

Technische Universität München
Hals-Nasen-Ohren Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier)

**Korrelation von TP53 Mutation und Stk15 Polymorphismus in Bezug auf
Überleben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im
Kopf-Hals-Bereich**

Karthiga Santhirasegaram

Vollständiger Ausdruck 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. Priv.-Doz. Dr. A. Pickhard

2. Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier

**Die Dissertation wurde 17.07.2014 bei der Technischen Universität eingereicht und
durch die Fakultät der Medizin am 11.03.2015 angenommen.**

Widmung an

Asaipillai, Jeyrany, Chanuran, Ajitharan und Anita Santhirasegaram

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Vorwort.....	3
1.2	Grundlagen	3
1.2.1	Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC: Head and Neck squamous cell carcinoma)	3
1.2.2	TP53	10
1.2.3	Stk 15/Aurora Kinase A (AURKA)	14
1.3	Problemstellung	15
1.4	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Studienkollektiv	16
2.1.2	Geräte	18
2.1.3	Puffer/Verbrauchsmaterial	19
2.1.4	Primer	19
2.1.5	Sonstiges Verbrauchsmaterial	21
2.1.6	Sequenzierung/Computerprogramme.....	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	TP53	21
2.2.2	Stk15 Polymorphismus	25
2.2.3	Statistik.....	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Charakterisierung des Studienkollektivs	29
3.2	TP53.....	30
3.2.1	Exon 5	30
3.2.2	Exon 6	31

3.2.3	Exon 8	32
3.2.4	Anzahl der TP53 Mutationen bezogen auf das Tumor- und Kontrollkollektiv in Prozentangaben.	33
3.3	Stk15 Polymorphismus.....	34
3.3.1	Exemplarische Genotypisierung.....	34
3.3.2	Verteilung des Stk15 Polymorphismus	34
3.4	Signifikanzniveaus (Log-rank Test und exacter Test nach Fisher)	35
3.5	Kaplan Meier Kurven und Log-rank Test	36
4	Diskussion	43
4.1	Einleitung.....	43
4.2	Methoden	44
4.2.1	PCR	44
4.3	Vergleich erwartete Ergebnisse mit den tatsächlichen Ergebnissen.....	45
4.3.1	Allgemeine Statistik	45
4.3.2	TP53	45
4.3.3	Stk15 Polymorphismus	47
4.3.4	Kombination Stk15 und TP53.....	48
4.4	Kritische Beurteilung.....	48
5	Zusammenfassung	49
6	Anhang	50
6.1	Tabellenverzeichnis	50
6.2	Abbildungsverzeichnis	50
6.3	Abkürzungsverzeichnis	52
6.4	Literatur	55
6.5	Danksagung	60
7	Abstract	61

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Kopf-Hals-Karzinome gehören weltweit zu den 6. häufigsten Tumoren. Allein im Jahre 2000 zählte man ungefähr 390 000 Neuerkrankungen weltweit (Lin et al., 2007). In Deutschland beträgt die Anzahl der Krankheitsfälle laut Angaben des Robert Koch Instituts im Jahre 2008 um die 9520 (Erkrankungsrate 19,1) bei Männern und bei Frauen 3490 (Erkrankungsrate 5,1), davon starben etwa 4946 Erkrankte an der gefährlichen Krankheit. Somit betrug die Sterberate 9,2, eine erschreckend hohe Rate (Berlin 2012). Die Plattenepithelkarzinome (PECA), die die häufigste Entität im Kopf-Hals-Bereich darstellen, haben bedauerlicherweise bis heute eine sehr schlechte Prognose. Trotz langjähriger Forschung konnte seit mehr als 40 Jahren die Überlebenswahrscheinlichkeit durch medizinische Therapien wie Bestrahlung, Chemotherapie oder chirurgische Verfahren nicht verbessert werden (Hunter et al., 2005). Patienten, die die Diagnose Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs erhalten, haben aktuell eine 5 Jahres Überlebensrate von 40%. Die Ursache für solch eine schlechte Aussicht liegt in der Natur dieser malignen Tumoren. Die Plattenepithelkarzinome haben einen recht aggressiven Charakter und wachsen dadurch sehr invasiv in die benachbarten Gewebe und metastasieren zudem früh in die lokoregionären Lymphknoten. Später kann mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 2,2% eine Metastasierung in entfernte Organe wie Lunge und Leber erfolgen. Deshalb konzentriert sich die Forschung zunehmend darauf, die Ursache und vor allem die Signalwege der Metastasierung zu verstehen. Hiervon verspricht man sich neue Therapieansätze zu finden um so den aggressiven Charakter des Plattenepithelkarzinoms abzumildern und es dadurch besser behandeln zu können (Lin et al., 2007, Hunter et al., 2005, Mast et al., 2009).

1.2 Grundlagen

1.2.1 Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC: Head and Neck squamous cell carcinoma)

1.2.1.1 Definition

Die Kopf-Hals-Karzinome sind eine Gruppe maligner Tumoren, die ihren Ursprung im Kopf-Hals-Bereich haben. Je nach Ort ihrer Entstehung weisen die Tumoren unterschiedliche Eigenschaften auf. Die häufigsten Malignome entstehen zu 90% aus dem Plattenepithel. Die

PECA können nach anatomischen Lokalisationen in Tumoren der Mundhöhle, des Pharynx (Naso-, Oro-, Hypopharynx) und des Larynx gegliedert werden (Mast et al., 2009).

1.2.1.2 Epidemiologie

Weltweit belegen Plattenepithelkarzinome den 6. Platz bei den Tumorneuerkrankungen. Bei den Todesursachen werden sie an achter Stelle genannt (Hunter et al., 2005, Ragin et al., 2007). Die PECA des Kopf-Hals-Bereichs sind zu 50% im Bereich der Mundhöhle zu finden. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten im Bereich des Larynx oder des Pharynx beträgt in beiden Fällen um die 25%. Alle Tumorlokalisationen zusammenfassend ergibt eine Neuerkrankungsrate für Männer von 6,3% für Frauen von 2,1%. Zu beachten gilt, dass die einzelnen Tumorgruppen Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung zwischen den Geschlechtern aufweisen. Beispielsweise findet man ein Männer Frauen Verhältnis von 1:5 bei PECA des Larynx. Zudem stellte man in den letzten Jahren eine Inzidenzzunahme des PECA bei alten Menschen und vor allem bei jungen Frauen fest. Das mittlere Erkrankungsalter liegt heute sowohl bei Frauen als auch bei Männern bei ca. 60 Jahren (Mast et al., 2009). Bei 3-9% der Patienten lässt sich der Primärtumor nicht finden. Diese sind als Cancer of unknown origin/primary (CUP) bekannt. CUPs, mit einem plattenepithelialem Ursprung, machen 10% aller CUPs und 70% aller CUPs im Kopf-Hals-Bereich aus (Jungehulsing et al., 2000, Petrovic et al., 2007).

1.2.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Als wesentliche Ursache für die Krebserkrankung im Kopf-Hals-Bereich gilt heute der Nikotinkonsum. Als einen weiteren wichtigen Risikofaktor, der vermutlich gleichermaßen an der Krebsentstehung im Kopf-Hals-Bereich beteiligt ist, ist der regelmäßige Genuss von hochprozentigem Alkohol. Beide Faktoren zusammen, der Genuss von Alkohol und der Nikotinkonsum, bilden eine wichtige Grundlage für die Entstehung von PECA (Hunter et al., 2005, Meurman and Uittamo, 2008). Weitere Risikofaktoren sind schlechte Mundhygiene oder scharfe Zahnkanten (Mast et al., 2009). Eine weitere Rolle bei der Entstehung von PECA spielt die Exposition gegenüber beruflichen Kanzerogenen wie zum Beispiel Asbest, Benzol und Nickel, oder auch Nahrungsmitteln wie Bettelnuss (Mast et al., 2009, Carpenter et al., 2005, Jacob et al., 2004). Zudem muss eine HPV-Infektion als Risikofaktor bei v.a. Oropharynxkarzinomen erwähnt werden (Gillison, Koch et al., 2000).

1.2.1.4 TNM-Klassifikation

Der ICD Katalog gliedert die Kopf-Hals Karzinome in folgende Kategorien (DIMDI 2008):

- C00-C14,6 Bösartige Neubildungen der Lippe, der Mundhöhle und des Pharynx (C00 C14)
- C30-C39 Bösartige Neubildungen der Atmungsorgane und sonstiger intrathorakaler Organe (C30-C32)

Die nachfolgende Tab.1 beschreibt die aktuelle Klassifikation der PECA. Die Klassifikation entspricht dem aktuellen Stand gemäß der International Union against Cancer. Dabei steht T für die Größe des Primärtumors, N beschreibt die Ausbreitung des Tumors in die regionären Lymphknoten, M zeigt das Vorhandensein von Fernmetastasen an, R beschreibt den Resektionsstatus nach operativer Tumorexstirpation und G klassifiziert die histologische Differenzierung (Grading). Das Suffix „c“ kennzeichnet einen klinischen Befund, der Zusatz „p“ beschreibt, dass das jeweilige Stadium anhand histopathologischer Befunde gesichert wurde. Das T-Stadium ist für die verschiedenen Tumorlokalisationen im Kopf-Hals-Bereich unterschiedlich. Dahingegen ist die N-Klassifikation mit Ausnahme der Nasopharynx-Tumoren für alle PECA gleich. Auch M-, R- und G-Klassifikation werden für PECA aller Lokalisationen angewendet (Sobin and Wittekind, 2002).

pT-Klassifikation	
pTx	Keine histologische Beurteilung des Primärtumors möglich
pT0	Kein histologischer Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1-4	Zunehmende Größe und/oder lokale Ausdehnung des Primärtumors
Mundhöhle/Lippe	
T1	Tumor mit 2 cm oder weniger in seiner Ausdehnung
T2	Tumor mit mehr als 2 cm, jedoch nicht mehr als 4 cm Ausdehnung
T3	Tumor mit mehr als 4 cm Ausdehnung
T4	Tumor mit Ausdehnung auf Nachbarstruktur
T4 a	Lippe: Infiltration durch kortikalen Knochen, oder den N. alveolaris inf., oder Mundhöhlenboden, oder in Haut von Kinn oder Nase Mundhöhle: Infiltration durch kortikalen Knochen, oder in die äußere Muskulatur der Zunge, oder Kieferhöhle, oder Gesichtshaut
T4 b	Infiltration des Spatium masticatorium, oder Proc. pterygoideus, oder Schädelbasis, oder Tumor umschließt A. carotis interna
Oropharynx	
T1	Tumor mit 2 cm oder weniger in seiner Ausdehnung
T2	Tumor mit mehr als 2 cm, jedoch nicht mehr als 4 cm Ausdehnung

T3	Tumor mit mehr als 4 cm Ausdehnung
T4	Tumor mit Ausdehnung auf Nachbarstruktur
Nasopharynx	
T1	Tumor auf Nasopharynx begrenzt
T2	Überschreitung des Organs mit Befall von Oropharynx und/oder Nasenhöhle und/oder parapharyngeale Ausbreitung
T3	Tumor infiltriert Knochen und/oder Nasennebenhöhle
T4	Tumor mit intrakranieller Ausbreitung und/oder Befall von Hirnnerven, Hypopharynx, Augenhöhle
Hypopharynx	
T1	Tumor mit 2 cm oder weniger auf einen Unterbezirk begrenzt
T2	Tumor 2-4 cm und Befall von 2 Unterbezirken
T3	Tumor mit mehr als 4 cm und/oder Fixation des Hemilarynx
T4	Tumor mit Ausdehnung auf Nachbarstruktur
Larynx	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk begrenzt, Stimmlippe beweglich a) Befall einer Stimmlippe b) Befall beider Stimmlippen
T2	Tumor auf 2 Unterbezirke ausgedehnt, Stimmlippe bei Befall eingeschränkt beweglich
T3	Tumor in mehr als 2 Unterbezirke, auf den Larynx begrenzt, Stimmlippen bei Befall fixiert
T4	Einbruch in den Knorpel oder Überschreiten der Organgrenzen
R-Faktor	
Rx	Keine Beurteilung des Vorhandenseins eines Residualtumors möglich
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor
R2	Makroskopisch sichtbarer Residualtumor
G-Faktor	
G1	Hoch differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Niedrig differenziert

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der HNSCC (Sobin and Wittekind 2002, Boenninghaus and Lenarz, 2007)

1.2.1.5 Stadieneinteilung

Die folgende Tab.2 zeigt die Stadieneinteilung der Karzinome im Kopf-Hals-Bereich. Die Tabelle gilt für alle Karzinome im Kopf-Hals-Bereich aller Lokalisationen außer der Schilddrüse und des Nasopharynx.

Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2	N1, N0	M0
	T3	N1	M0
Stadium IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadium IVb	Alle T	N3	M0
	T4b	Alle N	M0
Stadium IVc	Alle T	Alle N	M1

Tabelle 2: Stadieneinteilung der Karzinome im Kopf-Hals-Bereich (Sobin and Wittekind 2002)

1.2.1.6 Pathologie

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs gehört zu den malignen epithelialen Tumoren mit plattenepithelialer Differenzierung. Grundsätzlich werden zwei Formen des Plattenepithelkarzinoms unterschieden. Dazu gehören der verhornende Typ und der nicht verhornende Typ. Makroskopisch wächst der Tumor meist endophytisch, knotig und oberflächlich ulzerierend. In einigen Fällen kann man aber auch makroskopisch die exophytisch-papilläre Wuchsform eines hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinoms sehen (Silverman et al., 1984, Hittelman et al., 1993). Der Tumor zeigt mikroskopisch große, polygonale oder spindelzellige Tumorzellen mit Kernatypien und atypischen Mitosefiguren. Je besser der Tumor differenziert ist, desto ausgeprägter ist das Auftreten einer Verhornung (Shanmugaratnam and Sobin, 1993). Auch das Auftreten von Interzellularbrücken ist bei besser differenzierten PECA häufiger zu sehen. Die Verhornung kann in Form konzentrischer Hornperlen oder auch als Einzelzellverhornung in Erscheinung treten (Böcker et al., 2008, Mast et al., 2009).

1.2.1.7 Molekularpathologie

Ähnlich wie bei anderen soliden Tumoren gehen die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs von einer prämaligen Vorläuferzelle aus. Im Laufe der Zeit führen weitere

Mutationen zur Anhäufung genetischer Veränderungen. Durch die Veränderungen im Erbgut der Zelle erlangt diese ungünstige tumorigene Charakterzüge, die die Tumorigenität der Zelle erhöhen. Insertionen, Deletionen, Promotormethylierungen, Genamplifikationen, Punkt- und Chromosomenmutationen können die tumorigene Eigenschaft begünstigen indem sie Protoonkogene aktivieren und/oder Tumorsuppressorgene inaktivieren. Durch genetische Alterationen wird massiv in die fein regulierten molekularen Mitoseprozesse eingegriffen. Die prämaligene Zelle verliert zunehmend die Kontrolle über die präzise abgestimmten Mitoseabläufe bis sich die prämaligene Vorläuferzelle unkontrolliert zu einem tumorösen Gebilde vermehrt. In 70-80% der Fälle ist der Verlust der chromosomalen Region 9p21 nachweisbar. In dieser Region werden Proteine kodiert, die an der Ubiquitinierung von p53 (Tumor Protein p53) und an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Mao et al., 1996, van der Riet et al., 1994). Häufig betroffene Tumorsuppressorgene und Protoonkogene in PECA sind p53, p16ink4A, Cyclin D1, p14ARF, FHIT, RASSF1A, Rb und der EGF-Rezeptor (Perez-Ordenez et al., 2006).

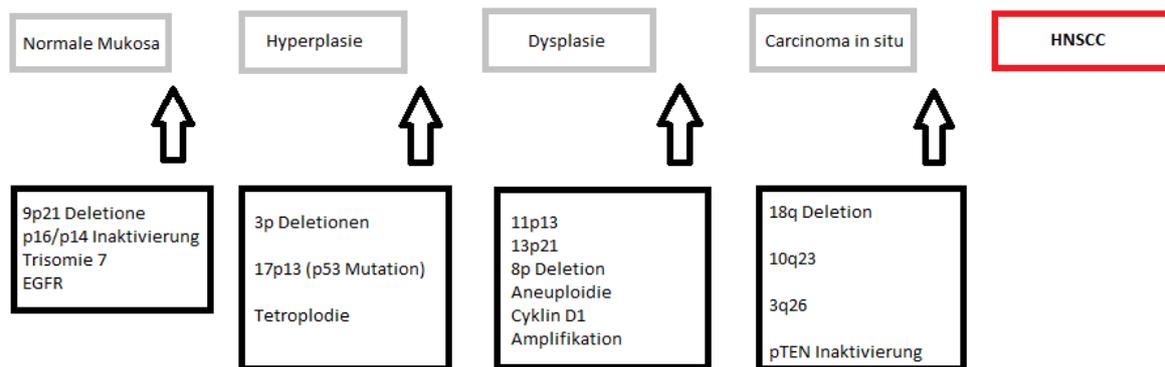


Abbildung 1: Hypothetisches Modell für die Karzinogenese in HNSCC (Perez-Ordenez et al. 2006)

1.2.1.8 Symptome und klinische Diagnostik

Je nach Lokalisation des PECA werden unterschiedlich früh Symptome vom Patienten beklagt. So fallen glottische Larynxkarzinome frühzeitig durch eine Heiserkeit auf, während Hypopharynxkarzinome häufig erst spät durch Odynophagie, Dysphagie, Dyspnoe oder vergrößerte Lymphknoten diagnostiziert werden. Mit Hilfe klinischer Untersuchungsverfahren wie der Inspektion, Palpation oder auch Laryngoskopie kann der Verdacht eines Karzinoms weiter erhärtet werden. Um den Verdacht zu sichern sollten weitere diagnostische Methoden angewandt werden. Dazu gehört die bildgebende Diagnostik wie die Sonografie oder schnittbildgebende Verfahren. Zudem sollte eine Probeentnahme im

Rahmen einer Panendoskopie erfolgen. Zum Staging und um Fernmetastasen ausschließen zu können sollte mindestens eine Röntgenaufnahme des Thorax, ggf. auch eine CT des Thorax erfolgen. Zudem sollte eine Oberbauchsonografie durchgeführt werden. Nach Vorliegen aller Befunde kann schließlich die genaue Therapieplanung erfolgen und mit dem Patienten besprochen werden (Mast et al., 2009).

1.2.1.9 Therapie

Die Therapie des PECAs erfolgt in der Regel in Abhängigkeit von Tumorlokalisation und Tumorstadium. Je nach Zusammensetzung der zuvor erhobenen Parameter und unter Berücksichtigung von individuellen Patientenegebenheiten wie zum Beispiel dem Alter, dem Allgemeinzustand, dem persönlichen Wunsch des Patienten etc. kann die optimale Therapie auf den Patienten zugeschnitten werden. Prinzipiell stehen hier drei Therapieformen nämlich Chirurgie, Strahlentherapie, Chemotherapie und die Kombination der genannten Verfahren zur Verfügung. Bei der Behandlung des PECAs existieren heutzutage in der modernen Medizin zwei Behandlungskonzepte. Die eine Säule des Behandlungskonzepts beinhaltet die primär chirurgische Therapie. Das Ziel dieser Methode besteht darin zum einen den Tumor restlos zu entfernen zum anderen eine für den Patienten zufriedenstellende Ästhetik und die Funktion des betroffenen Organs wiederherzustellen bzw. zu erhalten (Hartl, 2007, Robbins et al., 2008, Mendenhall et al., 1990). Zudem wird bei den Patienten meist eine Neck dissection (ND) durchgeführt, bei der die lokoregionären Lymphdrainagewege ausgeräumt werden. Hierbei kann man zwischen einer therapeutischen und einer elektiven Neck dissection unterscheiden (Robbins et al., 2008, Robbins et al., 1991). Während bei einem klinischen N0 Status die elektive ND zur Vermeidung eines Rezidiv durch okkulte Tumorzellen vorgenommen wird, kann bei der therapeutischen ND bei N+ Verdacht der Umfang der Operation im Sinne einer radikalen, modifiziert radikalen oder selektiven/funktionellen ND erfolgen (Mast et al., 2009). Adjuvante Strahlentherapien werden nach einer primären Operation zusätzlich angewandt wenn sich die PECA in einem fortgeschrittenen Stadium befinden. Indikationen für eine adjuvante Strahlen(chemo)therapie sind: Lokal fortgeschrittener Tumor (T3, T4), positiver fortgeschrittener Lymphknotenbefall (N2, N3), extrakapsuläre Ausbreitung der Lymphknotenmetastasen, nahe oder positive Resektionsränder, ossäre, perineurale oder lymphovaskuläre Invasion und hohe Wahrscheinlichkeit einer okkulten Ausbreitung in die Halslymphknoten bei nicht durchgeführter Neck dissection (Kao et al., 2008). Die zweite Säule des Behandlungskonzepts ist die primäre Radio(chemo)therapie. Diese kommt dann zum Zuge wenn sich der Tumor an einer anatomisch ungünstigen Stelle und/oder in einem weit fortgeschrittenen Stadium

befindet (Garden et al., 1996). Falls die Lymphknoten befallen sind, werden diese ebenfalls in das Strahlenfeld mit eingeschlossen. Zu erwähnen ist hierbei auch, dass es Bestrebungen gibt, die Radiochemotherapie ebenso als eine neoadjuvante Therapie vor geplanter Operation zu nutzen (Budach et al., 2006). Die neoadjuvante Therapie verfolgt das Ziel den Tumor zu verkleinern um dessen Operabilität und den postoperativen R0 Resektionsstatus zu verbessern (Mast et al., 2009, Pignon et al., 2000).

1.2.1.10 Prognosefaktoren

Lymphknotenmetastasen gelten nach heutigem Stand der Wissenschaft als entscheidender Prognosefaktor bei PECA des Kopf-Hals-Bereichs. Patienten mit Lymphknotenmetastasen zeigen im Vergleich zu Patienten ohne Lymphknotenmetastasen eine signifikant verringerte Überlebensrate (O'Brien et al., 1986). Weitere Faktoren wie lokale Ausbreitung, Lokalisation des Tumors, histologische Differenzierung und Resektionsstatus beeinflussen zudem die Prognose des erkrankten Patienten. Die Invasion des Tumors in Blut- und Lymphgefäße, extrakapsuläre Infiltration von Lymphknotenmetastasen und eine Perineuralscheideninvasion spielen ebenfalls als Prognosefaktoren eine Rolle. Der Zeitpunkt der Diagnose kann den Therapieerfolg und somit die Prognose positiv beeinflussen. Hier gilt die Devise je früher desto besser. Unglücklicherweise werden die meisten Malignome des Kopf-Hals-Bereichs in einem spätem Stadium entdeckt, was deren Prognose drastisch verschlechtert. Unter den verschiedenen PECA zeigen Karzinome der Mundhöhle und des Larynx die beste und PECA des Hypopharynx die schlechteste Prognose (Mast et al., 2009, Fortin et al., 2001).

1.2.2 TP53

1.2.2.1 Definition

TP53, der „Wächter des Genoms“, ist vermutlich eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene im menschlichen Organismus. Man nimmt an, dass wahrscheinlich bei 50% aller Tumorerkrankungen ein Defekt des TP53 vorliegt. Der p53 Spiegel ist in teilenden Zellen erhöht, wobei p53 in ruhenden Zellen, d.h. nicht mehr teilungsaktiven Zellen, fast nicht zu finden ist. Das Gen liegt auf dem Chromosom 17p13.1 (Isobe et al., 1986, Matlashewski et al., 1984, Kern et al., 1991, McBride et al., 1986). Den Namen erhielt das Protein aufgrund seiner Molekularmasse von 53 kDa (Ziener et al., 1982). Die kodierenden Sequenzen, die eine entscheidende Funktion im fertigen Protein haben, sind die Exons 2, 5, 6, 7 und 8 (May and May, 1999).

1.2.2.2 Funktion

p53 erfüllt eine äußerst bedeutende Aufgabe in der menschlichen Zelle. Es überwacht die Intaktheit der DNA und stellt so sicher, dass das Genom zu jeder Zeit fehlerfrei in seinem Informationsgehalt vorliegt, so dass es einwandfrei an die Tochterzellen weitergegeben werden kann. Treten schwerwiegende Schäden an der DNA auf, werden eine Reihe verschiedener Mechanismen aktiviert, die dazu führen, dass p53 aktiviert wird und akkumuliert (Appella and Anderson, 2001). Die Aktivierung des p53 führt zur Blockade des Zellzyklus. Die DNA-Reparaturmechanismen werden in Gang gesetzt, die den Schaden zu beheben versuchen. Gelingt die Schadensreparatur kann der Zellzyklus fortgesetzt werden. Sind allerdings die Defekte so gravierend, dass keine Reparatur mehr möglich ist, wird der zelleigene Tod, die sogenannte Apoptose, eingeleitet. Der Sinn besteht darin, die Gefahr einer möglichen Entartung bzw. Akkumulierung von geschädigten Genen abzuwenden (Schuler and Green, 2001).

1.2.2.3 Wirkungsmechanismus

In jeder Zelle wird das p53 Protein in einem geringen Maße exprimiert. Die Ligase MDM2-Ubiquitin ist für den Abbau des Protein mit verantwortlich. Nachdem Ubiquitin an p53 gebunden wurde, erfolgt schließlich der Abbau des Proteins durch das Proteasom 26S. Entstehen nun aufgrund von genotoxischem Stress DNA Schäden, führen verschiedene Sensormechanismen zur Aktivierung der Proteinkinasen Ataxia telangiectasia mutated (ATM), ATM-and-Rad3-related (ATR) oder DNA-abhängige Proteinkinasen (DNA-PK). Diese Proteinkinasen phosphorylieren p53, wodurch es nicht mehr von der MDM2-Ubiquitin-Ligase abgebaut wird. Folglich steigt der p53 Spiegel an. Das aktive p53 stimuliert dann die Expression verschiedener Gene (Harris and Levine, 2005).

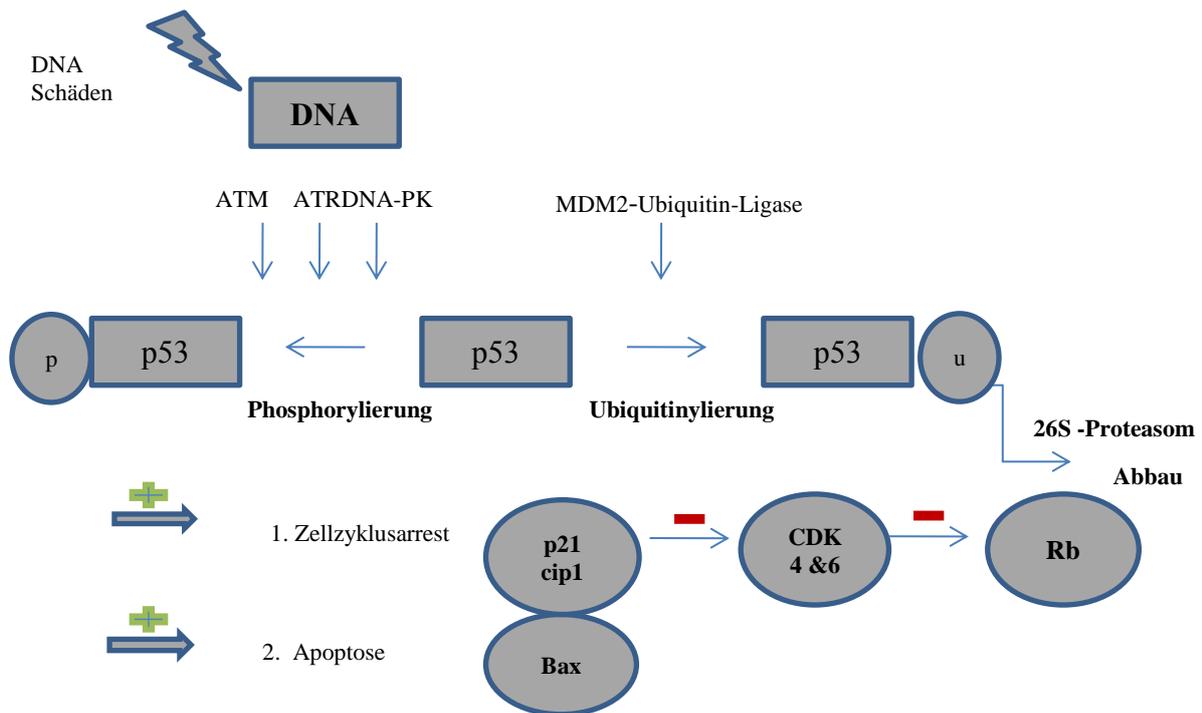


Abbildung 2: Regulation und Wirkung von p53 (Rassow et al., 2006)

Für den Eintritt in den Zellzyklusarrest spielt der CDK Inhibitor p21cip1 eine entscheidende Rolle. Dieser Inhibitor hemmt die Kinasen CDK4 und CDK6 (Zykin abhängige Kinasen 4 und 6) und folglich die Phosphorylierung vom Rb (Retinoblastom-Protein), einem Tumorsuppressor. Rb spielt eine zentrale Rolle im Zellzyklus und kontrolliert den Eintritt in die S-Phase, in der das gesamte Genom verdoppelt wird. Falls das Rb nicht durch die spezifischen CDKs phosphoryliert wird, wird so der Eintritt in die S-Phase verhindert (Bartek and Lukas, 2001, Mercer, 1998).

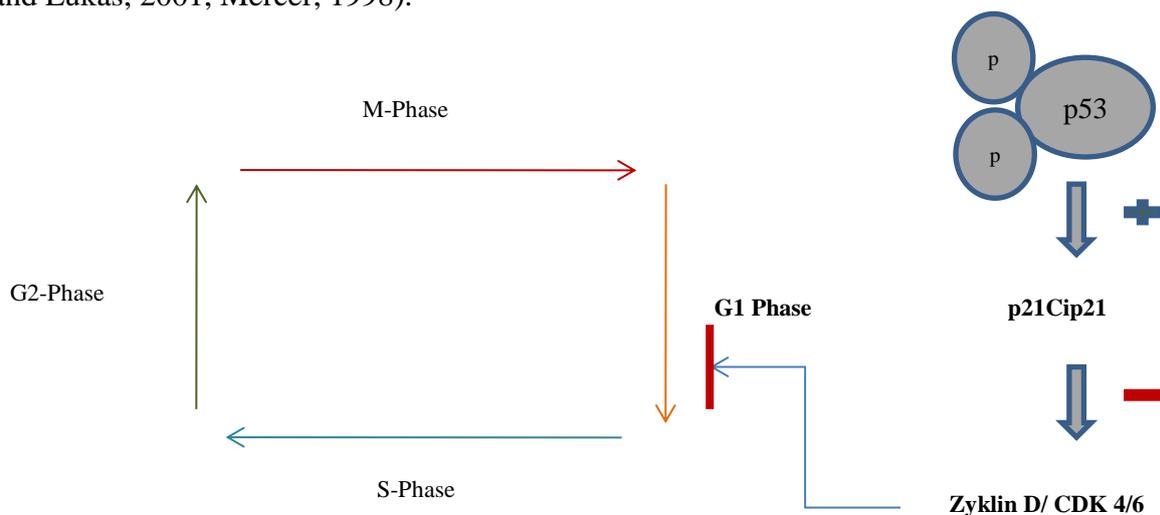


Abbildung 3: Veranschaulichung der Mechanismen des Zellzyklusarrestes (Rassow et al., 2006)

Während des Zellzyklusarrestes hat die Zelle die Möglichkeit mithilfe verschiedener DNA Reparaturmechanismen den Schaden zu beheben. Nach Behebung des DNA Schadens sinkt

der p53 Spiegel und die Zelle kann in die S-Phase eintreten. Bei Scheitern der Reparaturversuche wird die Apoptose eingeleitet.

Intrazelluläre Stresssignale wie DNA Schäden oder oxidativer Stress, die nicht mehr behoben werden können, zwingen p53 dazu die Expression des proapoptotischen Proteins Bax einzuleiten. Bax spielt eine zentrale Rolle bei der Auslösung der intrinsischen Apoptose (Mitochondrien abhängig). In Abwesenheit von Stress wird die Stabilität der Mitochondrienmembran durch die Balance der antiapoptotischen (Bcl2) und proapoptotischen (Bax, Bak und Bid) Proteine gewährleistet. Steigt nun die Konzentration des proapoptotischen Proteins Bax, durch p53 induziert, gerät das Gleichgewicht zu Gunsten des proapoptotischen Bax Proteins außer Kontrolle. Daraufhin werden sog. Permeabilitäts-Transitions-Poren gebildet, die das Membranpotenzial der inneren Mitochondrienmembran zusammenbrechen lassen. Aus dem Inneren der Mitochondrien treten verschiedene Apoptose-Mediatorproteine (Cytochrom c, Smac/Diablo und Endonuclease G) ins Zytoplasma aus (Schuler and Green, 2001) und die intrinsisch ausgelöste Apoptose wird in Gang gesetzt (siehe Abb. 4).

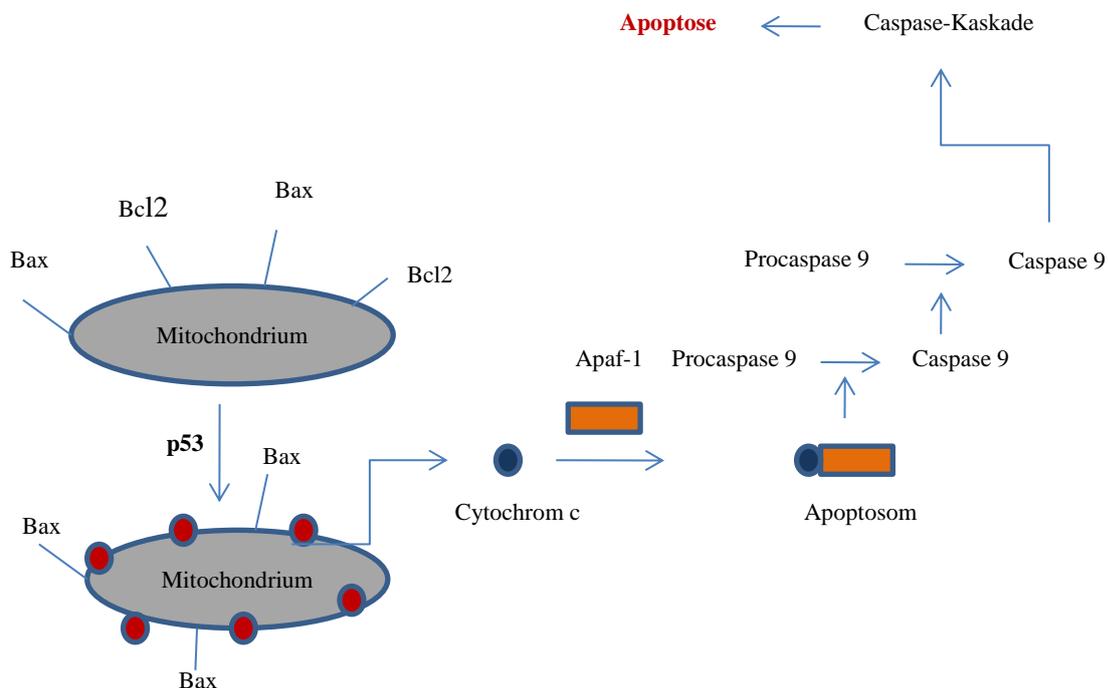


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Apoptose (Rassow et al., 2006)

1.2.2.4 Aktuelle Forschung bezüglich TP53 Mutation

Auf diesem Gebiet unternahm man zahlreiche Untersuchungen, da Mutationen im TP53 Gen als entscheidender Faktor für die Entstehung von Tumoren verantwortlich schienen (Hollstein et al., 1991). Forschungsergebnisse zeigten Abweichungen in wild-type Sequenzen im TP53

Gen, insbesondere in den sogenannten „hotspot Exons“ 5-8 (Schlechte et al., 1998, Ganci et al., 2011). In Urothelkarzinomen, Prostatakarzinomen oder auch Blasenepithelkarzinomen konnten Veränderungen im TP53 Gen aufgezeigt werden (Algaba et al., 2003, Schlechte et al., 1998, Kelsey et al., 2005). Homozygote Mutationen des TP53 Gens können das Tumorstadium fördern (Symonds et al., 1994). Dies sind Beispiele dafür, dass das TP53 Gen vermutlich eine Rolle in der Entstehung von Tumoren spielt. Bei PECA des Kopf-Hals-Bereichs zeigen Untersuchungen, dass TP53 Mutationen eine negative Korrelation mit dem Überleben strahlentherapierter Patienten aufweisen. Allerdings konnte kein Zusammenhang mit operativ therapierten Patienten gefunden werden (Alsner et al., 2001).

1.2.3 Stk 15/Aurora Kinase A (AURKA)

1.2.3.1 Definition

Die Aurora Kinasen A, B und C sind Enzyme im menschlichen Organismus, die entscheidende zellzyklusregulierende Aufgabe während der Mitose und Meiose einnehmen. Die Aurora Kinase Familie gehört zu den Serin/Thyreonin-Kinasen, die Ähnlichkeiten zu der in Hefen vorkommenden Ipl1 und in Drosophila-Fliegen vorkommenden Aurora Kinasen aufweisen (Giet and Prigent, 1999). Das Enzym ist 46 kDa schwer und wird auf dem Chromosomen 20q13.2 kodiert (Sen et al., 1997).

1.2.3.2 Funktion/Wirkungsmechanismus

Die Aurora Kinase A wird durch Phosphorylierungen aktiviert und hat seine höchste Aktivität während der G2- und M-Phase während der Mitose. Je stärker die Aurora Kinase phosphoryliert ist desto höher ist ihr Aktivierungsgrad, wobei Autophosphorylierungen ebenfalls eine große Rolle spielen. Zudem hat sie eine zentrale Stellung in der Regulation der Zentrosomen Funktion und der Chromosomen Verteilung. Die Aufgabenbereiche der Aurora Kinase A sind sehr vielfältig und umfassen auch die Regulation des Ein- und Austritts in die Mitose. Trotz umfassender Forschung sind die genauen Mechanismen hierfür bis heute nicht erklärt und verstanden (Dar et al., 2010, Bischoff et al., 1998).

1.2.3.3 Aktuelle Forschungsstand bezüglich Stk 15/Aurora Kinase A

Polymorphismus

Die Aurora Kinase spielt wie oben beschrieben eine wichtige Rolle in der Zellteilung. In sogenannten Kontrollphasen scheint dieses Enzym vermehrt aktiv zu sein. Veränderungen in der Gensequenz können den Aktivierungszustand des Enzyms verändern und damit signifikante Störungen in der Mitose auslösen. Die Überexpression von Stk15 geht mit einer

schlechteren Prognose einher (Reiter et al., 2006). Auch in Ösophaguskarzinomen, kolorektalen Karzinomen aber auch in Ovarialkarzinomen sowie in NSCLC (nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom) konnte eine Überexpression des Stk15 Proteins nachgewiesen werden (Bischoff et al., 1998, Landen et al., 2007, Miao et al., 2004, Gu et al., 2007). Außerdem wurde auch hier ein Zusammenhang mit der Tumoraggressivität gezeigt, was auf eine mögliche Rolle des Stk15 in der Tumorgenese hinweisen könnte. Nicht nur der Aktivierungszustand sondern auch verschiedene Polymorphismen des kodierenden Gens können mit einer Tumorgenese in Verbindung gebracht werden (Tatsuka et al., 2009, Dicioccio et al., 2004). So steht beispielsweise das Erkrankungsrisiko für ein Lungenkarzinom in Zusammenhang mit dem Stk15 Polymorphismus (Gu et al., 2007). Dieser Zusammenhang konnte allerdings nicht beim Nierenzellkarzinom oder Ösophaguskarzinom gezeigt werden (Hammerschmied et al., 2007, Wang et al., 2007).

1.3 Problemstellung

Bisher scheint die TNM-Klassifikation der beste Anhaltspunkt für eine Prognoseeinschätzung bei Erstdiagnose zu sein. Allerdings lässt sich diese Prognose nur schwer auf den individuellen Patienten übertragen. Trotz des Versuchs der individuell zugeschnittenen Therapie treten bei mehr als 50% der fortgeschrittenen PECA Lokalrezidive auf oder es kommt zu einer weiteren Metastasierung (Gasparotto and Maestro, 2007, Gath and Brakenhoff, 1999). Unabhängig von der Therapieentscheidung Chirurgie oder primäre Radiochemotherapie haben Patienten mit einem fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinom eine schlechte Prognose. Unklar ist zudem, ob bestimmte Genmutationen oder Veränderungen in Proteinexpressionen die Prognose beeinflussen.

Heutzutage ist man sich im Klaren, dass Mutationen von Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen unter anderem verantwortlich sind für die Entartung und das aggressive Verhalten der Tumorzellen. Dabei spielt das TP53 eine frühe Rolle in der Tumorentstehung (May and May, 1999). Mittlerweile existieren viele Untersuchungen die zeigen, dass TP53 häufig in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs aber auch in vielen anderen Tumoren wie Blasenkarzinomen oder kolorektalen Karzinomen verändert ist (Mahdavinia et al., 2008, George et al., 2007). Hier liegt die Frage nahe, ob Patienten mit TP53 Mutationen eine schlechtere Prognose aufweisen als Patienten ohne TP53 Mutationen.

Ein weiteres interessantes Molekül für die Tumorgenese scheint Stk15 zu sein. Für Stk15 existiert ein Polymorphismus, dessen Rolle in der Tumorentstehung noch nicht gänzlich geklärt ist. Laut einer Studie haben Kaukasier mit dem Genotyp Ile/Ile ein signifikant

reduziertes Risiko an einem Lungenkarzinom zu erkranken und zu versterben (Gu et al., 2007). Im Gegensatz hierzu wird in einer anderen Arbeit gezeigt, dass es beim Nierenzellkarzinom keinen statistisch relevanten Zusammenhang zwischen Überlebensrate und Polymorphismus gibt (Hammerschmid et al., 2007). Zur Zeit existieren keine diesbezüglichen Untersuchungen für das PECA des Kopf-Hals-Bereichs. Somit stellt sich auch hier die Frage, ob Stk15 für die Prognose relevant ist.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Identifizierung von TP53 Mutationen bei PECA im Vergleich zum Vorliegen im Normalgewebe. Hierbei sollte v.a. auf die Exons 5, 6 und 8 eingegangen werden. Im Anschluss wurden Korrelationen mit histopathologischen und klinischen Parametern wie Therapieoption, TNM-Klassifikation, Stadium, Grading, Lokalisation, Rezidivrate, 2. Karzinomstatus, Alkohol- und Nikotinkonsum vorgenommen. Ein ähnliches Vorgehen erfolgte dann bei der Identifizierung des Stk15 Polymorphismuses. Zum Schluss sollte noch untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer TP53 Mutation und des Stk15 Polymorphismus gibt und ob dies ein wichtiger Gesichtspunkt hinsichtlich der Prognose sein könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Studienkollektiv

Die Gewebe des Studienkollektivs stammen aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar. Diese Gewebe wurden im Rahmen von Studien, die durch die Wilhelm-Sander-Stiftung und das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) unterstützt wurden, gewonnen. Dabei handelte es sich um Operationspräparate, die aus dem Zeitraum 1993 und 1997 stammen (Steuer-Vogt, Bonkowsky et al. 2001, Steuer-Vogt, Bonkowsky et al. 2006). Beide Projekte unterschieden sich lediglich in der Therapie: Bei nicht metastasierten Tumoren kam die ausschließliche chirurgische Therapie zum Zuge (Sander Projekt), bei den lymphatisch metastasierten, resektablen Tumoren wurde zur operativen Entfernung des Tumors eine postoperative konventionelle Radiatio durchgeführt (BMBF-Projekt). Der Nachbeobachtungszeitraum betrug durchschnittlich 13,3 Jahre. Desweiteren wurden Gewebeproben primär radio(chemo)therapierter Patienten untersucht. Diese stammten

ebenfalls aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Klinikums rechts der Isar. Der Nachbeobachtungszeitraum betrug hier 7,2 Jahre.

Es wurden 67 Gewebeproben von Patienten mit einer primären Operation, ggf. mit adjuvanter Strahlentherapie, 60 Gewebeproben von Patienten, die eine primäre Radio- oder Radiochemotherapie erhielten untersucht. Zudem wurden noch 64 Gewebeproben von gesunden Patienten, die eine Tonsillektomie im Zeitraum von 1995-1997 erhielten, als Normalgewebe in die Studie eingeschlossen und dienten somit als Kontrollkollektiv. Außerdem wurden von 43 Tumorpatienten korrespondierendes Normalgewebe untersucht. Schließlich wurden verschiedene Patientenparameter wie TNM-Klassifikation, Stadium, Lokalisation, Grading, Alkohol- und Nikotinkonsum, Rezidivrate, Auftreten von Zweitumoren und Overall survival (OS) erhoben. Zusätzlich wurden in das Studienkollektiv zwölf Zelllinien mit eingeschlossen. Die Tab.3 zeigt die verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Tumor	Alter/Geschlecht	Tumorlokalisation	Grading o. TMN
LN 18	-	-	-	-
BHY	Humanes Orales Plattenepithelkarzinom	52 a, männlich	Unterer Alveolarkamm mit Infiltration der Mandibula und der Mundbodenmuskulatur	G1
Cal-27	Humanes Plattenepithelkarzinom der Zunge	56 a, männlich	Zunge	G3
HN	Humanes orales Plattenepithelkarzinom	60 a, männlich	Weicher Gaumen mit Infiltration der Muskulatur	G2
UD1	-	64 a, männlich	Oropharynx	T3N2bM0
UD3	-	45 a, männlich	Larynx	T2N2cM0
UD4	-	47 a, männlich	Zunge	T3N1M0
UD5	-	44 a, männlich	Zunge	T1N1M0
UD6	-	64 a, männlich	Zunge	T2N0M0
UD7	-	-	-	-
HLAC	-	-	-	-
DDP	-	-	-	-

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien (Lin et al., 2007)

2.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller/Einstellung	
Microtom HM 355 S	MicomInternational GmbH, D-69190 Walldorf, Deutschland	
NanoDrop Gerät	Peqlab Biotechnologie GmbH, Carl-Thiersch-Str. 2b, D-91052 Erlangen	
Thermomixer Eppendorfcomfort 1.5 ml	Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Deutschland	
Bio Rad DNA Engine	Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, D-80939 München, Postfach 450133	
Schüttler/Mixer	Gemini B.V., Zwaansprengweg 4, 7332 BE Apeldoorn, Niederlande	
Zentrifuge: Eppendorf centrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Deutschland	
Kühlschrank/Gefrierschrank (4°C)	Liebherr comfort Liebherr-International Deutschland GmbH, Hans-Liebherr-Strasse 45, D-88400 Biberach an der Riss	Premium NoFrost von Liebherr, Hans-Liebherr- Strasse 45, D-88400 Biberach an der Riss
Waage: Sartorius universal	Sartorius AG, Weenderlandstrasse 94-108, D-37075 Goettingen, Germany	
Magnetrührer: IKA MEG Ret	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Janke & Kunkel-Str. 10, 79219 Staufen, Germany/Deutschland	
Mikrowelle NN-5256	Panasonic Deutschland GmbH, Winsbergring 15, 15255 Hamburg	
Gelektrophorese Kammer: Mini Protean III, Biorad; Biorad Power + PAC 300 Spannungsgerät; Gelgießkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, D-80939 München, Postfach 450133	
Autoclave	LabSource, Inc., 1186 Arbor Dr Romeoville, IL 60446	
Eagle Eye II Stratagene	Company & Division Headquarters Agilent Technologies, Inc. Life Sciences and Chemical Analysis Group, 5301 Stevens Creek Boulevard,	"Dynamic Integration Parameters" - Starting Count: 44 Frames @ 1/30 sec.

	Santa Clara	00015 = 00:00 min - Incrementel Count: 33 Frames@1/30 sec. 00010 = 00:00 min
--	-------------	---

Tabelle 4: Geräte

2.1.3 Puffer/Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Mengen/Zusammensetzung
Mini Kit von Qiange	Germany — QIAGEN GmbH, QIAGENStrasse 1, 40724 Hilden	
PBS		1x
5x Enhancer Solution P; 10x Reactionbuffer S; dNTP Mix; Taq Polymerase	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Carl-Thiersch-Str. 2b, D-91052 Erlangen	Lot 120710 Store at -20°C Lot 063010 Store at -20°C 10 mM each Lot 081710 Store at -20°C 250 Units 5 U/μl Lot 06269-9 Exp 09/12
Agarose	Biozym Scisweentific GmbH, Steinbrinkg 27, 31840 Hessisch Oldendorf	
Ethidium Bromid	AMRESCO Inc., BrandedProducts Group, 6681 Cochran, Solon, OH 44139-0098 USA	0,625 mg/ml
Größenstandard	Roche	
10x TBE		1,0 M Tris, 0,9 M Boric Acid, 0,01 EDTA
1x TBE		100 ml 10x TBE + 900 ml Aqua dest.
1x TBE Laufpuffer		100 ml 10x TBE + 900 ml Aqua dest. + 1 Tr. EtBr

Tabelle 5: Puffer/Verbrauchsmaterial

2.1.4 Primer

Primer/Exon	Hersteller/Sequenz
Primer	Eurofins MWG Operon, Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Germany
TP53 Exon 5	for: 5' ATCTGTTCACCTTGTGCCCTG 3' rev: 5' AACCAGCCCTGTCGTCTCTC 3'
TP53 Exon 6	for: 5' AGGGTCCCCAGGCCTCTGAT 3' rev: 5' CACCCTTAACCCCTCCTCCC 3'
TP53 Exon 8	for: 5' TTCCTTACTGCCTCTTGCTT 3'

	rev: 5' TGTCCTGCTTGCTTACCTCG 3'
Stk15 Codon 91	for: 5'CTTTCATGAATGCCAGAAAGTT 3'
	rev: 5' CTGGGAAGAATTTGAAGGACA 3'

Tabelle 6: Primer

2.1.4.1 Master Mix TP53

Materialien	MM für 1 Reaktion	MM für 30 Reaktionen	Endkonzentration
Aqua dest.	215 µl	688 µl	-
5 Enhancer P	10 µl	300 µl	1x
10 Puffer S	5 µl	150 µl	1x
dNTP	1 µl	30 µl	0,2 mM
for Primer	1 µl	30 µl	0,4 pmol
rev Primer	1 µl	30 µl	0,4 pmol
Taq Polymerase	0,5 µl	15 µl	1 units/µl

Tabelle 7: Master Mix Inhalt TP53

2.1.4.2 Master Mix Stk15

Materialien	Stock	Volumen	Endkonzentration
Aqua dest.	-	21,8 µl	-
5 Enhancer P	5x	10 µl	1x
10 Puffer S	10x	5 µl	1x
dNTP	10 mM	1 µl	0,2 mM
for Primer	20 pmol	1 µl	0,4 pmol
rev Primer	20 pmol	1 µl	0,4 pmol
Taq Polymerase	5 units/µl	0,2 µl	1 units/µl
DNA	20 ng/µl	10 µl	200 ng

Tabelle 8: Master Mix für Stk 15

2.1.4.3 Restriktionsverdau Stk15 Polymorphismus

Reagenz	Stock	Volumen	Endkonzentration
Puffer	5x	2,5 µl	1x
BSA	10 mg/ml	0,25 µl	1 µg
Apol	1000 units/ml	1 µl	1000 units/ml
Aqua dest.	-	1 µl	-
PCR-Amplifikat	-	20 µl	-

Tabelle 9: Restriktionsverdau Stk15

2.1.5 Sonstiges Verbrauchsmaterial

Geräte	Hersteller
Pipetten Gilson	Gilson, Inc., P.O. Box 620027, Middleton, WI 53562-0027 USA
Pipettenspitzen: Josef PeskeoHG	Josef Peske GmbH & Co. KG, Hofmarkstraße 6, D-86447 Aindlingen-Arnhofen
Latex Free Semper Care Nitril Handschuhe	Semperit Technische Produkte GmbH Division, Sempermed Österreich, 1031 Wien, Modecenterstraße 22
8x 96 wellplate	Eurofins MWG

Tabelle 10: Verbrauchsmaterial

2.1.6 Sequenzierung/Computerprogramme

Auswertungsprogramme und Dateien	Internetadresse/Herkunft
Eurofins MWG operon	Eurofins MWG GmbH, Anzinger Str. 7a, D-85560 Ebersberg
Bioedit	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
Ape Plasmid editor	http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/Download/latest%20alphas/Windows%20PC/
pdf Datei und AB1 Datei	Eurofins MWG
Exonsequenzinformation	http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000141510;r=17:7565257-7590856;t=ENST00000269305
SPSS	Version 18/ 19 von IBM, IBM Deutschland GmbH, 71137 Ehningen

Tabelle 11: Auswertungsprogramme

2.2 Methoden

2.2.1 TP53

2.2.1.1 DNA Isolierung aus FFPE Material

Hierbei wurden 10 µm dicke Schnitte von einem Paraffinblock mit einem Mikrotom angefertigt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 1 ml Xylol und 250 µl 70% Ethanol wurden zugegeben danach wurden die Proben 15 Sekunden gevortext und anschließend 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet in der Vakuum-Zentrifuge je nach Gewebemenge 30-60 Minuten getrocknet. Das Pellet

wurde nach dem Trocknen in 300-600 µl Protinase K-Puffer und 0,1% Tween resuspendiert und mit einer Pipettenspitze mechanisch zerkleinert. Danach kamen 25-50 µl Protinase K hinzu und die Proben wurden über Nacht bei 55°C inkubiert (Schüttelfrequenz 550 rpm). Die Enzyminaktivierung erfolgte durch kochen für 10 Minuten, diese erfolgte nach vollständigem Verdau. Die DNA-Stammlösung wurde im NanoDrop von PeqLab gemessen und mit aqua dest. auf eine Konzentration von 25 ng/µl eingestellt. Die DNA-Stammlösung wurde bei 4°C gelagert.

2.2.1.2 DNA-Isolierung aus Zellen

Die DNA-Isolierung wurde mit dem DNA Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst mit 1x PBS gespült und mit Accutase abgelöst. Die abgelöste Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1800 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Die Resuspendierung des Zellpellets erfolgte mit 200 µl 1x PBS und mit 20 µl Protinase K sowie 200 µl Puffer AL. Der Proteinverdau erfolgte bei 56°C und dauerte eine halbe Stunde. Schließlich kamen 200 µl 100 % Ethanol hinzu und die Proben wurden erneut durchgemischt. Die Lösung wurde dann auf eine Spin Column pipettiert und bei 8000 rpm 1 Minute zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift des Spin Columns mit 500 µl Puffer AW1 und erneutes Zentrifugieren bei 8000 rpm für 1 Minute. Es schloss sich ein zweiter Waschschrift mit 500 µl Puffer AW1 an. Zum Schluss erfolgte die Zentrifugation der DNA mit 200 µl Puffer AE bei 8000 rpm für 1 Minute. Mittels NanoDrop Geräts wurde die DNA-Konzentration gemessen und durch Zugabe von aqua dest. auf eine Konzentration von 25 ng/µl eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2.1.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.2.1.3.1 Theorie

Die Methode der Polymerase Kettenreaktion wurde erstmals von Saiki beschrieben (Saiki et al., 1988). Hierbei handelt es sich um eine Methode, um einen bestimmten DNA Abschnitt außerhalb lebender Zellen zu vermehren.

Temperatur	Zeit
95°C	5 min
95°C	30 sec
Annealing temperature (siehe Tab. 13)	30 sec
72°C	1 min

72°C	7 min
8°C	~

Tabelle 12: PCR Programm TP53

Genbereich	Annealingtemperatur	Größe
Exon 5	60°C	276 bp
Exon 6	62°C	199 bp
Exon 8	56°C	217 bp

Tabelle 13: Annealing temperature

2.2.1.3.2 Durchführung

Zunächst wurde der Master Mix (5 µl Reaktionspuffer, 10 µl Enhancer P, 1 µl dNTP's (0,2 mM), 1 µl Primer forward (for) (0,4 pmol), 1 µl Primer reverse (rev) (0,4 pmol), 0,2 µl taq. Polymerase (1 unit/µl), 2 µl cDNA (50 ng), 29,8 µl aqua dest.) für die entsprechende Anzahl an Reaktionen zusammenpipettiert und anschließend je 48 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß gegeben. Von der angetauten, auf Eis stehenden cDNA wurden je 2 µl (50 ng) zu dem entsprechenden Master Mix hinzugefügt, so dass ein Reaktionsvolumen von 50 µl entstand. Das PCR-Programm für den BioRad Thermocycler lautete wie folgt: 95°C 5 min, 95°C 30 sec, Annealing 30 sec, 72°C 1 min, 72°C 7 min.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

2.2.1.4.1 Theorie

Diese molekularbiologische Methode erlaubt Nukleinsäuren wie DNA (aber auch RNA) nach ihrer Größe aufzutrennen. Um dieses Ziel zu erreichen, ist das Agarosegel wie ein Netz aufgebaut, das die DNA Fragmente durchwandern müssen. Je feiner das Netz desto genauer wird die Trennung der Nukleinsäuren, wobei kleine Fragmente schneller bzw. weiter im Gel vorankommen. Damit die Moleküle in Bewegung kommen wird ein elektrisches Feld mit einem Plus- und Minuspol angelegt. Die negativ geladene DNA wandert entlang des elektrischen Felds Richtung Pluspol. Nach einer gewissen Zeit legen die DNA Fragmente je nach Größe eine bestimmte Strecke zurück. Mithilfe der Referenz kann die Größe der Fragmente bestimmt werden (Adkins and Burmeister, 1996, Britos et al., 2004). Zuletzt wird die Fluoreszenzphotographie angewandt, um die DNA Banden sichtbar zu machen. Das im Gel beigemengte Ethidiumbromid (EtBr) hat eine Fluoreszenzeigenschaft, eine kurzzeitige spontane Emission von Licht, dass beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie frei wird, wobei das emittierte Licht im Regelfall energieärmer ist als das vorher absorbierte. Das EtBr hat in Lösung eine geringe

Fluoreszenzeigenschaft, da dieses seine Konformation frei ändern kann. Sobald das EtBr an DNA gebunden ist, erhöht sich seine Fluoreszenzfähigkeit enorm. Durch Anregung mit ultraviolettem Licht emittiert das EtBr Licht bestimmter Wellenlänge, das dargestellt und per Foto dokumentiert werden kann. Somit können die DNA Banden, die durch das gebundene EtBr hell aufleuchten, angezeigt werden (Adkins and Burmeister, 1996).

2.2.1.4.2 Durchführung

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2%iges Agarosegel aus 1x TBE-Puffer, Agarose und einem Tropfen Ethidiumbromid (entsprechend $1,25 \times 10^{-3}$ mg) hergestellt. Dieses Gel wurde in einer Laufkammer mit Ethidiumbromid versetzt und mit 1x TBE Puffer bedeckt. 10 µl des PCR-Amplifikats wurden mit 1 µl Ladepuffer vermischt und anschließend in die Taschen des Gels gegeben. In die letzte Tasche des Gels wurde stets der Größenstandard gegeben. Die Laufzeit betrug 45 Minuten bei einer Spannung von 90 V. Im Anschluss wurde das Gel mit dem Eagle-Eye II Gel-Dokumentationssystem der Firma Stratagene fotografiert und dokumentiert.

2.2.1.5 DNA Sequenzierung

2.2.1.5.1 Theorie nach Sanger: Kettenabbruch Methode

Die DNA Sequenzierung erfolgt nach der Methode von Sanger, der Kettenabbruch-Synthese. Dabei kommen zusätzlich zu den gewöhnlichen Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) spezielle Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) zum Einsatz, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaft zu einem Strangbruch führen. Der zu untersuchende DNA Abschnitt wird durch Erwärmung denaturiert und dadurch wird die DNA Doppelhelix in seine DNA Stränge getrennt. Danach kommt ein kurzer Abschnitt bekannter Sequenz, der sogenannte Primer, hinzu. Eine DNA Polymerase verlängert nun, ausgehend von diesem Primer, komplementär die DNA. Dabei bedient sich die Polymerase zufällig einer der oben genannten dNTP oder ddNTP. Sobald die ddNTP eingebaut wird, kommt es aufgrund des Fehlens der 3'-Hydroxygruppe zum Kettenabbruch, da die notwendige Verbindung zur nächsten Base nicht mehr verknüpft werden kann. Um die komplette Sequenz zu entschlüsseln benötigt man vier parallel laufende Ansätze, die jeweils einer der ddNTP also ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP enthält. Somit erhält man DNA Fragmente unterschiedlicher Länge, die dann markiert und in einer Gelelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt werden. Anhand dieser kann nun die Sequenz bestimmt und computertechnisch graphisch dargestellt werden (Sanger et al., 1977).

2.2.1.5.2 Durchführung

Die PCR-Amplifikate wurden unaufgereinigt in 96-well plates an die Firma MWG-Eurofins geschickt, die die Sequenzierung durchführte.

2.2.2 Stk15 Polymorphismus

2.2.2.1 Theorie Restriktionslängenpolymorphismus

Durch Mutationen in den Gensequenzen verändert sich die Basenabfolge. Spezielle Restriktionsenzyme, die auch als molekulare „Scheren“ bezeichnet werden, können kurze Basenabfolgen innerhalb der Gensequenz erkennen und dort die DNA trennen. Dadurch entstehen unterschiedlich lange DNA Fragmente. Durch die Veränderung der Gensequenz können sich diese Schnittstellen verändern und dabei die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme verändern. Somit können entweder zusätzliche DNA Fragmente oder keine DNA Fragmente entstehen. Die DNA Fragmente werden markiert und mithilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Anhand der Fragmentzahl können Rückschlüsse auf den vorhandenen Polymorphismus gezogen werden (Alberts et al., 2002). Phe/Phe bringt zwei Banden (153 bp und 12 bp), Phe/Ile bringt drei Banden (89 bp, 69 bp und 12 bp) und Ile/Ile bringt ebenfalls drei Banden (89 bp, 69 bp und 12 bp) zur Darstellung.

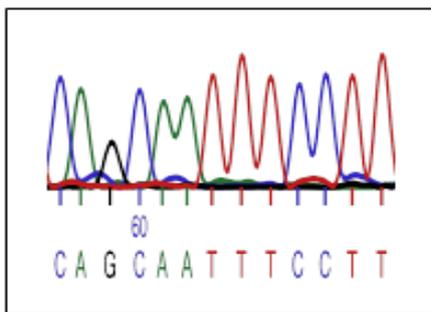
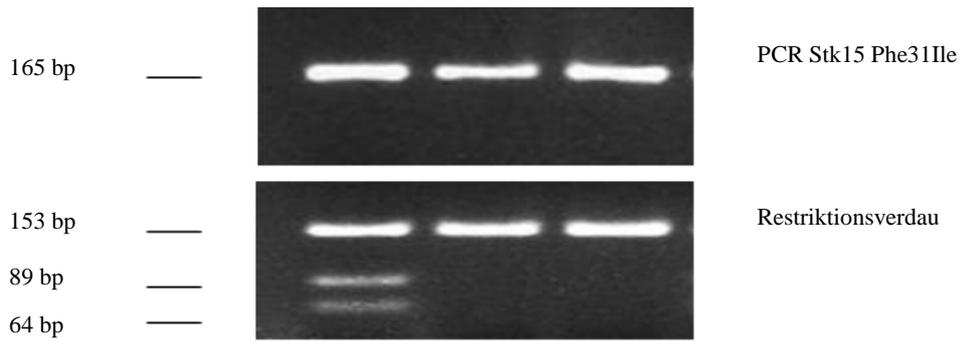
2.2.2.2 Durchführung

Im ersten Schritt wird der zu analysierende Stk15-Genabschnitt im Bereich des Codon 91 mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die in der Tab.6 genannten Primer verwendet. Für die spezifische PCR-Reaktion wird in der Tabelle 8 aufgezeigte Master-Mix zusammenpipettiert und mit dem PCR Programm amplifiziert (Tab.15). Nach Überprüfung der Qualität und Quantität des 165 bp großen PCR-Amplifikats mittels Gelelektrophorese erfolgt im Anschluss der Restriktionsverdau des PCR-Fragmentes mit dem Enzym ApoI.

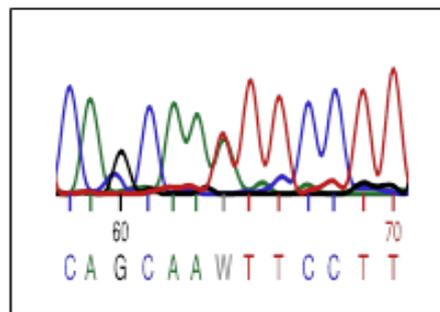
Dazu wird der in Tab. 8 folgende Reaktionsansatz in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgte im Thermoblock bei 55°C über Nacht. Nach der Enzyminaktivierung bei 80°C für 20 Minuten werden die Restriktionsfragmente in einem 2,5%-igen Agarosegel separiert. Folgende Bandenmuster ergeben sich für die Stk15-Allele:

Stk15 Allel	Restriktionsfragmente
31Phe/Phe	153 bp, 12 bp
31Phe/Ile	89 bp, 64 bp, 12 bp
31Ile/Ile	89 bp, 64 bp, 12 bp

Tabelle 14: Bandenmuster für die Stk15 Allele



Phe/Phe



Phe/Ile

Temperatur	Zeit
95°C	7 min.
95°C	30 sec.
60°C	30 sec.
72°C	1 min. 30 sec.
72°C	7 min.

Tabelle 15: PCR Programm Stk15

Die Durchführung der Untersuchung erfolgte in einer separaten Arbeit. Die statistische Korrelation der Ergebnisse mit klinischen Daten erfolgte allerdings in dieser Arbeit.

2.2.3 Statistik

2.2.3.1 TP53

2.2.3.1.1 Auswertung

I. Homozygote Mutation: Vergleich der Sequenzierungsdaten mit der wild-type Sequenz

Die homozygoten Mutationen, die einen kompletten Austausch einer Base in beiden Allelen beinhalten, sind im Gegensatz zu heterozygoten Mutationen in der graphischen Darstellung der Sequenzierungssequenz nicht erkennbar. Es ist daher notwendig die korrigierte Sequenz mit der wild-type Sequenz abzugleichen. Die wild-type Sequenz kann über die internationale Datenbank Ensemble bezogen werden (siehe Tab.11). Die einzelnen wild-type Sequenzen werden in Tab. 17, 19 und 21 demonstriert. Der Vergleich erfolgte anschließend durch das Ape Plasmid Programm. Die wild-type Sequenz und die PCR Sequenzierungsergebnisse wurden durch das Ape Plasmid editor abgeglichen. So konnten komplett ausgetauschte Basen d.h. homozygote Mutationen eindeutig detektiert werden.

II. Heterozygote Mutation

Zusätzlich war es erforderlich, die graphische Darstellung (PDF Format) der Sequenzierungsergebnisse zu betrachten und nach heterozygoten Mutationen zu fahnden. Die heterozygoten Mutationen können nicht durch Abgleich mit der wild-type Sequenz auffindig gemacht werden. Deshalb wurde außerdem bei jedem Sequenzierungsprodukt nach Ausschluss homozygoter Mutationen (siehe vorheriger Schritt I.) die PDF Datei begutachtet um vorhandene heterozygote Mutationen zu entdecken. Dabei waren Doppelkurven bei einer einzelnen Base sehr verdächtig für eine heterozygote Mutation. Kam es zu dieser Situation, war es obligat die Reverse-Sequenz zu prüfen ob eine entsprechende gegenläufige Doppelkurve an der passenden Stelle zu finden war. Bei passenden Doppelkurven in der Forward-Sequenz und in der Reverse-Sequenz kann von einer möglichen heterozygoten Mutation ausgegangen werden.

2.2.3.2 Statistik für TP53 und Stk15

2.2.3.2.1 SPSS

Die Statistik wurde mit der Software SPSS Version 18/ 19 von IBM durchgeführt. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanz-Niveau von 5% festgelegt.

Die Auswertung der Überlebensdaten erfolgte mittels Kaplan Meier Kurven und Log-rank Test. Zudem wurden zusätzliche Parameter wie Alkohol- oder Nikotinkonsum, Therapie Regime, Grading, Lokalisation, Stadium, TNM-Klasifikation, Rezidivrate und Zweitkarzinomhäufigkeit mit in die Betrachtung aufgenommen.

Der exakte Test nach Fisher wurde herangezogen um die statistischen Unterschiede zwischen Tumorkollektiv und Kontrollkollektiv/korrespondierendes Normalgewebe zu verifizieren.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

Die nachfolgende Tab.16 veranschaulicht die Charakterisierung des Patientenkollektivs.

Charakteristika	Daten	In Prozent
Alter Mittleres Alter Range	69 Jahre 47-89 Jahre	
Geschlecht Männlich Weiblich	102 25	80,3% 19,6%
Therapie Op or Op + adjuvante Radiatio Radiatio or Radiochemo	60 67	52,8% 47,2%
Tabakkonsum Raucher/Nichtraucher Keine Angaben	96/20 11	75,6%/15,7% 8,7%
Alkoholkonsum Regelmäßig/nicht regelmäßig Keine Angaben	87/22 18	68,5%/17,3% 14,2%
T-Klassifikation 1 2 3 4 Keine Angaben	32 31 35 26 3	25,1% 24,4% 27,6% 20,4% 2,3%
N-Klassifikation N0 N1 N2a N2b N2c N3 Keine Angaben	45 15 4 27 28 2 6	35,4% 11,8% 3,1% 21,3% 22,0% 1,6% 4,7%
M-Klassifikation M0 M1 Keine Angaben	116 5 6	91,3% 3,9% 4,7%
Stadium 1 2 3 4 Keine Angaben	20 17 17 71 2	15,7% 13,4% 13,4% 55,9% 1,6%
Grading G1/G2/G3 Keine Angaben	7/60/53 7	5,5%/47,2%/41,7% 5,5%

Anatomische Lokalisation		
Mundhöhle	17	14,3%
Oropharynx	51	40,2%
Hypopharynx	25	19,7%
Larynx	29	22,8%
Keine Angaben	5	3,9%
Rezidiv		
Nein/ja	96/24	75,6%/18,9%
Keine Angaben	7	5,5%
2. Karzinom		
Nein/ja	98/22	77,2%/17,3%
Keine Angaben	7	5,5%

Tabelle 16: Charakterisierung des Studienkollektivs

3.2 TP53

3.2.1 Exon 5

Die nachfolgende Tab. 17 zeigt die wild-type Sequenz von Exon 5 forward/reverse von 5' nach 3'. Insgesamt zeigten sich im Exon 5 drei missense Mutationen (siehe Tab. 18). Abb. 5 zeigt ein Beispiel der Sequenzierung.

Forward	Reverse
5'TACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTT TGCCAACCTGGCCAAGACCTGCCCTGTGC AGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCC CGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATC TACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAG GTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGC GCTGCTCAGATAGCGATG 3'	5'CATCGCTATCTGAGCAGCGCTCATGGTG GGGCAGCGCCTCACAACCTCCGTCATGT GCTGTGACTGCTTGTAGATGGCCATGGCG CGGACGCGGGTGCCGGGCGGGGGTGTGG AATCAACCCACAGCTGCACAGGGCAGGTC TTGGCCAGTTGGCAAACATCTTGTGAG GGCAGGGGAGTA 3'

Tabelle 17: forward/reverse Sequenz Exon 5

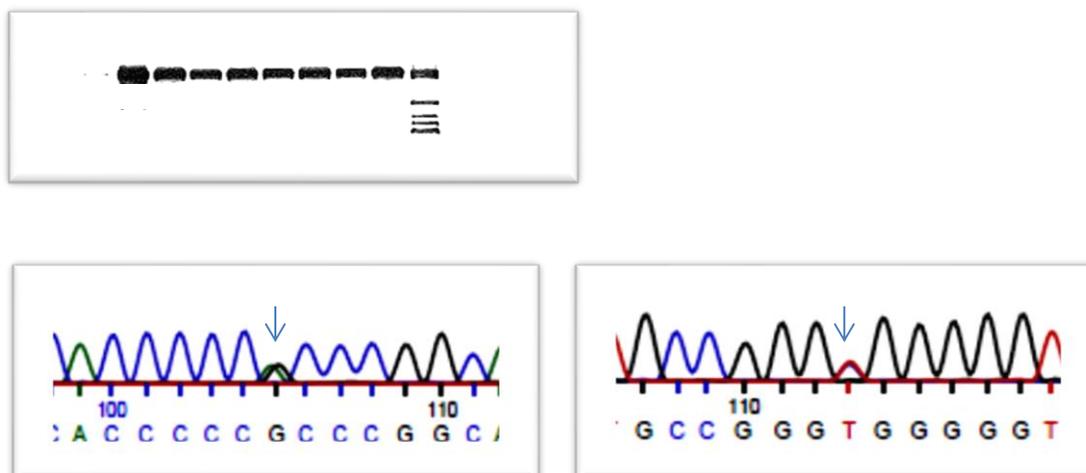


Abbildung 5: Beispiel Sequenzierung Exon 5 forward/reverse

Proben Nr.	Forward	Reverse	Form	Austausch
21	TAC → aAC	GTA → GTt	Heterozygot	c. 488 T > a p. Tyr 163 Asn
80	CCG → CCa	CGG → tGG	Heterozygot	c. 456 G > a p. Pro 151 Pro
178	GTG → aTG	CAC → CAt	Heterozygot	c. 517 G > a p. Val 173 Met

Tabelle 18: Mutationen Exon 5

3.2.2 Exon 6

Die Tab. 19 zeigt die wild-type Sequenz Exon 6 forward/reverse von 5' nach 3'. Abb. 6 zeigt ein Beispiel der Sequenzierung auf. Exon 6 zeigte insgesamt 15 Veränderungen. Darunter waren ein Introsplize Stelle, zwei nonsense Mutationen (Stopcodon), neun stille Mutationen und drei missense Mutationen zu finden (siehe Tab. 20).

Forward	Reverse
5'GTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTATCC GAGTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTA TTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACAT AGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCGCTG AG 3'	5'CAGACCGGGGAGGAGTCGTAGAATAG GCTCACCTTCCTTTAAACGCACACCTCAT AAACCTACTGTCTTTGTGAAAAGCTGTAT CACACCACCGGGATACTCGGCGGACT C 3'

Tabelle 19: forward/reverse Sequenz Exon 6

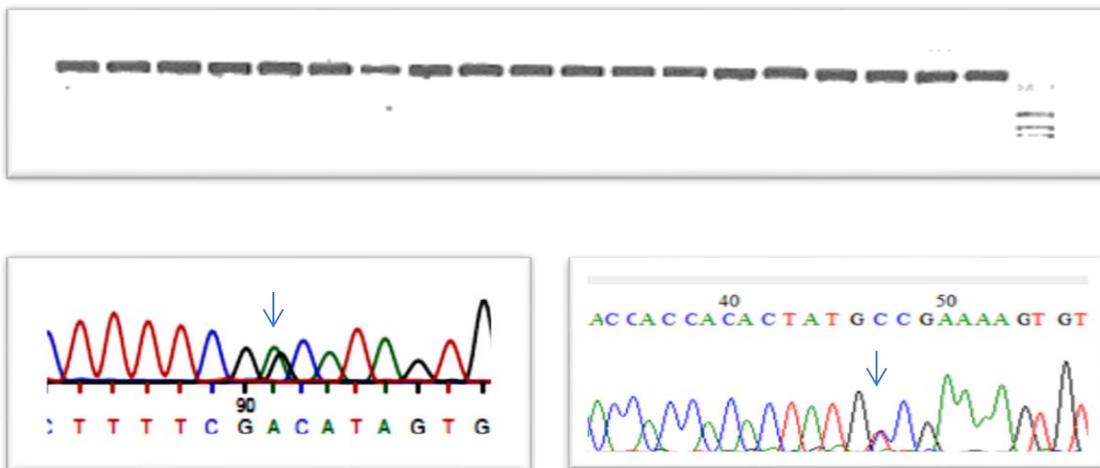


Abbildung 6: Beispiel Sequenzierung Exon 6 forward/reverse

Proben Nr.	Forward	Reverse	Form	Austausch
5	GGT → GaT	ACC → AtC	Heterozygot	Intronsplizestelle
6	GAG → tAG	CTC → CTa	Homozygot	c. 670 G > t p. Glu 224 X

9	TAT → TgT	ATA → AcA	Homozygot	c. 659 A > g p. Tyr 220 Cys
11	CGA → CGg	TCG → cCG	Homozygot	c. 639 A > g p. Arg 213 Arg
12	CGA → CGg	TCG → cCG	Homozygot	c. 639 A > g p. Arg 213 Arg
29	ATC → tTC	GAT → GAa	Heterozygot	c. 583 A > t p. Ile 195 Leu
54	GTG → aTG	CAC → CAt	Heterozygot	c. 646 G > a p. Val 216 Met
67	CGA → CGg	TCG → cCG	Heterozygot	c. 639 A > g p. Arg 213 Arg
71	CGA → CGg	TCG → cCG	Heterozygot	c. 639 A > g p. Arg 213 Arg
101	CGA → CGg	TCG → cCG	Heterozygot	c. 639 A > g p. Arg 213 Arg
139	CGA → CGg	TCG → cCG	Heterozygot	c. 639 A > g p. Arg 213 Arg
183	CGA → CGg	TCG → cCG	Heterozygot	c. 639 A > g p. Arg 213 Arg
184	CGA → CGg	TCG → cCG	Heterozygot	c. 639 A > g p. Arg 213 Arg
198	GAG → tAG	CTC → CTa	Heterozygot	c. 610 G > t p. Glu 204 X
201	CGA → CGg	TCG → cCG	Heterozygot	c. 639 A > g p. Arg 213 Arg

Tabelle 20: Mutationen Exon 6

3.2.3 Exon 8

In der Tab. 21 wird die wild-type Sequenz Exon 8 forward/reverse von 5' nach 3' aufgezeigt. Die Abb. 7 zeigt ein Sequenzierungsbeispiel auf. Insgesamt wurden im Exon 8 neun Mutationen festgestellt, darunter acht missense Mutationen und ein nonsense Mutation (stopcodon) (siehe Tab. 22).

Forward	Reverse
5'TGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTT TGAGGTGCGTGTGTTGTGCCTGTCCTGGGA GAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATC TCCGCAAGAAAGGGAGCCTCACACG AGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAG 3'	5'ACCATTAGATGACCCTGCCTTGTGCGAA ACTCCACGCACAAAACGGACAGGACCCT CTCTGGCCGCGTGTCTCCTTCTCTTAGAG GCGTTCTTTCCCCTCGGAGTGGTGCTCGA CGGGGTCCCCTCGTGATTCGCTC 3'

Tabelle 21: forward/reverse Sequenz Exon 8

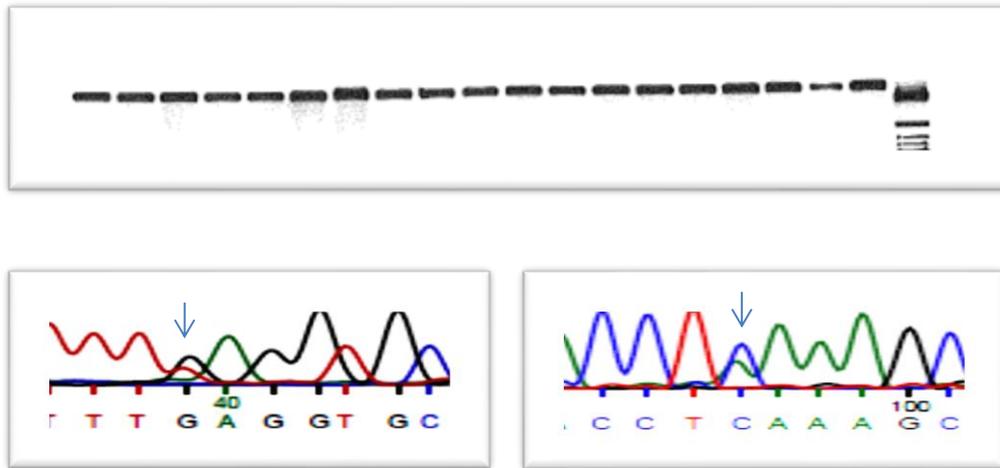


Abbildung 7: Beispiel Sequenzierung Exon 8 forward/reverse

Proben Nr.	Forward	Reverse	Form	Austausch
15	CGT → tGT	ACG → ACa	Heterozygot	c. 817 C > t p. Arg 273 Cys
20	GTT → GcT	AAC → AgC	Heterozygot	c. 820 G > c p. Val 274 Ala
33	AGA → gGA	TCT → TCc	Heterozygot	c. 838 A > g p. Arg 280 Gly
38	CGT → CtT	ACG → AaG	Heterozygot	c. 818 G > t p. Arg 273 Leu
44	GGA → aGA	TCC → TCt	Heterozygot	c. 796 G > a p. Gly 267 Arg
170	CGG → tGG	CCG → CCa	Heterozygot	c. 844 C > t p. Arg 282 Trp
171	CGT → tGT	ACG → ACa	Heterozygot	c. 817 C > t p. Arg 273 Cys
190	GAG → tAG	CAC → CAa	Heterozygot	c. 811 G > t p. Glu 271 X
191	CGT → tGT	ACG → ACa	Heterozygot	c. 817 C > t p. Arg 273 Cys

Tabelle 22: Mutationen Exon 8

3.2.4 Anzahl der TP53 Mutationen bezogen auf das Tumor- und Kontrollkollektiv in Prozentangaben.

Exon	Absoluter Wert	Relativer Wert
5	2	1,4% (2/139)
6	13	9,4% (13/139)
8	9	6,5% (9/139)

Tumorgewebe (inkl. 12 HNSCC Zelllinien)	24	17,3% (24/139)
12 HNSCC Zelllinien	5	3,4% (5/139)
Kontrollkollektiv (Normalgewebe)	3	4,7% (3/64)
Korrespondierendes Normalgewebe	0	0%

Tabelle 23: TP53 Anzahl der Mutationen

3.3 Stk15 Polymorphismus

3.3.1 Exemplarische Genotypisierung

Die Untersuchung des Stk15 Polymorphismus wurde nicht an den 12 HNSCC Zelllinien durchgeführt. Insgesamt zeigte sich im untersuchten Kollektiv im Tumorgewebe eine Verteilung von 44,1% Phe/Phe, 47,2% Phe/Ile und 2,4% Ile/Ile. Beim Normalgewebe verteilte es sich auf 67,2% Phe/Phe und 32,8% Phe/Ile. Im Normalgewebe wurden keine Ile/Ile Polymorphismus gefunden. Das korrespondierende Normalgewebe zeigte folgende Verteilung: 60,5% Phe/Phe und 34,9% Phe/Ile, auch hier wurden keine Ile/Ile Polymorphismus entdeckt (siehe Tab. 24).

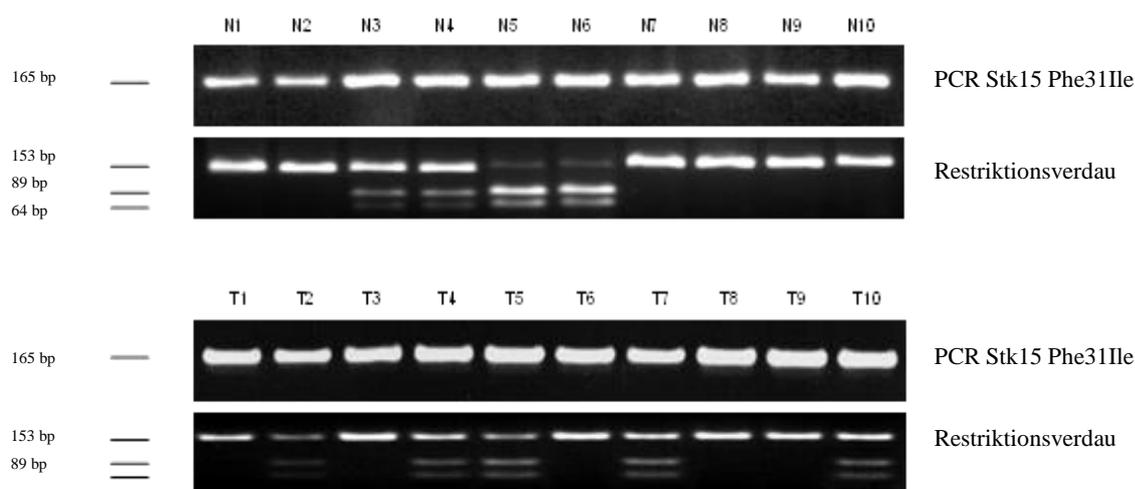


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Genotypisierung von Stk15 Codon 91 an Normal- und Tumorgewebe

3.3.2 Verteilung des Stk15 Polymorphismus

Die nachfolgende Tab.24 zeigt die Verteilung des Stk15 Polymorphismuses jeweils für Tumorgewebe, Normalgewebe und korrespondierendem Normalgewebe für Phe/Phe (p/p), Phe/Ile (p/I) und Ile/Ile (I/I). Die Untersuchung des Stk15 Polymorphismuses wurde nicht an den 12 HNSCC Zelllinien durchgeführt.

Polymorphismus	Absoluter Wert	Relativer Wert
Tumorgewebe (p/p), (p/l), (l/l) Ausfall	56/60/3 8	44,1%/47,2%/2,4% 6,2%
Normalgewebe (p/p), (p/l), (l/l) Ausfall	43/21/0 0	67,2%/32,8%/0% 0%
Korrespondierendes Normalgewebe (p/p), (p/l), (l/l) Ausfall	26/15/0 2	60,5%/34,9%/0% 4,7%

Tabelle 24: Stk15 Polymorphismus Verteilung

3.4 Signifikanzniveaus (Log-rank Test und exacter Test nach Fisher)

Auswertung	Signifikanzniveau
Korrelation TP53 Mutation vs. TP53 wild-type	
	0.204
Korrelation der Patientendaten mit dem TP53 Mutationsstatus	
Therapie	0.086
T-Klassifikation	0,308
N-Klassifikation	0,256
M-Klassifikation	0.196
Grading	0,187
Lokalisation	0,244
Stadium	0,232
Alkohol	0,409
Nikotin	0,248
2. Karzinom	0,161
Rezidivrate	0,530
Vergleich zwischen Tumorkollektiv und Kontrollkollektiv (Gesunde)	
	0,04
Vergleich zwischen Tumorkollektiv und korrespondierendem Normalgewebe	
	0,01
Korrelation der Patientenparameter und des Stk15 Polymorphismuses	
Therapie	0,503
T-Klassifikation	0,882
N-Klassifikation	0,811

M-Klassifikation	0,901
Grading	0,997
Lokalisation	0,714
Stadium	0,687
Alkohol	0,861
Nikotin	0,802
2. Karzinome	0,651
Rezidivrate	0,8
Korrelation der Patientenparameter mit dem zeitgleichen Vorliegen von TP53 Mutation und Stk15 Polymorphismus	
Therapie	0,637
T-Klassifikation	0,85
N-Klassifikation	0,722
M-Klassifikation	0,732
Grading	0,867
Lokalisation	0,688
Stadium	0,707
Alkohol	0,824
Nikotin	0,909
2. Karzinome	0,586
Rezidivrate	0,786

Tabelle 25: Signifikanzniveaus

3.5 Kaplan Meier Kurven und Log-rank Test

3.5.1.1 Überlebenskurven in Bezug auf Patientenparametern

Die Auswertung der Überlebenskurven in Bezug auf die Patientenparameter verdeutlicht, dass das Überleben der Patienten mit höheren Stadien oder fortgeschrittenem T-Stadium, Vorliegen von Lymphknoten oder Fernmetastasen, positivem Alkohol- oder Nikotinkonsum schlechter ist. Patienten, die eine Strahlen- oder eine Radiochemotherapie erhielten zeigten ebenfalls eine schlechtere Prognose als Patienten, die primär operiert wurden. Hypopharynxkarzinome scheinen ebenfalls mit einem schlechteren Outcome verbunden zu sein ($p > 0,05$).

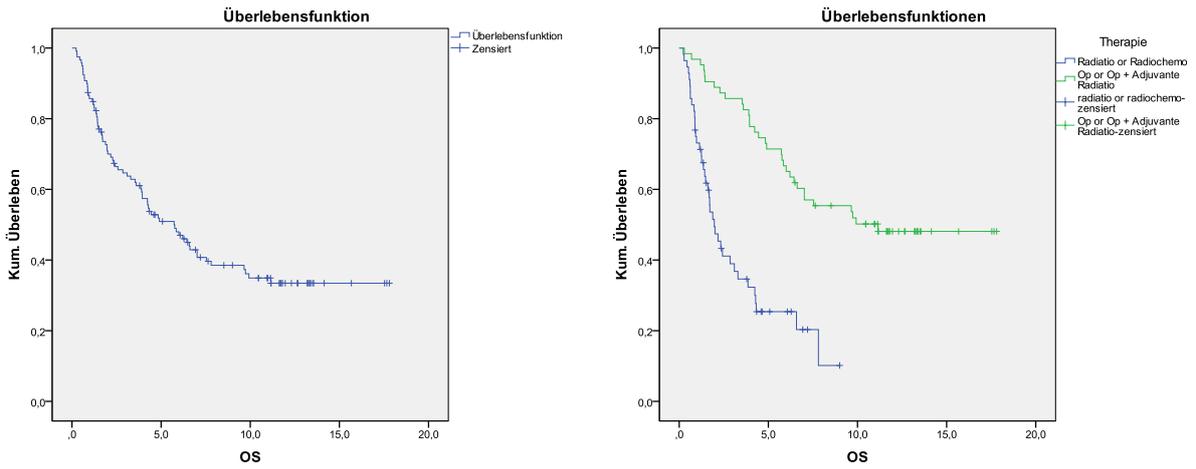


Abbildung 9/10: Überlebenskurve und Therapie Option

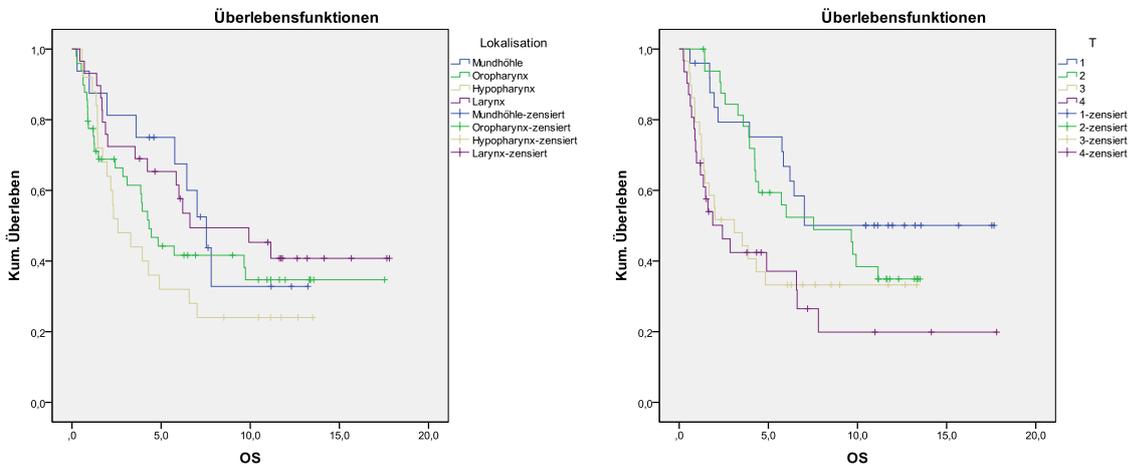


Abbildung 11/12: Lokalisation und T- Klassifikation

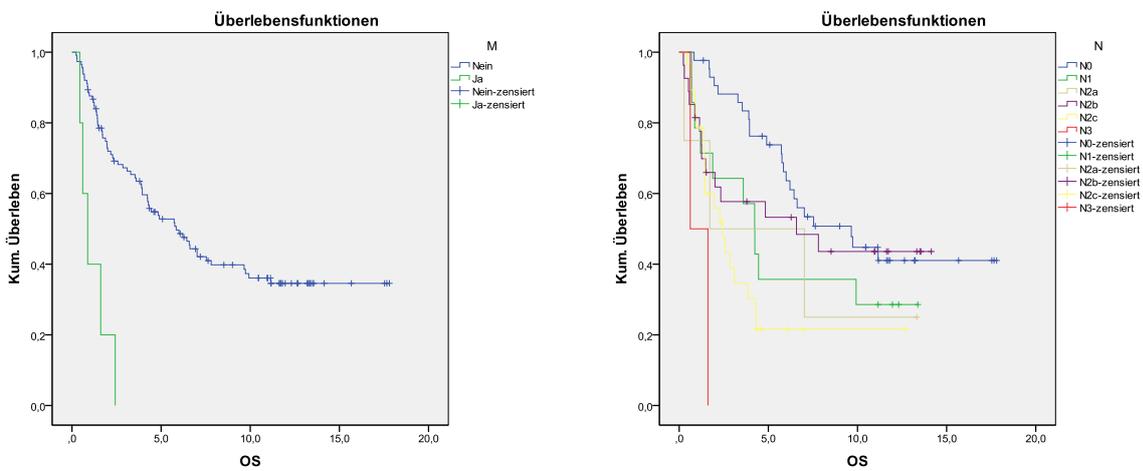


Abbildung 13/14: M- und N-Klassifikation

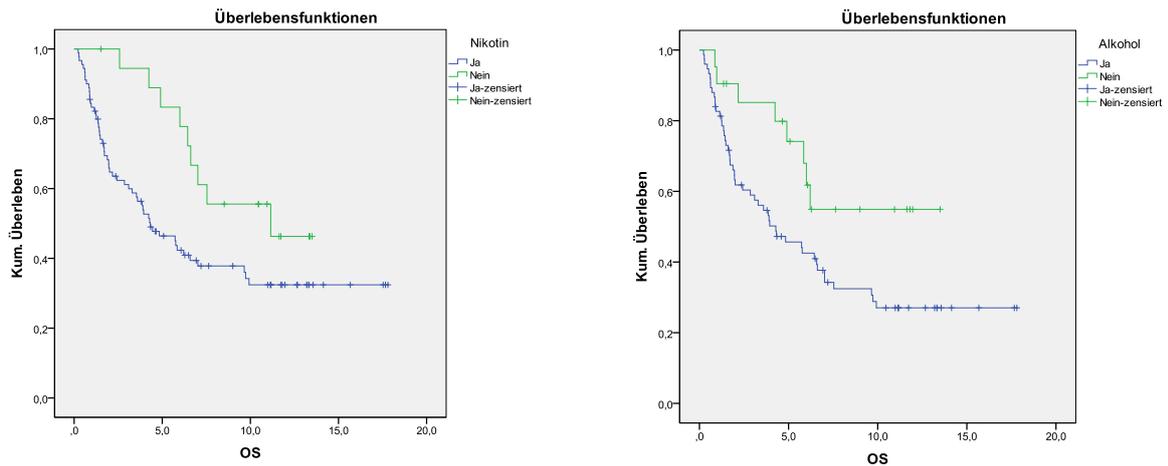


Abbildung 15/16: Nikotin ja/nein und Alkohol ja/nein

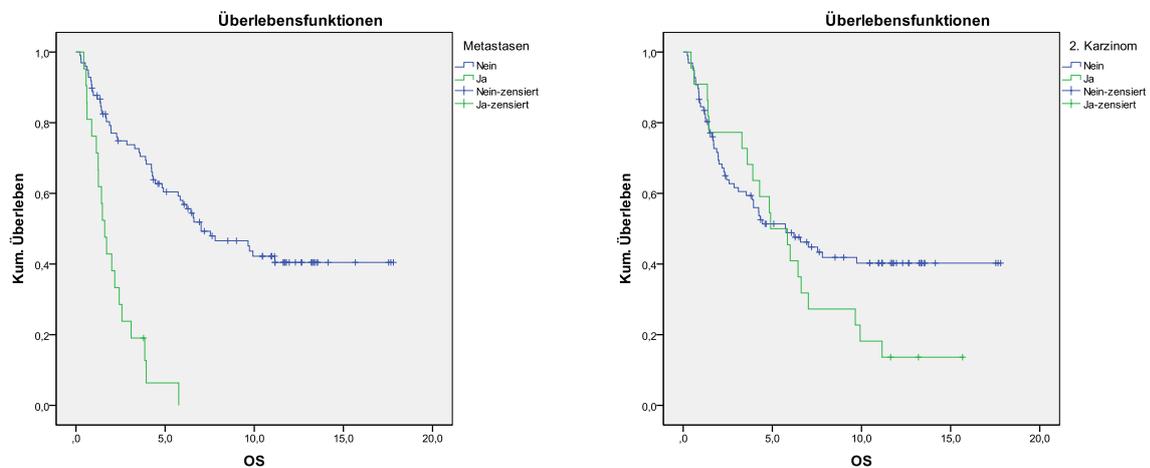


Abbildung 17/18: Metastasen ja/nein und 2. Karzinom ja/nein

3.5.1.2 Überlebenskurve bzgl. TP53 Mutationsstatus

Die nachfolgende Kaplan Meier Kurve beschreibt die Überlebenskurven von Patienten mit Mutationen im TP53 Gen. Hierbei zeigt sich graphisch (Abb. 19), dass die Kurve der Patienten mit einer TP53 Mutation unterhalb der nicht mutierten Patienten verläuft. Eine statistische Signifikanz konnte allerdings nicht gezeigt werden ($p=0,204$).

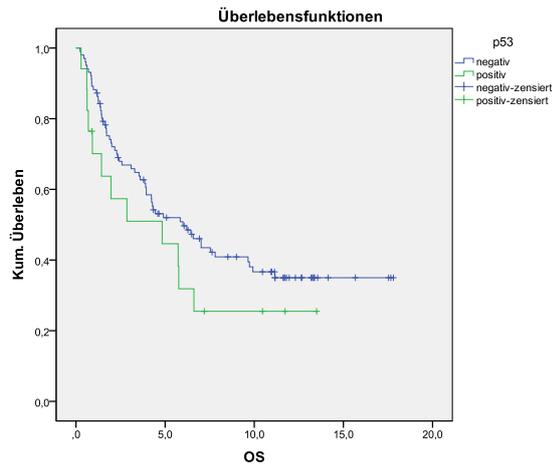


Abbildung 19: TP53 pos. Patienten und TP53 neg. Patienten

3.5.1.3 Korrelation von Patientendaten mit dem Vorliegen von TP53 Mutationen

Die Auswertung der Überlebenskurven in Bezug auf das Vorhandensein von TP53 Mutationen in Abhängigkeit von Patientenparameter wie Therapie Regime, TNM-Klassifikation, Grading, Stadium, Lokalisation, Alkohol-, Nikotinstatus, Auftreten von 2. Karzinom und Rezidiven zeigte keine statistische Signifikanz $p > 0,05$ (siehe Tab. 25).

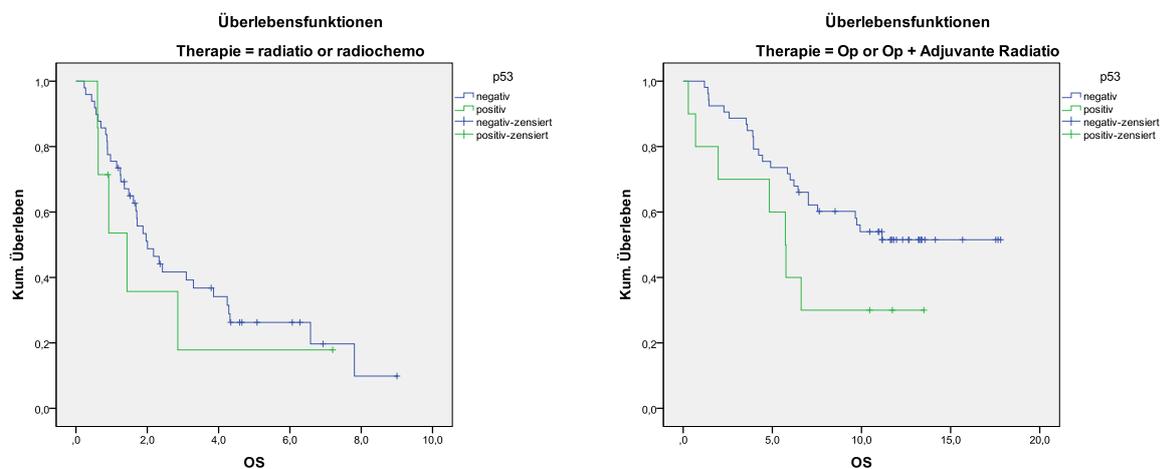


Abbildung 20: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Therapie Regime in Bezug auf TP53 Status pos./neg.

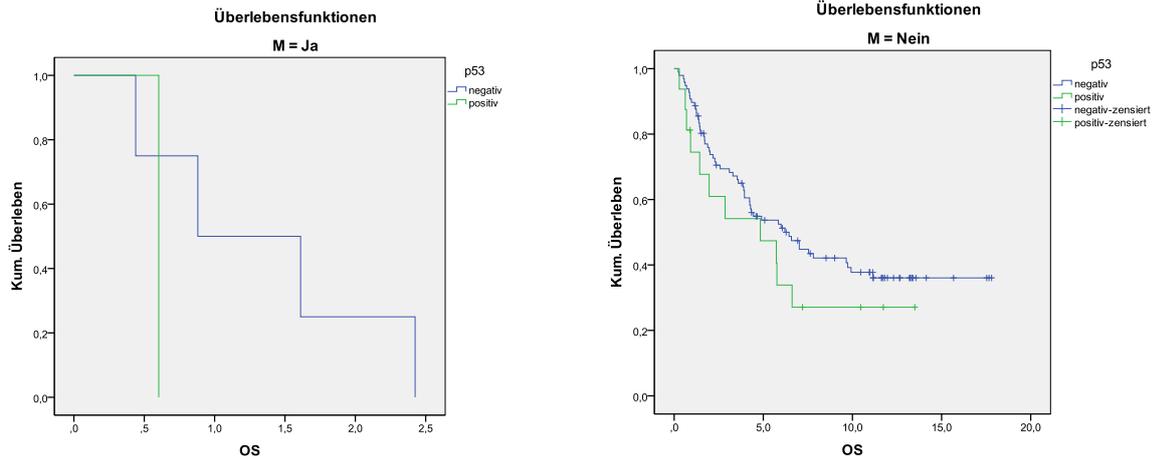


Abbildung 21: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Fernmetastasen ja/nein in Bezug auf TP53 Status pos./neg.

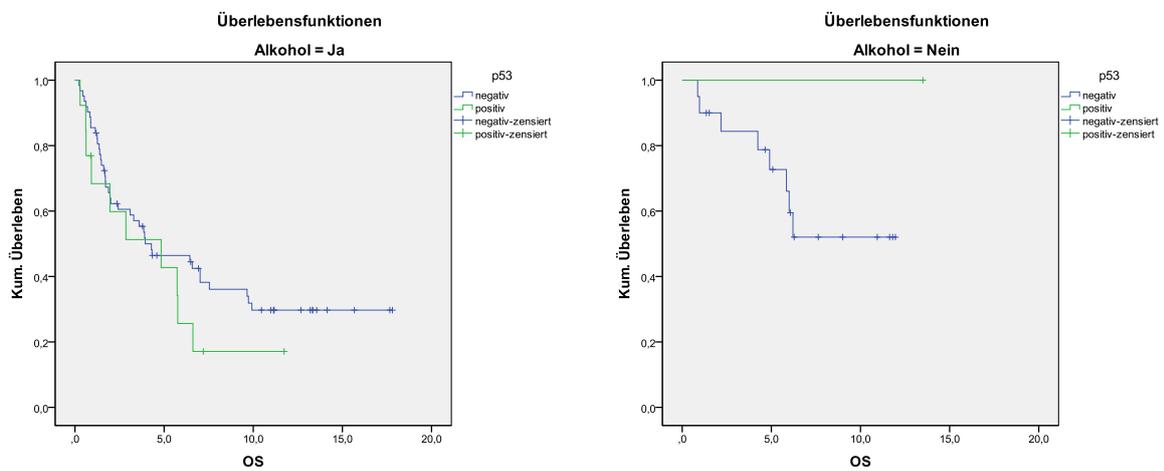


Abbildung 22: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Alkohol ja/nein in Bezug auf TP53 Status pos./neg.

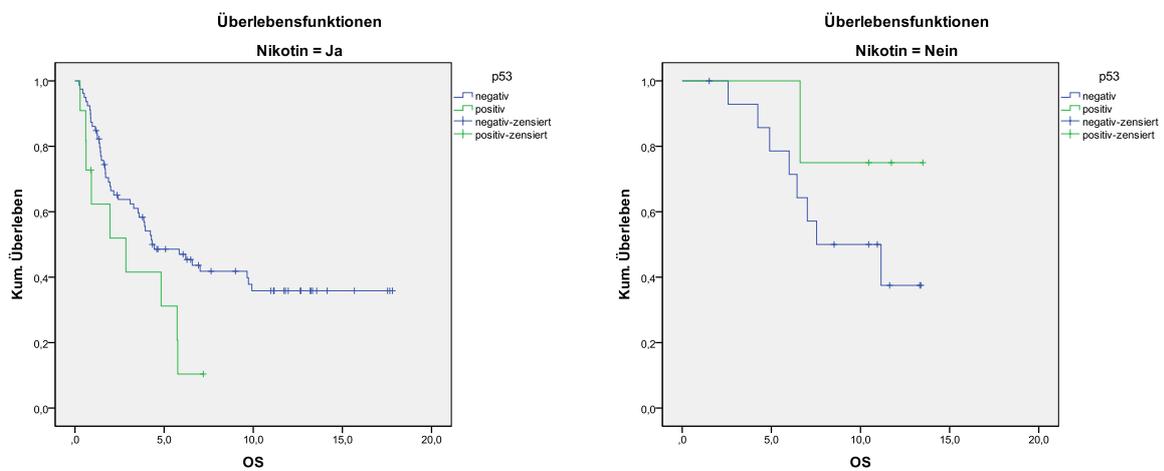


Abbildung 23: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Nikotin ja/nein in Bezug auf TP53 Status pos./neg.

3.5.1.4 Vergleich TP53 Mutationsrate im Tumor- und Normalgewebe

Der Vergleich der Mutationsrate zwischen Tumor- und Normalgewebe erfolgte mittels Fisher's exact test. Das Signifikanzniveau lag bei 0,04. Dieser Wert liegt unterhalb der 5% Grenze und ist somit statistisch signifikant.

3.5.1.5 Auswertung TP53 Mutationsrate im Tumorgewebe und korrespondierendem Normalgewebe

Das Tumorgewebe und das korrespondierende Normalgewebe unterschieden sich hinsichtlich Mutationen im TP53 Gen ($p=0,01$).

3.5.1.6 Korrelation von Patientenparametern und Stk15 Polymorphismus

Aufgrund einer zu niedrigen Fallzahl wurde der Polymorphismus Ile/Ile für die statistische Untersuchung ausgeschlossen. Die Kaplan Meier Kurven in Bezug auf die Parameter Therapie Regime, TNM-Klassifikation, Stadium, Lokalisation, Grading, Alkohol- und Nikotinkonsum, Vorliegen von 2. Karzinom oder Rezidiven zeigten keinen graphischen oder statistischen Zusammenhang $p > 0,05$ (siehe Tab. 25). Abb. 24-26 zeigen einige Beispiele:

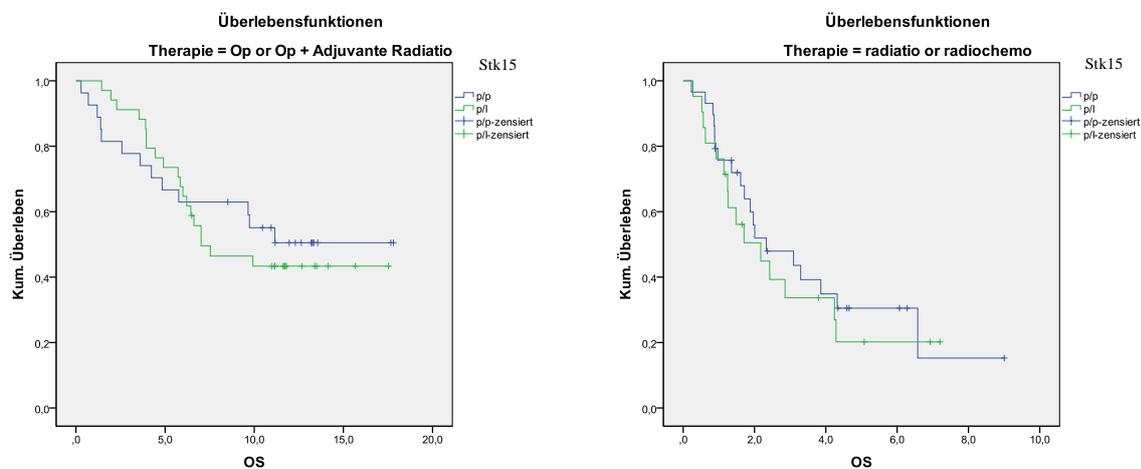


Abbildung 24: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Therapie Op or Op + adjuvante Radiatio oder Radio(chemo) in Bezug auf Stk15 Polymorphismus p/p und p/l.

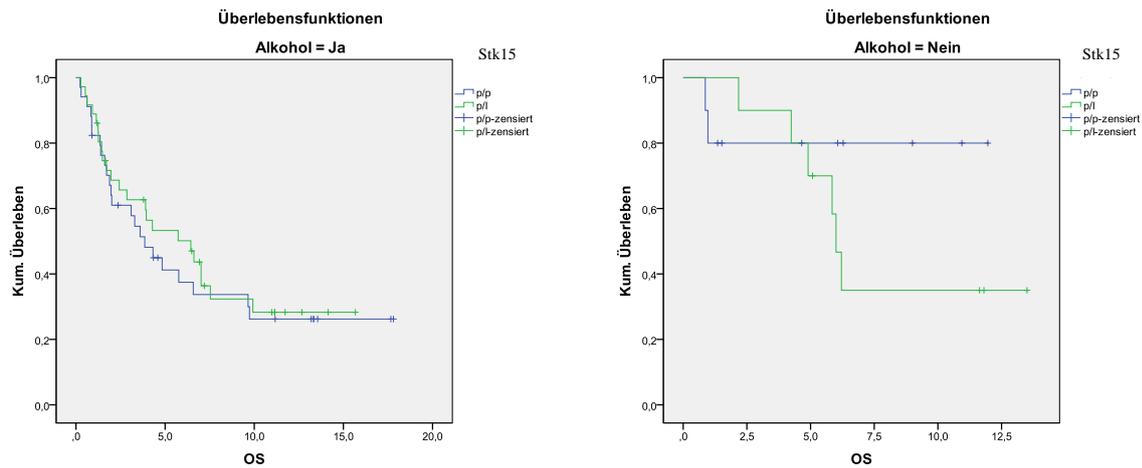


Abbildung 25: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Alkohol ja/nein in Bezug auf Stk15 Polymorphismus p/p und p/l

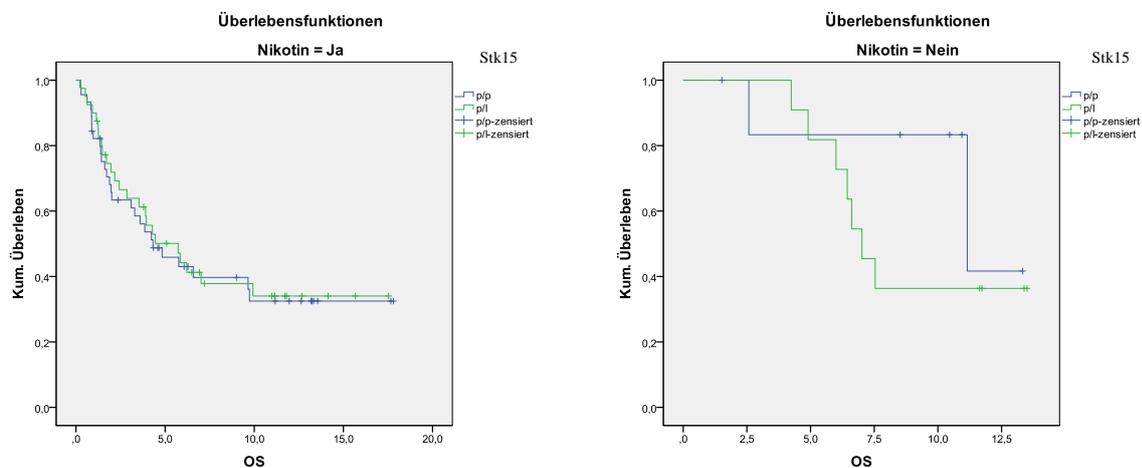


Abbildung 26: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Nikotin ja/nein in Bezug auf Stk15 Polymorphismus p/p und p/l.

3.5.1.7 Korrelation der Patientenparameter mit dem zeitgleichen Vorliegen von TP53 Mutation und Stk15 Polymorphismus

Bei der kombinierten Auswertung TP53 Mutation ja/nein und Stk15 Polymorphismus Phe/Phe und Phe/Ile zeigte keine statistische Signifikanz hinsichtlich Therapie Regime, TNM Klassifikation, Stadium, Lokalisation, Grading, Alkohol- oder Nikotinkonsum, Rezidiv oder dem Vorliegen von 2. Karzinomen $p > 0,05$ (siehe Tab. 25). Abb. 27-28 zeigen einige Beispiele auf.

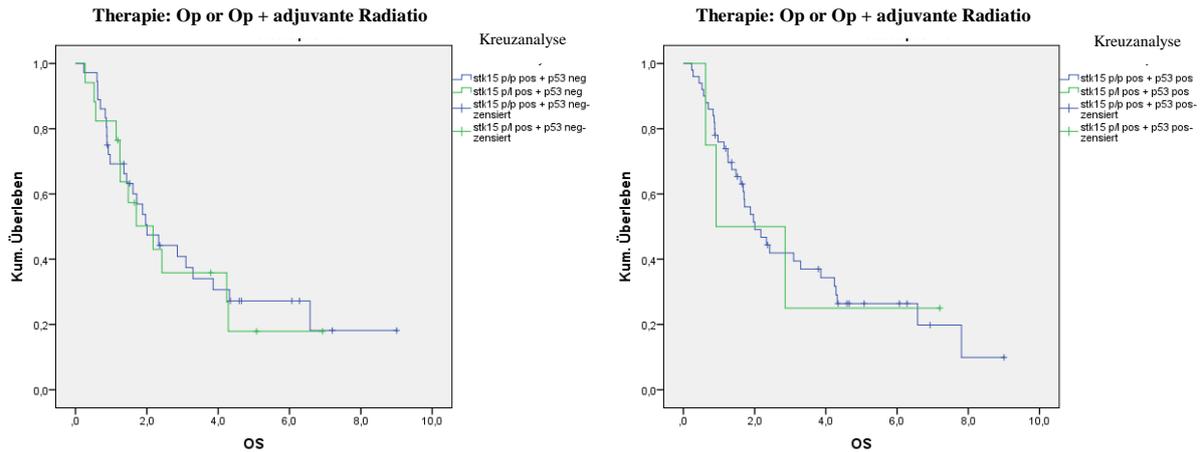


Abbildung 27: Kreuzanalyse Therapie Op or Op + adjuvante Radiatio Stk15 pos./ TP53 neg. und Stk15 pos./TP53 pos.

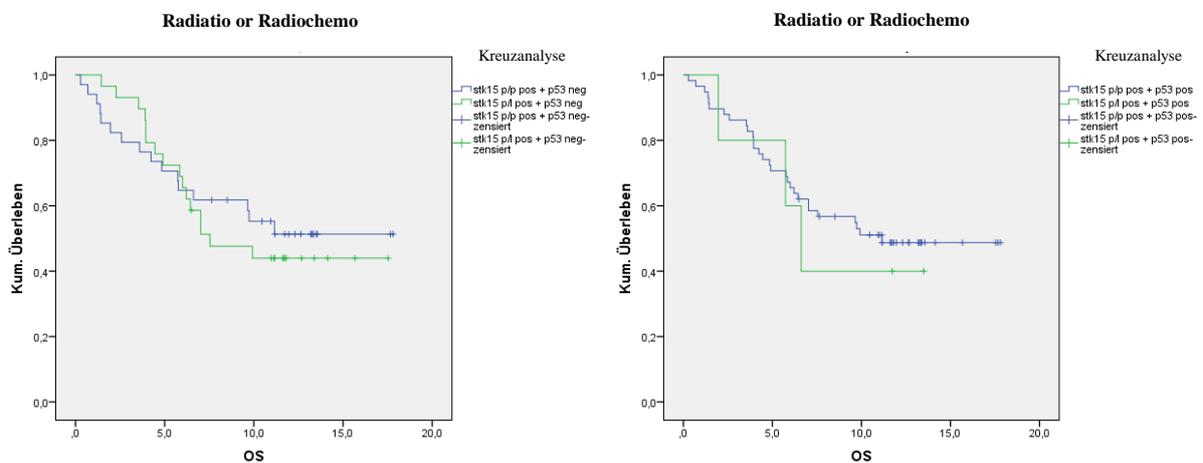


Abbildung 28: Kreuzanalyse Therapie Radiatio or Radiochemo Stk15 pos./ TP53 neg. und Stk15 pos./TP53 pos.

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) stehen weltweit an sechster Stelle der Tumorerkrankungen und führen nicht selten den Tod des Patienten herbei (Hunter et al., 2005, Ragin et al., 2007). Therapieoptionen stellen die Operation oder auch eine kombinierte Radiochemotherapie dar (Mast et al., 2009, Gasparotto and Maestro, 2007). Plattenepithelkarzinome (PECA), die die häufigste Tumorentität im Kopf-Hals-Bereich darstellen, haben bedauerlicherweise bis heute eine sehr schlechte Prognose. Trotz langjähriger Forschung konnte seit mehr als 40 Jahren die Überlebenschancen durch medizinische Therapien wie Bestrahlung, Chemotherapie oder chirurgische Verfahren nicht wesentlich verbessert werden (Hunter et al., 2005). Forscher bemühen sich deshalb

Faktoren auf molekularer Ebene zu identifizieren, um die Prognose der Patienten besser einschätzen zu können. Bis heute scheint die TNM-Klassifikation als klinischer Marker der beste Anhaltspunkt für die Prognoseeinschätzung zu sein. Bisher konnte man eine mögliche Rolle des p53 in der Tumorgenese nachweisen (Symonds et al., 1994). In über 50% der Fälle weisen Tumoren Missens-Mutationen in diesem Protein auf (Hollstein et al., 1994). PECA weisen ebenfalls in der Frühphase der Tumorentstehung Veränderungen im TP53 Gen auf (Thomas et al., 2005). Auch gibt es Untersuchungen, die einen bestimmten Stk15 (Aurora Kinase A) Polymorphismus in Zusammenhang mit Tumoren bringen (Gu et al., 2007, Miao et al., 2004). Doch stehen die klinischen Parameter wie Überleben, TNM-Klassifikation, Therapie Option, Stadium, Lokalisation, Grading, Vorliegen von 2. Karzinom, Rezidiv, Alkohol- oder Nikotinkonsum tatsächlich in Zusammenhang mit Veränderungen im TP53 Gen? Zeigen Varianten des Polymorphismuses von Stk15 womöglich unterschiedliche Prognosen bezüglich der vorhin genannten klinischen Parameter? Solche Zusammenhänge könnten ein Indiz dafür sein, wie molekulare Veränderungen und klinische Parameter die Prognose des Patienten maßgeblich beeinflussen könnten. Umgekehrt können schlechter Lebensstil mit positivem Nikotin- oder Alkoholkonsum auf molekularer Ebene Veränderungen im TP53 oder Stk15 Gen hervorrufen und so die Entstehung von Tumorzellen oder ein aggressiveres Tumorwachstum auch hinsichtlich Metastasierung, starker Gewebsinfiltration oder einer Rezidivneigung begünstigen und damit die klinische Prognose verschlechtern.

4.2 Methoden

4.2.1 PCR

Zur Bestimmung der Mutationen in den „hotspot Regionen“ Exon 5, 6 und 8 im TP53 Gen stellt die Polymerase Kettenreaktion eine etablierte und vor allem sichere Methode dar. Die erstmals von Kary Mullis im Jahre 1970 entwickelte PCR Methode erlaubt die quantitative und/oder qualitative Untersuchung von DNA Abschnitten. Die qualitative Untersuchung erlaubt Genabschnitte zu vermehren und diese zum Beispiel auf Veränderungen zu untersuchen (Mullis, 1990). Dabei arbeitet die PCR mit einer hohen Spezifität (Saiki et al., 1988). Die PCR Methode stellt eine sichere Methode dar und wurde daher in dieser Arbeit Western blot Untersuchungen vorgezogen. Unter Verwendung von Standardprotokollen können die PC-Reaktionen im PCR Gerät ablaufen. In der Vergangenheit verwendete man die Methode um Genabschnitte zu untersuchen (Lamperska et al., 2002, Alsner et al., 2001). Insgesamt wurden in dieser Arbeit 12 HNSCC Zelllinien, 67 Gewebeproben von primär

operierter Patienten mit teilweiser adjuvanter Strahlentherapie, 60 Gewebeproben von Patienten mit einer primären Radio(chemo)therapie und schließlich 64 Gewebeproben von tonsillektomierten Patienten, die als Normalgewebe und somit als Kontrollkollektiv dienen untersucht. Zum Schluss wurden außerdem noch von insgesamt 43 Fällen primär operierter Patienten korrespondierendes Normalgewebe identifiziert und mit in die Untersuchung mit einbezogen.

4.3 Vergleich erwartete Ergebnisse mit den tatsächlichen Ergebnissen

4.3.1 Allgemeine Statistik

Die Überlebenskurven zeigen, dass die Patienten ein deutlich schlechteres Überleben hatten, wenn ein positiver Alkohol- oder Nikotinkonsum vorlag oder wenn bei Erstdiagnose ein fortgeschrittenes Tumorstadium oder Lymphknotenmetastasen vorlagen. Auch wurde das Überleben durch das Auftreten von 2. Karzinomen oder Rezidiven negativ beeinflusst. Letztendlich fand sich auch ein Zusammenhang mit dem Stadium. Im wesentlichen zeigen diese Kurven die allgemein bekannte Tatsache, dass die genannten klinischen Parameter mit einem negativen Vorhersagewert bezogen auf das Überleben verbunden sind (Mast et al., 2009).

4.3.2 TP53

Anhand des oben charakterisierten Patientenkollektivs sollten dann Veränderungen in den „hotspot Regionen“ Exon 5, 6 und 8 untersucht werden, um diese mit den klinischen Daten statistisch in Korrelation zu setzen. Hier sollte die Überlebensprognose von jenen Patienten mit und ohne TP53 Mutation direkt verglichen werden. Ergänzend sollten die TP53 Mutationen mit klinischen Parametern wie Alkohol-, Nikotinkonsum, TNM-Status, Therapie Regime, Differenzierungsgrad, Lokalisation, Stadium, Rezidiv und 2.Karzinom korreliert werden. Ziel der Arbeit war es auch Tumorkollektiv und Kontrollkollektiv bezüglich ihrer Mutationsrate zu prüfen. Dieser Vergleich sollte die Bedeutung der Veränderungen im TP53 Gen aufzeigen. Wir gehen davon aus, dass sich die Ergebnisse vom Normalgewebe deutlich vom Tumorgewebe unterscheiden. Außerdem scheint es interessant zu sein, die separat isolierten korrespondierenden Normalgewebe hinsichtlich der TP53 Mutation zu untersuchen. Solch eine Untersuchung wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Bei der Untersuchung der klinischen Parameter wie TNM-Klassifikation, Stadium und Grading fanden sich keine signifikanten Korrelationen. In einer Arbeit von 2001 wurden ebenfalls keine Korrelationen zwischen TP53 Mutationen und TN-Klassifikation, Grading

oder Tumorlokalisation (Alsner et al., 2001) gefunden. Eine andere Arbeit wiederum konnte Zusammenhänge in der histopathologischen Differenzierung (Grading) und der Tumorlokalisation beobachten, wenn auch ohne statistische Signifikanz (Golusinski et al., 2011).

Im Weiteren fand sich bei den unterschiedlichen Behandlungsregimen (Operation oder Operation mit adjuvanter Strahlentherapie und primärer Radio(chemo)therapie) ein Zusammenhang bezüglich des Vorliegens einer TP53 Mutation. Ähnliches beschrieb auch Alsner. Er fand einen Zusammenhang von TP53 Mutationen und schlechterem Überleben bei Patienten, die eine Bestrahlungstherapie erhielten; doch wurden derartige Zusammenhänge nicht bei operierten Patienten gefunden (Alsner et al., 2001). Der Signifikanz Wert bei unserer Arbeit liegt mit $p=0,086$ oberhalb der festgelegten 5% und ist somit statistisch nicht relevant. Nichtsdestotrotz zeigen die Kurven einen Trend, der auf eine mögliche Rolle des TP53 hinweisen könnte.

Alkohol und/oder Nikotinkonsum sind zweifelsohne einer der wichtigsten Risikofaktoren bei der Entstehung von PECA, weshalb der Alkohol- und Nikotinkonsum in die statistische Auswertung mit einbezogen wurde. Betrachtet man die Kaplan Meier Kurven von den Patienten mit bejahendem Alkohol- und Nikotinstatus, so verläuft die Überlebenskurve der Patienten mit mutiertem TP53 unterhalb der der wild-type TP53. Eine derartige Beobachtung wurde ebenso in der Arbeit von Golusinski 2011 gemacht (Golusinski et al., 2011). Unglücklicherweise konnte die Gegenprüfung mit einem negativen Alkohol- und Nikotinstatus nicht eindeutig geprüft werden, da hier insgesamt weniger Patienten zu Verfügung standen und somit keine statistische Aussage getroffen werden konnte. Trotzdem könnte dies ein Hinweis dafür sein, dass Nichtalkoholiker oder Nichtraucher insgesamt weniger Veränderung im TP53 aufweisen, da ihre Körperzellen nicht den gefährlichen Substanzen ausgesetzt sind. Zur statistischen Bestätigung müssen weitaus mehr Patienten untersucht werden. Eine Signifikanz ($p=0,409$ und $p=0,248$) kann hier, wie bei der Untersuchung von Golusinski, nicht aufgezeigt werden.

Bei der Untersuchung der Parameter Vorliegen von Metastasen, von Rezidiven und 2. Karzinomen wurde ein Trend bei der Korrelation mit dem Vorliegen von TP53 Mutationen verzeichnet. Bei Patienten ohne Metastasen, Rezidiv oder 2. Karzinom haben die Patienten ohne TP53 Mutationen eine bessere Überlebenskurve als die mit den Veränderungen. Hingegen konnte eine solche Verbindung bei denjenigen Patienten mit Metastasen, Rezidiv oder 2. Karzinom nicht aufgezeigt werden. Der Grund liegt hier ebenfalls an der kleinen

Patientenzahl. Insbesondere wurden bei den Einschlusskriterien der Studie mit operativen Vorgehen Patienten mit schlechten klinischen Parametern wie Metastasen, Rezidiv oder fortgeschrittenem Stadium aus dem Kollektiv ausgeschlossen (siehe kritische Beurteilung). In ähnlichen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurden ebenfalls keine statistischen Zusammenhänge mit TP53 Mutationen und dem Auftreten von Metastasen und Rezidiven beschrieben (Alsner et al., 2001).

Im direkten Vergleich zwischen Tumorkollektiv und Kontrollkollektiv besteht ein klarer Unterschied. Mit 17,3% weist das Tumorkollektiv viel mehr Mutationen auf als das Kontrollkollektiv. Hier liegt der Wert bei 4,7%. Der p Wert ist mit 0,04 ein signifikanter Wert. Das Ergebnis zeigt, dass Veränderungen des TP53 Gens weitaus häufiger im Tumor vorkommen. Dies kann auch ein Hinweis darauf sein, dass TP53 Mutationen eine Rolle in den Tumoren spielen. Trotzdem ist 17,3% nicht unbedingt ein hoher Wert. Im Vergleich zu anderen Studien, die bis zu oder mehr als 50% Mutationen fanden, wurden hier deutlich weniger Mutationen entdeckt (Golusinski et al., 2011, Alsner et al., 2001, Poeta et al., 2007). Allerdings sollte hier noch erwähnt werden, dass bei unserer Studie nur drei Exons auf Mutationen untersucht wurden, was den Unterschied erklären könnte.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit auch gezielt das korrespondierende Normalgewebe von Tumorpatienten untersucht. Hierbei konnte allerdings nicht von jedem Tumorpatienten auch Normalgewebe gewonnen werden. Aus 67 Tumorgeweben konnten 43 korrespondierende Normalgewebe untersucht werden. Das Ziel war eine Untersuchung durchzuführen, die genetische Unterschiede zwischen dem Tumorgewebe und dem korrespondierendem Normalgewebe aufdeckt. Auf dieser Weise hätte man Schlüsselveränderungen aufweisen können, die die Tumorentstehung entscheidend beeinflussen. Im korrespondierendem Normalgewebe konnte keine Mutation entdeckt werden. Statistisch zeigt sich hierbei mit einem Wert von $p=0,01$ eine Signifikanz. Zudem belegt dieses Ergebnis die Daten von Califano, bei dessen Tumorprogressionsmodelle TP53 eine frühe Mutation in der Tumorentstehung ist (Califano et al., 1996).

4.3.3 Stk15 Polymorphismus

Das Patientenkollektiv sollte zudem auch auf die verschiedenen Varianten des Stk15 Polymorphismuses hin untersucht werden und ebenfalls mit den klinischen Daten statistisch geprüft werden. Dadurch sollte die Frage beantwortet werden, ob Varianten des Stk15 Polymorphismuses womöglich unterschiedliche Prognosen haben. Der Stk15 Polymorphismus wurde in der Forschung des Öfteren untersucht. Dabei konnte beispielsweise

festgestellt werden, dass dieser eine Rolle beim kolorektalen Karzinom, Bronchielkarzinom, Uterus- oder Ovarialkarzinom spielt (Zhang et al., 2006, Gu et al., 2007, Milam et al., 2007, Dicioccio et al., 2004). Doch konnten andere Untersuchungen an Nierenzell- oder Speiseröhrenkarzinomen einen solchen Zusammenhang nicht bestätigen (Hammerschmied et al., 2007, Wang et al., 2007).

Eine derartige Untersuchung wurde bisher nicht an HNSCC durchgeführt. Unser Ziel war eine solche Untersuchung an einem HNSCC Studienkollektiv durchzuführen und womöglich einen neuen Prognosefaktor zu verifizieren. Bei Korrelationen mit klinischen Parametern konnten keine Signifikanzen erhoben werden. Es zeigte sich auch kein auffallendes Muster, das einem Polymorphismus eine schlechtere klinische Prognose zuschreibt. So kann die Hypothese, dass bestimmte Stk15 Polymorphismen mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sind, nicht bestätigt werden. Daher kann der Stk15 Polymorphismus nicht als prognostischer Parameter dienen, was den Ergebnissen an Nierenzell- oder Speiseröhrenkarzinomen ähnlich ist.

4.3.4 Kombination Stk15 und TP53

Letztendlich sollte noch untersucht werden, ob bei der gemeinsamen Korrelation von Stk15 Polymorphismus und TP53 Mutation mit den klinischen Daten eine Hochrisiko-Patientengruppe identifiziert werden könnte. Es fanden sich allerdings keine signifikanten Korrelationen, so dass das gemeinsame Vorliegen der beiden Parameter wohl zu keiner schlechteren Prognose führt.

4.4 Kritische Beurteilung

Ziel der Arbeit war es molekulare Marker hinsichtlich ihrer Wertigkeit für die Prognose zu untersuchen. Hierfür wurden 139 Tumorproben untersucht. Da allerdings auch weitere klinische Parameter in die Untersuchungen mit eingegangen wurde das Kollektiv für gewisse Faktoren (z.B. Nichtraucher) zu klein, so dass keine statistische Aussage mehr getroffen werden konnte. Da in den Untersuchungen allerdings häufig ein Trend zu verzeichnen war, sollten die Untersuchungen nochmals an einem größeren Kollektiv wiederholt werden.

Zudem sollte noch die Auswahl der Patienten kritisch beleuchtet werden. Wie oben in der Diskussion bereits erwähnt verzeichnen andere Forscher in ihrer Arbeit deutlich mehr Mutationen im TP53 Gen. Verantwortlich dafür könnten die Ausschlusskriterien für das Patientenkollektiv der primär operierten Patienten sein. Patienten mit sehr schlechten klinischen Daten wie erhöhte Leberwerte oder Fernmetastasen wurden ausgeschlossen.

Zudem wurden weit fortgeschrittene Tumorstadien nicht mit einbezogen. Um einen Ausgleich zu schaffen wurden zusätzlich 63 Patienten die eine primäre Radiochemotherapie erhielten und sich somit in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befanden mit untersucht. In einer Folgestudie sollte allerdings eine genaue Aufteilung auf die verschiedenen Stadien erfolgen, so dass ein homogeneres Kollektiv entsteht.

5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches stehen weltweit an sechster Stelle aller Tumorentitäten. Dabei haben sie trotz Verbesserung der Diagnose- und Therapieverfahren eine schlechte 5-Jahres-Überlebensrate. Ziel der Arbeit war es den Stk15 Polymorphismus und TP53 Mutationen hinsichtlich ihrer Relevanz für die Prognoseeinschätzung zu untersuchen.

Im Tumorgewebe fanden sich in 17,3% der Fälle TP53 Mutationen im Gegensatz zum Normalgewebe 4,7%. Das korrespondierende Normalgewebe zeigte keine TP53 Mutationen. Für das Gesamtüberleben zeichnete sich ein Trend zugunsten der nicht mutierten Patienten ab. Eine Signifikanz bei der Untersuchung klinischer Parameter wie TNM-Klassifikation, Stadium, Lokalisation, Grading, Vorliegen von 2. Karzinom, Rezidiv, Alkohol- oder Nikotinabusus und Therapie Regime konnte nicht erhoben werden.

Die Untersuchung des Stk15 Polymorphismus ergab folgendes Bild: Im Tumorgewebe zeigte sich eine Verteilung von 44,1% Phe/Phe, 47,2% Phe/Ile und 2,4% Ile/Ile. Beim Normalgewebe verteilte es sich auf 67,2% Phe/Phe und 32,8% Phe/Ile. Im Normalgewebe wurden kein Ile/Ile Polymorphismus gefunden. Das korrespondierende Normalgewebe zeigte folgende Verteilung: 60,5% Phe/Phe und 34,9% Phe/Ile, auch hier wurden kein Ile/Ile Polymorphismus entdeckt. Korrelationen mit dem Gesamtüberleben und den klinischen Parametern ergaben keine Signifikanz.

Zusammenfassend lässt sich somit keine prognostische Relevanz für den Stk15 Polymorphismus und dem Vorliegen von TP53 Mutationen ableiten.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der HNSCC (Sobin and Wittekind 2002, Boenninghaus and Lenarz, 2007)	6
Tabelle 2: Stadieneinteilung der Karzinome im Kopf-Hals-Bereich (Sobin and Wittekind 2002).....	7
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien (Lin et al., 2007).....	17
Tabelle 4: Geräte	19
Tabelle 5: Puffer/Verbrauchsmaterial	19
Tabelle 6: Primer.....	20
Tabelle 7: Master Mix Inhalt TP53	20
Tabelle 8: Master Mix für Stk 15	20
Tabelle 9: Restriktionsverdau Stk15	20
Tabelle 10: Verbrauchsmaterial	21
Tabelle 11: Auswertungsprogramme	21
Tabelle 12: PCR Programm TP53.....	23
Tabelle 13: Annealing temperature	23
Tabelle 14: Bandenmuster für die Stk15 Allele	25
Tabelle 15: PCR Programm Stk15	26
Tabelle 16: Charakterisierung des Studienkollektivs.....	30
Tabelle 17: forward/reverse Sequenz Exon 5	30
Tabelle 18: Mutationen Exon 5	31
Tabelle 19: forward/reverse Sequenz Exon 6	31
Tabelle 20: Mutationen Exon 6.....	32
Tabelle 21: forward/reverse Sequenz Exon 8	32
Tabelle 22: Mutationen Exon 8.....	33
Tabelle 23: TP53 Anzahl der Mutationen	34
Tabelle 24: Stk15 Polymorphismus Verteilung	35
Tabelle 25: Signifikanzniveaus	36

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hypothetisches Modell für die Karzinogenese in HNSCC (Perez-Ordenez et al. 2006).....	8
--	---

Abbildung 2: Regulation und Wirkung von p53 (Rassow et al., 2006).....	12
Abbildung 3: Veranschaulichung der Mechanismen des Zellzyklusarrests (Rassow et al., 2006).....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Apoptose (Rassow et al., 2006).....	13
Abbildung 5: Beispiel Sequenzierung Exon 5 forward/reverse	30
Abbildung 6: Beispiel Sequenzierung Exon 6 forward/reverse	31
Abbildung 7: Beispiel Sequenzierung Exon 8 forward/reverse	33
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Genotypisierung von Stk15 Codon 91 an Normal- und Tumorgewebe	34
Abbildung 9/10: Überlebenskurve und Therapie Option.....	37
Abbildung 11/12: Lokalisation und T- Klassifikation	37
Abbildung 13/14: M- und N-Klassifikation	37
Abbildung 15/16: Nikotin ja/nein und Alkohol ja/nein	38
Abbildung 17/18: Metastasen ja/nein und 2. Karzinom ja/nein.....	38
Abbildung 19: TP53 pos. Patienten und TP53 neg. Patienten	39
Abbildung 20: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Therapie Regime in Bezug auf TP53 Status pos./neg.....	39
Abbildung 21: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Fernmetastasen ja/nein in Bezug auf TP53 Status pos./neg.....	40
Abbildung 22: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Alkohol ja/nein in Bezug auf TP53 Status pos./neg.....	40
Abbildung 23: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Nikotin ja/nein in Bezug auf TP53 Status pos./neg.....	40
Abbildung 24: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Therapie Op or Op + adjuvante Radiatio oder Radio(chemo) in Bezug auf Stk15 Polymorphismus p/p und p/l. .	41
Abbildung 25: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Alkohol ja/nein in Bezug auf Stk15 Polymorphismus p/p und p/l.....	42
Abbildung 26: Überlebenskurve in Abhängigkeit OS und dem Parameter Nikotin ja/nein in Bezug auf Stk15 Polymorphismus p/p und p/l.....	42
Abbildung 27: Kreuzanalyse Therapie Op or Op + adjuvante Radiatio Stk15 pos./ TP53 neg. und Stk15 pos./TP53 pos.....	43
Abbildung 28: Kreuzanalyse Therapie Radiatio or Radiochemo Stk15 pos./ TP53 neg. und Stk15 pos./TP53 pos.....	43

6.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
aqua dest.	destilliertes Wasser
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
bp	Basenpaar
bzgl.	Bezüglich
CUP	Carcinoma of unkown primary
Cys	Cystein
ddATP	Didesoxyribonukleosidadenosintriphospate
ddCTP	Didesoxyribonukleosidcystosintriphospate
ddGTP	Didesoxyribonukleosidguanintriphospate
ddTTP	Didesoxyribonukleosidthymidinetriphospate
dntp	Desoxyribonukleosidtriphospate
EtBr	Ethidium Bromid
etc.	et cetera
for	forward
g	Gramm
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin

HNSCC	Head and Neck squamous cell carcinoma
Ile	Isoleucin
Ile/Ile	Isoleucin/Isoleucin
inf.	Inferior
inkl.	Inklusive
Leu	Leucin
Met	Methionin
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ND	Neck dissection
neg.	negativ
ng	Nanogramm
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
Op	Operation
OS	Overall Survival
PCR	Polymerasekettenreaktion
PECA	Plattenepithel Carcinom
Phe/Ile	Phenylalanin/Isoleucin
Phe/Phe	Phenylalanin/Phenylalanin
pmol	Pikomol
pos.	positiv
Pro	Prolin

rev.	reverse
rpm	Revolutions per minute
sec.	Sekunde
Tab.	Tabelle
TP53	Tumor Protein 53
Tr.	Tropfen
Trp	Tryptophan
Tyr	Thyrosin
v.a.	vor allem
Val	Valin
vs	Versus
X	Stopcodon

6.4 Literatur

- ADKINS, S. & BURMEISTER, M. 1996. Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem*, 240, 17-23.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., WALTER, P., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. 2002: *Molecular Biology of the Cell*, Verlag Taylor & Francis, 4. Auflage.
- ALGABA, F., TRIAS, I., SANTINELLI, A. & MONTIRONI, R. 2003. TP53 in urologic tumors. *Anal Quant Cytol Histol*, 25, 123-30.
- ALSNER, J., SORENSEN, S. B. & OVERGAARD, J. 2001. TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol*, 59, 179-85.
- APPELLA, E. & ANDERSON, C. W. 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*, 268, 2764-72.
- BARTEK, J. & LUKAS, J. 2001. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett*, 490, 117-22.
- BERLIN 2012. "Krebs in Deutschland 2007/2008". 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
- BISCHOFF, R., J., ANDERSON, L. & AL., E. 1998. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J* 17(11):, 3052-65.
- BÖCKER, W. E. A., H.DENK & P.U.HEITZ 2008. Pathologie. Urban & Fischer Verlag, München. 4. Auflage:203-204.
- BOENNINGHAUS, H.-G. & LENARZ, T. 2007. *HNO; 13.Auflage*
- BRITOS, L., GOYENOLA, G. & ORONO, S. U. 2004. Simple protocol for secondary school hands-on activity: Electrophoresis of pre-stained nucleic acids on agar-agar borate gels. *Biochem Mol Biol Educ*, 32, 341-7.
- BUDACH, W., HEHR, T., BUDACH, V., BELKA, C. & DIETZ, K. 2006. A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer*, 6, 28.
- CALIFANO J., VAN DER RIET P., WESTR W., NAWROZ H., CLAYMAN G., PIANTADOSI S., CORIO R., LEE D., GREENBERG B., KOCH W. & SIDRANSKY G. 1996. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996;56:2488–2492.
- CARPENTER, J. M., SYMS, M. J. & SNIEZEK, J. C. 2005. Oral carcinoma associated with betel nut chewing in the Pacific: an impending crisis? *Pac Health Dialog*, 12, 158-62.
- DAR, A. A., GOFF, L. W., MAJID, S., BERLIN, J. & EL-RIFAI, W. 2010. Aurora kinase inhibitors--rising stars in cancer therapeutics? *Mol Cancer Ther*, 9, 268-78.
- DICIOCCIO, R. A., SONG, H., WATERFALL, C., KIMURA, M. T., NAGASE, H., MCGUIRE, V., HOGDALL, E., SHAH, M. N., LUBEN, R. N., EASTON, D. F., JACOBS, I. J., PONDER, B. A., WHITTEMORE, A. S., GAYTHER, S. A., PHAROAH, P. D. & KRUGER-KJAER, S. 2004. STK15 polymorphisms and association with risk of invasive ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13, 1589-94.
- FORTIN, A., COUTURE, C., DOUCET, R., ALBERT, M., ALLARD, J. & TETU, B. 2001. Does histologic grade have a role in the management of head and neck cancers? *J Clin Oncol*, 19, 4107-16.

- GANCI, F., CONTI, S., FONTEMAGGI, G., MANCIOCCO, V., DONZELLI, S., COVELLO, R., MUTI, P., STRANO, S., BLANDINO, G. & SPRIANO, G. 2011. Allelic expression imbalance of TP53 mutated and polymorphic alleles in head and neck tumors. *OMICS*, 15, 375-81.
- GARDEN, A. S., MORRISON, W. H., CLAYMAN, G. L., ANG, K. K. & PETERS, L. J. 1996. Early squamous cell carcinoma of the hypopharynx: outcomes of treatment with radiation alone to the primary disease. *Head Neck*, 18, 317-22.
- GASPAROTTO, D. & MAESTRO, R. 2007. Molecular approaches to the staging of head and neck carcinomas (review). *Int J Oncol*, 31, 175-80.
- GATH, H. J. & BRAKENHOFF, R. H. 1999. Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 18, 109-26.
- GEORGE, B., DATAR, R. H., WU, L., CAI, J., PATTEN, N., BEIL, S. J., GROSHEN, S., STEIN, J., SKINNER, D., JONES, P. A. & COTE, R. J. 2007. p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*, 25, 5352-8.
- GIET, R. & PRIGENT, C. 1999. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci*, 112, 3591-601.
- GILLISON ML., KOCH WM., CAPONE RB., SAFFORD M., WESTRA WH., WU L., ZAHURAK ML., DANIEL RW., VIGLIONE M., SYMER DE., SHAH KV. & SIDRANSKY D. 2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92(9): 709-20.
- GOLUSINSKI, P., LAMPERSKA, K., PAZDROWSKI, J. & GOLUSINSKI, W. 2011. Analysis of mutations within the TP53 gene in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Pol*, 65, 114-21.
- GU, J., GONG, Y., HUANG, M., LU, C., SPITZ, M. R. & WU, X. 2007. Polymorphisms of STK15 (Aurora-A) gene and lung cancer risk in Caucasians. *Carcinogenesis*, 28, 350-5.
- HAMMERSCHMIED, C. G., STOEHR, R., WALTER, B., WIELAND, W. F., HARTMANN, A., BLASZYK, H. & DENZINGER, S. 2007. Role of the STK15 Phe31Ile polymorphism in renal cell carcinoma. *Oncol Rep*, 17, 3-7.
- HARRIS, S. L. & LEVINE, A. J. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24, 2899-908.
- HARTL, D. 2007. Transoral laser resection for head and neck cancers. *Bull Cancer*, 94, 1081-6.
- HITTELMAN, W. N., VORAVUD, N., SHIN, D. M., LEE, J. S., RO, J. Y. & HONG, W. K. 1993. Early genetic changes during upper aerodigestive tract tumorigenesis. *J Cell Biochem Suppl*, 233-6.
- HOLLSTEIN, M., RICE, K., GREENBLATT, M. S., SOUSSI, T., FUCHS, R., SORLIE, T., HOVIG, E., SMITH-SORENSEN, B., MONTESANO, R. & HARRIS, C. C. 1994. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, 22, 3551-5.
- HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B. & HARRIS, C. C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 49-53.
- HUNTER, K. D., PARKINSON, E. K. & HARRISON, P. R. 2005. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 5, 127-35.
- ISOBE, M., EMANUEL, B. S., GIVOL, D., OREN, M. & CROCE, C. M. 1986. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, 320, 84-5.

- JACOB, B. J., STRAIF, K., THOMAS, G., RAMADAS, K., MATHEW, B., ZHANG, Z. F., SANKARANARAYANAN, R. & HASHIBE, M. 2004. Betel quid without tobacco as a risk factor for oral precancers. *Oral Oncol*, 40, 697-704.
- JUNGEHULSING, M., SCHEIDHAUER, K., DAMM, M., PIETRZYK, U., ECKEL, H., SCHICHA, H. & STENNERT, E. 2000. 2[F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography is a sensitive tool for the detection of occult primary cancer (carcinoma of unknown primary syndrome) with head and neck lymph node manifestation. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 123, 294-301.
- KAO, J., LAVAF, A., TENG, M. S., HUANG, D. & GENDEN, E. M. 2008. Adjuvant radiotherapy and survival for patients with node-positive head and neck cancer: an analysis by primary site and nodal stage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 71, 362-70.
- KELSEY, K. T., HIRAO, T., HIRAO, S., DEVI-ASHOK, T., NELSON, H. H., ANDREW, A., COLT, J., BARIS, D., MORRIS, J. S., SCHNED, A. & KARAGAS, M. 2005. TP53 alterations and patterns of carcinogen exposure in a U.S. population-based study of bladder cancer. *Int J Cancer*, 117, 370-5.
- KERN, S. E., KINZLER, K. W., BRUSKIN, A., JAROSZ, D., FRIEDMAN, P., PRIVES, C. & VOGELSTEIN, B. 1991. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*, 252, 1708-11.
- LAMPERSKA, K., KAREZEWSKA, A., KWIATKOWSKA, E. & MACKIEWICZ, A. 2002. Analysis of mutations in the p16/CDKN2A gene in sporadic and familial melanoma in the Polish population. *Acta Biochim Pol*, 49, 369-76.
- LANDEN, JR., C. N., LIN, Y. G. & AL., E. 2007. Overexpression of the centrosomal protein Aurora-A kinase is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 13(14):, 4098-104.
- LIN, C. J., GRANDIS, J. R., CAREY, T. E., GOLLIN, S. M., WHITESIDE, T. L., KOCH, W. M., FERRIS, R. L. & LAI, S. Y. 2007. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck*, 29, 163-88.
- MAHDAVINIA, M., BISHEHSARI, F., VERGINELLI, F., CUMASHI, A., LATTANZIO, R., SOTOUDEH, M., ANSARI, R., SEMERARO, D., HORMAZDI, M., FAKHERI, H., RAKHSHANI, N., DE LELLIS, L., CURIA, M. C., CAMA, A., PIANTELLI, M., MALEKZADEH, R., IACOBELLI, S. & MARIANI-COSTANTINI, R. 2008. P53 mutations in colorectal cancer from northern Iran: Relationships with site of tumor origin, microsatellite instability and K-ras mutations. *J Cell Physiol*, 216, 543-50.
- MAO, L., LEE, J. S., FAN, Y. H., RO, J. Y., BATSAKIS, J. G., LIPPMAN, S., HITTELMAN, W. & HONG, W. K. 1996. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med*, 2, 682-5.
- MAST, G., F. Z., S.IHRLER & A.KOLK, C. M. A. 2009. MANUAL Kopf-Hals-Malignome. *Zuckschwerdt Verlag München Wien New York*. 4. Auflage.
- MATLASHEWSKI, G., LAMB, P., PIM, D., PEACOCK, J., CRAWFORD, L. & BENCHIMOL, S. 1984. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J*, 3, 3257-62.
- MAY, P. & MAY, E. 1999. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, 18, 7621-36.
- MCBRIDE, MERRY D & D., G. 1986. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Nature*.

- MENDENHALL, W. M., PARSONS, J. T., STRINGER, S. P., CASSISI, N. J. & MILLION, R. R. 1990. Carcinoma of the supraglottic larynx: a basis for comparing the results of radiotherapy and surgery. *Head Neck*, 12, 204-9.
- MERCER, W. E. 1998. Checking on the cell cycle. *J Cell Biochem Suppl*, 31, 50-4.
- MEURMAN, J. H. & UITTAMO, J. 2008. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. *Acta Odontol Scand*, 66, 321-6.
- MIAO, X., SUN, T., WANG, Y., ZHANG, X., TAN, W. & LIN, D. 2004. Functional STK15 Phe31Ile polymorphism is associated with the occurrence and advanced disease status of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 64, 2680-3.
- MILAM, M. R., GU, J., YANG, H., CELESTINO, J., WU, W., HORWITZ, I. B., LACOUR, R. A., WESTIN, S. N., GERSHENSON, D. M., WU, X. & LU, K. H. 2007. STK15 F31I polymorphism is associated with increased uterine cancer risk: a pilot study. *Gynecol Oncol*, 107, 71-4.
- MULLIS, K. B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin*, 48, 579-82.
- O'BRIEN, C. J., SMITH, J. W., SOONG, S. J., URIST, M. M. & MADDOX, W. A. 1986. Neck dissection with and without radiotherapy: prognostic factors, patterns of recurrence, and survival. *Am J Surg*, 152, 456-63.
- PEREZ-ORDONEZ, B., BEAUCHEMIN, M. & JORDAN, R. C. 2006. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol*, 59, 445-53.
- PETROVIC, D., MUZIKRAVIC, L. & JOVANOVIC, D. 2007. Metastases of unknown origin--principles of diagnosis and treatment. *Med Pregl*, 60, 29-36.
- PIGNON, J. P., BOURHIS, J., DOMENGE, C. & DESIGNE, L. 2000. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet*, 355, 949-55.
- POETA, M. L., MANOLA, J., GOLDWASSER, M. A., FORASTIERE, A., BENOIT, N., CALIFANO, J. A., RIDGE, J. A., GOODWIN, J., KENADY, D., SAUNDERS, J., WESTRA, W., SIDRANSKY, D. & KOCH, W. M. 2007. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 357, 2552-61.
- RAGIN, C. C., MODUGNO, F. & GOLLIN, S. M. 2007. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res*, 86, 104-14.
- RASSOW J., HAUSER K., NETZKER R. & DEUTZMANN R. 2006. In *Duale Reihe Lehrbuch für Biochemie: Zellzyklus, Apoptose & molekulare Onkologie*. Bob A. & K. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 1. Auflage, 512-534.
- REITER, R., P. GAIS & AL., E. 2006. Aurora kinase A messenger RNA overexpression is correlated with tumor progression and shortened survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12(17):, 5136-41.
- ROBBINS, K. T., MEDINA, J. E., WOLFE, G. T., LEVINE, P. A., SESSIONS, R. B. & PRUET, C. W. 1991. Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 117, 601-5.
- ROBBINS, K. T., SHAHA, A. R., MEDINA, J. E., CALIFANO, J. A., WOLF, G. T., FERLITO, A., SOM, P. M. & DAY, T. A. 2008. Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 134, 536-8.

- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-91.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SCHLECHTE, H., LENK, S. V., LONING, T., SCHNORR, D., RUDOLPH, B. D., DITSCHERLEIN, G. & LOENING, S. A. 1998. p53 tumour suppressor gene mutations in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Eur Urol*, 34, 433-40.
- SCHULER, M. & GREEN, D. R. 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 29, 684-8.
- SEN, S., ZHOU, H. & WHITE, R. A. 1997. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 14, 2195-200.
- SHANMUGARATNAM, K. & SOBIN, L. H. 1993. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition. *Cancer*, 71, 2689-97.
- SILVERMAN, S., JR., GORSKY, M. & LOZADA, F. 1984. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer*, 53, 563-8.
- SOBIN AND WITTEKIND 2002. TNM-Classification of malignant tumours. *John Wiley & Sons Inc. 6th edition*.
- STEUER-VOGT, M. K., V. BONKOWSKY, et al. (2001). The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: a randomised controlled clinical trial. *Eur J Cancer* 37(1): 23-31.
- STEUER-VOGT, M. K., V. BONKOWSKY, et al. (2006). Influence of ML-1 standardized mistletoe extract on the quality of life in head and neck cancer patients: *Hno* 54(4): 277-86.
- SYMONDS, H., KRALL, L., REMINGTON, L., SAENZ-ROBLES, M., LOWE, S., JACKS, T. & VAN DYKE, T. 1994. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, 78, 703-11.
- TATSUKA, M., SATO, S., KANDA, A., MIKI, T., KAMATA, N., KITAJIMA, S., KUDO, Y. & TAKATA, T. 2009. Oncogenic role of nuclear accumulated Aurora-A. *Mol Carcinog*, 48, 810-20.
- THOMAS, G. R., NADIMINTI, H. & REGALADO, J. 2005. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol*, 86, 347-63.
- VAN DER RIET, P., NAWROZ, H., HRUBAN, R. H., CORIO, R., TOKINO, K., KOCH, W. & SIDRANSKY, D. 1994. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res*, 54, 1156-8.
- WANG, N., WANG, G. Y., GUO, W., DONG, X. J. & LI, Y. 2007. Study on the association between STK15 Phe31Ile polymorphisms and esophageal squamous cell carcinoma. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 28, 394-7.
- ZHANG, W. J., MIAO, X. P., SUN, T., ZHANG, X. M., QU, S. N., TAN, W., XIONG, P., ZHENG, R. & LIN, D. X. 2006. Association between genetic polymorphism in STK15 and risk of colorectal cancer in a Chinese population. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 28, 43-6.
- ZIEMER, M. A., MASON, A. & CARLSON, D. M. 1982. Cell-free translations of proline-rich protein mRNAs. *J Biol Chem*, 257, 11176-80.

6.5 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. med. Bier bedanken, dafür dass ich in seiner Abteilung Hals-Nasen-Ohren Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar promovieren durfte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter PD Dr. med. Anja Pickhard, die mich stets mit guter menschlicher und fachlicher Betreuung während meiner Promotionszeit begleitet hat. Ihre fachliche Kompetenz, konstruktive Kritik und nicht zuletzt ihr enormes Engagement ermöglichte mir meine Dissertation fertigzustellen. Zudem möchte ich Herrn Guido Piontek für die tolle Betreuung hinsichtlich Hilfestellung im Labor und Korrekturlesen bedanken. Für die Hilfestellung bei der Auswertung der Ergebnisse möchte ich mich bei Herrn Bettstetter bedanken. Zuletzt geht mein Dank an allen Patienten, die letztendlich diese Doktorarbeit ermöglicht haben und so zum wissenschaftlichen Fortschritt beitragen.

Außerdem bedanke ich mich bei meinem Freund Thomas David für die unermüdliche Unterstützung und motivierender Worte während meiner Promotionszeit.

7 Abstract

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches stehen weltweit an sechster Stelle aller Tumorentitäten mit einer schlechten 5-Jahres-Überlebensrate. Es sollte nun der Stk15 Polymorphismus und TP53 Mutationen hinsichtlich ihrer Prognoserelevanz untersucht werden. Es zeigte sich, dass TP53 Mutationen deutlich häufiger in Tumorgeweben zu finden waren als im Normalgewebe. Auch der heterozygote Stk15 Polymorphismus Phe/Ile lag im Tumor häufiger vor. Korrelationen mit dem Gesamtüberleben und klinischen Parametern ergaben allerdings keine Signifikanz.