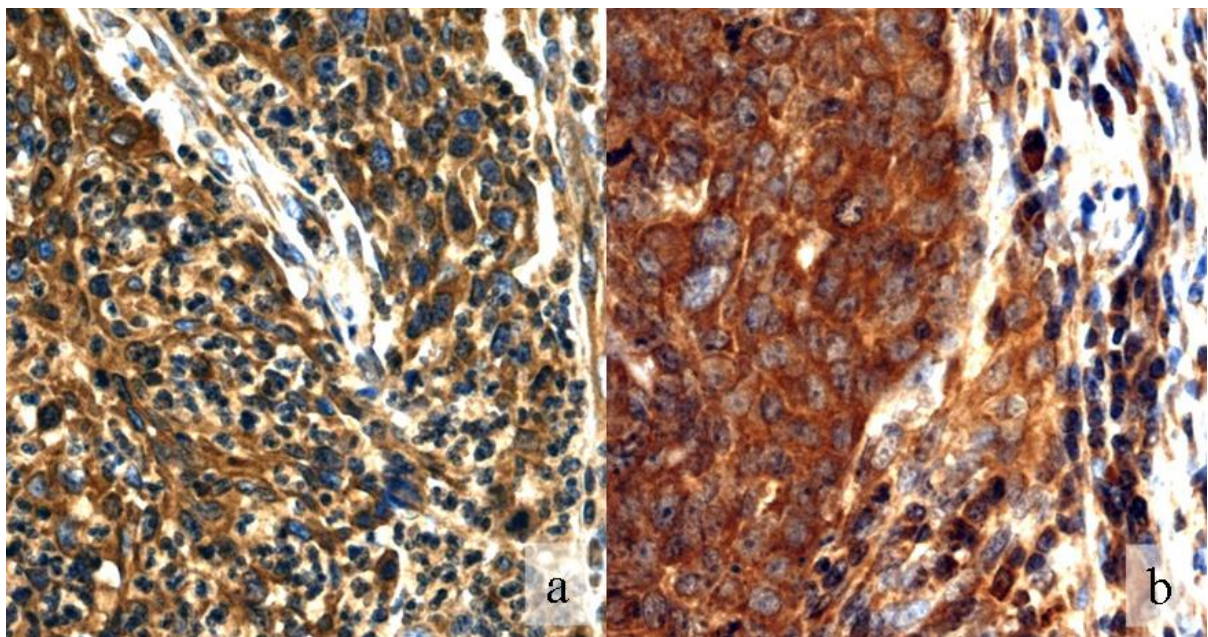


Abb.13: CXCL9 im Gesamtkollektiv der HNSCC (a) und BSCC (b). 40-fache Vergrößerung

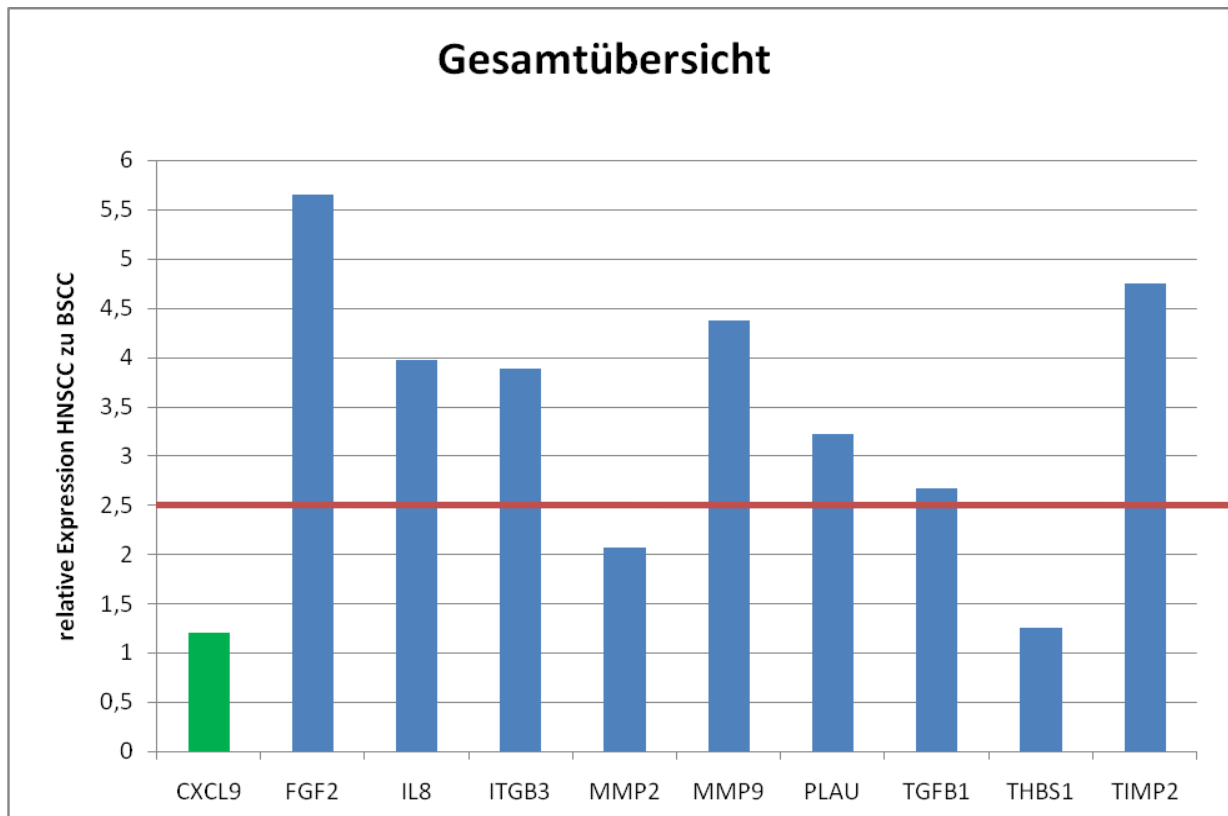


Diagramm 08: CXCL9 Expression

5.9 Thrombospondin 1 (THBS1)

Immunhistochemisch imponierte Thrombospondin 1 als sehr schwache Färbung. Hierbei zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie bei ITGB3 oder bFGF. Das Gesamtkollektiv der HNSCC konnte keine Probe aufweisen, bei der 41% oder mehr Tumorzellen gefärbt waren. 25 Proben (71%) zeigten eine Expression unter 11%. Entsprechendes Ergebnis zeigte sich für das BSCC Gesamtkollektiv. Auch nach Unterteilung in die oropharyngealen Untergruppen konnte in HNSCC und BSCC in 71% der Fälle eine Protein-Expression von unter 11% der Tumorzellen nachgewiesen werden. Mit einer Felddifferenz der Faktors 1,26 bestätigte die qPCR die fehlend differente Expression (Tab. 13., Abb. 14a und b, Diagramm 09).

Thrombospondin 1	HNSCC		BSCC	
	Gesamtkollektiv	Oropharynx	Gesamtkollektiv	Oropharynx
Negativ	8	1	18	7
1-10%	16 +	11 +	8 +	5 +
	1 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
11-40%	9 +	4 +	7 +	2 +
	1 ++	0 ++	1 ++	1 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
41-70%	0 +	0 +	1 +	1 +
	0 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
71-99 %	0 +	0 +	0 +	0 +
	0 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++
100%	0 +	0 +	0 +	0 +
	0 ++	0 ++	0 ++	0 ++
	0 +++	0 +++	0 +++	0 +++

Tab.13: THBS1 in der Gesamtpopulation und im Oropharynx. Anteil an positiv angefärbten Tumorzellen; Färbungsintensität schwach (+), mittel (++), stark (+++)

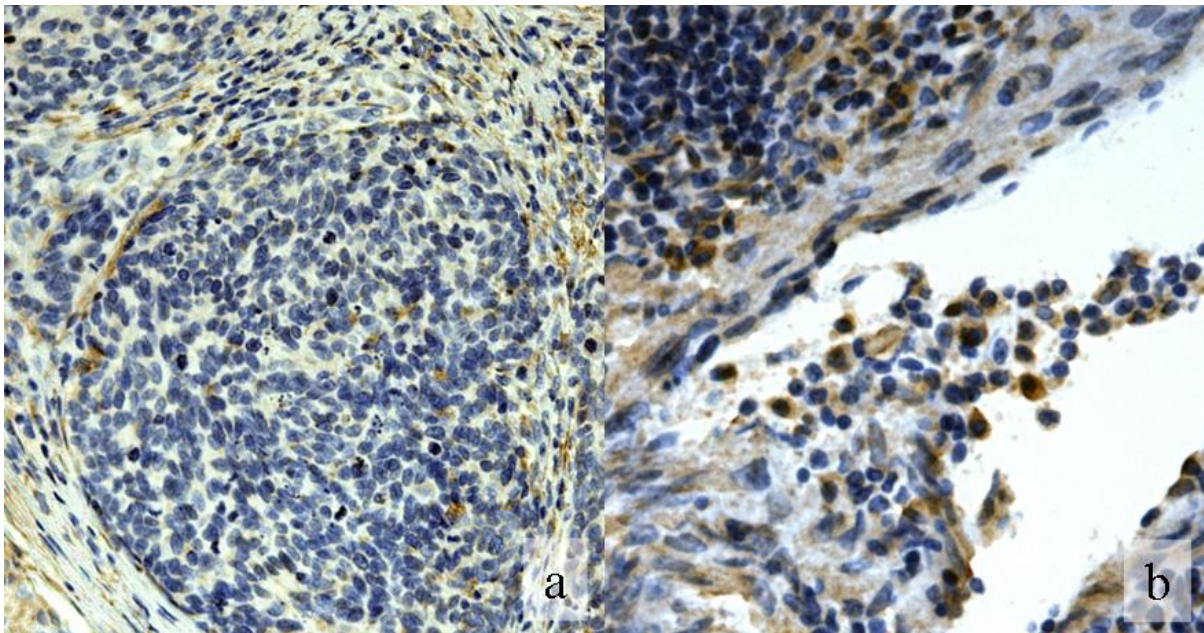


Abb.14: THBS1 im Gesamtkollektiv der HNSCC (a) und BSCC (b). 40-fache Vergrößerung

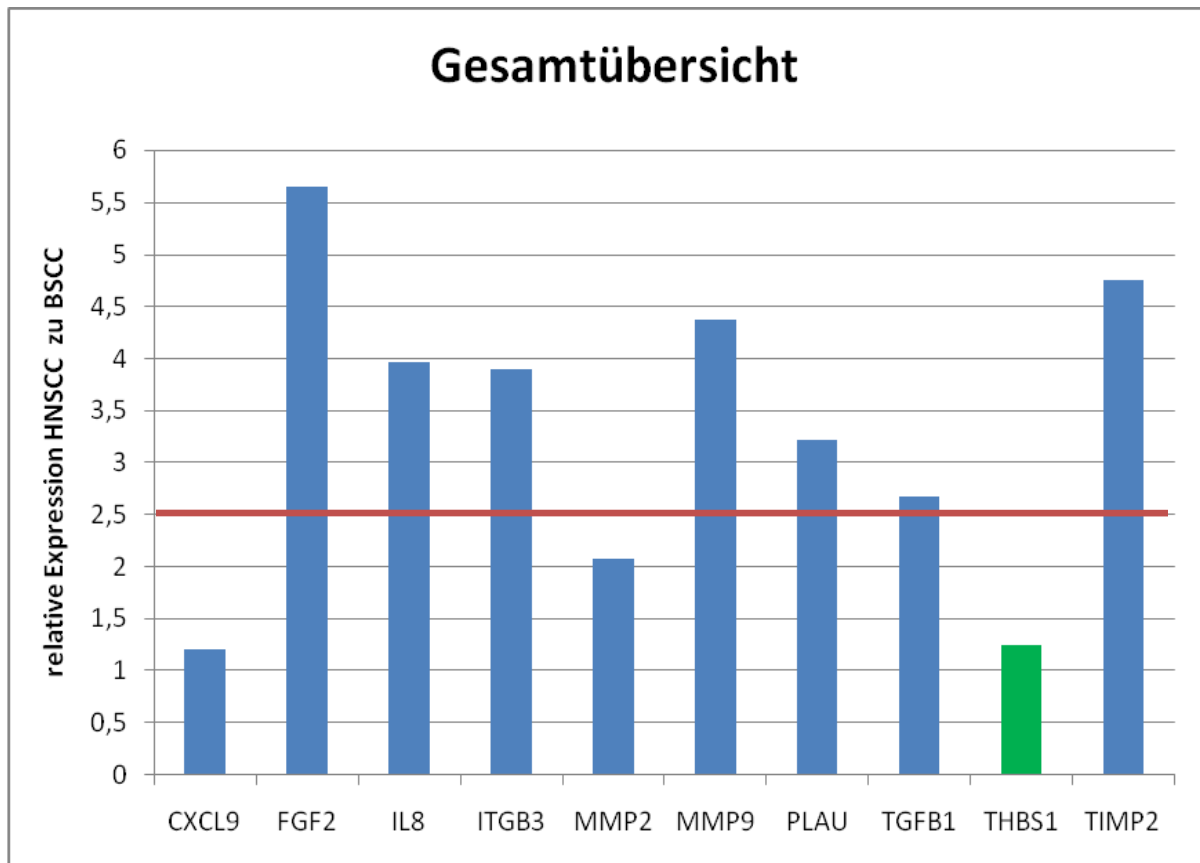


Diagramm 09: THBS1 Expression

5.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für MMP2, MMP9, TIMP2, IL8, PLAU und TGFB1 konnte sowohl immunhistochemisch als auch in der qPCR für HNSCC eine signifikant stärkere Protein- bzw. cDNA-Expression als in BSCC nachgewiesen werden. Die höhere Sensitivität der qPCR ermöglichte in den oropharyngealen Untergruppen die Bestimmung signifikanter Felddifferenzen für Gene, deren Proteinexpression in der Immunhistochemie sehr schwach war. Hierzu zählten TIMP2, TGFB1, bFGF und ITGB3. Für THBS1 und CXCL9 konnte keine differente Expression für BSCC gegenüber herkömmlichen HNSCC nachgewiesen werden.

6. Diskussion

Wain et al. stellten 1986 das basaloid squamöse Plattenepithelkarzinom als eine aggressive Variante des HNSCC vor (Wain et al., 1986). Verschiedene retrospektive Kohortenstudien schrieben den BSCC eine schlechtere Prognose zu, wenngleich keine ausreichenden Fallzahlen eingeschlossen werden konnten, um diese Vermutung abschließend zu klären. Darüber hinaus lagen wenige Untersuchungen vor, die die molekulare Grundlage des vermeintlich aggressiven Verhaltens analysierten.

Matrixmetalloproteinasen stellen eine Gruppe von Molekülen dar, die enzymatisch fast alle Proteine der Extrazellulärmatrix (ECM) abbauen können (O-charoenrat, Rhys-Evans und Eccles, 2001). In der Pathogenese von Tumoren spielen vor allem die Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2) und 9 (MMP9) eine bedeutende Rolle. Der Umbau der ECM während der Tumorprogression erfolgt durch eine synergetische Handlung von verschiedenen, durch Tumor- und Stromazellen produzierten proteolytischen Enzymen (Mignatti und Rifkin, 2000). Der Umbau wird insbesondere durch Metalloproteinasen vermittelt und führt zu einer erhöhten MVD (microvessel density) und einem invasiven Wachstumsmuster (Franchi et al., 2002; O-charoenrat et al., 2001). Klinisch war die Überexpression der Metalloproteinasen in HNSCC mit einem vermehrten Vorkommen von Lymphknoten und Fernmetastasen sowie einem schlechteren Patientenüberleben assoziiert (Werner et al., 2002; Kusakawa et al., 1993; Ruokolainen et al., 2006; Zhou et al., 2006). In der vorliegenden Studie ergab sich für die untersuchten Matrixmetalloproteinasen eine Überexpression zugunsten der HNSCC, wenngleich für MMP2 kein signifikantes Niveau erreicht wurde. Entsprechend dieser Ergebnisse konnten O-charoenrat et al. (2001) nur eine schwache Korrelation von MMP2 und Lymphknotenstatus feststellen, während sie MMP9 als einen nützlichen Marker zur Evaluation des bösartigen Potenzials des HNSCCs befanden. Dementsprechend erschien insbesondere die vermehrte Expression von MMP9 mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, Metastasierung und damit Prognose assoziiert zu sein (Zhou et al., 2006). In der Immunhistochemie spiegelte sich das Ergebnis der qPCR wieder. Auch auf Proteinebene zeigte sich sowohl für MMP2 als auch für MMP9 eine Überexpression im HNSCC. Konkordant mit den vorliegenden Ergebnissen identifizierten Arbeitsgruppen von Hensen und Ye MMP9 als die am stärksten exprimierte Metalloproteinase und folgerten ein biologisch aggressives Verhalten (Hensen et al., 2008; Ye et al., 2008). Es liegen nur wenige Untersuchungen vor, die den Expressionsstatus der Metalloproteinasen für BSCC und HNSCC vergleichend untersuchen. Entgegen der vorliegenden Studie zeigten Coletta et al.

(2001) eine Überexpression von MMP2 und MMP9 in BSCC gegenüber HNSCC. Es ist jedoch fraglich, ob Coletta et al. eine relevante Aussage bei einer Fallzahl von nur zwei BSCC Fällen treffen konnten. Der Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2 (TIMP2) wird als Gegenspieler der Metalloproteinasen verstanden. Die Bedeutung von TIMP2 in der Tumorprogression wird kontrovers diskutiert. Sowohl Polette et al., als auch Charous et al. stellten eine Korrelation zwischen einer erhöhten TIMP- Konzentration und eines weniger aggressiven Tumors her (Charous et al., 1997; Polette et al., 1993). So stellten Gorogh et al. 2006 passend zu diesen Erkenntnissen fest, dass TIMP1 und 2 die Metastasierung in laryngealen SCC unterdrückten (Gorogh et al., 2006). Entsprechend dieser Ergebnisse zeigte sich in der vorliegenden Studie sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene eine Überexpression von TIMP2 im HNSCC, was das biologisch aggressivere Verhalten zugunsten der HNSCC unterstrich. Entgegen dieser Ergebnisse brachten andere Arbeitsgruppen die erhöhte TIMP-Expression mit einem aggressiveren Tumorbild in Zusammenhang (Kurahara et al., 1999; Grignon et al., 1996; O-charoenrat et al., 2001; Ruokolainen et al., 2006).

Die vorliegenden Ergebnisse der Metalloproteinasen werden durch die ebenfalls proangiogenetischen Interleukin 8 (IL8), PLAU und bFGF bekräftigt. Es zeigte sich für das HNSCC sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine Überexpression von IL 8 im Vergleich zum BSCC. IL8 wurde als chemotaktischer Faktor für Leukozyten bekannt (Xie, 2001). In den letzten Jahren wurde allerdings die Rolle von IL8 in der Tumorprogression, pathologischen Angiogenese und Metastasierung zunehmend erforscht. Obgleich Rogala et al. (2001) keine Korrelation zwischen dem IL8- Gehalt im Tumorgewebe und der angiogenetischen Fähigkeit dieses Gewebes herstellen konnten (Rogala et al., 2001), überwiegen doch die Studien, die die proangiogenetische Rolle in der Tumorgenese unterstreichen. Insbesondere eine vermehrte Expression von Metalloproteinasen unter der Einwirkung von IL8 wurde beschrieben (Cheng et al., 2008). Klinisch konnte in Ovarial-, Prostata- und Mammakarzinomen eine gesteigerte Expression von IL8 mit einem vermehrten Tumorwachstum und Metastasierung in Verbindung gebracht werden (Shahzad et al., 2010; Araki et al., 2007; Ahmed et al., 2006; Snoussi et al., 2010). Eine erhöhte Serumkonzentration von IL8 konnte auch bei Patienten mit einem HNSCC gezeigt werden (Trellakis et al., 2011). In der vorliegenden Studie zeigte sich auch für PLAU auf RNA- und Proteinebene eine Überexpression im HNSCC im Vergleich zum BSCC. Di Bernardo (2009) unterstellte dem Plasminogen-Signalweg eine wichtige Rolle in dem Verhalten verschiedener Tumore, unter anderem dem Lungenkrebs. Eine schlechte Prognose in ErbB2 positiven Mammakarzinomen

stellten Urban et al. in einen Zusammenhang mit der Expression von PLAU, so dass PLAU als bedeutender prognostischer Indikator angesehen wurde (Urban et al., 2006; Schuetz et al., 2006; Carter et al., 2010). Auch in plattenepithelial differenzierten Speiseröhrentumoren (ESCC) konnte eine Korrelation zwischen einer PLAU-Überexpression und schlechten Überlebensprognose nachgewiesen werden (Shiomi et al., 2000). Einige Studien gingen auch auf das Verhältnis von PLAU in HNSCC Tumoren ein. Clayman et al. (1993) sahen einen invasiven Phänotyp bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle durch vermehrte Transkription von PLAU begünstigt, was sich in einer deutlich gesteigerten Metastasierungsrate äußerte (Petruzzelli, Snyderman und Johnson, 1994; Itaya et al., 1996). Die Hauptrolle von PLAU im Sinne der Metastasierung konnte auch durch Maguire et al. (2000) anschaulich demonstriert werden. Sie untersuchten Basalzellkarzinome, die durch eine extrem seltene Metastasierung gekennzeichnet waren. Im Gegensatz zu den Melanomen oder Plattenepithelkarzinomen zeigte sich eine deutlich niedrigere Expression von PLAU in BCC. Die maligne Potenz wurde durch Versuchsreihen mit Berberinen und Acacetin veranschaulicht, die durch unterschiedliche Signalwege in der Lage waren, die Expression von PLAU in Tumorzellen zu reduzieren, was mit einer deutlich reduzierten Zellmigration und Invasion einherging (Ho et al., 2009; Fong et al., 2010).

Auch bFGF wurde im HNSCC mit einem verstärkten Tumorwachstum und einer vermehrten Metastasierung korreliert (Dellacono et al., 1997). Insbesondere die Regulation von Gefäßendothelzellen und die Mikrovessikeldichte schienen die proangiogenetische Wirkung zu vermitteln (Dellacono et al., 1997; Riedel et al., 2000a). Darüber hinaus führte bFGF in Kooperation mit VEGF zu einer Tumorneovaskularisation (Riedel et al., 2000c). Obgleich Homer et al. 2002 keine Korrelation zwischen dem Serum-Level von bFGF und klinisch-pathologischen Faktoren oder Überlebensdaten feststellen konnten, erkannten sie doch den Trend in Richtung eines fortgeschrittenen, aggressiven Tumors bei einem erhöhten Level von bFGF (Homer et al., 2002). 2009 gelang es Montag et al. ein hochreguliertes bFGF im HNSCC mit einer schlechten Überlebensprognose festzustellen. Die klinische Bedeutung von bFGF illustrierte der erfolgreiche Einsatz von Docetaxel oder IFN- α und - β , die zu einer verminderten Expression von bFGF führten. Der Einsatz dieser Therapeutika ist heute im klinischen Alltag jedoch begrenzt (Yoo et al., 2002; Riedel et al., 2000b). In der vorliegenden Studie zeigte sich kein kongruentes Ergebnis für die qPCR und Immunhistochemie. Auf RNA-Ebene zeigte sich eine deutliche Überexpression von bFGF im HNSCC im Vergleich zum BSCC. Es zeigte sich nach Aufteilung der Population in oropharyngeale Untergruppen, dass für diese Tumoren nur eine schwache bFGF-Proteinexpression vorlag. Es lässt sich hier

nicht klären, ob die differente Expression in der weitaus sensitiveren qPCR zu einem funktionell differenten Ergebnis führen würde. In der vorliegenden Studie zeigte sich für TSP1 kein signifikanter Unterschied zwischen HNSCC und BSCC. Die Expression von TSP1 wurde in verschiedenen Tumoren untersucht. Eine abschließende Bewertung des metastatischen Potentials von TSP1 liegt nicht vor, wenngleich Korrelationen zu VEGF, MVD und Matrixmetalloproteinasen eine proangiogenetische Wirkung nahe legten (Nakao et al., 2010; John, Rothman und Tuszynski, 2010; Murphy-Ullrich, Schultz-Cherry und Hook, 1992). So zeigte eine Studie von Nucera et al. (2010) die Korrelation einer Überexpression von TSP1 zum Überleben in aggressiven Schilddrüsentumoren (Nucera et al., 2010). Auch Zhou et al. beschrieben eine Korrelation von TSP1 und regionaler Lymphknoteninvasion in ESCC (Zhou et al., 2009). Demgegenüber fanden auch verschiedene Studien eine negative oder fehlende Korrelation von Tumorwachstum und TSP1 Expression (Reynes et al., 2011). 2010 fanden Yang et al. in ihrer Studie über die TSP1 Expression in mucoepidermalen Karzinomen sogar eine Korrelation von positiver TSP1 Expression mit einer niedrigeren Malignität und einer besseren Prognose (Yang et al., 2010). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse zeigte sich in der TSP1 abhängigen Überexpression der proangiogenetischen MMPs, wie auch der antiangiogenetischen TIMPs (John et al., 2009). Die Bedeutung von ITGB3 wird in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert. Während einige Autoren ein besseres Überleben mit einer verminderten Expression von ITGB3 korrelierten, sahen andere eine Überexpression von ITGB3 als entscheidend für ein besseres Überleben. So zeigten Felding-Habermann et al., dass eine erhöhte Expression von $\alpha\beta 3$ Integrin den metastasierenden Phenotyp des Melanoms förderte (Felding-Habermann et al., 2002). Dies führten sie auf die durch ITGB3 vermittelten spezifischen invasiven und adhäsiven Eigenschaften der Tumorzellen zurück. Hiermit unterstützten sie die Studie von Liapis et al, die bereits 1997 entdeckten, dass eine hohe Expression von $\alpha\beta 3$ Integrin mit hoch malignen Ovarialkarzinomen korrelierte (Liapis et al., 1997). Auch ITGB3 schien seine proangiogenetischen Eigenschaften über Matrixmetalloproteinase zu vermitteln (Rolli et al., 2003). Demgegenüber zeigten Maubant et al. eine signifikant niedrigere Expression der $\beta 3$ Untereinheit in Grad 3 Ovarialkarzinomen im Vergleich zu Grad 1 oder 2 Tumoren. Darüber hinaus wurde eine niedrige Expression in den Peritonealmetastasen im Vergleich zum Primärtumor detektiert, so dass das metastatische Potential von ITGB3 angezweifelt wurde (Maubant et al., 2005). Ebenso demonstrierten Wu et al., dass eine Überexpression von ITGB3 im HCC zu einem Zellwachstumsarrest und einer verminderten Tumorgenität führten (Wu et al., 2009). Mithin wurde eine klinische Korrelation zwischen ITGB3 Expression im

Tumor und der erhöhten Überlebensrate hergestellt (Partheen et al., 2009). In der vorliegenden Studie zeigte sich ähnlich wie für bFGF eine nur schwache Proteinexpression mit deutlicher Felddifferenz in der qPCR zugunsten der HNSCC. Eine abschließende Beurteilung des biologischen Verhaltens ist nicht möglich. Für CXCL9 (=mig; monokine induced by gamma interferon) konnte weder auf RNA-, noch auf Proteinebene eine differente Expression nachgewiesen werden. In der Literatur wurde die biologische Bedeutung von CXCL9 unterschiedlich bewertet. Zum einen wurde eine vermehrte Expression von CXCL9 und 10 mit einem anti-tumorösen Effekt in Verbindung gebracht, was sich klinisch als Nekroseneigung äußerte (Sgadari et al., 1997; Hiroi und Ohmori, 2003). Ferner wurden Korrelationen zwischen einer Überexpression des T-Zell-Lockstoff CXCL9 mit einer kleinen Tumormgröße und einer verminderten Rate an Tumormetastasen hergestellt (Fulton et al., 2006). Die Unfähigkeit der Tumorzellen CXCL9 zu produzieren, stellte einen möglichen Wachstumsvorteil für diese Zellen durch eine Verminderung der Aktivität und/oder Stärke der tumor-spezifischen T-Zell Antwort dar (Gorbachev et al., 2007). Walser et al. hoben im gleichen Jahr die Rolle der NK Zellen als kritischen Punkt in der anti-metastatischen Wirkung von CXCL9 hervor. Sie formulierten die Hypothese, dass durch eine Manipulation der CXCL9-CXCR3 Achse Spenderimmunzellen zu dem Tumor dirigiert werden könnten, die sowohl auf das lokale Tumorstwachstum als auch auf die Metastasierung des Tumors einen Einfluss haben könnten (Walser et al., 2007). Auch Harlin erkannte die bedeutende Rolle von CXCL9 als T-Zell-Lockstoff. Ein vermindertes Vorkommen von Chemokinen limitierte möglicherweise die Einwanderung von T-Zellen in das Tumorumfeld, so dass eine Limitierung der Effektivität einer antitumorösen Immunität die Folge wäre (Harlin et al., 2009). Jedoch wurden auch einige Fälle beschrieben, in der eine Überexpression von CXCL9 mit Tumorstwachstum und einer begünstigenden Metastasierung einherging. Vor allem in den letzten Jahren wurde die Rolle des CXCL9 als die Tumorstprogression unterstützendes Molekül bekannt. 2006 wurde durch Ishikawa et al. eine Studie über die Auswirkung von Chemokinen auf den Tumor veröffentlicht. Sie hielten fest, dass die Tumorzellen Chemokinrezeptoren exprimierten sowie Chemokine benutzten, um zu den Zielregionen zu metastasieren. Eine besondere Rolle kam hierbei CXCL4 in der Rolle von Lymphknotenmetastasen von oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) zu (Ishikawa et al., 2006). Furuya et al. formulierten 2007 in ihrer Studie über Ovarialkarzinome die Hypothese, dass CXC Chemokine möglicherweise eine Tumor unterstützende Wirkung entfalteten (Furuya et al., 2007). CXC Chemokine, die durch Endothelzellen sezerniert werden, induzierten laut Warner et al. die Tumorstzellanvasion. Die chemotaktischen Signale leiteten den Weg der Tumorstzellstreuung ein (Warner et al.,

2008). Die erhöhte Expression von CXCL9 in Tumorpatienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ließen Ruiz-Garcia et al. zu dem Entschluss kommen, dass CXCL9, wie bereits in Studien über die Abgabe von CXCL9 aus Tumoren des Melanoms und des Nierenkarzinoms beschrieben, eine Tumor fördernde Wirkung zukam (Kunz et al., 1999; Bukowski et al., 1999; Ruiz-Garcia et al., 2010). Ähnlich wie bei TSP1, ITGB3 und CXCL9 wird TGFB1 als Malignitätsmarker kontrovers diskutiert. Während sich in HNSCC immunhistochemisch eine Korrelation zwischen histologischen Differenzierungsgrad und TGFB1 zeigte, konnte klinisch keine Prädiktion bezüglich der Patientenprognose nachgewiesen werden (Logullo et al., 2003). Weiterhin wurde eine immunhistochemisch verminderte Expression von TGFB1 mit einer Tumorprogression in Lungentumoren assoziiert (Zhao, El-Gabry und Hei, 2006) und ein Verlust der Expression dieses Gens in verschiedenen Tumoren festgestellt (Zhao, Piao und Hei, 2002). In der vorliegenden Studie wurde eine Überexpression TGFB1 in HNSCC im Vergleich zu BSCC detektiert. Damit liegt ein übereinstimmendes Expressionsverhalten von TGFB1 mit MMP2 und 9, IL8, PLAU und bFGF vor, was entsprechend der aktuellen Literatur mit einer schlechteren Prognose für HNSCC in Verbindung gebracht werden muss. Entgegen der Arbeitsgruppe von Logullo et al. konnte in anderen Arbeiten eine Zunahme der Angiogenese und Entzündung in Zusammenhang mit einer Überexpression von TGFB1 gebracht werden. Dabei schien TGFB1 in frühen Tumorstadien eine anti-proliferative Wirkung zu vermitteln, wohingegen es im späten Stadium die Tumorzellinvasion und Metastasierung zu unterhalten schien (Bierie und Moses, 2006; Jakowlew, 2006). Diese diskrepanten Ergebnisse erklärten Zhang et al. mit einer Tumorzell- oder Typ-spezifisch Dysregulation der TGFB1 Expression (Zhang et al., 2009b). Diese Hypothese bekräftigten Kwak et al., die sowohl eine Interaktion von TGFB1 mit den pro-angiogenetischen MMPs als auch mit den antiangiogenetischen TIMPs nachweisen konnten (Kwak et al., 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stehen in Widerspruch zu der Hypothese von Wain et al., die den BSCC ein schlechtes biologisches Verhalten zusprachen (Wain et al. 1986). Mit MMP2 und 9, IL8, bFGF und PLAU waren wesentliche pro-angiogenetische Gene in HNSCC signifikant stärker exprimiert, die mit einer schlechten Patientenprognose assoziiert sind. Allerdings bleibt zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Studie zur Untersuchung des biologisch differenten Verhaltens den BSCC HNSCC Partner zugeordnet wurden, die der jeweiligen UICC-Klassifikation der BSCC entsprachen. Die überwiegende Zahl aktueller Studien nahm jedoch keine Rücksicht auf die Stadienverteilung, so dass bezüglich der zugrunde liegenden Tumorbiologie von einem Probenbias auszugehen ist, da frühe

Tumorstadien drastisch überrepräsentiert sein dürften. Darüber hinaus waren die Fallzahlen, über die in der aktuellen Literatur berichtet wurde, zu gering, um auf ein differenziertes biologisches Verhalten zurück schließen zu können. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie geben Anlass zur Diskussion, ob BSCC tatsächlich gegenüber entdifferenzierten HNSCC biologisch aggressiver sind und ob dieses biologisch aggressive Verhalten tatsächlich zu einer schlechteren Prognose führt. Unlängst konnte anhand HPV-induzierter Oropharynx-Karzinome nachgewiesen werden, dass eine nodale Metastasierung nicht zwangsläufig mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Lowy und Munger, 2010). Große BSCC-Kohorten sollten im Rahmen von Multi-Center-Studien zusammengetragen werden, die differenziert der Tumorlokalisation, dem Grading, dem UICC-Stadium und dem jeweiligen Behandlungsregime Rechnung tragen.

7. Zusammenfassung

Das basaloid squamöse Plattenepithelkarzinom stellt eine aggressive Variante des herkömmlichen HNSCC dar. Es wird eine schlechte Überlebensprognose mit früher Metastasierung angenommen. Bisher konnte auf molekularer Ebene kein Anhaltspunkt gefunden werden, der dieses biologische Verhalten erklärt. Für die Kanzerogenese generell betrachtet, spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle, da Tumore für die Selbstversorgung Gefäße neu bilden können. Pro-angiogenetische Faktoren wurden oft in Zusammenhang mit einer früheren Metastasierung und schlechteren Prognose beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen von verschiedenen pro- und anti-angiogenetischen Faktoren im BSCC mit dem im HNSCC verglichen. Entgegen der von Wain et al. 1986 publizierten Theorie, dass sich es bei dem BSCC um eine aggressive Variante handeln könnte, zeigt sich in der vorliegenden Studie eine verminderte Expression von pro-angiogenetischen Faktoren im BSCC im Vergleich zum HNSCC. Hierbei zeigt sich im HNSCC sowohl auf Protein- als auch auf RNA- Ebene eine Überexpression der Matrixmetalloproteinasen 2 und 9, Interleukin 8 und dem Urokinase-typ Plasminogen Inaktivator. Diese Überexpression lässt für das HNSCC eine frühere Metastasierung und begünstigte Tumorprogression im Gegensatz zum BSCC vermuten. Im Rahmen von Multi-Center-Studien sollten größere BSCC-Kohorten zusammengetragen werden, die entsprechend der Tumorlokalisation, dem Grading, dem UICC-Stadium und dem jeweiligen Behandlungsregime vergleichend zum HNSCC untersucht werden. Hierdurch könnten die diskrepanten Ergebnisse der Patientenprognose bei BSCC abschließend geklärt werden. Ein

besonderes Augenmerk sollte auf dem HPV-Status liegen, der auf molekularer Ebene den positiven Lymphknotenstatus ohne damit verbundene Prognoseverschlechterung erklären und einen Erklärungsansatz für die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern könnte.

8. Literaturverzeichnis

1. Ahmed, O. I., A. M. Adel, D. R. Diab, and N. S. Gobran. Prognostic value of serum level of interleukin-6 and interleukin-8 in metastatic breast cancer patients. *Egypt.J.Immunol.* 13 (2006) 61-68.
2. Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.* (1990) 6757-64.
3. Amalinei, C., I. D. Caruntu, S. E. Giusca, and R. A. Balan. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom.J.Morphol.Embryol.* 51 (2010) 215-228.
4. Amatscheck S, Lucas R, Eger A, Pflueger M, Hundsberger H, Knoll C, Grosse-Kracht St, Schuett W, Koszik F, Maurer D, Wiesner C. CXCL9 induces chemotaxis, chemorepulsion and endothelial barrier disruption through CXCR3-mediated activation of melanoma cells. *Br J Cancer.* (2011) 469-79.
5. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med;* (2010) 24-35.
6. Applied Biosystems by Life Technologies Corporation, Carlsbad, California
7. Araki, S., Y. Omori, D. Lyn, R. K. Singh, D. M. Meinbach, Y. Sandman, V. B. Lokeshwar, and B. L. Lokeshwar. Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer. *Cancer Res.* 67 (2007) 6854-6862.
8. Altavilla G, Mannarà GM, Rinaldo A, Ferlito A. Basaloid squamous cell carcinoma of oral cavity and oropharynx. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* (1999) 169-73

9. Banks, E. R., H. F. Frierson, Jr., S. E. Mills, E. George, R. J. Zarbo, and P. E. Swanson. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 40 cases. *Am.J.Surg.Pathol.* 16 (1992) 939-946.
10. Barth TJ, Zöller J, Kübler A, Born IA, Osswald H. Redifferentiation of oral dysplastic mucosa by the application of the antioxidants beta-carotene, alpha-tocopherol and vitamin C. *Int J Vitam Nutr Res.* (1997) 368-76.
11. Basu R, Mandal S, Ghosh A, Poddar TK. Role of tobacco in the development of head and neck squamous cell carcinoma in an eastern Indian population. *Asian Pac J Cancer Prev.* (2008) 381-6.
12. Begum S, Westra WH. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPV status. *Am J Surg Pathol.* (2008) 1044-50
13. Bierie, B. and H. L. Moses. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat.Rev.Cancer* 6 (2006)506-520.
14. Boyle JO, Gümüs ZH, Kacker A, Choksi VL, Bocker JM, Zhou XK, Yantiss RK, Hughes DB, Du B, Judson BL, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Effects of cigarette smoke on the human oral mucosal transcriptome. *Cancer Prev Res (Phila)* (2010) 266-78
15. Brainard JA, Hart WR. Adenoid basal epitheliomas of the uterine cervix: a reevaluation of distinctive cervical basaloid lesions currently classified as adenoid basal carcinoma and adenoid basal hyperplasia. *Am J Surg Pathol.* (1998) 965-75.
16. Brambilla E, Moro D, Veale D, Brichon PY, Stoeber P, Paramelle B, Brambilla C. Basal cell (basaloid) carcinoma of the lung: a new morphologic and phenotypic entity with separate prognostic significance. *Hum Pathol.* (1992) 993-1003.
17. Bukowski, R. M., P. Rayman, L. Molto, C. S. Tannenbaum, T. Olencki, D. Peereboom, R. Tubbs, D. McLain, G. T. Budd, T. Griffin, A. Novick, T. A. Hamilton, and J. Finke. Interferon-gamma and CXC chemokine induction by interleukin 12 in renal cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 5 (1999) 2780-2789.

18. Calaf, G. M., C. Echiburu-Chau, Y. L. Zhao, and T. K. Hei. BigH3 protein expression as a marker for breast cancer. *Int.J.Mol.Med.* 21 (2008) 561-568.
19. Campman SC, Gandour-Edwards RF, Sykes JM. Basaloid squamous carcinoma of the head and neck. Report of a case occurring in the anterior floor of the mouth. *Arch Pathol Lab Med.* (1994) 1229-32.
20. Cardesa A, Zidar N, Ereno C, Basaloid squamous cell carcinoma, In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidrasky D, editors. Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization classification of tumours. Lyon, France: IARC Press; 2005, p.124-5
21. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* (2000) 389-95.
22. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* (2000) 249-57.
23. Carter, J. C., R. A. Campbell, J. A. Gibbons, M. W. Gramling, A. S. Wolberg, and F. C. Church. Enhanced cell-associated plasminogen activator pathway but not coagulation pathway activity contributes to motility in metastatic breast cancer cells. *J.Thromb.Haemost.* 8 (2010) 1323-1332.
24. Charous, S. J., G. P. Stricklin, L. B. Nanney, J. L. Netterville, and B. B. Burkey. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.* 106 (1997) 271-278.
25. Chen JK, Chao HH, Yang VC. Inhibition of the growth of a human nasopharyngeal carcinoma cell line by bFGF is mediated via FGFR-1. *FASEB J.* (1995) 1211-9.
26. Cheng, M., Y. Li, J. Wu, Y. Nie, L. Li, X. Liu, H. N. Charoude, and H. Chen. IL-8 induces imbalances between nitric oxide and endothelin-1, and also between plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator in cultured endothelial cells. *Cytokine* 41 (2008) 9-15.

27. Chetty R, Serra S, Hsieh E. Basaloid squamous carcinoma of the anal canal with an adenoid cystic pattern: histologic and immunohistochemical reappraisal of an unusual variant. *Am J Surg Pathol.* (2005) 1668-72.
28. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* (1998) 3527-61.
29. Clayman, G., S. W. Wang, G. L. Nicolson, A. el-Naggar, A. Mazar, J. Henkin, F. Blasi, H. Goepfert, and D. D. Boyd. Regulation of urokinase-type plasminogen activator expression in squamous-cell carcinoma of the oral cavity. *Int.J.Cancer* 54 (1993)73-80.
30. Coletta, R. D., P. Cotrim, P. A. Vargas, H. Villalba, F. R. Pires, Moraes M. de, and O. P. de Almeida. Basaloid squamous carcinoma of the oral cavity: report of 2 cases and study of AgNOR, PCNA, p53, and MMP expression. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 91 (2001) 563-569.
31. Coppola D, Catalano E, Tang CK, Elfenbein IB, Harwick R, Mohr R. Basaloid squamous cell carcinoma of floor of mouth. *Cancer.* (1993) 2299-305.
32. Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, van der Waal I. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* (1996) 55-62.
33. Cubilla AL, Reuter VE, Gregoire L, Ayala G, Ocampos S, Lancaster WD, Fair W. Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papilloma virus-related penile neoplasm: a report of 20 cases. *Am J Surg Pathol.* (1998) 755-61.
34. DAKO Corporation, Gostrup, Denmark
35. de Sampaio Goes, F. C., D. T. Oliveira, R. G. Dorta, I. N. Nishimoto, G. Landman, and L. P. Kowalski. Prognoses of oral basaloid squamous cell carcinoma and squamous cell carcinoma: a comparison. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 130 (2004) 83-86.

36. Dellacono, F. R., J. Spiro, R. Eisma, and D. Kreutzer. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors by head and neck squamous carcinoma tumor and vascular endothelial cells. *Am.J.Surg.* 174 (1997) 540-544.
37. Desruisseau, S., J. Palmari, C. Giusti, S. Romain, P. M. Martin, and Y. Berthois. Determination of TGFbeta1 protein level in human primary breast cancers and its relationship with survival. *Br.J.Cancer* 94 (2006) 239-246.
38. Di Bernardo, M. C., A. Matakidou, T. Eisen, and R. S. Houlston. Plasminogen activator inhibitor variants PAI-1 A15T and PAI-2 S413C influence lung cancer prognosis. *Lung Cancer* 65 (2009) 237-241.
39. Esser D, Anke S, Roessner A, Freigang B. [Second carcinomas in cancers of the mouth cavity, pharynx and larynx. Clinical, histopathologic and cell kinetic findings]. *Laryngorhinootologie.* (2000) 478-82.
40. Felding-Habermann, B., E. Fransvea, T. E. O'Toole, L. Manzuk, B. Faha, and M. Hensler. Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin.Exp.Metastasis* 19 (2002) 427-436.
41. Ferlito A. The World Health Organization's revised classification of tumours of the larynx, hypopharynx, and trachea. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* (1993) 666-9.
42. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* (1971) 1182-6
43. Folkman J, Beckner K. Angiogenesis imaging. *Acad Radiol.* (2000) 783-5
44. Fong, Y., K. H. Shen, T. A. Chiang, and Y. W. Shih. Acacetin inhibits TPA-induced MMP-2 and u-PA expressions of human lung cancer cells through inactivating JNK signaling pathway and reducing binding activities of NF-kappaB and AP-1. *J.Food Sci.* 75 (2010) H30-H38.
45. Franchi, A., M. Santucci, E. Masini, I. Sardi, M. Paglierani, and O. Gallo. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer* 95 (2002) 1902-1910.

46. Fulton, A., F. Miller, A. Weise, and W. Z. Wei. Prospects of controlling breast cancer metastasis by immune intervention. *Breast Dis.* (2006) 115-127.
47. Furuya, M., T. Suyama, H. Usui, Y. Kasuya, M. Nishiyama, N. Tanaka, I. Ishiwata, Y. Nagai, M. Shozu, and S. Kimura. Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis. *Hum.Pathol.* 38 (2007) 1676-1687.
48. Gao X, Chen L. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer survival. *N Engl J Med.* (2010) 1576.
49. Gasperini, S., M. Marchi, F. Calzetti, C. Laudanna, L. Vicentini, H. Olsen, M. Murphy, F. Liao, J. Farber, and M. A. Cassatella. Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J.Immunol.* 162 (1999) 4928-4937.
50. Goldman, E. The growth of malignant disease in man and the over animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 2 (1907) 1236-1249.
51. Gorbachev, A. V., H. Kobayashi, D. Kudo, C. S. Tannenbaum, J. H. Finke, S. Shu, J. M. Farber, and R. L. Fairchild. CXC chemokine ligand 9/monokine induced by IFN-gamma production by tumor cells is critical for T cell-mediated suppression of cutaneous tumors. *J.Immunol.* 178 (2007) 2278-2286.
52. Gorogh, T., U. H. Beier, J. Baumken, J. E. Meyer, M. Hoffmann, S. Gottschlich, and S. Maune. Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 28 (2006) 31-39.
53. Grignon, D. J., W. Sakr, M. Toth, V. Ravery, J. Angulo, F. Shamsa, J. E. Pontes, J. C. Crissman, and R. Fridman. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)

- expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 56 (1996) 1654-1659.
54. Harlin, H., Y. Meng, A. C. Peterson, Y. Zha, M. Tretiakova, C. Slingluff, M. McKee, and T. F. Gajewski. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res.* 69 (2009) 3077-3085.
55. Hensen, E. F., M. J. De Herdt, J. J. Goeman, J. Oosting, V. T. Smit, C. J. Cornelisse, and R. J. Baatenburg de Jong. Gene-expression of metastasized versus non-metastasized primary head and neck squamous cell carcinomas: a pathway-based analysis. *BMC.Cancer* (2008) 168.
56. Hiroi, M. and Y. Ohmori. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required to elicit interferon-gamma-induced expression of chemokine CXC ligand 9 (CXCL9) and CXCL10 in human tumour cell lines. *Biochem.J.* 376 (2003) 393-402.
57. Ho, Y. T., J. S. Yang, T. C. Li, J. J. Lin, J. G. Lin, K. C. Lai, C. Y. Ma, W. G. Wood, and J. G. Chung. Berberine suppresses in vitro migration and invasion of human SCC-4 tongue squamous cancer cells through the inhibitions of FAK, IKK, NF-kappaB, u-PA and MMP-2 and -9. *Cancer Lett.* 279 (2009) 155-162.
58. Hocking JS, Stein A, Conway EL, Regan D, Grulich A, Law M, Brotherton JM. Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *Br J Cancer.* (2011) 886-91.
59. Homer, J. J., J. Greenman, and N. D. Stafford. Circulating angiogenic cytokines as tumour markers and prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin.Otolaryngol.Allied Sci.* 27 (2002) 32-37.
60. Huang H, Lai JY, Do J, Liu D, Li L, Del Rosario J, Doppalapudi VR, Pirie-Shepherd S, Levin N, Bradshaw C, Woodnutt G, Lappe R, Bhat A. Specifically targeting angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, Tie2-expressing monocyte infiltration, and tumor growth. *Clin Cancer Res.* (2011) 1001-11.

61. Ikebe, T., M. Shinohara, H. Takeuchi, M. Beppu, S. Kurahara, S. Nakamura, and K. Shirasuna. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin.Exp.Metastasis* 17 (1999) 315-323.
62. Ishikawa, T., K. Nakashiro, S. Hara, S. K. Klosek, C. Li, S. Shintani, and H. Hamakawa. CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Int.J.Oncol.* 28 (2006) 61-66.
63. Itaya, T., K. Suzuki, I. Takagi, H. Motai, and S. Baba. Relationship between head and neck squamous cell carcinomas and fibrinolytic factors. Immunohistological study. *Acta Otolaryngol.Suppl* (1996) 113-119.
64. Jakowlew, S. B. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 25 (2006) 435-457.
65. John, A. S., X. Hu, V. L. Rothman, and G. P. Tuszynski. Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: exploring the functional significance in tumor cell invasion. *Exp.Mol.Pathol.* 87 (2009) 184-188.
66. John, A. S., V. L. Rothman, and G. P. Tuszynski. Thrombospondin-1 (TSP-1) Stimulates Expression of Integrin alpha6 in Human Breast Carcinoma Cells: A Downstream Modulator of TSP-1-Induced Cellular Adhesion. *J.Oncol.* (2010) 645376.
67. Johnson JT, Myers EN, Bedetti CD, Barnes EL, Schramm VL Jr, Thearle PB. Cervical lymph node metastases. Incidence and implications of extracapsular carcinoma. *Arch Otolaryngol.* (1985) 534-7.
68. Jung, S., K. Wermker, H. Poetschik, T. Ziebura, and J. Kleinheinz. The impact of hyperbaric oxygen therapy on serological values of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). *Head Face.Med.* (2010) 29.
69. Kazerounian, S., K. O. Yee, and J. Lawler. Thrombospondins in cancer. *Cell Mol.Life Sci.* 65 (2008) 700-712.

70. Koontongkaew, S., P. Amornphimoltham, P. Monthanpisut, T. Saensuk, and M. Leelakriangsak. Fibroblasts and extracellular matrix differently modulate MMP activation by primary and metastatic head and neck cancer cells. *Med.Oncol.* (2011) 690-703
71. Kunz, M., A. Toksoy, M. Goebeler, E. Engelhardt, E. Brocker, and R. Gillitzer. Strong expression of the lymphoattractant C-X-C chemokine Mig is associated with heavy infiltration of T cells in human malignant melanoma. *J.Pathol.* 189 (1999) 552-558.
72. Kurahara, S., M. Shinohara, T. Ikebe, S. Nakamura, M. Beppu, A. Hiraki, H. Takeuchi, and K. Shirasuna. Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 21 (1999) 627-638.
73. Kusukawa, J., Y. Sasaguri, I. Shima, T. Kameyama, and M. Morimatsu. Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. *Am.J.Clin.Pathol.* 99 (1993) 18-23.
74. Kwak, H. J., M. J. Park, H. Cho, C. M. Park, S. I. Moon, H. C. Lee, I. C. Park, M. S. Kim, C. H. Rhee, and S. I. Hong. Transforming growth factor-beta1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells. *Mol.Cancer Res.* 4 (2006) 209-220.
75. Lallemand, B., A. Evrard, C. Combescure, H. Chapuis, G. Chambon, C. Raynal, C. Reynaud, O. Sabra, D. Joubert, F. Hollande, J. G. Lallemand, S. Lumbroso, and J. P. Brouillet. Clinical relevance of nine transcriptional molecular markers for the diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma in tissue and saliva rinse. *BMC.Cancer* (2009) 370.
76. Lee HJ, Kim SA, Lee HJ, Jeong SJ, Han I, Jung JH, Lee EO, Zhu S, Chen CY, Kim SH. Paeonol oxime inhibits bFGF-induced angiogenesis and reduces VEGF levels in fibrosarcoma cells. *PLoS One.* (2010) 12358.

77. Li, X. G., X. H. Zou, and Y. Zhang. [Expression of transforming growth factor-beta1 in cervical squamous carcinoma cell and stroma]. *Zhong.Nan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.* 29 (2004) 44-46.
78. Liao, B., B. L. Zhong, Z. Li, X. Y. Tian, Y. Li, and B. Li. Macrophage migration inhibitory factor contributes angiogenesis by up-regulating IL-8 and correlates with poor prognosis of patients with primary nasopharyngeal carcinoma. *J.Surg.Oncol.* 102 (2010) 844-851.
79. Liapis, H., L. M. Adler, M. R. Wick, and J. S. Rader. Expression of alpha(v)beta3 integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Hum.Pathol.* 28 (1997) 443-449.
80. Logullo, A. F., S. Nonogaki, R. E. Miguel, L. P. Kowalski, I. N. Nishimoto, F. S. Pasini, M. H. Federico, R. R. Brentani, and M. M. Brentani. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. *J.Oral Pathol.Med.* 32 (2003) 139-145.
81. Lowy D., and Munger K. Prognostic Implications of HPV in Oropharyngeal Cancer. *N Eng J Med* (2010) 82-84
82. Lu, S. L., D. Reh, A. G. Li, J. Woods, C. L. Corless, M. Kulesz-Martin, and X. J. Wang. Overexpression of transforming growth factor beta1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer Res.* 64 (2004) 4405-4410.
83. Luna MA, el Naggar A, Parichatikanond P, Weber RS, Batsakis JG. Basaloid squamous carcinoma of the upper aerodigestive tract. Clinicopathologic and DNA flow cytometric analysis. *Cancer* (1990) 537-42.
84. Maguire, T., D. Chin, D. Soutar, and M. J. Duffy. Low levels of urokinase plasminogen activator components in basal cell carcinoma of the skin. *Int.J.Cancer* 85 (2000) 457-459.
85. Maubant, S., S. Cruet-Hennequart, S. Dutoit, Y. Denoux, H. Crouet, M. Henry-Amar, and P. Gauduchon. Expression of alpha V-associated integrin beta subunits in epithelial

ovarian cancer and its relation to prognosis in patients treated with platinum-based regimens. *J.Mol.Histol.* 36 (2005) 119-129.

86. Mignatti, P. and D. B. Rifkin. Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv.Cancer Res.* (2000) 103-157.
87. Montag, M., G. Dyckhoff, J. Lohr, B. M. Helmke, E. Herrmann, P. K. Plinkert, and C. Herold-Mende. Angiogenic growth factors in tissue homogenates of HNSCC: expression pattern, prognostic relevance, and interrelationships. *Cancer Sci.* 100 (2009) 1210-1218.
88. Murphy-Ullrich, J. E., S. Schultz-Cherry, and M. Hook. Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Mol.Biol.Cell* 3 (1992) 181-188.
89. Nakao, T., N. Kurita, M. Komatsu, K. Yoshikawa, T. Iwata, T. Utsunomiya, and M. Shimada. Expression of thrombospondin-1 and Ski are prognostic factors in advanced gastric cancer. *Int.J.Clin.Oncol.* (2010) 145-52
90. Nucera, C., A. Porrello, Z. A. Antonello, M. Mekel, M. A. Nehs, T. J. Giordano, D. Gerald, L. E. Benjamin, C. Priolo, E. Puxeddu, S. Finn, B. Jarzab, R. A. Hodin, A. Pontecorvi, V. Nose, J. Lawler, and S. Parangi. B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107 (2010) 10649-10654.
91. O-charoenrat, P., P. H. Rhys-Evans, and S. A. Eccles. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 127 (2001) 813-820.
92. Partheen, K., K. Levan, L. Osterberg, I. Claesson, K. Sundfeldt, and G. Horvath. External validation suggests Integrin beta 3 as prognostic biomarker in serous ovarian adenocarcinomas. *BMC.Cancer* (2009) 336.
93. Perera, M., C. S. Tsang, R. J. Distel, J. N. Lacy, L. Ohno-Machado, V. Ricchiuti, L. P. Samaranyake, G. B. Smejkal, M. G. Smith, A. J. Trachtenberg, and W. P. Kuo. TGF-beta1 interactome: metastasis and beyond. *Cancer Genomics Proteomics.* 7 (2010) 217-229.

94. Petruzzelli, G. J., C. H. Snyderman, and J. T. Johnson. In vitro urokinase type plasminogen activator levels and total plasminogen activator activity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 120 (1994) 989-992.
95. Polette, M., C. Clavel, P. Birembaut, and Y. A. De Clerck. Localization by in situ hybridization of mRNAs encoding stromelysin 3 and tissue inhibitors of metallo-proteinases TIMP-1 and TIMP-2 in human head and neck carcinomas. *Pathol.Res.Pract.* 189 (1993) 1052-1057.
96. Raghu, H., S. S. Lakka, C. S. Gondi, S. Mohanam, D. H. Dinh, M. Gujrati, and J. S. Rao. Suppression of uPA and uPAR attenuates angiogenin mediated angiogenesis in endothelial and glioblastoma cell lines. *PLoS.One.* 5 (2010) 12458.
97. Reynes, G., V. Vila, M. Martin, A. Parada, T. Fleitas, E. Reganon, and V. Martinez-Sales. Circulating markers of angiogenesis, inflammation, and coagulation in patients with glioblastoma. *J.Neurooncol.* 102 (2011) 35-41.
98. Riedel, F., K. Gotte, W. Bergler, W. Rojas, and K. Hormann. Expression of basic fibroblast growth factor protein and its down-regulation by interferons in head and neck cancer. *Head Neck* 22 (2000a) 183-189.
99. Riedel, F., K. Gotte, W. Bergler, W. Rojas, and K. Hormann. Expression of basic fibroblast growth factor protein and its down-regulation by interferons in head and neck cancer. *Head Neck* 22 (2000b) 183-189.
100. Riedel, F., K. Gotte, Y. Oulmi, and K. Hormann. Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Anticancer Res.* 21 (2001) 1873-1878.
101. Riedel, F., K. Gotte, J. Schwalb, W. Bergler, and K. Hormann. [Coexpression of VEGF and bFGF is associated with increased vascular density in head and neck carcinomas]. *Laryngorhinootologie* 79 (2000c) 730-735.

102. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Krebs in Deutschland 2007/2008. Berlin. 2012. p.12
103. Rogala, E., E. Skopinska-Rozewska, E. Sommer, K. Pastewka, J. Chorostowska-Wynimko, I. Sokolnicka, and M. Kazon. Assessment of the VEGF, bFGF, aFGF and IL8 angiogenic activity in urinary bladder carcinoma, using the mice cutaneous angiogenesis test. *Anticancer Res.* 21 (2001) 4259-4263.
104. Rolli, M., E. Fransvea, J. Pilch, A. Saven, and B. Felding-Habermann. Activated integrin alphavbeta3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003) 9482-9487.
105. Rosenthal, E. L. and L. M. Matrisian. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* 28 (2006) 639-648.
106. Ruiz-Garcia, E., V. Scott, C. Machavoine, J. M. Bidart, L. Lacroix, S. Delalogue, and F. Andre. Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening. *Br.J.Cancer* 102 (2010) 462-468.
107. Ruokolainen, H., P. Paakko, and T. Turpeenniemi-Hujanen. Tissue and circulating immunoreactive protein for MMP-2 and TIMP-2 in head and neck squamous cell carcinoma--tissue immunoreactivity predicts aggressive clinical course. *Mod.Pathol.* 19 (2006) 208-217.
108. Saltarelli MG, Fleming MV, Wenig BM, Gal AA, Mansour KA, Travis WD. Primary basaloid squamous cell carcinoma of the trachea. *Am J Clin Pathol.* (1995) 594-8.
109. Sarbia M, Verreet P, Bittinger F, Dutkowski P, Heep H, Willers R, Gabbert HE. Basaloid squamous cell carcinoma of the esophagus: diagnosis and prognosis. *Cancer* (1997) 1871-8.
110. Schuetz, C. S., M. Bonin, S. E. Clare, K. Nieselt, K. Sotlar, M. Walter, T. Fehm, E. Solomayer, O. Riess, D. Wallwiener, R. Kurek, and H. J. Neubauer. Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res.* 66 (2006) 5278-5286.

111. Sgadari, C., J. M. Farber, A. L. Angiolillo, F. Liao, J. Teruya-Feldstein, P. R. Burd, L. Yao, G. Gupta, C. Kanegane, and G. Tosato. Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo. *Blood* 89 (1997) 2635-2643.
112. Shahzad, M. M., J. M. Arevalo, G. N. Armaiz-Pena, C. Lu, R. L. Stone, M. Moreno-Smith, M. Nishimura, J. W. Lee, N. B. Jennings, J. Bottsford-Miller, P. Vivas-Mejia, S. K. Lutgendorf, G. Lopez-Berestein, M. Bar-Eli, S. W. Cole, and A. K. Sood. Stress effects on FosB- and interleukin-8 (IL8)-driven ovarian cancer growth and metastasis. *J.Biol.Chem.* 285 (2010) 35462-35470.
113. Shima, I., Y. Sasaguri, J. Kusakawa, H. Yamana, H. Fujita, T. Kakegawa, and M. Morimatsu. Production of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-3 related to malignant behavior of esophageal carcinoma. A clinicopathologic study. *Cancer* 70 (1992) 2747-2753.
114. Shiomi, H., Y. Eguchi, T. Tani, M. Kodama, and T. Hattori. Cellular distribution and clinical value of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and plasminogen activator inhibitor-2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Am.J.Pathol.* 156 (2000) 567-575.
115. Snoussi, K., W. Mahfoudh, N. Bouaouina, M. Fekih, H. Khairi, A. N. Helal, and L. Chouchane. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. *BMC.Cancer* (2010) 283.
116. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumors (UICC) 7th Edition. Singapore, 2010.
117. Staniszewska I, Zaveri S, Del Valle L, Oliva I, Rothman VL, Croul SE, Roberts DD, Mosher DF, Tuszynski GP, Marcinkiewicz C. Interaction of alpha9beta1 integrin with thrombospondin-1 promotes angiogenesis. *Circ Res.* (2007) 1308-16.
118. Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, Bankfalvi A, Scherag A, Hütte J, Dominas N, Lehnerdt GF, Hoffmann TK, Lang S, Brandau S. Polymorphonuclear

- granulocytes in human head and neck cancer: Enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer*. (2011) 2183-93.
119. Tribius S, Ihloff AS, Rieckmann T, Petersen C, Hoffmann M. Impact of HPV status on treatment of squamous cell cancer of the oropharynx: what we know and what we need to know. *Cancer Lett*. (2011) 71-9.
120. Urban, P., V. Vuaroqueaux, M. Labuhn, M. Delorenzi, P. Wirapati, E. Wight, H. J. Senn, C. Benz, U. Eppenberger, and S. Eppenberger-Castori. Increased expression of urokinase-type plasminogen activator mRNA determines adverse prognosis in ErbB2-positive primary breast cancer. *J.Clin.Oncol*. 24 (2006) 4245-4253.
121. Vakar-López F, Abrams J. Basaloid squamous cell carcinoma occurring in the urinary bladder. *Arch Pathol Lab Med*. (2000) 455-9.
122. Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Aviv A, Pecker I, Friedmann Y. Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis. *Isr Med Assoc J*. (2000) 37-45.
123. Wain, S. L., R. Kier, R. T. Vollmer, and E. H. Bossen. Basaloid-squamous carcinoma of the tongue, hypopharynx, and larynx: report of 10 cases. *Hum.Pathol*. 17 (1986) 1158-1166.
124. Walser, T. C., X. Ma, N. Kundu, R. Dorsey, O. Goloubeva, and A. M. Fulton. Immune-mediated modulation of breast cancer growth and metastasis by the chemokine Mig (CXCL9) in a murine model. *J.Immunother*. 30 (2007) 490-498.
125. Warner, K. A., M. Miyazawa, M. M. Cordeiro, W. J. Love, M. S. Pinsky, K. G. Neiva, A. C. Spalding, and J. E. Nor. Endothelial cells enhance tumor cell invasion through a crosstalk mediated by CXC chemokine signaling. *Neoplasia*. 10 (2008) 131-139.
126. Werner, J. A., I. O. Rathcke, and R. Mandic. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin.Exp.Metastasis* 19 (2002) 275-282.

127. Wu, Y., J. Zuo, G. Ji, H. Saiyin, X. Liu, F. Yin, N. Cao, Y. Wen, J. J. Li, and L. Yu. Proapoptotic function of integrin beta(3) in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin.Cancer Res.* 15 (2009) 60-69.
128. Xie, K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12 (2001) 375-391.
129. Yang, S., L. J. Guo, X. F. Tang, K. Tan, R. G. Gong, A. Li, T. Yu, Q. H. Gao, M. Xuan, Y. M. Wen, C. M. Wang, and X. Y. Wang. The alteration of Id-1 and TSP-1 expression in mucoepidermoid carcinoma associated with its clinical features and prognosis. *Int.J.Oral Maxillofac.Surg.* 39 (2010) 29-35.
130. Ye, H., T. Yu, S. Temam, B. L. Ziober, J. Wang, J. L. Schwartz, L. Mao, D. T. Wong, and X. Zhou. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC.Genomics* (2008) 69.
131. Yoo, G. H., M. P. Piechocki, J. F. Ensley, T. Nguyen, J. Oliver, H. Meng, D. Kewson, T. Y. Shibuya, F. Lonardo, and M. A. Tainsky. Docetaxel induced gene expression patterns in head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarray and PowerBlot. *Clin.Cancer Res.* 8 (2002) 3910-3921.
132. Zhang, X., Y. Wang, G. Yamamoto, and T. Tachikawa. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas. *Histopathology* 55 (2009a) 250-260.
133. Zhang, Y., G. Wen, G. Shao, C. Wang, C. Lin, H. Fang, A. S. Balajee, G. Bhagat, T. K. Hei, and Y. Zhao. TGFBI deficiency predisposes mice to spontaneous tumor development. *Cancer Res.* 69 (2009b) 37-44.
134. Zhao, Y., M. El-Gabry, and T. K. Hei. Loss of Betaig-h3 protein is frequent in primary lung carcinoma and related to tumorigenic phenotype in lung cancer cells. *Mol.Carcinog.* 45 (2006) 84-92.

135. Zhao, Y. L., C. Q. Piao, and T. K. Hei. Downregulation of Betaig-h3 gene is causally linked to tumorigenic phenotype in asbestos treated immortalized human bronchial epithelial cells. *Oncogene* 21 (2002) 7471-7477.
136. Zhou, X., S. Temam, M. Oh, N. Pungpravat, B. L. Huang, L. Mao, and D. T. Wong. Global expression-based classification of lymph node metastasis and extracapsular spread of oral tongue squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. 8 (2006) 925-932.
137. Zhou, Z. Q., W. H. Cao, J. J. Xie, J. Lin, Z. Y. Shen, Q. Y. Zhang, J. H. Shen, L. Y. Xu, and E. M. Li. Expression and prognostic significance of THBS1, Cyr61 and CTGF in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC.Cancer* (2009) 291.
138. Zygogianni AG, Kyrgias G, Karakitsos P, Psyrris A, Kouvaris J, Kelekis N, Kouloulis V. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. *Head Neck Oncol.* (2011) 2.