



Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der
Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
Direktor: Prof. Dr. Dr. Klaus Dietrich Wolff

*Erstellung eines TMA und Bestimmung der
Expression von CD44 und Nanog*

Christiane Dorfner

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

Doktors der Zahnheilkunde

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. Andreas Kolk

2. Prof. Dr. Herbert Deppe

Die Dissertation wurde am 13.12.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2019 angenommen.

I.	Einleitung	1
1.	Das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich.....	1
1.1.	Epidemiologie, Ätiologie und Karziogenese	1
1.2.	Diagnose und Klinik.....	2
1.3.	Lokalisation, Klassifikationen und Grading.....	2
2.	Therapie.....	9
2.1.	Konservative Therapie	9
2.2.	Tumormarker und Biomarker als Therapieansätze	10
3.	CD44	12
3.1.	Die Struktur	12
3.2.	Expression und Funktion von CD44	14
3.3.	Rolle bei Karzinomentstehung	16
4.	Nanog	18
4.1.	Struktur.....	18
4.2.	Expression und Funktion.....	19
4.3.	Nanog im Karzinom	22
5.	Zusammenspiel von Nanog und CD44	23
6.	Zielsetzung der Arbeit	24
II.	Materialien und Methoden	25
1.	Materialien.....	25
1.1.	Chemikalien	25
1.2.	Antikörper	26
1.3.	Geräte	27
1.4.	Patientengewebeproben.....	27
2.	Methoden.....	30
2.1.	Versuchsdurchführung	30
2.2.	Immunhistochemische Auswertung von CD44 und Nanog.....	31
2.3.	Statistik.....	35
2.4.	Störfaktoren	36
III.	Ergebnisse von CD44	37
1.	Verteilung der Expression von CD44 im Tumorzentrum, an der Invasionsfront und in den Lymphknotenmetastasen	37
2.	Die membranständige Expression von CD44 in Korrelation mit den klinisch- pathologischen Daten (Grading, T-Stadium, N-Stadium, UICC-Stadium, Alter und Geschlecht, L1-Status, Pn1-Status)	39
2.1.	Grading	39
2.2.	T-Stadium.....	39

2.3.	N-Stadium	40
2.4.	UICC-Stadium.....	40
2.5.	Alter und Geschlecht	41
2.6.	Lymphangiosis carcinomatosa (L1-Status).....	42
2.7.	Perineuralscheideninfiltration (Pn1-Status)	42
3.	Die membranständige Expression von CD44 in Korrelation zur Überlebenszeit (OS/DSS/DFS)	43
4.	Die membranständige Expression von CD44 in Korrelation zu Untergruppen des Rezidivs (Lokalrezidiv, Lymphknotenrezidiv, Fernrezidiv).....	48
4.1.	Lokalrezidiv	48
4.2.	Lymphknotenrezidiv	51
4.3.	Fernrezidiv	51
IV.	Ergebnisse von Nanog	52
1.	Verteilung der Expression von Nanog im Tumorzentrum, an der Invasionsfront und in den Lymphknotenmetastasen	52
2.	Die Expression von Nanog in Korrelation in Korrelation mit den klinisch-pathologischen Daten (Grading, T-Stadium, N-Stadium, UICC-Stadium, L1-Status, Pn1-Status, Alter und Geschlecht).....	55
2.1.	Grading.....	55
2.2.	T-Stadium.....	55
2.3.	N-Stadium	56
2.4.	UICC-Stadium.....	56
2.5.	Alter und Geschlecht	57
2.6.	Lymphangiosis carcinomatosa (L1-Status).....	57
2.7.	Perineuralscheideninfiltration (Pn1-Status)	58
3.	Die Expression von Nanog in Korrelation zur Überlebenszeit (OS/DSS/DFS)	59
4.	Die Expression von Nanog in Korrelation zu Untergruppen des Rezidivs (Lokalrezidiv, Lymphknotenrezidiv, Fernrezidiv).....	61
4.1.	Lokalrezidiv	61
4.2.	Lymphknotenrezidiv	63
4.3.	Fernrezidiv	64
V.	Die Korrelation der Expression der Tumormarker untereinander	65
1.	Die Expression der Marker im Zentrum des Tumors zur Expression an der Tumorfront	65
1.1.	CD44	65
1.2.	Nanog	65
2.	Die Expression des Tumormarkers im Lymphknoten in Korrelation zur Expression im Tumorzentrum	67
2.1.	CD44	67

2.2. Nanog	67
3. Die Expression des Tumormarkers im Lymphknoten in Korrelation zur Expression an der Invasionsfront des Tumors.....	68
3.1. CD44	68
3.2. Nanog	68
4. Korrelation zwischen Nanog Kern und Zytoplasma	68
5. Die Expression von CD44 in Korrelation zur Expression von Nanog.....	68
VI. Diskussion.....	69
1. Signifikante, aussagekräftige Ergebnisse CD44	70
2. Signifikante, aussagekräftige Ergebnisse für Nanog.....	73
3. Tumormarker untereinander	75
4. Klinischer Ausblick.....	76
VII. Zusammenfassung	78
VIII. Literaturverzeichnis	80
IX. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	102
X. Publikationen	105
XI. Danksagung.....	106

Verzeichnis der Abkürzungen

AD	Antibody Diluent, Antikörper-Verdünnungsmittel
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BALB/c	laborgezüchtete Albino-Hausmäuse
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CAAT-Domäne	Bindungsstelle im Gen, 80 Nucleotide stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle
CD2	zweite Transaktivierungsstelle von NANOG
CD44	ein Glykoprotein
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CpG-Inseln	Regionen im Genom von Eukaryoten mit statistisch erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte
c-Src	Tyrosinkinase Src (zusammengesetztes Akronym aus cellular und sarcoma)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAB	Diaminobenzidin
DFS	disease-free
DNA	Deoxiribonucleic acid
DSS	disease-specific
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
ES- Zellen	Embryonale-Stammzellen
EZM	Extrazelluläre Membran
Fa.	Firma
FoxD3	ein Transkriptionsfaktor
g	Gramm
G1-Phase	Gap-Phase
Gl.	Glandula
gp130	Interleukin-6-Transducer-Chain, ein Protein
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray

h	hour, Stunde
H3K4	Lysin 4 von Histon 4
H3K9	Lysin 3 von Histon 9
HA	Hyaluronan
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HRP	Horseradish peroxidase
IL1A	Interleukin 1 Alpha, ein Zytokin
IRS	Immunreaktivitäts-Score
kDA	Kilodalton
LIF	Leukemia inhibitory factor, ein Zytokin
LK	Lymphknoten
MAP	Mitogen-activated-protein
miR-21	microRNA 21
ml	Milliliter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NANOG	ein Transkriptionsfaktor
Nk-2-Gen	Transkriptionsfaktor
N-Stadium	Nodus-Status
N-Termuns	Amino-Terminus
Oct4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor
OS	overall-specific
p16	CDK-Inhibitor 2A (Abkürzung von cyclin dependent kinase inhibitor 2A)
p300	ein Protein
p53	ein Protein, ein Transkriptionsfaktor
PP	ein Prozent-Score
pTNM	P = pathologisch, T = Tumor, N = Nodus, M = Metastasen
Ras	Rat sarcoma, ein Onkogen
Rho-GTPase	Ras homologue → Ras gehört zur Superfamilie der kleinen GTPasen mit einer molaren Masse von 20 bis 40 kDa
RNA	Ribonukleinsäure
Sall4	Spalt Like Transcription Factor 4

SCC	Squamos-Cell-Carcinoma
SCCA	Squamos-Cell-Carcinoma-Antigen
SI	ein Intensitäts-Score
Sox-2	Transkriptionsfaktor
Sp1-Box	Promotor-Element
SPSS	Marke der Softwarefirma IBM, unter welcher Statistik- und Analyse-Software entwickelt und vertrieben wird
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3, ein Transkriptionsfaktor
TATA-Box	Promotorregion eines Gens
T(Brachyury)	ein Protein, ein Transkriptionsfaktor
TCF3	Transkriptionsfaktor 3
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNM	Tumor Nodus Metastasen
T-Stadium	Tumor-Stadium
UICC-(Status)	Union internationale contre le cancer-(Status)
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslated region
WHO	World Health Organization
WR	erste Transaktivierungsstelle von NANOG
Zyto	Zytoplasma

I. Einleitung

1. Das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich

1.1. Epidemiologie, Ätiologie und Karziogenese

Nach den Erkenntnissen des Robert Koch Instituts erkrankten in Deutschland im Jahr 2012 rund 478.000 Menschen an Krebs. Die häufigste Tumorart bei Männern ist Prostatakrebs, bei Frauen Brustkrebs. Nach dem Lungen- und Darmkrebs spielt auch das Plattenepithelkarzinom im Hals-Kopf-Bereich eine große Rolle (Robert-Koch-Institut 2015).

Laut WHO ist das Plattenepithelkarzinom im Larynx und im Pharynx die meist vorkommende existente Malignität (Cardesa et al. 2005). Während das Vorkommen dieses Malignoms im Kopf-Hals-Bereich in hochentwickelten Ländern, wie Deutschland, derzeit noch etwas geringer ist, ist es in unterentwickelten Ländern, wie im südlichen Asien, bereits die häufigste Tumorart (Parkin et al. 1999). Bei Männern tritt dieses Karzinom deutlich häufiger auf als bei Frauen (Robert Koch Institut 2015).

Die beiden größten Risikofaktoren für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich sind Alkohol und Zigaretten (Falk et al. 1989, Merletti et al. 1989). Durch diese Ätiologie ist es nachvollziehbar, weshalb mehr erwachsene Männer als Frauen betroffen sind. Die beiden Faktoren haben auch einen Einfluss auf die Therapie des Karzinoms, denn eine Bestrahlungstherapie schlägt bei einem Nichtraucher deutlich besser an (Bowman et al. 1993).

Weitere Ursachen für die Entstehung sind der Epstein-Barr-Virus und das humane Papillomvirus (Andl et al. 1998, Gillson et al. 2000). Auch können genetische Faktoren, Mangelernährung (z. B. Vitamin A Mangel), chronischer Reflux, Asbest und schlechte Mundhygiene mögliche Gründe sein (Maier et al. 1991, Spitz 1996, Morrison 1988, Graham et al. 1977, Parnes 1990).

Gesundes Plattenepithel besteht aus der Dermis, der Basalmembran, dem Stratum basale, dem Stratum spinosum und dem Stratum superficiale. Ist das Epithel keratinisiert, besteht es anstelle des Stratum superficiale aus dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum (Presland, Jurevic 2002).

Das Epithel kann nun durch bestimmte exogene (z. B. Rauchen, Alkohol, Viren) und endogene Faktoren (z. B. DNA Mutationen) proliferieren. Gesunde Zellen verfügen über sogenannte Mismatchreparaturgene. Sind diese jedoch defekt, kann der Schaden nicht repariert werden. Mutationen häufen sich an und es kommt zur malignen Transformation. Zielgene dieser Mismatchgene greifen in die Zellzyklus- und Apoptoseregulation ein. Aufgrund des Mismatchreparaturdefizites können nun Fehler im Zellzyklus und der Apoptose vorkommen (Weber, Tannapfel 2002).

Im Vergleich zu anderen Organtumoren wurden bei Kopf-Hals-Tumoren relativ wenige Mutationen bestimmter Tumorsuppressorgene, wie p53 und p16, in der Literatur beschrieben. P16 ist ein wichtiger Inhibitor des Zellzyklus, der den Übergang in die G1-Phase reguliert. Außerdem spielen Mutationen von Onkogenen und Wachstumsfaktoren eine große Rolle. Der Epidermal Growth Factor stimuliert das Wachstum bestimmter Gewebe. Besteht hier eine Fehlregulation mit seinem Rezeptor, kann dies zu malignen Veränderungen führen. Bei 86 % der Plattenepithelkarzinome wurden erhöhte Telomeraseaktivitäten festgestellt, welche die Tumorzellen immortalisieren. Weiterhin spielen auch die, in dieser Arbeit untersuchten Proteine CD44 und Nanog, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines Karzinoms (Weber, Tannapfel 2002).

1.2. Diagnose und Klinik

Das Plattenepithelkarzinom ist charakterisiert durch seine Malignität, Interzellularbrücken und Hornbildung (Michaels, Hellquist 2001). Die hohe Malignität erreicht das Karzinom wegen der häufig auftretenden Rezidive (Clay et al. 2010).

Als klinisches Erscheinungsbild gelten die papillomatöse Wucherung, der Ulkus und die flachknotige Form. Bereits als Präkanzerose, entweder in Form einer Leukoplakie oder einer Erythroplakie, kann das Plattenepithelkarzinom in der Mundhöhle erkannt werden (Schmelzle et al. 2008).

Abhängig von der Lokalisation des Plattenepithelkarzinoms können folgende Symptome auftreten: Heiserkeit, Stimmveränderungen, verändertes Gefühl im Hals, Hämoptoe, Odynophagie, Massenzunahme im Nacken, Stridor, Dyspnoe, Keuchen, Atemprobleme sowie Husten (Ferlito, Rinaldo 2000).

Das Karzinom entwickelt sich aus Plattenepithel der Oberflächen oder aus respiratorischem Flimmerepithel mit Plattenepithelmetaplasien (Michaels, Hellquist 2001). Unterscheiden lassen sich intraepitheliale Läsionen (Gale et al. 2005) und invasive Karzinome, welche dann erst als Plattenepithelkarzinom bezeichnet werden (Gale, Zidar 2009).

1.3. Lokalisation, Klassifikationen und Grading

Die Lokalisation des Plattenepithelkarzinoms umfasst folgende Regionen: Lippen, Mundhöhle, Pharynx (Oro-, Naso-, Hypopharynx), Larynx (Supraglottis, Glottis, Subglottis), Kieferhöhle, Nasenhöhle, Siebbeinzellen, große Speicheldrüsen und Schilddrüse. Am häufigsten ist es jedoch am Oropharynx, Hypopharynx, Larynx und in der Mundhöhle zu diagnostizieren (Forastiere et al. 2001, Wittekind 2017).

Die folgende Übersicht gibt einen Überblick über die verschiedenen Lokalisationen des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich nach Wittekind:

Anatomische Bezirke der Lippe

Oberlippe, Lippenrot	C 00.0
Unterlippe, Lippenrot	C 00.1
Mundwinkel	C 00.6

Anatomische Bezirke der Mundhöhle

Mundschleimhaut

Schleimhaut Ober- und Unterlippe	C 00.3,4
Wangenschleimhaut	C 06.0
Retromolargegend	C 06.2
Sulcus buccomandibularis und -maxillaris	C 06.1
Oberer Alveolarfortsatz und Gingiva	C 03.0
Unterer Alveolarfortsatz und Gingiva	C 03.1
Harter Gaumen	C 05.0
Zungenrücken und -rand vor den Papillae vallatae	C 02.0,1
Zungenunterseite	C 02.2
Mundboden	C 04.0

Anatomische Bereiche des Oropharynx

Zungengrund (hinter den Papillae circumvallatae oder hinteres Drittel)	C 01
Vallecula	C 10.07
Seitenwand	C 10.2
Tonsillen	C 09.9
Fossa tonsillaris/Gaumenbögen	C09.9/1

Glossotonsillarfurche	C 10.2
Hinterwand	C 10.3
Obere Wand	
Orale Oberfläche des weichen Gaumens	C 05.1
Uvula	C 05.2
<i>Anatomische Bezirke des Nasopharynx</i>	
Dach und Hinterwand (von Übergang zwischen harter und weicher Gaumen bis Schädelbasis)	C11.0,1
Seitenwand (mit Rosenmüller-Grube)	C 11.2
Untere Wand (nasale Fläche des weichen Gaumens)	C 11.3
<i>Anatomische Bezirke des Hypopharynx</i>	
Pharyngoösophagale Grenze	C13.0
Sinus piriformis	C12.9
Hypopharynxhinterwand	C 13.2
<i>Anatomische Bezirke des Larynx</i>	
Supraglottis	C32.1
Suprahyoidale Epiglottis	
Aryepiglottische Falte, laryngeale Oberfläche	
Arythenoidgegend	
Infrahyoidale Epiglottis	
Taschenfalten	
Glottis	C 32.0
Stimm lippen	
Vordere Kommissur	
Hintere Kommissur	

Supraglottis	C 32.2
<i>Anatomische Bezirke der Nasen- und Nasennebenhöhlen</i>	
Nasenhöhle	C30.0
Septum	
Nasenboden	
Laterale Wand	
Vestibulum	
Kieferhöhle	C 31.0
Siebbeinzellen	C 31.1
Links	
Rechts	
<i>Anatomische Bezirke der großen Speicheldrüsen</i>	
Gl. parotis	C 07.9
Gl. submandibularis	C 08.0
Gl. sublingualis	C 08.1
<i>Anatomische Bezirke der Schilddrüse</i>	
Schilddrüse	C 73

Tabelle 1: Lokalisationen des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich (Wittekind 2017)

Grundlegend wird zwischen dem nicht invasivem und dem invasivem Karzinom unterschieden (Gale et al. 2005). Das nicht invasive Karzinom teilt sich durch das WHO-Dysplasie-System in drei Kategorien (Gale et al. 2005):

Die erste Kategorie ist die Hyperplasie mit erhöhter Zellzahl. Sie kennzeichnet sich dadurch, dass sie keine Zellatypien enthält und auch die Architektur des Epithels normal ist. Des Weiteren betrifft sie nur die Stachelzellschicht (Arkanthose) sowie die Basal- und Parabasalzellschicht (Gale et al. 2005).

Zur zweiten Kategorie zählt die Dysplasie, welche in drei Grade unterteilt wird (Gale et al. 2005):

Grad 1: Architekturstörungen, die sich im unteren Drittel des Epithels (Basal-Parabasalzellen) befinden und zytologische Atypien. Diese erste Stufe der Dysplasie bezeichnet man als leichte Dysplasie (Gale et al. 2005).

Grad 2: Architekturstörungen, die bis ins mittlere Drittel des Epithels reichen und einen zunehmenden Schweregrad von zytologischen Atypien aufweisen. Hier handelt es sich um eine mäßige Dysplasie (Gale et al. 2005).

Grad 3: Architekturstörungen, die sich in mehr als zwei Drittel des Epithels befinden und assoziierte zytologischen Atypien oder Architekturstörungen, die sich im mittleren Drittel des Epithels befinden mit hinreichend zytologischen Atypien. Bei dieser Form spricht man von einer schweren Dysplasie (Gale et al. 2005).

Die dritte Kategorie bildet das Carcinoma in situ. Hier ist beinahe das komplette Epithel mit Architekturstörungen und ausgeprägten Zellatypien befallen. Auch atypische sowie abnorme oberflächliche Mitosen sind zu finden (Gale et al. 2005).

Das invasive Plattenepithelkarzinom wird eingeteilt in mikroinvasives Karzinom, konventionelles Karzinom, Spindelzellkarzinom, verruköses Karzinom, papilläres Karzinom, basaloïdes Karzinom, adenoïdes Karzinom, adenosquamöses und lymphoepitheliales Karzinom (Gale, Zidar 2009).

Eine weitere wichtige Klassifikationsmethode ist das Grading:

Grad 1 (hoch differenziert) bedeutet, dass das Epithel große Ähnlichkeit mit gesundem Epithel besitzt. Es kommen Verhornungen und Interzellularbrücken darin vor. Seltener findet man Pleomorphien und Mitosen (Cardesa et al. 2005, Ihrler, Weiler 2014).

Grad 2 (mäßig differenziert) bedeutet, dass eine Pleomorphie des Kerns und viele Mitosen, darunter auch atypische Mitosen, vorkommen. Hornbildung und Interzellularbrücken dagegen sind kaum vorhanden. Dies ist die häufigste Form (Cardesa et al. 2005, Ihrler, Weiler 2014).

Grad 3 (niedrig differenziert) bedeutet, dass Kernpleomorphien und atypische Mitosen sehr häufig sind (Cardesa et al. 2005, Ihrler, Weiler 2014).

Die letzte Klassifikation ist die (p)TMN-Klassifikation. Das p vor TNM bedeutet, dass die Klassifikation auf Befunden der pathologischen Untersuchung beruht (Wittekind 2017, Ihrler, Weiler 2014).

pTX	Primärtumor histologisch nicht beurteilbar
pT0	Kein histologischer Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1-4	Zunehmende Größe/Ausdehnung des Primärtumors (für verschiedene Lokalisationen unterschiedlich)

Tabelle 2: pT-Klassifikation (Primärtumor) (Ihrler, Weiler 2014)

pNX	Regionäre LK nicht beurteilbar
pN0	Keine regionäre LK-Metastasen
pN1	Metastase im solitärem, ipsilateralem LK, 3cm oder kleiner
pN2a	Metastase im solitärem, ipsilateralem LK, größer als 3 cm, kleiner als 6 cm
pN2b	Metastase in multiplen ipsilateralen LK, kleiner als 6 cm
pN2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen LK, kleiner als 6 cm
pN3	Metastase(n) in LK größer als 6 cm

Tabelle 3: pN- Klassifikation (außer bei Nasopharynx) (Ihrler, Weiler 2014)

pNX und pN0	Siehe Tabelle 3: pN-Klassifikation (außer bei Nasopharynx) (Ihrler, Weiler 2014)
pN1	Unilaterale Metastasen in Halslymphknoten und/oder uni- oder bilaterale Metastasen in retropharyngealen Lymphknoten, 6 cm oder weniger in größter Ausdehnung, oberhalb der kaudalen Begrenzung des Krikoidknorpels
pN2	Metastase(n) in bilateralen LK über der Supraklavikularebene, oberhalb der kaudalen Begrenzung des Krikoidknorpels
pN3	Metastasen in LK größer als 6 cm in größter Ausdehnung und/oder jenseits der kaudalen Begrenzung des Krikoidknorpels

Tabelle 4: pN-Klassifikation beim Nasopharynx (Wittekind 2017)

pMX	Fernmetastasen histologisch nicht beurteilbar
pM0	Histologisch keine Fernmetastasen
pM1	Histologisch gesicherte Fernmetastase

Tabelle 5: pM-Klassifikation (Fernmetastase bei allen Lokalisationen) (Ihrler, Weiler 2014)

Nach der Behandlung kann das Vorhandensein eines Residualtumors durch die R-Klassifikation beschrieben werden. Wenn diese nicht beurteilt werden kann, wird das als RX bezeichnet. RO beschreibt das Fehlen eines Residualtumors. Bei R1 ist ein mikroskopisch, bei R2 ein makroskopisch sichtbarer Residualtumor vorhanden (Wittekind 2017).

2. Therapie

2.1. Konservative Therapie

Zur heutigen Standardtherapie des Plattenepithelkarzinoms zählt die Tumorresektion und prophylaktisch die Ausräumung der regionären Lymphknoten. Danach entscheidet der histologische Befund über das weitere Vorgehen (Ehrenfeld et al. 2010, Rogers et al. 2009).

Es wird immer individuell nach Rezidivrisiko, Lokalisation, Größe des Primärtumors, Befall der regionären Lymphknoten, einer möglichen tumorösen Kapselüberschreitung sowie dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten entschieden (Pigorsch et al. 2014, Al-Saraff 2002).

Primäre Strahlentherapien können bei Tumoren in sehr frühen Stadien durchgeführt werden. Indikationen dafür können auch Begleiterkrankungen sein, welche eine Resektion oder eine Radiochemotherapie nicht zulassen (Pigorsch et al. 2014).

Präoperative Strahlentherapien dienen zur Sterilisation der Tumoren außerhalb der Resektionsgrenzen, zur Remission des Tumors und damit zur Verbesserung der Resektabilität sowie der besseren Verträglichkeit des gesunden Gewebes durch die geringere Dosis (Pigorsch et al. 2014).

Postoperativ sollte bei lokal fortgeschrittenen, rezidierten Tumoren bestrahlt werden. Dennoch muss immer individuell nach Lokalisation und Größe des Tumors, nach den Resektionsgrenzen, einer möglichen Perineuralscheideninvasion oder Lymphangiominvasion, den Befall lokoregionärer Lymphknoten und den möglichen extrakapsulären Wachstum befallenen Lymphknoten entschieden werden (Pigorsch et al. 2014).

Für Tumorstadien T1-G1-2-N0 wird meist auf eine adjuvante Strahlentherapie verzichtet, da diese oftmals zu keiner Verbesserung führt. Auch für das Stadium T1-2-N1 ist der Vorteil einer adjuvanten Bestrahlung nicht belegt. Eine postoperative Radio- oder Radiochemotherapie sollte unbedingt für das Stadium T3-N2a-b durchgeführt werden. Für eine Radiochemotherapie spricht ein extrakapsuläres Wachstum eines Lymphknotens oder ein R1-Stadium. Für Tumoren der Größe T3/T4 muss wieder individuell entschieden werden, ob eine postoperative Bestrahlung angewendet werden soll. Meist ist jedoch eine simultane Radiochemotherapie das Mittel der Wahl. Die Gesamtdosis einer Strahlentherapie beträgt in der Regel 50 – 60 Gray (Pigorsch et al. 2014, Al-Saraff 2002).

Erfolgt eine Operation, so ist auch die Wiederherstellung ein wichtiger Teil. Bei kleinen Resektionen erfolgt eine lokale Lappenplastik, bei größeren Resektionen eine Gewebstransplantation mittels freiem, gestieltem oder mikrochirurgischem Transplantat (Ehrenfeld et al. 2010).

2.2. Tumormarker und Biomarker als Therapieansätze

Neben den konventionellen Prognosefaktoren, wie Tumorgröße, axillärer Lymphknotenstatus, Grading, Tumortyp, Hormonrezeptorstatus, Menopausenstatus und Alter des Patienten können als neue Therapieansätze immunhistochemische und molekulare Marker als prognostische und prädiktive Faktoren verwendet werden. Sie erlauben eine Aussage über den individuellen Krankheitsverlauf und das Ansprechen auf eine Systemtherapie. Dadurch kann man für jeden Patienten sofort eine individuelle Therapie entwickeln (Hauser et al. 2008).

Zur Bestimmung der Tumorprogression sind Tumormarker zu einem sehr wichtigen Hilfsmittel geworden, da diese 1 – 6 Monate vor anderen Methoden eine Aussage über die Progression geben können. Tumormarker sind Moleküle, welche man im Blut oder Urin nachweisen kann. Das Vorhandensein und die Konzentrationsänderung dieser Marker hängt mit der Ausbreitung der Krankheit und der Prognose der Krankheit stark zusammen (Lordick et al. 2008).

Bekannte Tumormarker für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich sind SCCA. Diese dienen zur Verlaufs- und Therapiekontrolle der Primär- und Rezidiv-Behandlung beim Plattenepithelkarzinom. Die Sensitivität nimmt mit TNM und klinischen Stadium zu (Lamerz 2005).

Auch CEA ist ein wichtiges Glykoprotein, hat jedoch eine geringere Sensitivität als SCCA. Kombiniert man beide Marker erhält man ein gutes Spezifitäts-Sensitivitäts-Profil (Lordick et al. 2008).

Molekulare Marker sagen etwas über die Prognose und die Wirkung der Therapie aus. Einer der besten Prognosemarker für Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) (Thariat et al. 2007).

Wenn eine Überexpression von EGFR vorliegt ist die Überlebensprognose schlecht. Außerdem liegt eine Resistenz gegen eine Chemo- und Strahlentherapie vor (Wen et al. 1996, Nicholson et al. 2001).

Um eine erfolgreiche Therapie zu erlangen muss der monoklonale EGFR-Antikörper Cetuximab in Kombination mit der Chemo- und Strahlentherapie angewandt werden (Bonner et al. 2006, Wheeler et al. 1999).

Neue Therapieansätze erfolgen durch solche biologische Agenzien, die bestimmte Regionen der Krebszelle als Ziel haben sollten. Tyrosin-Kinasen beispielsweise sind wichtige Bestandteile der Zell-Signalübertragung. Diese Kinasen können in Rezeptoren für epitheliale Wachstumsfaktoren (EGFR), vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren, Fibroblastenwachstumsfaktoren und Hepatozytenwachstumsfaktoren gegliedert werden. EGFR ist für die zelluläre Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zellen zuständig und wird im malignem Gewebe, besonders im Plattenepithelkarzinom, exprimiert. Daraus entstehen gezielte Therapien mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren. Sie sind jedoch keine Wundermittel und helfen nur bei ca. 10 % der Fälle als alleiniges Mittel. In Kombination mit einer Chemotherapie wirken sie in ca. 20 % der Fälle (Al-Saraff 2002).

Das Vorliegen des p53-Supressor-Proteins gibt beste Hinweise auf Platin- und Strahlentherapi sensitivität (Osman et al. 2002). Ist ein Kopf-Hals-Tumor jedoch bereits fortgeschritten, kommt es immer häufiger zu Mutationen dieses Proteins (Boyle et al. 1993).

Die Überlebensrate für fünf Jahre beträgt insgesamt ca. 50 % (Ferlay et al. 2015, Maula et al. 2003).

Die ungünstige Prognose dieses Karzinoms hängt damit zusammen, dass die Diagnose meist erst im fortgeschrittenen Stadium des Tumors gestellt wird. Bei ca. 50 % der Fälle sind zum Zeitpunkt der Operation bereits Lymphknotenmetastasen vorhanden. Beim Oro- und Hypopharynxkarzinom sogar in bis zu 80 % der Fälle (Remmert et al. 2001).

Von allen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich hat das Larynxkarzinom mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 62 % für Männer bzw. 65 % für Frauen die beste Prognose, denn vorallem bei glottischen Larynxkarzinomen tritt eine frühzeitigen Symptomatik auf und es sind nur spärliche Lymphbahnen vorhanden, was zur geringeren Metastasierung führt (Robert-Koch-Institut 2015, Lang et al. 2002, Hussex et al. 1991).

Die schlechteste Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 22 % für Männer und 24 % für Frauen besitzt das Ösophaguskarzinom. Ebenfalls eine schlechte Prognose besitzt das Hypopharynxkarzinom mit 30 % aufgrund des sehr späten Auftretens einer Symptomatik (Robert-Koch-Institut 2015, Lang et al. 2002, Hussex et al. 1991, Grau et al. 1997).

Die wichtigsten Faktoren für das Überleben des Patienten sind Lokalisation des Primärtumors, Lymphknotenstatus, Differenzierungsgrad und der R-Status (Lang et al. 2002, Hussex et al. 1991).

Bei einem N0-Status liegt die Überlebensrate bei 80 %, wohingegen bei vorhandenen Lymphknotenmetastasen die 5-Jahres-Überlebensrate bis auf 45 % sinkt (Houck, Medina 1995, Leemans et al. 1993). Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, neue Methoden für die Therapie dieses Tumors zu entwickeln.

3. CD44

3.1. Die Struktur

CD44 ist ein Zelloberflächenglycoprotein, dessen molekulare Größe zwischen 85 und 230 kDA variiert. Es besteht aus einer distalen extrazellulären, einer membranständigen proximalen, einer membranüberspannenden, und einer cytoplastischen Domäne. Dieses Protein wird auch als Adhäsionsmolekül bezeichnet, da es zu spezifischen Liganden eine starke Bindung hat (Naor et al. 1997).

CD44 ist beim Menschen auf dem Chromosom 11 lokalisiert, bei der Maus jedoch auf dem Chromosom 2 (Goodfellow et al. 1982, Hofmann et al. 1991, Friedrichs et al. 1999). Es besteht aus den Exons 1 – 5 und 16 – 20 (Hofmann et al. 1991, Dougherty et al. 1991, Tolg et al. 1993, Screatton et al. 1992). Proteine, die nur diese Exons enthalten, sind die Standardisoform CD44s. Weiterhin gibt es die variablen Exons 6 – 15, welche ein Protein zur variablen Form CD44v werden lässt. Exon 6 enthält beim Menschen ein Stoppcodon und wird somit normalerweise nicht transkribiert (Hofmann et al. 1991, Dougherty et al. 1991, Tolg et al. 1993, Screatton et al. 1992, Screatton et al. 1993, Ermak et al. 1996).

Aufgrund der beschriebenen Wandelbarkeit können mehr als 1000 CD44 Varianten entstehen (Tolg et al. 1993).

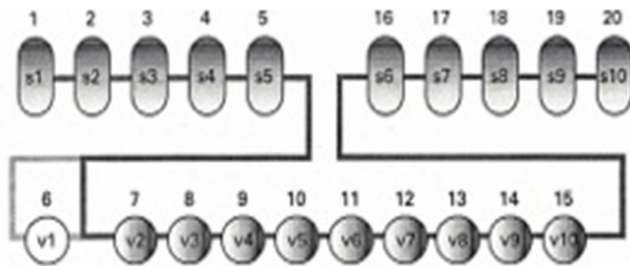


Abbildung 1: Aufbau des CD44 Gens (Goodison et al. 1999).

Die Isoform, welche am häufigsten vorkommt, besteht aus 363 Aminosäuren und wiegt theoretisch 37 kDA. Sie besteht aus einer C-terminalen, zytoplasmatischen, hoch konservierten Domäne aus 72 AS, einer transmembranen Domäne aus 21 AS, und einer extrazellulären Domäne (auch N-terminale Domäne) aus 270 AS. Die intrazelluläre Domäne wird durch Exon 18, 19 und 20 codiert (Goodison et al. 1999).

Sie kann entweder als Kurz- oder aber häufiger als Langform, welche die C-terminalen Exons miteinschließt, existieren (Goldstein, Butcher 1990). Die extrazelluläre Domäne ist hydrophob und kann in hochkonserviert und nichtkonserviert unterteilt werden. Die N-terminale Ektodomäne, codiert durch die Exons 1 – 5, ist hoch konserviert und ist vermutlich als eine globuläre, tertiäre Faltenstruktur vorhanden (Goodison et al. 1999, Haynes et al. 1989, Goldstein et al. 1989).

Diese entsteht durch Bildung von Disulfidbrücken zwischen drei Paaren von Cysteinresten. Außerdem enthält sie eine 100 AS lange Struktur, welche den wichtigsten Liganden HA binden kann. Sie wird daher auch als Linkdomäne bezeichnet (Goodison et al. 1999, Perkins et al. 1989, Hardingham, Fosang 1992, Kohda et al. 1996, Neame, Barry 1993, Neame et al. 1986, Day, Sheehan 2001, Banerji et al. 1998). Zudem befindet sich extrazellulär eine Region, in welche variable Exons eingebaut sind. Die Exons 16 und 17 liegen in der extrazellulären Region proximal der Membran, wobei diese Region wenig konserviert ist (Goodison et al. 1999).

CD44 kann sowohl aktiv induzierbar als auch inaktiv, im Bezug auf die HA-Bindung, exprimiert werden (Lesley et al. 1995). Weiter kann extrazellulär Osteopontin (Ue et al. 1998), Kollagen (Fasseen et al. 1992, Knutson et al. 1996), Fibronectin und Laminin (Jalkanen, Jalkanen 1992), sowie auch Selektin (Dimitroff et al. 2001, Hanley et al. 2005) gebunden werden. Durch die intrazelluläre Bindung, z. B. von Ankyrin (Zytoskeletprotein), kann auch die extrazelluläre Bindung beeinflusst werden (Bourguignon et al. 1998, Lokeshwar et al. 1994 et al. 2005, Zhu, Bourguignon 1998).

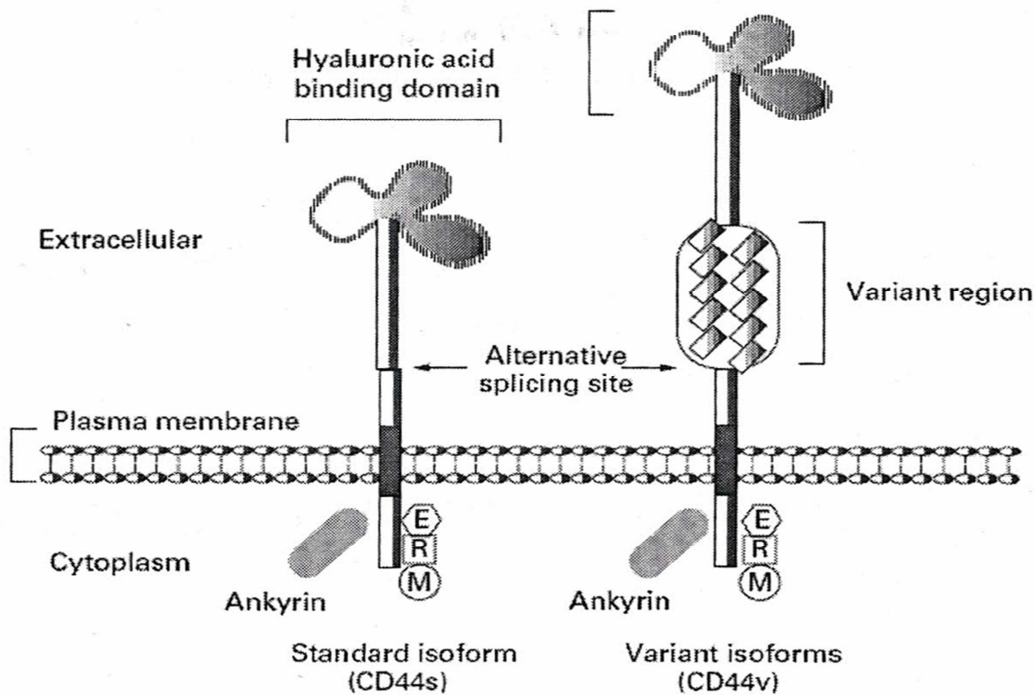


Abbildung 2: CD44 Protein-Struktur (Goodison et al. 1999)

Außerdem bindet CD44 ERM Proteine (Turley et al. 2002) und das proinflammatorische, tumorsuppressive Protein Merlin (Herrlich et al. 2000).

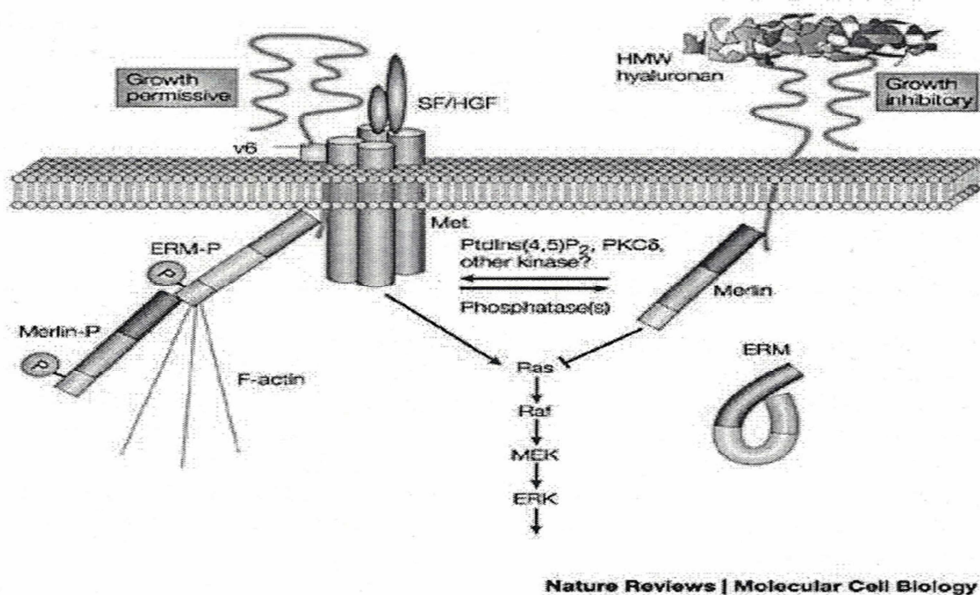


Abbildung 3: CD44 Interaktionen (Ponta et al. 2003)

Auch dieses Protein wird posttranslational modifiziert. An der N-terminalen Ektodomäne gibt es mindestens fünf N-Glykosylierungsstellen und zwei Chondroitinsulfat Bindungsstellen. Mehr O-Glykosylierungsstellen gibt es in der membranären, proximalen, extrazellulären Region. Auf der extrazellulären Standard Region bindet auch Heparansulfat, Keratinsulfat und Sialinsäurereste (Goodison et al. 1999).

Die variable extrazelluläre Region enthält Serin- und Threoninreste (Bennett et al. 1995), welche zur O-Glykosylierung beitragen, sowie vier Serin Glycin-Motive, an welche Chondroitinsulfat und Heparansulfat binden kann (Goldstein et al. 1989, Stamenkovic et al. 1989, Brown et al. 1991). Der Grad der Glykosylierung hat Einfluss auf die Ligandenbindung und somit auf die Funktion des Proteins (Bennett et al. 1995).

3.2. Expression und Funktion von CD44

Die meisten Säugerzellen exprimieren die Standardisoform von CD44 (CD44s) (Goodison et al. 1999). Einige Epithelzellen exprimieren jedoch auch größere Isoformen (CD44E) (Iida, Bourguignon 1995). Die Standardisoform CD44s wird auch als hämatopoetische Isoform bezeichnet. Bei dieser Form werden lediglich die neun Standardexons zusammengefügt (Screaton et al. 1992, Screaton et al. 1993).

Isoformen die v6 enthalten kommen in den Brustdrüsenkanälen (Terpe et al. 1994, Mackay et al. 1994) und der Bauchspeicheldrüse vor (Gansauge et al. 1995). Isoformen die dagegen v4 enthalten treten in normalen Urothelzellen auf (Southgate et al. 1995, Hong et al. 1995).

Die Expression von CD44 findet vorwiegend in der basalen Schicht des Epithels statt. Es gibt jedoch auch Zellen, wie Hepatozyten, Tubuli der Niere und der Pankreas sowie pankreatische Azinuszellen, die keine oder nur sehr wenige CD44-Isoformen exprimieren (Terpe et al. 1994, Southgate et al. 1995).

Die vielfältigen Funktionen des CD44 Proteins hängen mit der HA-Bindung, aber auch in geringerem Umfang mit anderen extrazellulären Liganden zusammen. Die funktionelle Diversität von CD44 wird durch alternatives Spleißen der prä-mRNA erreicht. Die Feinregelung der Ligandenbindung an das Glykoprotein wird durch posttranslationale Modifikation und Wechselwirkung mit anderen zellulären Faktoren erreicht (Turley et al. 2002).

Eine Aufgabe des CD44 Proteins ist die Zelladhäsion, -migration (Turley et al. 2002) und sogar -aggregation. Diese Funktionen können entweder durch Bindungen von CD44 an Moleküle der EZM, vor allem durch HA-Bindungen von CD44 exprimierenden Zellen, oder über inter-CD44 Bindung über bestimmte Glycosylierungen vermittelt werden (Cooper, Dougherty 1995).

Zellen, die eine Reparatur oder eine Expansion durchführen, haben eine vermehrte CD44 und HA Produktion. Diese vermehrte Produktion hilft den Zellen ein strukturelles Gerüst zu produzieren und sich während der Expansion an das Gerüst zu binden (Alho, Underhill 1989, Jain et al. 1996).

HA akkumuliert bei der Angiogenese (Trochon et al. 1996), der Wundheilung (Jain et al. 1996) und der embryonalen Zellmigration (Sherman et al. 1996, Wainwright et al. 1996). Auch bei der Zellbewegung spielen CD44 und HA eine wichtige Rolle (Thomas et al. 1992). Weiterhin ist eine Aggregation von Zellen, wie Makrophagen, Lymphozyten oder Fibroblasten (Green et al. 1988, Underhill, Dorfmann 1978) möglich. Durch weitere Zell-Matrix-Interaktionen mit anderen Molekülen der EZM (Kollagen, Fibronectin, Laminin, Chondroitinsulfat), können viele Funktionen des CD44 festgestellt werden (Naor et al. 1997).

Für die Funktion der Lymphozyten ist CD44 ebenfalls sehr wichtig. Lymphozyten, auf deren Oberfläche vermehrt CD44 vorkommt, sind charakteristisch für die T-Zell-Aktivierung nachdem sie ihrem cognaten Antigen begegnet sind (DeGrendele et al. 1997 b). Außerdem ist CD44 entscheidend für die Extravasation von Lymphozyten ins Entzündungsgewebe, da sie durch HA-Bindungen an vaskuläres Endothel binden können und die Gefäße nur so verlassen können (DeGrendele et al. 1997 a, Estess et al. 1998). Die HA-Synthese wird durch proinflammatorische Cytokine, den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) und Interleukin 1 α (IL-1A) angeregt (Mohamadzadeh et al. 1998).

Insgesamt führen auch andere Interaktionen mit dem Cytoskelet und extrazellulären Proteinen zu Migrationen sowie anderen physiologischen Prozessen in den Zellen (Goodison et al. 1999). Zum Beispiel haben Interaktionen über die Phosphotyrosinkinase Einfluss auf die Singnaltransduktion (Taher et al. 1996, Ilangumaran et al. 1998, Bates et al. 2001).

3.3. Rolle bei Karzinomentstehung

Es wurde schon früh nachgewiesen, dass eine erhöhte Expression von CD44 einen Tumor aggressiver machen kann (Birch et al. 1991, Horst et al. 1990). Veränderungen des Expressionsmusters des CD44 Adhäsionsmoleküls in einem Gewebe stören die normalen epithelial-mesenchymale Interaktionen, was dann zur strukturellen und funktionellen Disorganisation führt. Dies ist ein häufiges Merkmal des Karzinoms (Goodison et al. 1999). Mesenchymale Zellen regulieren Adhäsionsmoleküle, wie E-Cadherin, herunter und sind für die Invasion des Tumors, die Metastasenbildung, die Rezidivrate und die Therapieresistenz verantwortlich (Chen et al. 2011 b).

Auch das Zusammenspiel von CD44 mit bestimmten Liganden spielt eine große Rolle bei der Tumorentstehung. Dass CD44 und HA zusammen vorhanden sein müssen, zeigt ein lösliches humanes CD44s Fusionsprotein, welches die Tumorentwicklung durch Störung der CD44-HA-Interaktion unterdrückte (Sy et al. 1992, Zawadzki et al. 1998). Das Spritzen von Hyaluronsäure Oligomeren hemmt auch das Tumorwachstum, da es die CD44-HA-Bindung beeinflusst (Zeng et al. 1998). Außerdem fördert diese Hemmung die Apoptose der Tumorzellen (Zeng et al. 1998, Arpicco et al. 2013, Ganesh et al. 2013 a, Bassi et al. 2011, Yu et al. 1997, Ganesh et al. 2013 b), wodurch auch schon Mammakarzinomzellen unterdrückt werden konnten (Yu et al. 1997).

Studien belegen bereits, dass im Tumorgewebe ungewöhnliche CD44 Transkripte vorhanden sind, welche eher weniger im gesunden Epithel exprimiert werden (Stamenkovic et al. 1989, Stamenkovic et al. 1991). CD44v6 beispielsweise, die Isoform welche bereits am häufigsten untersucht wurde (Nelson, Grandis 2007), fördert die Proliferation durch eine anhaltende Aktivierung der MAP-Kinase (Marhaba et al. 2005) sowie durch eine Induktion einer Ras vermittelten positiven regulatorischen Spleiß-Schleife, was zum ständigen Spleißen von CD44v6 und nachgeschalteten Ras Signalen führt (Cheng et al. 2006).

Allgemein lässt sich sagen, dass das Zusammenspiel von CD44 und Hyaluronsäure intrazelluläre Signaltransduktionswege, wie z. B. die Tyrosinkinase von HER2 und die Rezeptor Kinase c-Src, aktiviert. Diese Kinasen phosphorylieren dann die Cortactin und Rho-artige GTPasen. Des Weiteren bindet der intrazelluläre Teil des CD44 Proteins an Zytoskelettproteine der ERM-Familie, wie Ankyrin oder Proteine. Dies kann zu bestimmten zellulären Funktionen, aber auch zum Wachstum, Migration und Progression des Tumors führen (Turley et al. 2002).

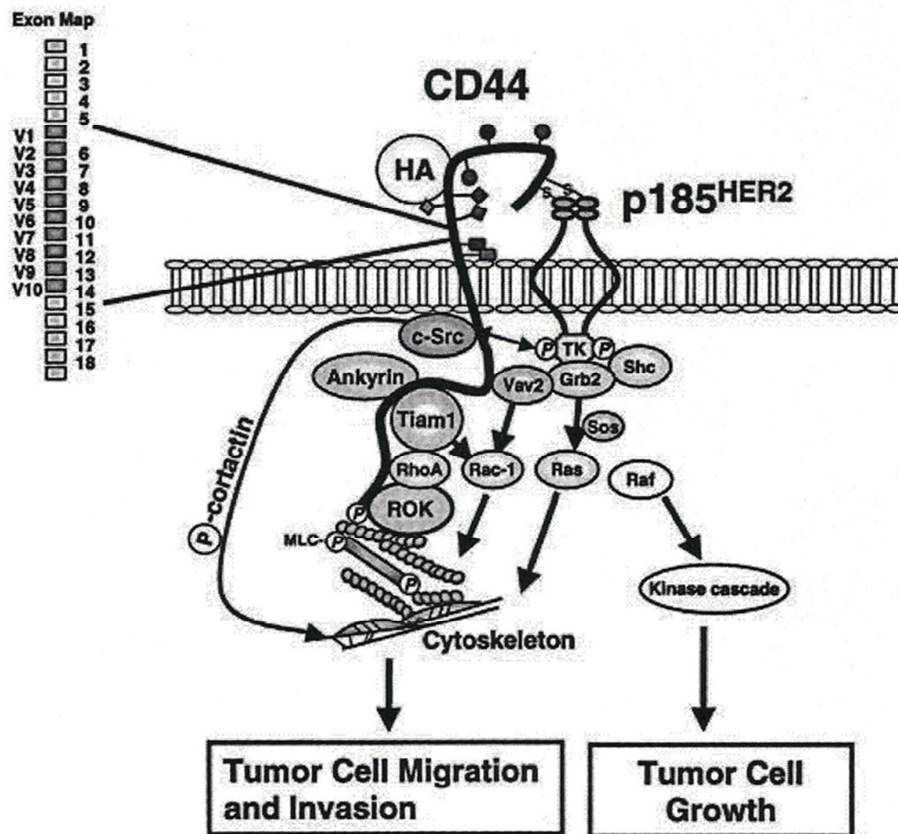


Abbildung 4: Tumormigration, Wachstum und Invasion durch CD44-Signaltransduktionswege (Turley et al. 2002)

CD44 steht ebenfalls unter Verdacht etwas mit der Metastasierung des Tumors zu tun zu haben, da es viele Parallelen zwischen der Lymphozyten-Migration und dem Prozess der Metastasierung gibt (Goodison et al. 1999).

Ein wichtiger Ligand, der wohl zur Metastasierung beiträgt, ist das E-Selektin. CD44 bindet E-Selektin durch seine sialylierten, fucosylierten Bindungsstelle am N-Glycan. Dieses Endothel Molekül funktioniert so als wichtiger Klebstoff und verhilft der Tumorzelle zur Adhäsion am Gefäßendothel. Durch diesen Vorgang kommt es also vermehrt zur Metastasierung, wenn CD44 vorhanden ist (Dimitroff et al. 2001, Hanley et al. 2005).

CD44 korreliert mit der Invasions- und Migrationsfähigkeit des Tumors, gibt Auskunft über die Rezidivwahrscheinlichkeit und die Sensibilität auf Radio- und Chemotherapien. Außerdem korreliert die Expression mit dem T-Stadium und der Prognose des Patienten (Negi et al. 2012, Joshua et al. 2012).

4. Nanog

4.1. Struktur

Das Protein Nanog ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor (Chambers et al. 2003), welches aus 305 Aminosäuren besteht. Ferner enthält es eine Homöobox-Domäne zwischen der 96. und 155. Aminosäure (Chambers et al. 2003, Mitsui et al. 2003). Zwei der vier Exons, aus denen Nanog besteht, kodieren für diese konservierte Homöodomäne (Booth, Holland 2004). An dieser Domäne wird DNA erkannt und gebunden (Mitsui et al. 2003, Hart et al. 2005).

Das erste Exon besteht aus 151 bp, das Zweite aus 263 bp, das Dritte aus 87 bp und das Vierte aus 417 bp. Hinzukommend besitzt es zwei untranslatierte Bereiche: Die 5' UTR mit 216 bp und die 3' UTR mit 963 bp (Booth, Holland 2004).

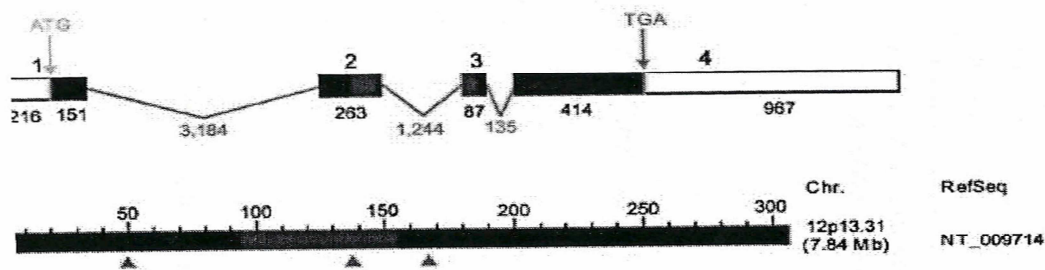


Abbildung 5: Struktur des Nanog-Gens (Booth, Holland 2004)

Der Promotor hat weder eine TATA-Box noch eine Sp1-Box. Es existieren nur drei putative CAAT-Domänen vor der Transkriptionsinitiationsstelle (Booth, Holland 2004). Das Protein besitzt auch einen N-Terminus, welcher sehr serinreich ist, und einen C-Terminus (Chambers et al. 2003).

Das humane Nanog Protein ist auf dem Chromosom 12p13, das murine Nanog auf Chromosom 6 lokalisiert (Mitsui et al. 2003, Hart et al. 2005). Der Name Nanog stammt aus der celtischen Mythologie:

Tir Na Nog: land of the ever young (Chambers et al. 2003, Mitsui et al. 2003)

Die Homeodomäne ähnelt von der Struktur her sehr der Nk-2-Gen-Familie (Harvey 1996), jedoch besitzt es statt Tyrosin Valin. Die Sequenz Trp X-X-X wird zehnmal im Tandem wiederholt, dessen Funktion jedoch nicht bekannt ist (Mitsui et al. 2003).

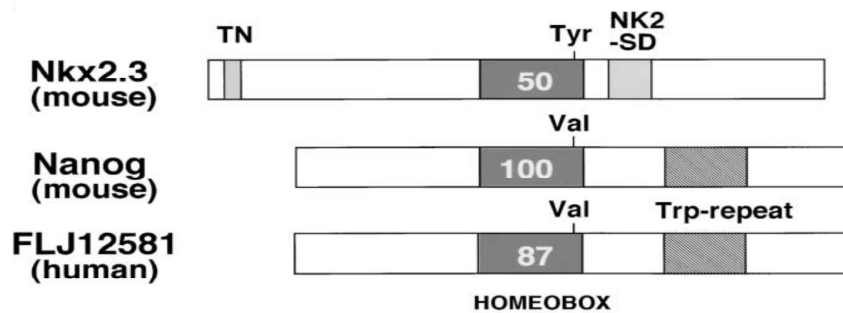


Abbildung 6: Vergleich Nanog und NKx2.3 (Mitsui et al. 2003)

Die Funktion zur Transaktivierung liegt beim humanen Nanog nur im C-Terminus. Im Gegensatz zum murinen Nanog, bei dem diese sowohl am C- als auch am N-Terminus liegt (Oh et al. 2005, Pan, Pei 2005). Die erste Transaktivierungsstelle wird als WR bezeichnet und ist tryptophanreich. Die Zweite wird als CD2 bezeichnet und liegt direkt am C-Terminus (Pan, Pei 2005).

Auch die Expression des Nanog-Proteins wird durch Modifikationen an Histonen und der DNA reguliert. Während der frühen Differenzierungsphase wird die Nanog-Expression durch p300 Histonacetyltransferase reguliert (Zhong, Jin 2009).

Das humane Nanog wird sowohl durch H3K4-tri-Methylierung als auch durch H3K9-Acetylierung am Promotor aktiviert (Freberg et al. 2007). Auch im murinen Nanog konnte eine H3K9-Methylierung nachgewiesen werden (Loh et al. 2007). Diese Methylierung verschwand sobald sich die ES-Zellen differenzierten (Levasseur et al. 2008).

Neben der Chromatin-Modifikation gibt es auch DNA-Methylierungen an den CpG-Inseln. Starke Methylierung führt zur Kondensierung der DNA-Abschnitte, was wiederum bei reprimierten Genen der Fall ist (Antequera 2003). Sobald eine Zelle jedoch Pluripotenz aufweist sind die CpG-Inseln demethyliert und die Expression nimmt zu (Freberg et al. 2007, Bllloch et al. 2006).

4.2. Expression und Funktion

Nanog wird überwiegend in pluripotenten Stammzellen von preimplantierten Embryos in Mäusen (ES), in embryonalen Keimzellen (EG), in embryonalen Karzinomzellen sowie in ES Zellen von Affen und Menschen exprimiert (Chambers et al. 2003, Mitsui et al. 2003, Hart et al. 2005, Wang et al. 2003, Hartano et al. 2005).

Die Expression von Nanog ist eine zeitliche Welle. Sie erreicht ihr Maximum in der späten Morula und der Mitte des Blastozysten-Stadiums. Kurz vor der Implantation dagegen wird Nanog herunterreguliert (Chambers et al. 2003).

Die embryonalen Stammzellen, welche nanoghaltig sind, können die Fähigkeit zur Selbsterneuerung aufrechterhalten und sind pluripotent. Das heißt, sie können sich noch zum Endo-, Meso- und Ektoderm entwickeln (Mitsui et al. 2003, Hwei-Hansen et al. 2005, Darr et al. 2006). Dies wird durch die Bindung von Nanog an Gene, die selbsterneuernde Prozesse oder Zelldifferenzierungen ermöglichen, erreicht (Boyer et al. 2005).

Wie nun das Nanog Protein genau die Gene für die Differenzierung inhibiert, andere Gene modifiziert und somit beeinflusst, wurde noch nicht hinreichend beschrieben. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass das humane Protein bei dem Selbsterneuerungsvorgang ganz unabhängig von der LIF/gp 130 Zytokin Stimulation und der Stat3 Aktivierung ist. Dieser Vorgang war vorerst der bekannteste Mechanismus zur Selbsterneuerung. Ebenso wenig aktiviert Nanog selbst Stat3. Nichtsdestotrotz verbessert die Kombination von Nanog und LIF den Vorgang der Selbsterneuerung. Somit handeln die Beiden doch kombinatorisch miteinander (Chambers et al. 2003).

Um die Stammzellen-Identität aufrecht zu erhalten ist Oct-4 und Nanog essentiell, wohingegen Stat3 nur eine nebensächliche Funktion besitzt (Chambers et al. 2003). Nanog befindet sich je nach Alter und Funktion der Zelle im Kern oder im Zytoplasma (Sandeep et al. 2008).

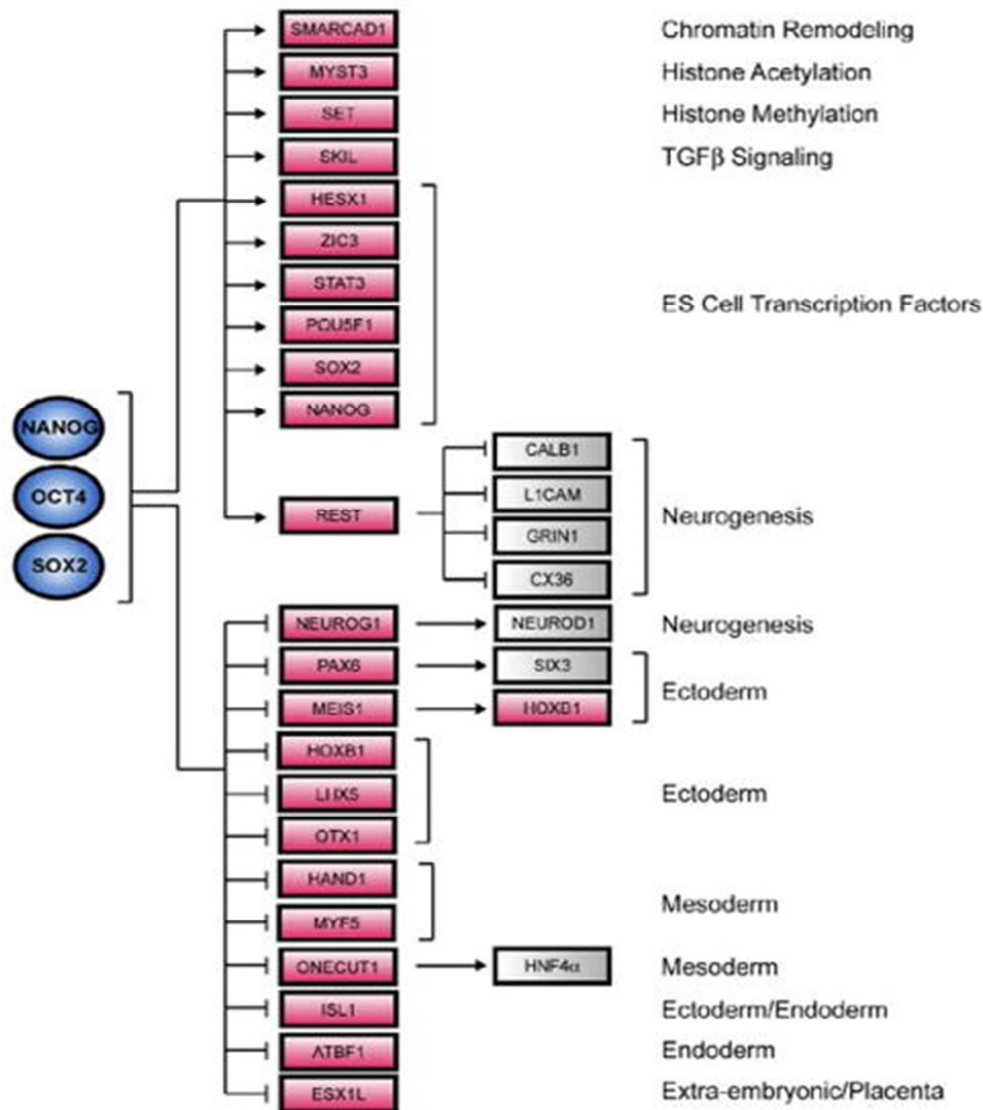


Abbildung 7: Netzwerk des Nanog-Proteins (Boyer et al. 2005)

Nanog kann sowohl positiv als auch negativ reguliert werden. Zu den positiven Regulatoren gehören Stat3, T (Brachyury), FoxD3, Sall4 und Nanog selbst (Suzuki et al. 2006, Loh et al. 2006, Wu et al. 2006, Pan et al. 2006). FoxD3 sowie Oct4/Sox2 binden direkt die proximale Region des Nanog-Promotors und unterstützen die Expression des Nanog Proteins (Rodda et al. 2005, Pan, Thomson 2007). Außerdem wurde durch Luziferase Reporterexperimente gezeigt, dass Oct4 und Sox2 mit ihrer Herunterregulation die Promotor-Aktivität von Nanog reduzieren (Rodda et al. 2005). Die Tumorsuppressoren p53 und TCF3 können an den Nanog Promotor binden, die Expression verhindern und somit die Selbsterneuerung verhindern aber auch die Fähigkeit zur Differenzierung fördern (Lin et al. 2005). Beim humanen Nanog wurde bisher nur eine Interaktion mit den Faktoren Sox2 und Oct4 nachgewiesen (Kuroda et al. 2005). LIF und BMP, deren Downstream-Effektoren Stat3 und T sind, spielen auch eine Rolle bei der Regulation der Nanog-Expression (Pan, Pei 2005).

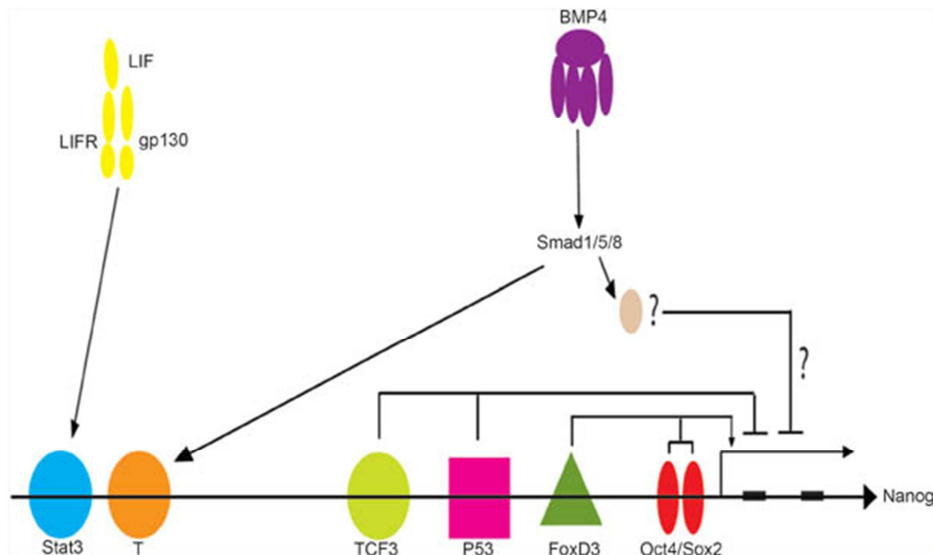


Abbildung 8: Regulation der Nanog Expression (Pan, Pei 2005)

4.3. Nanog im Karzinom

In mehreren Studien konnte bereits der Zusammenhang einer hohen Nanog-Expression und einer schlechteren Überlebensprognose der Tumorpatienten, der Progression des Tumors, der Metastasen- und Rezidiventstehung bewiesen werden (Habu et al. 2015, Huang et al. 2014, Kong et al. 2010, Chiou et al. 2008).

Im oralen Plattenepithelkarzinom kommt überwiegend eine heterogene Population von Krebszellen vor, aber auch eine seltene Subpopulation von Zellen, die als Krebsstammzellen bezeichnet werden. Sind diese Stammzellen vorhanden, hat der Tumor eine höhere Migration, Invasion und Bösartigkeit. Zudem ist er differenzierungsfähig und erreicht höhere Grade (Chiou et al. 2008, Jordan et al. 2006, Dalerba et al. 2007, Clarke et al. 2006).

Gleiches wurde auch im Retinoblastom, im Prostatakarzinom, im embryonalen Karzinom und im metastasierenden Keimzellenkarzinom festgestellt (Freberg et al. 2007, Seigel et al. 2007, Santagata et al. 2007, Gu et al. 2007, Hoei-Hansen et al. 2007). Diese Krebsstammzellen exprimieren verstärkt den Transkriptionsfaktor Nanog (Chiou et al. 2008).

Ferner wurde festgestellt, dass nanoghaltige Zellen weniger apoptosefähig sind und somit als Therapie meist eine Chemotherapie benötigt wird. Dies ist nicht unerwartet, da zur Selbsterneuerung auch die Regulation der Apoptose notwendig ist (Duval et al. 2006, Pyle et al. 2006).

Viele Studien haben gezeigt, dass sich Körperzellen mit Stammzellenmarkern, wie Nanog, zurück in pluripotente embryonale Stammzellen wandeln können (Aoi et al. 2008, Yu, et al. 2007). Diese Epithel-Mesenchymal-Transition ist in der Embryonalzeit ein wichtiger Teil der Entwicklung, führt aber beim Tumor dazu, dass ein frühes Stadium in einen invasiven Tumor übergeht (Thiery 2002). Rezidive entstehen dadurch, dass die Stammzellen ein Reservoir bilden von dem aus sie nach der Therapie zum Wiederaufleben des Tumors beitragen (Kong et al. 2010).

5. Zusammenspiel von Nanog und CD44

In einer Studie wurde nachgewiesen, dass durch die Bindung von HA an CD44 auch ein Komplex zwischen Nanog und Stat3 entsteht. Nach der Bindung wandern Stat3 und Nanog vom Cytoplasma in den Kern und interagieren mit der Promotor-Region von miR-21. Das wiederum führt zur miR-21 Gen-Expression und somit dann zur Reifung von miR-21-Produkten. Dies reguliert die Tumor-Suppressor-Proteine herunter, fördert die HNSCC Zell-Aktivität und führt somit zur Chemoresistenz, zur Anti-Apoptose und somit zum Überleben der Tumorzellen (Bourguignon et al. 2012).

6. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression des Proteins Nanog im Zellkern und im Zytoplasma sowie die Expression des Proteins CD44 in der Membran des Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches an verschiedenen Lokalisationen zu untersuchen. Hierzu wurden Tumorproben von insgesamt 180 Patienten herangezogen.

Die Expression der Proteine auf den Tumorproben der Invasionsfront, des zentralen Tumors und der Lymphknotenmetastasen soll dann auf einen möglichen Zusammenhang mit dem Grading, dem T-Stadium, dem N-Stadium, dem UICC-Stadium, dem L1-Status, dem Pn1-Status, dem Metastasierungsverhalten, der Rezidivhäufigkeit und dem Überlebenszeitraum des Patienten überprüft werden.

Im Falle einer Korrelation von CD44 und/oder Nanog als Target könnte eine individualisierbare Tumorthherapie angewandt werden. Dadurch könnte die Prognose für jeden Patient genau eingeschätzt und die richtige Therapie individuell angewandt werden.

Da in vielen Studien bereits bewiesen wurde, dass sowohl CD44 als auch Nanog als Stammzellenmarker, Einfluss auf die Aggressivität eines Karzinoms besitzen, war die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass die Expression von CD44/Nanog im Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich prognostische Aussagekraft hinsichtlich

- des Gesamtüberlebens (OS) und des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) betroffener Patienten
- auf das progressionsfreie Überleben (DFS) betroffener Patienten
- und auf klinisch-pathologische Faktoren, wie Grading, T-Stadium, N-Stadium und UICC-Stadium, Alter und Geschlecht, L1-Status und Pn1-Status

hat.

II. Materialien und Methoden

1. Materialien

1.1. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Antibody Diluent S2022	Dako, Hamburg, Deutschland
Citric acid monohydrate C1909-500G	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
DAB 500 plus (Chrom/Puffer)	Zytomed, Berlin, Deutschland
Destilliertes Wasser	hauseigene Anlage
Ethanollösung, 96 %, 70 %	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Hämatoxilin nach Mayer T865.2	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
Natriumchlorid (NaCl) 1.06404.1000	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natreiumhydroxis (NaOH) 1.09136.1000	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pertex mounting medium 41-4012-00	Medite, Burgdorf, Germany
Polymer HRP Ak aus Kit ZUC053-100	Zytomed, Berlin, German
Salzsäure (2N HCL) 1.00317.1000	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trizma-Base T1503	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 30 %	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München

Pufferlösungen	Hersteller
Citratpuffer	Citric acid monohydraete 2,1 g, Aqua dest 1L mit NaOH pH auf 6,0 einstellen
Tris Buffered Saline (TBS) für 1000ml	60,5 g Trizma-Base in 700 ml Aqua dest mit 2N Salzsäure auf pH 7,6, darin 90 g NaCl, TBS dann 1:10 mit Aqua dest verdünnen

1.2. Antikörper

Folgende Antikörper wurden verwendet:

CD44(156-3C11) Mouse mAb #3570S

Monoklonaler Antikörper aus der Maus, von Cell Signaling Technology. Dieser wurde durch Immunisierung von BALB/c Mäusen mit stimulierten humanen Leukozyten produziert. Der Antikörper erkennt die endogenen Level des gesamten CD44 Proteins.

Anschließend folgt eine Visualisierung des Primärantikörpers durch sekundären AK: markierter Polymer-HRP-AK (Dako K4056) und DAB-Substrat (Fa. Zytomed) (Lot 5: 96 Mikrogramm/ml, Verdünnung von Cell Signaling)

Nanog(D7364) XP Rabbit mAb #4903

Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, von Cell Signaling Technology. Dieser wurde durch Immunsierung von Kaninchen durch ein synthetisches Peptid, welches Rückständen nahe des Aminoterminus des menschlichen Nanogproteins entspricht, produziert. Der Antikörper erkennt endogene Level des gesamten Nanog- Proteins.

Anschließend folgt eine Visualisierung des Antikörper durch einen sekundären AK: markierter Polymer-HRP-AK (Dako K4056) und DAB-Substrat (Fa. Zytomed) (Lot 3: 19 Mikrogramm/ml)

1.3. Geräte

Geräte	Hersteller
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Kodak Image Station 440	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Kühlplatte OP30	Medite, Burgdorf, Deutschland
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Micro Tissue Arrayer	Beecher Instruments, Maryland, USA
Mikroskop Axioplan 2	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf, Deutschland
Objekträger SuperFrost plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
pH-Messgerät	Schott, Mainz, Deutschland
Pipetten Multipette plus	Eppendorf-Netheter-Hinz, Hamburg, Deutschland
Schüttler	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Waage BP310S	Sartorius Basic, Göttingen, Deutschland
Wasserbad TFB35	Medite, Burgdorf, Deutschland

1.4. Patientengewebeproben

Die formalin-fixierten, paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebeproben von 180 therapie-naiven Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (davon 88 mit metastatisch befallenen Lymphknoten) stammten aus Resektionspräparaten im Zeitraum von 2007 – 2012, welche in der HNO-Klinik und der Abteilung für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar nach einem standardisierten chirurgischen Verfahren und einer Begleittherapie durchgeführt wurden (Wolff et al. 2012). Es handelte sich in 170 Fällen um orale Plattenepithelkarzinome, in drei Fällen war der Tumor im Weichgaumen, in vier Fällen in der Tonsille, und in je einem Fall im Oropharynx, Hypopharynx und im Larynx lokalisiert. Patienten mit primären Fernmetastasen, zur Zeit der Diagnose, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Fälle mit einer neoadjuvanten Radio- oder Chemotherapie. Alle Patienten wurden mit einer

primären, radikalen Resektion in kurativer Absicht nach einem standardisierten chirurgischen Verfahren behandelt. Ein weiteres Einschlusskriterium war die Vollständigkeit demographischer und klinischer Daten innerhalb der Nachsorgezeit, die primäre Radikalchirurgie und die Verfügbarkeit des Gewebes. Alle Patienten mit pT4 Tumoren und/oder Nodalstatus pN1 und pN2a/b erhielten eine Begleittherapie mit einer Bestrahlung der Gesamtdosis von 65 – 70 Gy. Bei Lymphknotenstatus cN0 wurde eine selektive, bei auffälligem Lymphknotenstatus eine modifizierte, radikale Neck-dissection durchgeführt. Die Patienten haben sich mit einer wissenschaftlichen Untersuchung des Gewebes einverstanden erklärt. Diese Untersuchungen wurden von der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt.

Diagnostik und Stadieneinteilung wurden entsprechend der Richtlinien der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 3. Ausgabe) der Tumoren von Kopf und Hals (Barnes et al. 2005) und der UICC-Tumor-, Knoten-, Metastasierungs-(TNM)-Klassifikation (7. Ausgabe) (Wittekind, Bertolini 2010) durchgeführt. Die Patienten befanden sich zum Diagnosezeitpunkt zwischen dem 38. und 86. Lebensjahr (mittleres Alter: 57). Insgesamt waren 61 Patienten weiblich und 119 männlich. 68 Patienten erlitten in der Nachsorgezeit ein Rezidiv und 112 blieben rezidivfrei. Während der Nachsorgezeit starben 75 der Tumorpatienten, 105 waren nach der Nachsorgezeit noch am Leben. Die mittlere Nachsorgezeit für die überlebenden Patienten lag bei 45,4 Monaten (Range: 1,4 – 106,8 Monate). Die mittlere Nachsorgezeit der verstorbenen Patienten lag bei 20,7 Monaten (Range: 1,5 – 91 Monate). Die Verteilung der klinischen Daten wird in der Tabelle 6 dargestellt.

Alter	57 (38 bis 86)	Fälle	180	Prozent	
Geschlecht	w	61		33,9	
	m	119		146,1	
pT	x	1		0,6	
	1	52		28,9	
	2	62		34,4	
	3	20		11,1	
	4a/b	45		25,0	
pN	0	92		51,1	
	1	26		14,4	
	2a/b	62		34,5	

II. Materialien und Methoden

UICC	1	38	21,1
	2	26	14,4
	3	27	15,0
	4	89	49,5
Grading	x	1	0,6
	1	15	8,3
	2	121	67,2
	3	43	23,9
Pn1	ja	36	20,0
	nein	113	62,8
	n.a.	31	17,2
L1	ja	32	17,8
	nein	117	65,0
	n.a.	31	17,2
Rezidive	lokal	39	21,7
	nodal	24	13,3
	Fern	22	12,2
	ohne Angabe	2	1,1
	kombinierte Rezidive*	10	5,6
	Fälle mit Rezidive	68	37,8
	ohne Rezidive	112	62,2

Tabelle 6: Verteilung der klinischen Daten (*Kombinierte Rezidive: Patienten mit mehreren Rezidiven nochmals extra aufgelistet)

2. Methoden

Die HE-gefärbten Schnittpräparate wurden morphologisch begutachtet, und das histopathologische Grading nach WHO (Grad 1–3) sowie der Nachweis einer Lymphangiosis carcinomatosa (11) und einer Perineuralscheideninfiltration (PN1) dokumentiert.

2.1. Versuchsdurchführung

Gewebe-Microarray (TMA) Herstellung

Auf HE-gefärbten Schnittpräparaten der FFPE-Blockpräparate (aus dem Archiv des Institutes für Pathologie der TU München) von Primärtumoren, jeweils im Bereich der Invasionsfront und des Tumorzentrums, und assoziierten Lymphknotenmetastasen wurden zwei tumortragende Areale ausgewählt und markiert. Aus dem FFPE-Gewebe wurden aus diesen Arealen unter Verwendung eines Tissue Microarrayers (Beecher Instruments, Sun Prairie, USA) mit einer Stanzzyylindergröße von 0,6 mm ein Gewebe-Microarray (TMA) gestanzt. Insgesamt wurden 180 Primärtumore und 88 LK-Metastasen in den TMAs integriert. Zum Vergleich wurde benachbartes gesundes Schleimhautgewebe von $n = 20$ Fällen in der gleichen Weise zu einem TMA zusammengestellt.

Immunhistochemie (IHC)

Die IHC wurde an 2 μm dicken Schnitten der TMAs wie folgt durchgeführt:

Die Gewebeproben durchliefen zur Hydrierung und Entparaffinisierung folgende Alkoholreihe: Xylol für zwei mal zehn Minuten, Isopropanol für zweimal fünf Minuten, 96 % Ethanol und 70 % Ethanol für je fünf Minuten.

Für eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers und Färbung wurde der Objektträger fünf Minuten mit Pufferwechsel mit Tris (Zusammensetzung siehe 1.2 Pufferlösungen) gewaschen. Anschließend wurde der Objektträger für vier Minuten mit Citratpuffer (Zusammensetzung siehe 1.2 Pufferlösungen) im Dampfdrucktopf gekocht. Dann wurden die Schnitte fünf Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt und danach wieder fünf Minuten mit Pufferwechsel mit Trispuffer gewaschen. Danach wurde die Peroxidase-Aktivität des Tumorgewebes durch 3%iges Wasserstoffperoxid zum Ausschluss einer falsch positiven Färbung geblockt. (5 ml 30 % Wasserstoffperoxid wird mit 45 ml destilliertem Wasser verdünnt). Vor Aufbringen des primären Antikörpers wurde der Objektträger nochmals fünf Minuten mit Trispuffer und Pufferwechsel gewaschen. Dann wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper für CD44 im Verhältnis 1:100 (AK: ADgrün) über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Ähnlich wurde mit dem Nanog AK vorgegangen. Dieser wird jedoch im Verhältnis 1:250 aufgebracht. Nach 9 – 14h wurde der Objektträger wieder mit Pufferwechsel mit Trispuffer fünf Minuten gewaschen. Danach wurde je Schnitt 120 Mikroliter des markierten Polymer-HRP-AK aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Dieser sekundäre AK musste aufgebracht werden, da die Färbung mit der indirekten Methode durchgeführt wird. Dann wird der Objektträger nochmals fünf Minuten mit Pufferwechsel mit Trispuffer gewaschen.

Anschließend wurde das DAB-Substrat aufgetragen (1000 Mikroliter Puffer und 50 Mikroliter Chrom). Wieder 120 Mikroliter pro Schnitt allerdings mit einer Inkubationszeit von acht Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Der Objektträger musste zum letzten Mal fünf Minuten mit Pufferwechsel mit Trispuffer gewaschen werden. Für die Gegenfärbung wurde der Objektträger 45 Sekunden in Hämalaun gelassen und anschließend fünf Minuten gebläut, indem der Objektträger fünf Minuten mit laufendem Leitungswasser gewaschen wird. Anschließend kam der Träger in destilliertes Wasser.

Damit die Färbung unter dem Mikroskop betrachtet werden konnte, mussten die Schnitte wieder dehydriert werden. Dazu musste der Schnitt nun eine aufsteigende Alkoholreihe durchlaufen. Je drei Minuten 70 % Ethanol, 96 % Ethanol, zweimal Isopropanol und am Ende zweimal Xylol. Für eine langfristige Aufbewahrung dient das Eindeckeln mit Pertex, wodurch das Gewebe luftdicht verschlossen wird. Es wurden sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Negativkontrolle lief nach dem gleichen Schema ab, jedoch ohne primären AK. Für Nanog war die Positivkontrolle ein Seminom und für CD44 die plattenepitheliale Schleimhaut des Ösophagus.

Die Färbungen wurden im zytologischen Labor der Frauenheilkunde der Technischen Universität München durchgeführt.

2.2. Immunhistochemische Auswertung von CD44 und Nanog

Die immunhistochemische Auswertung des Patientenkollektives konnte für Nanog in 125 Fällen an der Invasionsfront, in 115 Fällen im Tumorzentrum und in 49 Fällen in befallenen LK untersucht werden. Für CD44 gelang die Auswertung in 129 Fällen an der Invasionsfront, in 115 Fällen im Tumorzentrum und in 45 Fällen in befallenen LK. Die Diskrepanz zwischen der Anzahl der Fälle der CD44- und der Nanog-Auswertung ist auf die unterschiedliche Qualität der TMAs und der Immunhistochemie zurückzuführen. Es waren für Nanog 51 Fälle an der Invasionsfront, 65 Fälle im Tumorzentrum und 131 Fälle in befallenen Lymphknoten nicht auswertbar. Für CD44 waren von den initial 180 Patienten an der Invasionsfront 51 Fälle, im Tumorzentrum 65 Fälle und an befallenen Lymphknoten 135 Fälle nicht auswertbar.

Die CD44-Färbung war ausschließlich membranständig. Die Nanog-Färbung konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus ausgewertet werden.

Für Nanog wurden die nukleäre Expression sowie die Expression im Zytoplasma, im Referenzgewebe, an der Invasionsfront, im Zentrum des Tumors, in Lymphknotenmetastasen untersucht. Für CD44 wurde die membranständige Expression im Referenzgewebe, in der Invasionsfront, im Zentrum des Tumors sowie in den Lymphknotenmetastasen untersucht.

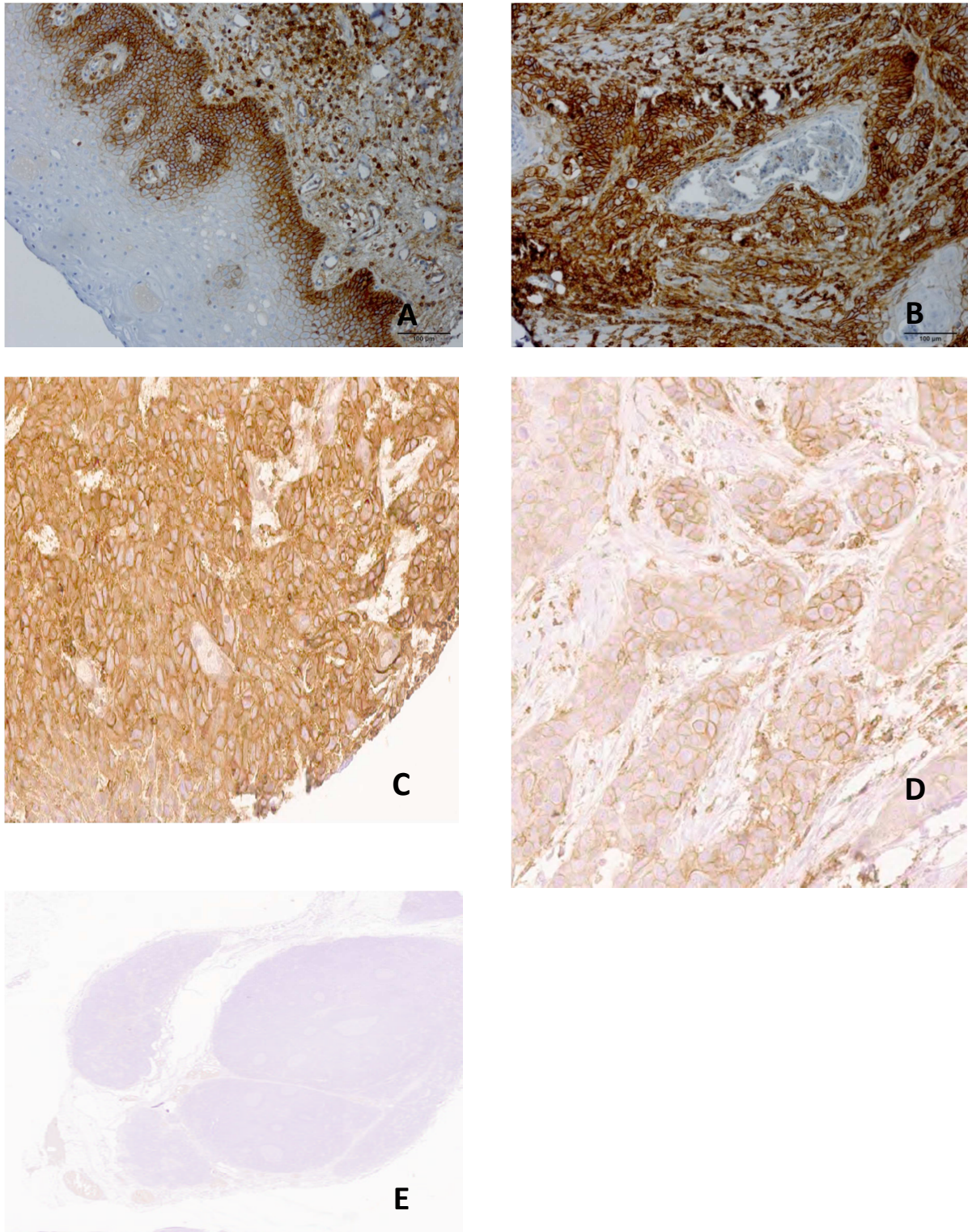
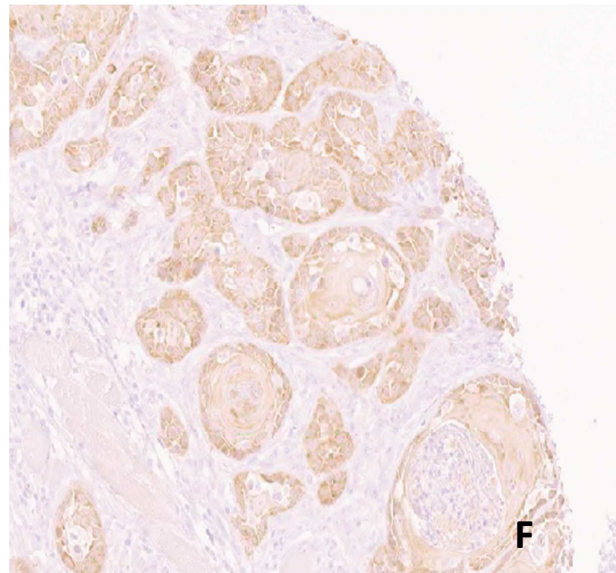
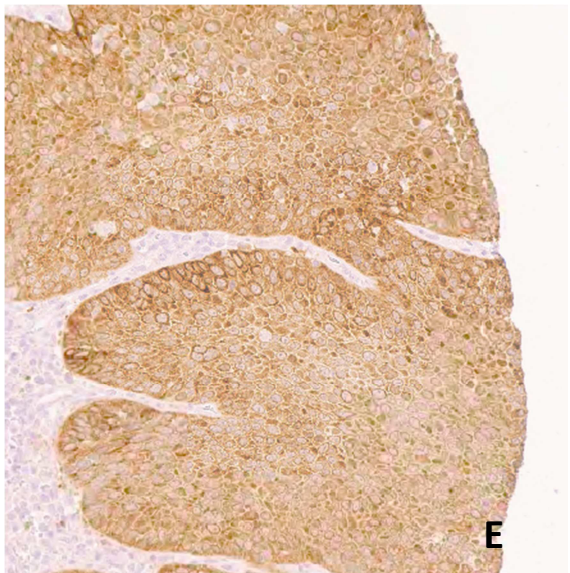
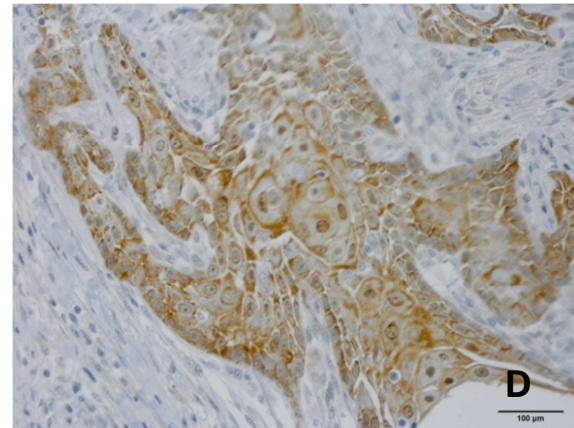
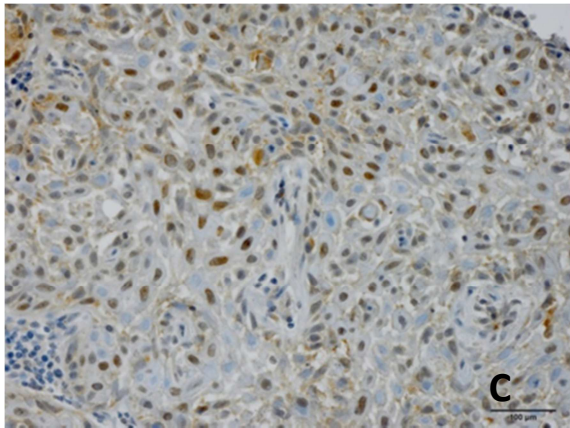
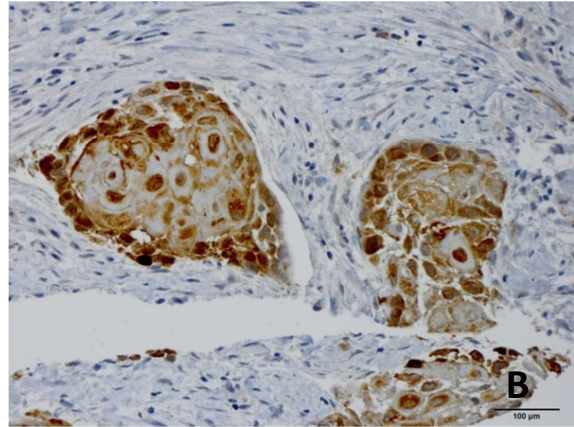
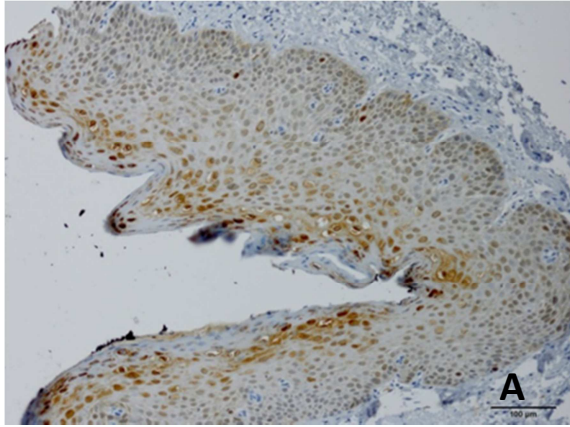


Abbildung 9: Die immunhistochemische Auswertung der Tumorgewebeproben, des Normalgewebes (3,3`Diaminbenzidine (DAB) mit Hämatoxylin als Gegenfärbung) sowie der Negativkontrolle: A: Ausprägung der CD44- Expression im gesundes Plattenepithel in 20-facher Vergrößerung, B: starke, membranständige CD44- Expression im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, C: mittelstarke, membranständige CD44- Expression im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, D: schwache, membranständige CD44- Expression im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, E: Negativkontrolle in 5-facher Vergrößerung



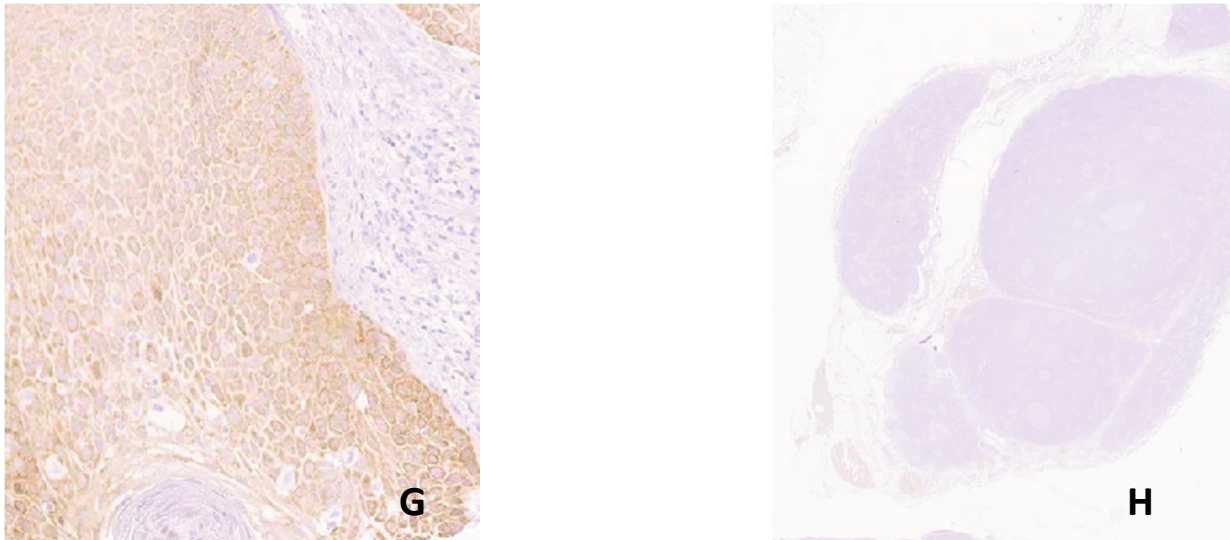


Abbildung 10: Die immunhistochemische Auswertung der Tumorgewebeproben, des Normalgewebes (3,3'Diaminbenzidine (DAB) mit Hämatoxylin als Gegenfärbung) sowie der Negativkontrolle: A: Ausprägung der Nanog- Expression im gesundes Plattenepithel in 20-facher Vergrößerung, B: starke, nukleäre Nanog- Expression im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, C: mittelstarke, nukleäre Nanog- Expression im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, D: schwache, nukleäre Nanog- Expression im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, E: starke Nanog- Expression im Zytoplasma im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, F: mittelstarke Nanog- Expression im Zytoplasma im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, G: schwache Nanog- Expression im Zytoplasma im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, H: Negativkontrolle in 5-facher Vergrößerung

Die Auswertung der IHC mit dem Lichtmikroskop wurde in Anlehnung an eine für die Auswertung der Hormonrezeptoren im Mammakarzinom etablierten Klassifikation von Remmele, 1987, vorgenommen (Remmele, Stegner 1987):

Prozentzahl (PP) der Zellen, welche CD44 bzw. Nanog exprimieren:

0 = 0 %,

1 = < 20 %,

2 = 20 % – 50 %,

3 = 51 % – 80 %

4 = 81 % – 100 %

Intensität (SI) der Expression von CD44 bzw. Nanog:

0 = negativ

1 = schwach,

2 = mittel,

3 = stark

Die Ergebnisse für PP und SI wurden multipliziert, was zu einem Immunoreaktivitäts-Score (IRS) 0 – 12 führte (sogenannter Remmele-Score). Für die weitere Auswertung wurde dieser wie folgt eingeteilt:

0 = 0 – 3

1 = 4 – 8

2 = 9 – 12

Die Auswertung für das CD44 Referenzgewebe ergab für die positiven Zellen den Wert 3 (51 – 80 %) und für die Expression auch den Wert 2 (mittel). Die Expression war vorwiegend in den basalen unteren zwei Drittel der Schichten des Epithels vorhanden und nahm zunehmend in die höher liegenden Schichten ab. Somit ergab sich ein IRS 6 (entsprechend Remmele-Score 1). Für Nanog ergab sich der Wert 3 (51 – 80 %) und 2 (mittel) für den Nukleus, entsprechend IRS 6. Das Zytoplasma hingegen war negativ. Auch hier nahm die Positivität und Intensität von basal nach oben hin ab und die Expression lag in den unteren zwei Dritteln der Epithelschichten.

Zusammenfassend ergab sich ein Remmele-Score 1 für die Expression der Marker im Normalgewebe. Darauf basierend wurden Fälle mit einem Remmele-Score 0 und 1 für weitere Analysen als „low“ definiert, Fälle mit einem Remmele-Score 3 – entsprechend einer Überexpression der Marker im Vergleich zum Normalgewebe – als „high“. Dieser Wert, der in die statistische Auswertung einging, wird im Folgenden mit Remmel_2 bezeichnet.

Expression “high”: Remmele-Score 2

Expression “low”: Remmele-Score 0; 1

2.3. Statistik

Statistische Analysen wurden unter Verwendung von SPSS für Windows, Version 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Verteilung kategorialer Merkmale wurde zwischen Gruppen unter Verwendung des χ^2 -Tests oder des exakten Tests nach Fisher, abhängig von den Zellzahlen der entsprechenden Kontingenztabellen, verglichen. Der Vergleich quantitativer Merkmale zwischen Gruppen erfolgte unter Verwendung des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests. Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden mit der Kaplan-Meier-Methode geschätzt, der Log-Rank-Test wurde verwendet um die Verteilung der Überlebenszeiten zwischen unabhängigen Gruppen zu vergleichen. Die multivariable Überlebenszeitanalyse wurde mit dem Cox-Proportional-Hazard-Modell durchgeführt. Um die Beziehung zwischen kontinuierlichen Variablen zu untersuchen, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson herangezogen. Für ordinal-skalierte Variablen wurde der nichtparametrische Koeffizient nach Spearman berechnet. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig auf einem Signifikanzniveau von 5 % durchgeführt.

2.4. Störfaktoren

Folgende Störfaktoren mussten bei der Auswertung der Überlebenszeit und der Entstehung Rezidivs beachtet werden: Grading, T-Stadium, N-Stadium, UICC-Stadium, Diagnosealter und Geschlecht. Diese Faktoren wurden mittels der multivariaten Cox-Regression berücksichtigt. Das UICC-Stadium galt als einflussreicher Störfaktor, da die Expression von CD44 im Tumorzentrum gegenläufig zum UICC-Stadium verlief. Was bedeutete, dass CD44 bei Tumoren mit niedrigem UICC-Stadium häufiger exprimiert wurde als bei Tumoren mit hohem UICC-Stadium. Da die Diagnose für Tumore mit hohem UICC-Stadium allerdings schlechter war, wurde die Korrelation allein durch die Kaplan-Meier-Kurve und den Log-Rank-Test nicht deutlich. Aus diesem Grund, musste für jedes, auch nicht signifikante Ergebnis, zusätzlich die Cox-Regression angewendet werden.

III. Ergebnisse von CD44

1. Verteilung der Expression von CD44 im Tumorzentrum, an der Invasionsfront und in den Lymphknotenmetastasen

Innerhalb des Tumorzentrums variierte die Intensität der Färbung zwischen schwach (27/115; 23,5 %), mittel (42/115; 36,5 %) und stark (46/115; 40,0 %). Der Prozentsatz der positiven Tumorzellen wurde als 1 in 9/115 (7,8 %), 2 in 14/115 (12,2 %), 3 in 25/115 (21,7 %) und 4 in 67/115 (58,3 %) Fällen klassifiziert. Multiplikation dieser Werte resultierte in Remmele_2: CD44 low in 73/115 (63,5 %) und CD44 high in 42/115 (36,5 %) Fällen. Für die Werte für CD44-Expression an der invasiven Front galt: schwach 28/129 (21,7 %), mittel 49/129 (38,0 %) und stark 52/129 (40,3 %). Der Prozentsatz der positiven Tumorzellen war wie folgt: 1 5/129 (3,9 %), 2 14/129 (10,9 %), 3 29/129 (22,5 %), 4 81/100 (62,7 %). Entsprechend lag CD44 low an der invasiven Front bei 78/129 (60,5 %) und CD44 high bei 42/129 (39,5 %).

Die Analyse der CD44-Expression im befallenen Lymphknoten zeigte eine schwache Intensität in 17/45 (37,8 %), eine mittlere Intensität in 17/45 (37,8 %) und eine starke Intensität in 11/45 (24,4 %) Fällen. Die Verteilung der prozentualen Positivität war 1 in 4/45 (8,9 %), 2 in 6/45 (13,3 %), 3 in 10/45 (22,2 %) und 4 in 25/45 (55,6 %) Fällen. Zusammenfassend galt im befallenen Lymphknoten: CD44 low in 35/45 (77,8 %) Fällen und CD44 high in 10/45 (22,2 %) Fällen.

III. Ergebnisse von CD44

		Tumorzentrum n = 115	Invasionsfront n = 129	Lymphknoten n = 45
Remmele_2	low	73 (63,5 %)	78 (60,5 %)	35 (77,8 %)
	high	42 (36,5 %)	51 (39,5 %)	10 (22,2 %)
Intensiät	1	27 (23,5 %)	28 (21,7 %)	17 (37,8 %)
	2	42 (36,5 %)	49 (38,0 %)	17 (37,8 %)
	3	46 (40,0 %)	52 (40,3 %)	11 (24,4 %)
Prozent	1	9 (7,8 %)	5 (3,9 %)	4 (8,9 %)
	2	14 (12,2 %)	14 (10,9 %)	6 (13,3 %)
	3	25 (21,7 %)	29 (22,5 %)	10 (22,2 %)
	4	67 (58,3 %)	81 (62,7 %)	25 (55,6 %)

Tabelle 7: Verteilung der CD44-Expression

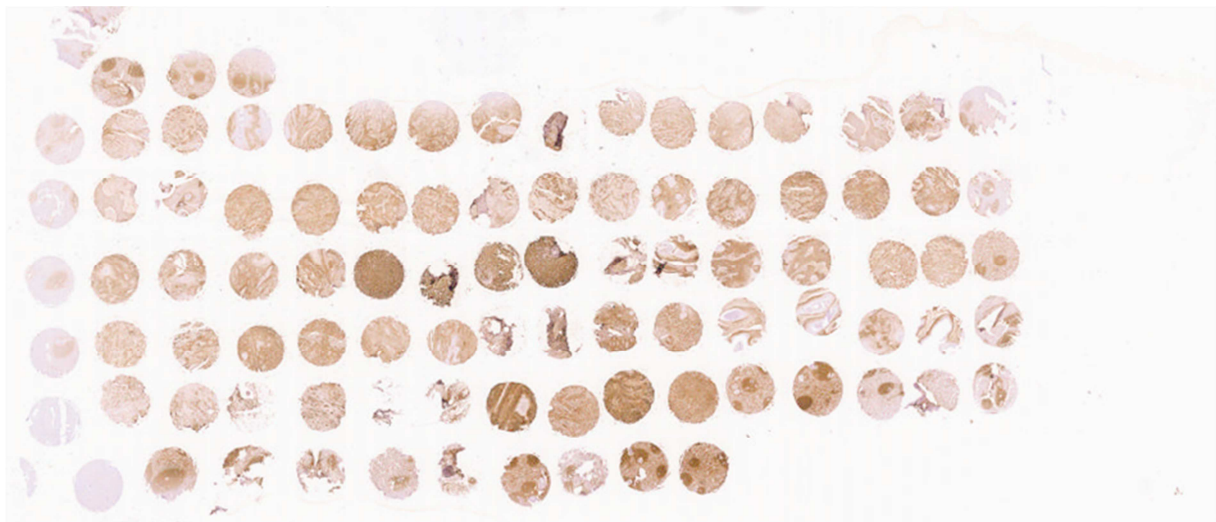


Abbildung 11: TMA repräsentiver Tumorgewebeproben für die immunhisto-chemische Auswertung der CD44-Expression

2. Die membranständige Expression von CD44 in Korrelation mit den klinisch-pathologischen Daten (Grading, T-Stadium, N-Stadium, UICC-Stadium, Alter und Geschlecht, L1-Status, Pn1-Status)

2.1. Grading

Im Tumorzentrum

Aus der statistischen Analyse konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Grading und der CD44 Expression abgelesen werden (p-Werte: 0,639).

An der Tumordinvasionsfront

Auch an der Invasionsfront konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grading des Tumors und der Expression von CD44 hergestellt werden (p-Wert: 0,411).

Im befallenen Lymphknoten

Auch hier ergab der p-Wert (1,000) kein signifikantes Ergebnis.

2.2. T-Stadium

Im Tumorzentrum

Für die CD44-Expression und das T-Stadium ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse (p-Wert: 0,081) im Tumorzentrum.

An der Invasionsfront

Es ergab sich eine statistisch signifikante positive Korrelation der CD44 Expression mit dem T-Stadium ($p = 0,019$). Die Expression von CD44 stieg mit zunehmendem T-Stadium. CD44 low war in 1/1 Fall der T1-Fälle (100 %), in 28/39 der T2-Fälle (71,8 %), aber nur in 13/31 der T4-Fälle (41,9 %) vertreten. Im Gegensatz dazu zeigten 0/1 Fall (0 %) der T1-Fälle, 11/39 der T2-Fälle (28,2 %), aber nur 18/31 Fälle (58,1 %) der T4-Fälle CD44 high an (Tabelle 8).

Kreuztabelle

		pT					Gesamt
		0	1	2	3	4	
Remmele_2 an der Invasionsfront							
CD44	low	1	28	26	10	13	78
CD44	high	0	11	18	4	18	51
Gesamt		1	39	44	14	31	129

Tabelle 8: Patienten mit T-Stadium 0-4 und einer Expression von CD44 low und high an der Invasionsfront des Tumors

Im befallenen Lymphknoten

Hier zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der CD44-Expression und dem T-Stadium (p-Wert: 0,586).

2.3. N-Stadium

Im Tumorzentrum

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von CD44 und dem N-Stadium berechnet werden (p-Wert: 0,298).

An der Tumorinvasionsfront

Auch hier konnte die Hypothese nicht signifikant nachgewiesen werden (p-Wert: 0,322).

Im befallenen Lymphknoten

Der p-Wert (1,000) bestätigte die Aussage, dass die CD44-Expression Einfluss auf das N-Stadium hat, nicht.

2.4. UICC-Stadium

Im Tumorzentrum

Eine signifikante Korrelation ergab sich im Tumorzentrum zwischen der CD44-Expression und dem UICC-Stadium mit dem p-Wert 0,018 (Tabelle 9). Die Expression von CD44 sank mit zunehmendem UICC-Stadium. Von 15 UICC1-Fällen zeigten 5 Fälle (33,3 %), jedoch 44 (69,8 %) der 63 UICC4-Fälle CD44 low an. Im Gegensatz dazu war CD44 high in 10/15 Fällen (66,7 %) der UICC1 Fälle, jedoch nur in 19/63 der UICC4-Fälle (43,2 %) vertreten.

Kreuztabelle

Remmele_2 im Tumorzentrum		UICC				Gesamt
		1	2	3	4	
CD44	low	5	12	12	44	73
CD44	high	10	8	5	19	42
Gesamt		15	20	17	63	115

Tabelle 9: Patienten mit UICC-Stadium 1 – 4 und einer Expression von CD44 (low und high) im Tumorzentrum

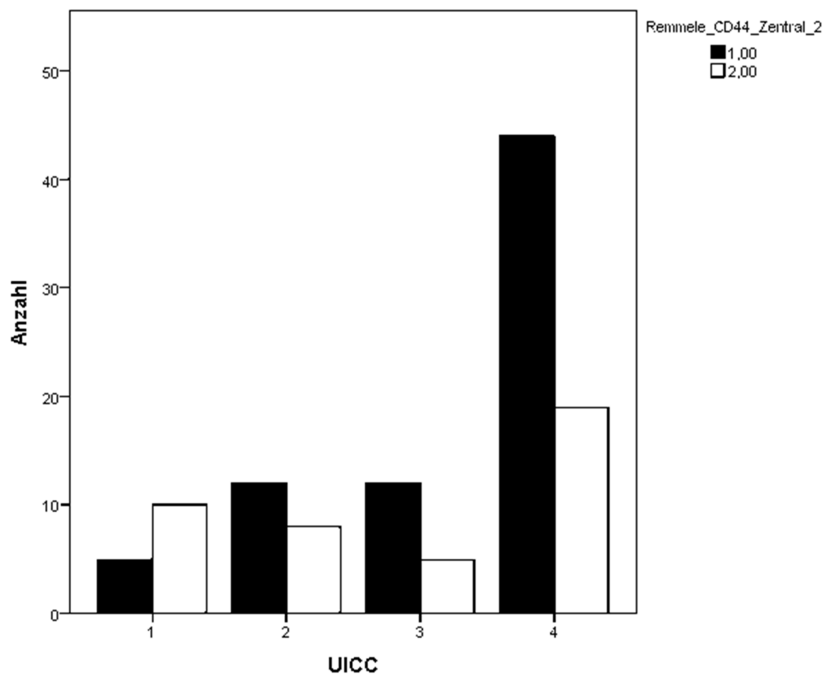


Abbildung 12: Verteilung der UICC-Stadien und der CD44-Expression: 1: low, 2: high

An der Invasionsfront

Für die Expression von CD44 und dem UICC-Stadium (p-Wert: 0,381) ergab sich kein signifikantes Ergebnis.

Im befallenen Lymphknoten

Hier zeigte sich bei der Auswertung (p-Wert: 0,675) für die Expression von CD44 und das UICC-Stadium kein signifikantes Ergebnis.

2.5. Alter und Geschlecht

Tumorzentrum

Es konnte keine Korrelation von der CD44-Expression und dem Alter bzw. dem Geschlecht hergestellt werden (p-Wert: 0,092 bzw. 1,000).

Invasionsfront

Auch hier bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CD44-Expression und dem Alter bzw. dem Geschlecht (p-Wert: 0,518 bzw. 1,000).

Im befallenen Lymphknoten

Auch an dieser Lokalisation konnte keine Korrelation erkannt werden (p-Wert: 0,897 bzw. 0,071).

2.6. Lymphangiogenesis carcinomatosa (L1-Status)

Im Tumorzentrum

Der Zusammenhang zwischen der Expression von CD44 und dem Eindringen des Tumors in ein Lymphgefäß konnte nicht bewiesen werden (p-Wert: 0,646).

An der Tumorinvasionsfront

Auch hier ergab sich keine signifikante Korrelation (p-Wert: 0,813) zwischen den beiden Faktoren.

Im befallenen Lymphknoten

Kein Nachweis einer statistisch signifikanten Korrelation der CD44 Expression mit Nachweis einer L1 (p-Wert: 1,000).

2.7. Perineuralscheideninfiltration (Pn1-Status)

Im Tumorzentrum

Es konnte keine signifikante Korrelation (p-Wert: 0,204) zwischen der CD44-Expression und dem Eindringen des Tumors in die Perineuralscheide eines Nervs nachgewiesen werden.

An der Tumorinvasionsfront

Die Hypothese wurde auch für die Invasionsfront durch den statistischen Test mit folgendem p-Wert widerlegt: 0,115.

Im befallenen Lymphknoten

Auch im tumorbefallenen Lymphknoten waren keine Zusammenhänge zwischen der Expression von CD44 und dem Eindringen des Tumors in eine Perineuralscheide eines Nervs zu erkennen (p-Wert: 0,645).

3. Die membranständige Expression von CD44 in Korrelation zur Überlebenszeit (OS/DSS/DFS)

Die Hypothese, dass die CD44-Expression Einfluss auf die Überlebenszeit (OS/DSS/DFS) besitzt, wurde zunächst mittels einer univariaten Analyse (Kaplan-Meier-Kurve und Log-Rank-Test) überprüft. Anschließend wurde eine multivariaten Analyse (Cox-Regression) angeschlossen, welche das Grading, das T-Stadium, das N-Stadium und das UICC-Stadium, das Alter und das Geschlecht berücksichtigt, um einen möglichen Einfluss der genannten Faktoren (insbesondere aufgrund der genannten negativen Korrelation von CD44 Expression und UICC Stadium) auszuschließen.

Im Tumorzentrum

In der univariaten Analyse zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen CD44 und dem Gesamtüberleben (OS) (p-Wert: 0,986).

Auch für das tumorabhängige Überleben (DSS) (p-Wert: 0,442) (Abbildung 13) und das progressionsfreie Überleben (DFS) (p-Wert: 0,165) konnte keine Signifikanz festgestellt werden (Abbildung 14).

Die mittlere Überlebenszeit für DSS betrug für Patienten mit CD44 low 62,6 Monate (Standardfehler: 3,9 Monate) und für Patienten mit CD44 high 43,6 Monate (Standardfehler: 3,9 Monate) (Tabelle 10).

Die mittlere Überlebenszeit für DFS betrug für Patienten mit CD44 low 57,2 Monate (Standardfehler: 4,1 Monate) und für Patienten mit CD44 high 37,2 Monate (Standardfehler: 4,3 Monate) (Tabelle 11).

Anhand der multivariaten Analyse ergaben das tumorabhängige Überleben mit der Hazard Ratio (HR) 2,3 (1,1 – 4,9) (DSS, p-Wert: 0,035) und das progressionsfreie Überleben mit HR 2,5 (1,2 – 5,0) (DFS, p-Wert: 0,011) mit der CD44-Expression eine signifikante Korrelation (Tabelle 12 und 13).

Für OS konnte kein signifikantes Ergebnis abgelesen werden (p-Wert: 0,259).

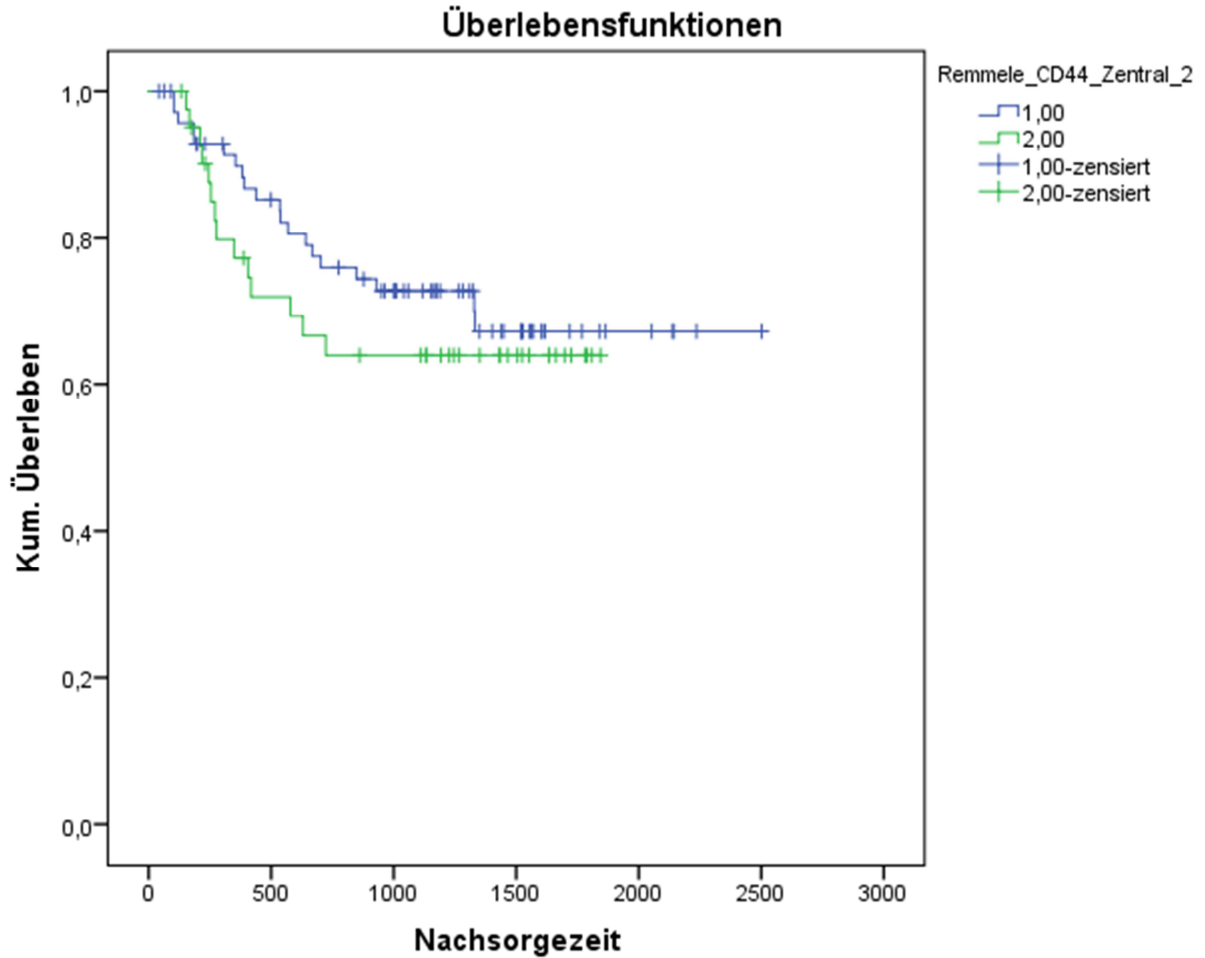


Abbildung 13: Korrelation zwischen Expression von CD44 und dem tumorabhängigem Überleben (DSS) (low: blau, high: grün)

Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit

Remmele_2 im Tumorzentrum	Mittelwert ^a			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
CD44 low	1878,114	117,128	1648,543	2107,685
CD44 high	1306,683	116,085	1079,156	1534,211
Gesamt	1825,681	96,047	1637,429	2013,933

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardfehler für das tumorabhängige Überleben

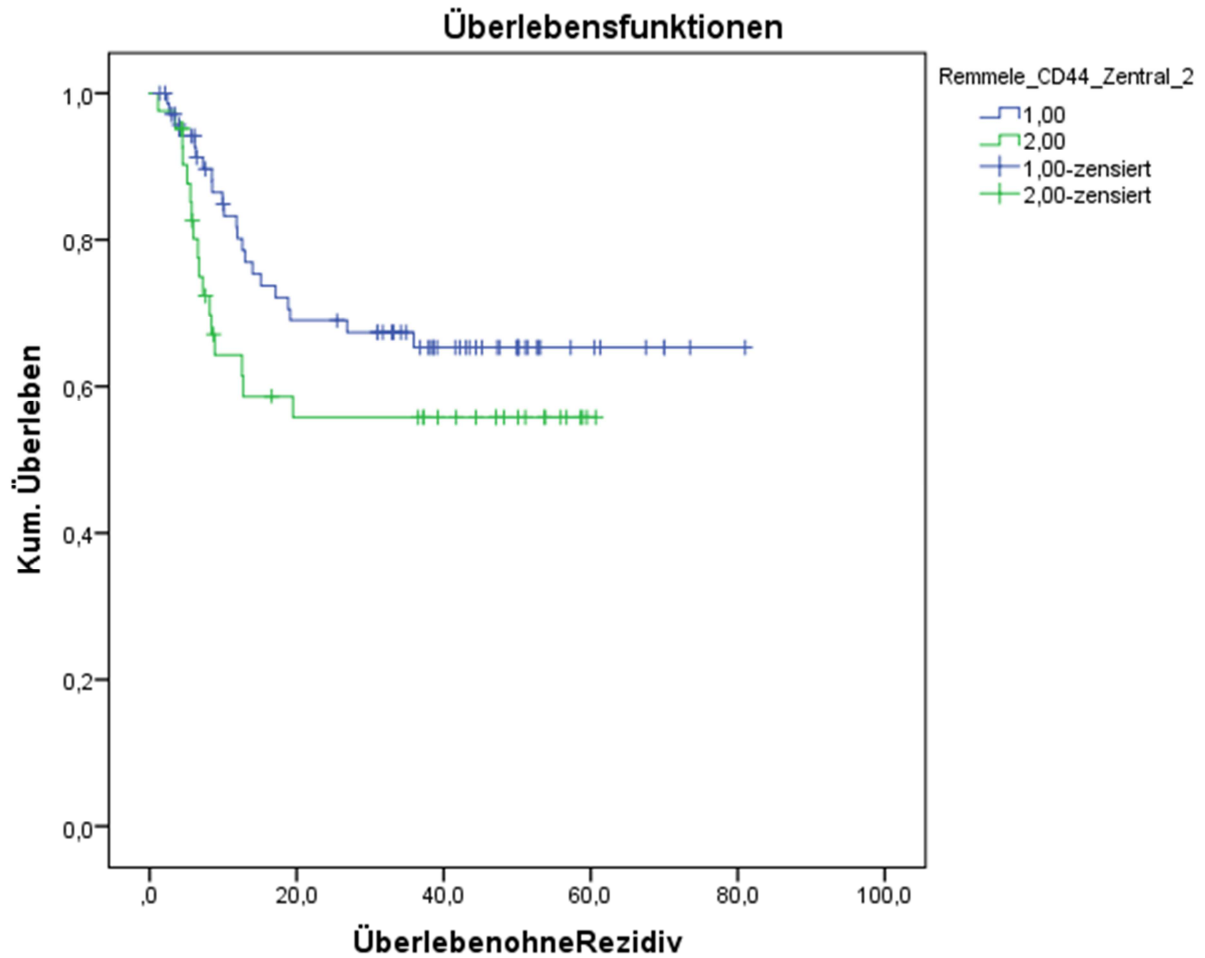


Abbildung 14: Korrelation zwischen Expression von CD44 und dem progressionsfreiem Überleben (DFS) (low: blau, high: grün)

Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit

Remmele_2 im Tumorzentrum	Mittelwert ^a			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
CD44 low	57,230	4,139	49,118	65,342
CD44 high	37,210	4,299	28,783	45,636
Gesamt	54,017	3,432	47,290	60,744

Tabelle 11: Mittelwerte und Standardfehler für das progressionsfreie Überleben

Variablen in der Gleichung

	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzinterv. für HR	
			Untere	Obere
pT	,703			
pT(1)	,191	,118	,005	2,912
pT(2)	,159	,209	,024	1,847
pT(3)	,213	,224	,021	2,352
pT(4)	,206	,248	,029	2,147
pN	,939			
pN(1)	,751	1,256	,307	5,146
pN(2)	,770	1,198	,358	4,004
UICC	,556			
UICC(1)	,515	,367	,018	7,480
UICC(2)	,882	,802	,044	14,664
UICC(3)	,791	1,506	,073	31,243
gender	,886	,938	,394	2,236
Diagnosealter	,758	,993	,951	1,038
Grading	,024			
Grading(1)	,964	,000	,000	4,230E+303
Grading(2)	,003	,022	,002	,276
Grading(3)	,002	,017	,001	,229
Remmele_CD44_Zentral_2	,035	2,272	1,061	4,864

Tabelle 12: Cox-Regression für das tumorabhängige Überleben

Variablen in der Gleichung

	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzinterv. für HR	
			Untere	Obere
pT	,917			
pT(1)	,559	,396	,018	8,905
pT(2)	,604	,570	,068	4,758
pT(3)	,372	,328	,029	3,775
pT(4)	,566	,536	,063	4,519
pN	,591			
pN(1)	,305	,435	,088	2,137
pN(2)	,738	,821	,257	2,616
UICC	,703			
UICC(1)	,943	1,101	,078	15,447
UICC(2)	,893	1,216	,070	21,035
UICC(3)	,506	2,630	,152	45,428
gender	,571	1,247	,581	2,676
Diagnosealter	,178	,972	,933	1,013
Grading	,296			
Grading(1)	,963	148,949	,000	8,353E+94
Grading(2)	,954	545,811	,000	3,030E+95
Grading(3)	,959	284,318	,000	1,580E+95
Remmele_CD44_Zentral_2	,011	2,485	1,234	5,004

Tabelle 13: Cox-Regression für progressionsfreies Überleben an der Invasionsfront

Bei der univariaten Analyse ergab sich keine signifikante Korrelation für die Expression von CD44 und OS (p-Wert: 0,869), DSS (p-Wert: 0,331) oder DFS (p-Wert: 0,077).

Auch mittels einer multivariaten Analyse brachten OS (p-Wert: 0,839)/DSS (p-Wert: 0,376) und DFS (p-Wert: 0,118) keine signifikanten Ergebnisse hervor.

Im befallenen Lymphknoten

Auch im befallenen Lymphknoten zeigte sich in der multivariaten Auswertung weder für OS (p-Wert: 0,462), noch für DSS (p-Wert: 0,416), noch für DFS (p-Wert: 0,456) ein signifikantes Ergebnis. Auch mittels der multivariaten Analyse war kein signifikantes Ergebnis zu erkennen (OS: p-Wert: 1,000, DSS: p-Wert: 0,255, DFS: p-Wert: 0,504).

4. Die membranständige Expression von CD44 in Korrelation zu Untergruppen des Rezidivs (Lokalrezidiv, Lymphknotenrezidiv, Fernrezidiv)

Die Hypothese, dass die CD44-Expression Einfluss auf die Rezidive besitzt wurde zunächst mittels einer univariaten Analyse (Kaplan-Meier-Kurve und Log-Rank-Test) überprüft. Anschließend wurde eine multivariaten Analyse (Cox-Regression) angeschlossen, welche das Grading, das T-Stadium, das N-Stadium sowie das UICC-Stadium, das Alter und das Geschlecht berücksichtigte, um einen möglichen Einfluss der genannten Faktoren (insbesondere aufgrund der genannten negativen Korrelation von CD44 Expression und UICC Stadium) auszuschließen.

4.1. Lokalrezidiv

Im Tumorzentrum

Anhand einer univariaten Auswertung konnte kein signifikantes Ergebnis erreicht werden (p-Wert: 0,537) (Abbildung 15).

Die mittlere rezidivfreie Zeit für Patienten mit einer low-Expression betrug 63,7 Monate (Standardfehler: 4,2 Monate) und für Patienten mit einer high-Expression 46,9 Monate (Standardfehler: 4,0 Monate) (Tabelle 14).

Die anschließende multivariate Analyse unter Berücksichtigung der o. g. möglichen Confounder ergab eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von CD44 und der Bildung eines Lokalrezidivs mit dem HR von 2,8 (1,1 – 7,4) (p-Wert: 0,037, Tabelle 15).

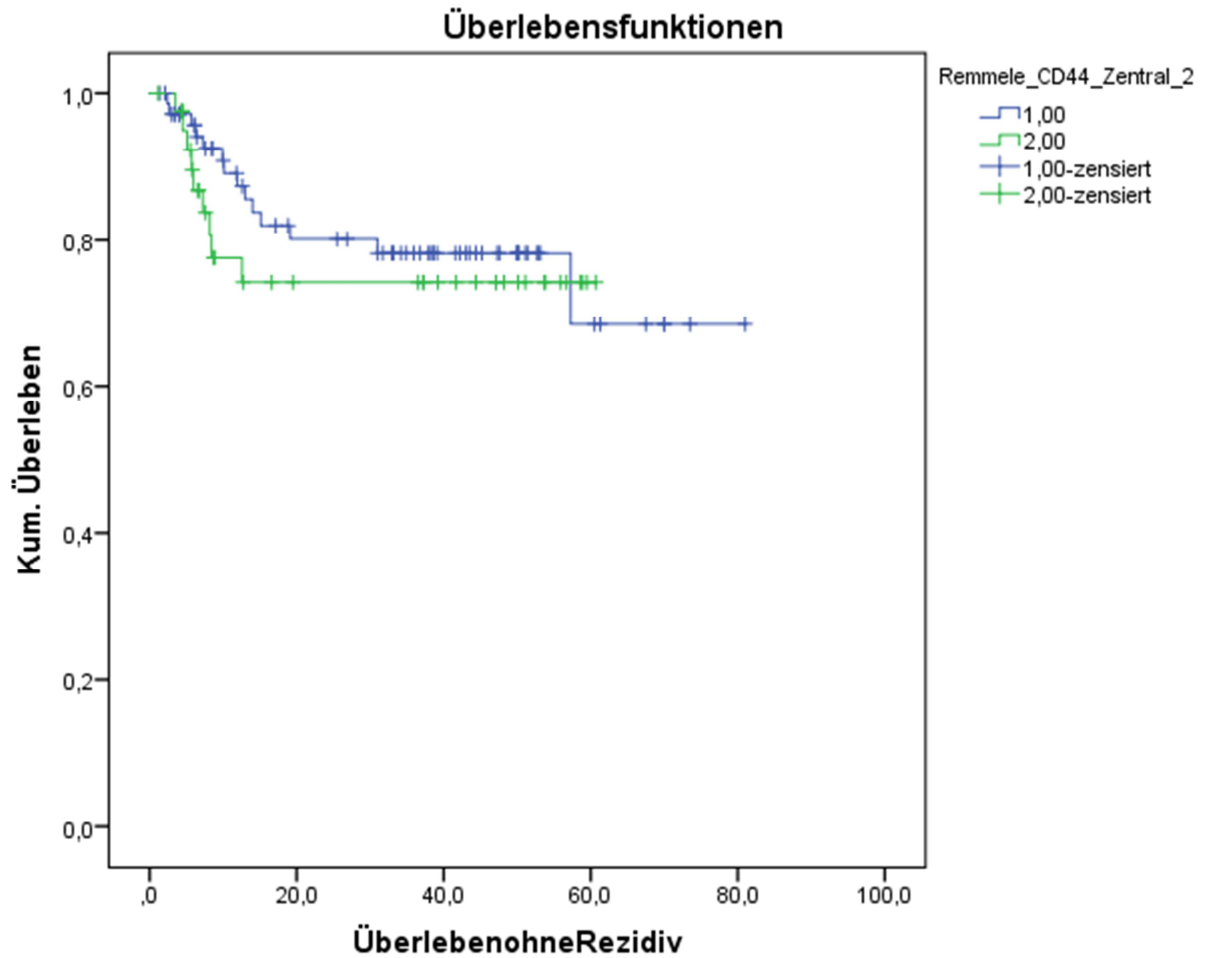


Abbildung 15: Korrelation zwischen Expression von CD44 und dem Entstehen eines Lokalrezidivs (low: blau, high: grün)

Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit

Remmele_2 im Tumorzentrum	Mittelwert ^a			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
CD44 low	63,650	4,167	55,482	71,818
CD44 high	46,857	4,012	38,994	54,719
Gesamt	62,907	3,364	56,313	69,500

Tabelle 14: Mittelwerte und Standardfehler für das Entstehen eines Lokalrezidivs

Variablen in der Gleichung

	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzinterv. für HR	
			Untere	Obere
pT	,803			
pT(1)	,699	,003	,000	15804906883,511
pT(2)	,606	,561	,062	5,064
pT(3)	,235	,142	,006	3,544
pT(4)	,541	,499	,054	4,647
pN	,768			
pN(1)	,623	,540	,047	6,271
pN(2)	,790	1,291	,197	8,438
UICC	,854			
UICC(1)	,804	,025	,000	120225513230,259
UICC(2)	,858	,069	,000	359677693507,201
UICC(3)	,853	,063	,000	334341660892,611
gender	,473	1,461	,518	4,120
Diagnosealter	,010	,926	,873	,982
Grading	,117			
Grading(1)	,956	722,560	,000	5,506E+103
Grading(2)	,961	349,200	,000	2,644E+103
Grading(3)	,977	32,135	,000	2,453E+102
Remmele_CD44_Zentral_2	,037	2,799	1,065	7,355

Tabelle 15: Cox-Regression für das Entstehen eines Lokalrezidivs

An der Tumorinvasionsfront

An der Invasionsfront konnte weder durch eine univariate (p-Wert: 0,348), noch durch eine multivariate Analyse (p-Wert: 0,344) eine signifikante Korrelation hergestellt werden.

Im befallenen Lymphknoten

Auch im befallenen Lymphknoten ergab sich weder mittels einer univariaten (p-Wert: 0,139) noch mittels einer multivariaten Analyse (p-Wert: 0,213) eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von CD44 und der Entstehung eines Lokalrezidivs.

4.2. Lymphknotenrezidiv

Im Tumorzentrum

Im Tumorzentrum bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von CD44 und der Entstehung eines Lymphknotenrezidivs. Dies wurde mittels einer univariaten (p-Wert: 0,861) und einer multivariaten Analyse (p-Wert: 0,567) geprüft.

An der Tumorinvasionsfront

Auch in der Invasionsfront konnte keine Korrelation zwischen der Expression und der Erkrankung an einem Lymphknotenrezidiv hergestellt werden welche die Hypothese bestätigt (univariate Analyse: p-Wert: 0,749, multivariate Analyse: p-Wert: 0,365).

Im befallenen Lymphknoten

Ebenfalls keine Signifikanz war im befallenen Lymphknoten für die Korrelation zwischen Expression von CD44 und Lymphknotenrezidiv zu erkennen. Weder mittels der univariaten (p-Wert: 0,535), noch mittels der multivariaten Analyse (p-Wert: 0,923).

4.3. Fernrezidiv

Im Tumorzentrum

Für die CD44-Expression und die Entstehung einer Fernmetastase ergab sich mittels der univariaten Kaplan-Meier-Analyse und des Log-Rank-Tests keine signifikante Korrelation (p-Wert: 0,877). Auch mittels der multivariaten Cox-Regression ergab sich kein signifikanter Zusammenhang (p-Wert: 0,584).

An der Tumorinvasionsfront

Auch an der Invasionsfront ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Expression von CD44 und der Entstehung eines Fernrezidivs mittels der Kaplan-Meier-Analyse und des Log-Rank-Tests (p-Wert: 0,443) oder der Cox-Regression (p-Wert: 0,772).

Im befallenen Lymphknoten

Im befallenen Lymphknoten ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse durch die univariate Kaplan-Meier-Analyse und den Log-Rank-Test (p-Wert: 0,237) oder die multivariate Cox-Regression (p-Wert: 0,856).

IV. Ergebnisse von Nanog

1. Verteilung der Expression von Nanog im Tumorzentrum, an der Invasionsfront und in den Lymphknotenmetastasen

Die Nanog-Expression wurde anhand von 180 Primärtumoren und 88 befallenen Lymphknoten analysiert. Von diesen Fällen konnten 115 Fälle für die Nanog-Expression im Kern und im Zytoplasma innerhalb des Tumorzentrums, 125 Fälle für die Expression an der invasiven Front und 49 Fälle im befallenen Lymphknoten ausgewertet werden.

Innerhalb des Tumorzentrums variierte die Intensität der Färbung im Kern zwischen negativ (26/115, 22,6 %), schwach (63/115; 54,8 %), mittel (26/115; 22,6 %) und stark (0/115; 0 %). Der Prozentsatz der positiven Tumorzellen wurde als 0 in 89/115 (77,4 %) 1 in 26/115 (22,6 %), 2 in 0/115 (0 %), 3 in 0/115 (0 %) und 4 in 0/115 (0 %) Fällen klassifiziert. Multiplikation dieser Werte resultierte in Remmele_2: Nanog low in 111/115 (96,5 %) und Nanog high in 4/115 (3,5 %) Fällen. Innerhalb des Tumorzentrums variierte die Intensität der Färbung im Zytoplasma zwischen negativ (3/115, 2,6 %), schwach (81/115; 70,4 %), mittel (31/115; 27,0 %) und stark (0/115; 0 %). Der Prozentsatz der positiven Tumorzellen wurde als 0 in 26/115 (22,6 %), 1 in 89/115 (77,4 %), 2 in 0/115 (0 %), 3 in 0/115 (0 %) und 4 in 0/115 (0 %) Fällen klassifiziert. Multiplikation dieser Werte resultierte in Remmele_2: Nanog low in 85/115 (73,9 %) und Nanog high in 36/115 (26,1 %) Fällen.

Für die Werte für die Nanog-Expression im Kern an der invasiven Front galt: negativ 21/125 (16,8 %), schwach 77/125 (61,6 %), mittel 27/125 (21,6 %) und stark 0/129 (0 %). Der Prozentsatz der positiven Tumorzellen war wie folgt: 0 76/125 (60,8 %), 1 49/125 (39,2 %), 2 0/129 (0 %), 3 0/129 (0 %), 4 0/100 (0 %). Deswegen lag Nanog low an der invasiven Front bei 117/125 (93,6 %) und Nanog high bei 8/125 (6,4 %). Für die Werte für die Nanog-Expression im Zytoplasma an der invasiven Front galt: negativ 2/125 (8,0 %), schwach 89/125 (71,2 %), mittel 34/125 (27,2 %) und stark 0/129 (0 %). Der Prozentsatz der positiven Tumorzellen war wie folgt: 0 35/125 (28,0 %), 1 90/125 (72,0 %), 2 0/129 (0 %), 3 0/129 (0 %), 4 0/100 (0 %). Deswegen lag Nanog low an der invasiven Front bei 95/125 (76,0 %) und Nanog high bei 30/125 (24,0 %).

Die Analyse der Nanog-Expression im Kern im befallenen Lymphknoten zeigte keine Färbung in 6/49 (12,2 %) , eine schwache Intensität in 36/49 (73,5 %), eine mittlere Intensität in 6/49 (12,3 %) und eine starke Intensität in 0/49 (0 %) Fällen. 1 Fall war nicht auswertbar (2,0 %) Die Verteilung der prozentualen Positivität war 0 in 20/49 (40,8 %), 1 in 28/49 (57,2 %), 2 in 0/49 (0%), 3 in 0/49 (0 %) und 4 in 0/49 (0 %) Fällen. 1 Fall war nicht auswertbar (2,0 %) Zusammenfassend galt im befallenen Lymphknoten: Nanog low in 44/49 (89,8 %) Fälle und Nanog high in 4/49(8,2 %) Fälle. 1 Fall war nicht auswertbar (2,0 %). Die Analyse der Nanog-Expression im Zytoplasma im befallenen Lymphknoten zeigte eine negative Intensität in 1/49 (2,0 %) , eine schwache Intensität in 13/49 (71,5 %), eine mittlere Intensität in 13/49 (26,5 %) und eine starke Intensität in 0/49 (0 %) Fällen. 1 Fall war nicht auswertbar (2,0 %). Die Verteilung der prozentualen Positivität war 0 in 11/49 (22,4 %), 1 in 38/49 (77,6 %), 2 in 0/49 (0%), 3 in 0/49 (0 %) und 4 in 0/49 (0 %) Fällen. Zusammenfassend galt im befallenen Lymphknoten: Nanog low in 36/49 (73,5 %) Fälle und Nanog high in 13/49(26,5 %) Fälle.

IV. Ergebnisse von Nanog

		Tumorzentrum Kern n = 115	Tumorzentrum Zytoplasma n = 115	Invasionsfront Kern n = 125	Invasionsfront Zytoplasma n = 125	Lymphknoten Kern n = 49	Lymphknoten Zytoplasma n = 49
Remmele_2	low	111 (96,5 %)	85 (73,9 %)	117 (93,6 %)	95 (76,0 %)	44 (89,8 %)	36 (73,5 %)
	high	4 (3,5 %)	30 (26,1 %)	8 (6,4 %)	30 (24,0 %)	4 (8,2 %)	13 (26,5 %)
	NA					1 (2 %)	
Intensität	0	26 (22,6 %)	3 (2,6 %)	21 (16,8 %)	2 (8,0 %)	6 (12,2 %)	1 (2,0 %)
	1	63 (54,8 %)	81 (70,4 %)	77 (61,6 %)	89 (71,2 %)	36 (73,5 %)	35 (71,5 %)
	2	26 (22,6 %)	31 (27,0 %)	27 (21,6 %)	34 (27,2 %)	6 (12,3 %)	13 (26,5 %)
	3	0	0	0	0	0	
	NA					1 (2,0%)	
Prozent	0	89 (77,4 %)	26 (22,6 %)	76 (60,8 %)	35 (28,0 %)	20 (40,8 %)	11 (22,4 %)
	1	26 (22,6 %)	89 (77,4 %)	49 (39,2 %)	90 (72,0 %)	28 (57,2 %)	38 (77,6 %)
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0
	NA					1 (2,0 %)	

Tabelle 16: Verteilung der Nanog-Expression

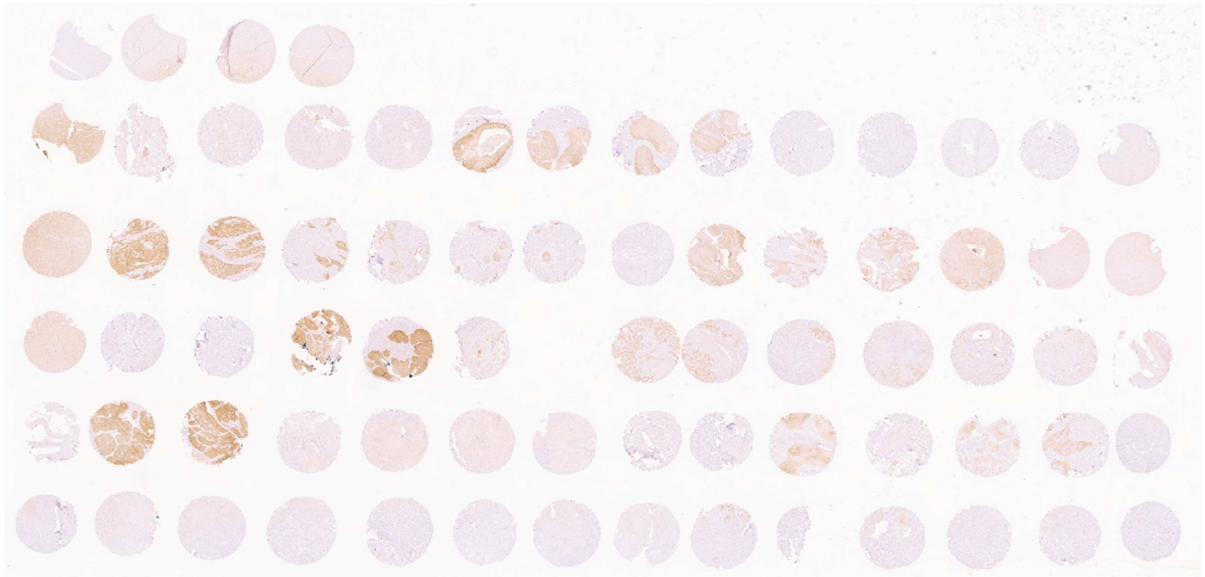


Abbildung 16: TMA repräsentativer Tumorgewebebeobachten für die immunhisto-chemische Auswertung der Nanog-Expression

2. Die Expression von Nanog in Korrelation in Korrelation mit den klinisch-pathologischen Daten (Grading, T-Stadium, N-Stadium, UICC-Stadium, L1-Status, Pn1-Status, Alter und Geschlecht)

2.1. Grading

Im Tumorzentrum

Die Expression von Nanog stand gemäß statistischer Analyse nicht im Zusammenhang mit dem Tumor-Grading. (p-Wert: Kern: 0,258, Zyto: 0,249).

An der Invasionsfront

Auch hier konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Nanog und dem Tumor-Grading erkannt werden (p-Wert: Remmele_2: Kern: 0,399, Zyto: 0,234).

Im befallenen Lymphknoten

Für die Auswertung der Expression von Nanog im Kern ergab sich ein signifikanter p-Wert von 0,024 (Tabelle 17). Die Expression von Nanog stieg mit zunehmendem Grading. Nanog low zeigte sich in 1/1 Fall (100 %) der Grading1-Fälle, in 36/37 (97,3 %) Grading2-Fällen und in 7/10 (70,0 %) Grading3-Fällen. Im Gegensatz dazu zeigte sich Nanog high in 0/0 (0,0 %) der Grading1-Fälle, in 1/37 (2,7 %) der Grading2-Fälle, jedoch in 3/10 (30,0 %) der Grading3-Fälle. Bei der Expression im Zytoplasma war keine Signifikanz zu erkennen (p-Wert: Zyto: 0,280).

Kreuztabelle

Remmele_2 im Lymphknoten im Kern		Grading			Gesamt
		1,0	2,0	3,0	
Nanog	low	1	36	7	44
Nanog	high	0	1	3	4
Gesamt		1	37	10	48

Tabelle 17: Patienten mit Grading1-3 und einer Expression von Nanog (low und high) im Kern der Zelle im befallenen Lymphknoten

2.2. T-Stadium

Im Tumorzentrum

Es wurde kein Zusammenhang zwischen der Expression von Nanog und der Tumorgroße des Patienten festgestellt (p-Wert: Kern: 0,247, Zyto: 0,097).

An der Invasionsfront

Auch hier konnte keine Korrelation zwischen den Faktoren festgestellt werden (p-Wert: Kern: 0,871, Zyto: 0,777).

Im befallenen Lymphknoten

Die Expression von Nanog und die Tumorgröße standen auch hier gemäß statistischer Auswertung nicht im Zusammenhang (p-Wert: Kern: 0,612, Zyto: 0,206).

2.3.N-Stadium

Im Tumorzentrum

Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von Nanog und dem N-Stadium (p-Wert: Kern: 0,478, Zyto: 0,733).

An der Invasionsfront

Auch hier konnte keine signifikante Aussage über die Expression von Nanog und dem N-Stadium gemacht werden (p-Wert: Kern: 0,338, Zyto: 0,909).

Im befallenen Lymphknoten

Gemäß statistischer Analyse standen die Expression von Nanog und das N-Stadium nicht im Zusammenhang (p-Wert: Kern: 0,382, Zyto: 0,381).

2.4.UICC-Stadium

Im Tumorzentrum

Die Expression von Nanog gab keinen Aufschluss über das UICC-Stadium (p-Wert: Kern: 0,193, Zyto: 0,579).

An der Invasionsfront

Auch die Nanog-Expression an der Invasionsfront und das UICC-Stadium ergaben keinen signifikanten Zusammenhang (p-Wert: Kern: 0,142, Zyto: 0,801).

Im befallenen Lymphknoten

Die Nanog Expression im befallenen Lymphknoten und das UICC-Stadium standen nicht im Zusammenhang (p-Wert: Kern: 0,610, Zyto: 0,468).

2.5. Alter und Geschlecht

Tumorzentrum

Es konnte keine Korrelation von der Nanog-Expression und dem Alter bzw. dem Geschlecht hergestellt werden (p-Wert: Kern: 0,515, Zyto: 0,882 bzw. Kern: 1.000, Zyto: 0,489).

Invasionsfront

Auch hier bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Nanog-Expression und dem Alter bzw. dem Geschlecht (p-Wert: Kern: 0,714, Zyto: 0,684 bzw. Kern: 0,717, Zyto: 0,267).

Im befallenen Lymphknoten

Auch an dieser Lokalisation konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expression und dem Alter bzw. Geschlecht erkannt werden (p-Wert: Kern: 0,229, Zyto: 0,731 bzw. Kern: 0,592, Zyto: 0,304).

2.6. Lymphangiosis carcinomatosa (L1-Status)

Im Tumorzentrum

Es ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen den Faktoren (p-Wert: Kern: 0,575, Zyto: 0,262).

An der Invasionsfront

Ebenfalls keine signifikante Korrelation ergab sich auch an der Invasionsfront für die Expression im Kern zwischen den Faktoren (p-Wert: Kern: 0,624). Für die Nanog-Expression im Zytoplasma ergab sich ein signifikanter Wert (p-Wert: 0,015). Die Expression von Nanog stieg also mit Zunahme der positiven L1-Fälle. Nanog low war in 63/78 (80,8 %) L0-Fällen, jedoch nur in 13/24 (54,2 %) L1-Fällen vertreten. Im Gegensatz dazu zeigte sich Nanog high nur in 15/78 (19,2 %) der L0-Fälle, jedoch in 11/24 (45,8 %) der L1-Fälle (Tabelle 18).

Kreuztabelle

		L1		Gesamt
		0,0	1,0	
Remmele_2 an der Invasionsfront im Zytoplasma				
Nanog	low	63	13	76
Nanog	high	15	11	26
Gesamt		78	24	102

Tabelle 18: Patienten mit L1 (0,0: L0; 1,0: L1) (0,0: nicht eingedrungen, 1,0: eingedrungen) und einer Expression von Nanog (low und high) im Zytoplasma der Zelle an der Invasionsfront

Im befallenen Lymphknoten

Für die Expression von Nanog im Zytoplasma und das Eindringen des Tumors in ein Lymphgefäß war eine signifikante Korrelation nachweisbar (Tabelle 19). Die Expression von Nanog stieg also mit Zunahme der positiven L1-Fälle. Nanog low war in 22/26 (84,6 %) L0-Fällen, jedoch nur in 6/13 (46,2 %) L1-Fällen vertreten. Im Gegensatz dazu zeigte sich Nanog high nur in 4/26 (15,4 %) der L0-Fälle, jedoch in 7/13 (53,8 %) der L1-Fälle (p-Wert: 0,022). Für die Expression im Nukleus war das Ergebnis nicht signifikant (p-Wert: 0,538).

Kreuztabelle

		L1		Gesamt
		0,0	1,0	
Remmele_2 im Lymphknoten im Zytoplasma				
Nanog	low	22	6	28
Nanog	high	4	7	11
Gesamt		26	13	39

Tabelle 19: Patienten mit L1-Status (0,0: nein, 1,0:ja) und einer Expression von Nanog (low und high) im Zytoplasma der Zelle im befallenen Lymphknoten

2.7.Perineuralscheideninfiltration (Pn1-Status)

Im Tumorzentrum

Es konnte keine Korrelation zwischen den beiden Faktoren nachgewiesen werden (p-Wert: Kern: 0,194, Zyto; 0,800).

An der Invasionsfront

Auch hier ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Expression von Nanog und dem Eindringen des Tumors in die Perineuralscheide eines Nervs (p-Wert: Kern: 0,334, Zyto: 1,000).

Im befallenen Lymphknoten

Ebensowenig lies sich etwas über die Expression von Nanog im Bezug auf das Eindringen des Tumors in die Perineuralscheide eines Nervs machen (p-Wert: Kern: 1,000, Zyto: 0,718).

3. Die Expression von Nanog in Korrelation zur Überlebenszeit (OS/DSS/DFS)

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma im Tumorzentrum

In der univariaten Analyse zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Nanog im Zytoplasma oder im Kern und dem Gesamtüberleben (OS) (p-Wert: Kern: 0,544, Zyto: 0,449). Auch für das tumorabhängige Überleben (DSS) (p-Wert: Kern: 0,916, Zyto: 0,653) und das progressionsfreie Überleben (DFS) (p-Wert: Kern: 0,318, Zyto: 0,993) konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma an der Invasionsfront

Auch an der Invasionsfront ergab sich mittels der univariaten Analyse keine signifikante Korrelation für die Expression von Nanog im Zytoplasma oder im Kern und OS (p-Wert: Kern: 0,102, Zyto: 0,711), DSS (p-Wert: Kern: 0,103, Zyto: 0,860) oder DFS (p-Wert: Kern: 0,078, Zyto: 0,666).

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma im Lymphknoten

Im befallenen Lymphknoten konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Nanog im Zytoplasma und dem Gesamtüberleben (OS) festgestellt werden (p-Wert: 0,040) (Abbildung 17, Tabelle 20).

Die mittlere Überlebenszeit (OS) für Patienten mit der Expression „low“ lag bei 51,0 Monaten (Standardfehler: 5,3 Monate). Die mittlere Überlebenszeit (OS) für Patienten mit der Expression „high“ lag bei 24, 8 Monaten (Standardfehler: 5,1 Monate).

Im Kern konnte kein signifikantes Ergebnis für die Korrelation von Nanog und OS festgestellt werden (p-Wert: 0,382). Ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Expression von Nanog im Kern oder im Zytoplasma und DSS (p-Wert: Kern: 0,714, Zyto: 0,149) und DFS (P-Wert: Kern: 0,150, Zyto: 0,662) wurden analysiert.

Nach einer multivariaten Cox-Regression, welche die Faktoren Grading, T-Stadium, N-Stadium, UICC-Stadium, Alter und Geschlecht miteinbezieht, konnte jedoch auch für das Gesamtüberleben (OS) kein signifikantes Ergebnis erzielt werden (p-Wert: 1,000)

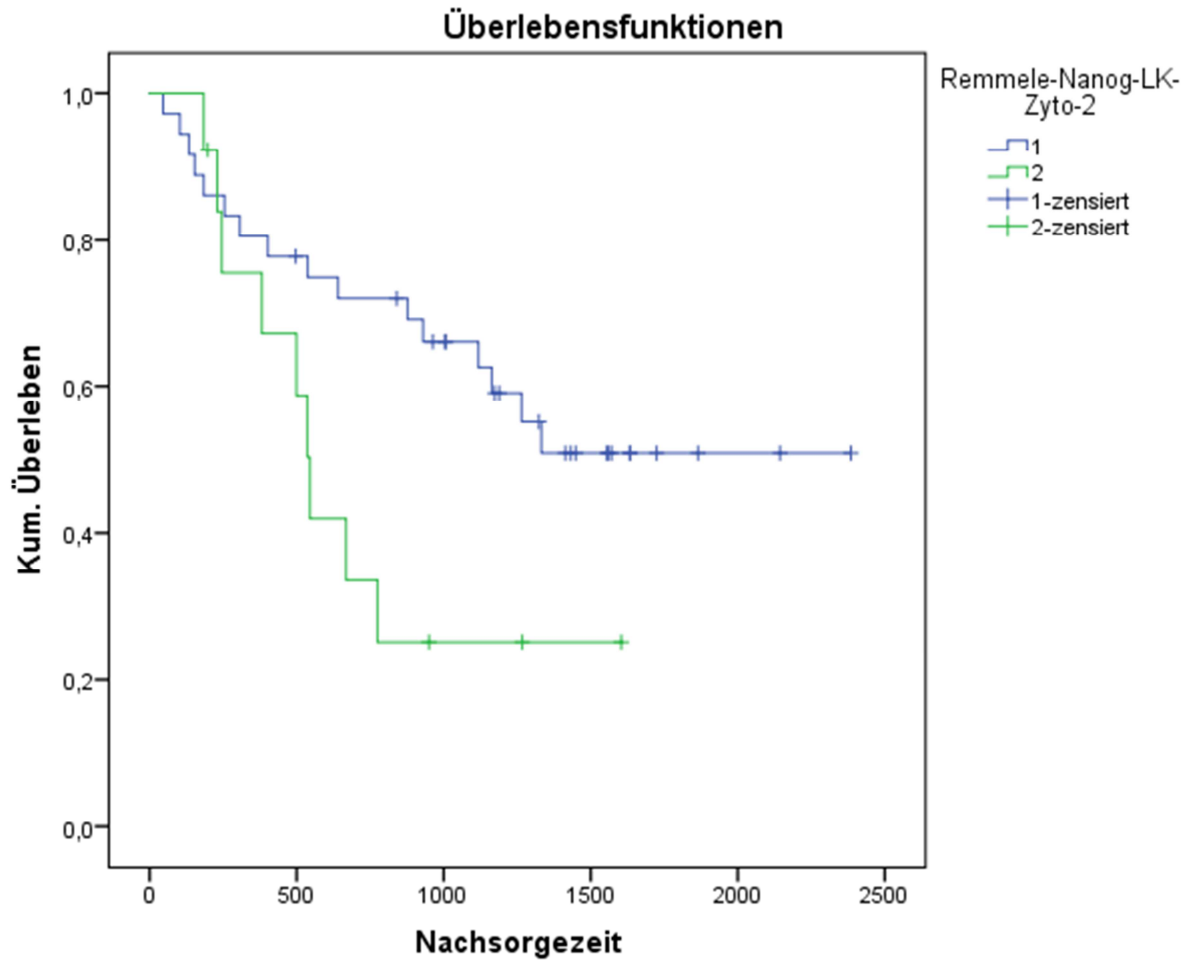


Abbildung 17: Korrelation zwischen Expression von Nanog im Zytoplasma und dem Gesamtüberleben (low: blau, high: grün)

Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit

Remmele_2 im Lymphknoten im Zytoplasma	Mittelwert ^a			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Nanog low	1531,409	160,495	1216,839	1845,979
Nanog high	743,552	151,845	445,937	1041,168
Gesamt	1378,961	140,477	1103,626	1654,295

Tabelle 20: Mittelwerte und Standardfehler für die Gesamtüberlebenszeit

4. Die Expression von Nanog in Korrelation zu Untergruppen des Rezidivs (Lokalrezidiv, Lymphknotenrezidiv, Fernrezidiv)

4.1. Lokalrezidiv

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma im Tumorzentrum

Anhand einer univariaten Auswertung konnte kein signifikantes Ergebnis erreicht werden (p-Wert: Kern: 0,432, Zyo: 0,894).

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma an der Tumorinvasionsfront

Auch an der Invasionsfront konnte durch eine univariate Analyse (p-Wert: Kern: 0,165, Zyto:0,801) keine signifikante Korrelation hergestellt werden.

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma im befallenen Lymphknoten

Hier ergab sich für die Expression von Nanog im Zytoplasma und die Entstehung eines Lokalrezidivs mittels einer univariaten Auswertung durch die Kaplan-Meier-Analyse und den Log-Rank-Test (p-Wert: 0,015) ein signifikantes Ergebnis (Abbildung 18). Die mittlere lokalrezidivfreie Zeit (Tabelle 21) der Patienten mit einer „low“-Expression betrug 64,5 Monate (Standardfehler: 4,9 Monate). Bei Patienten mit einer „high“-Expression betrug die mittlere lokalrezidivfreie Zeit 28,4 Monate (Standardfehler: 6,7 Monate).

Das Ergebnis wurde mittels der multivariaten Cox-Regression (Tabelle 22) überprüft, welche Grading, T-Stadium, N-Stadium, UICC-Stadium, Alter und Geschlecht des Patienten berücksichtigt. Auch hier konnte ein signifikantes Ergebnis erzielt werden mit dem HR von 7,8 (1,5 – 41,3) (p-Wert: 0,016).

Im Nukleus konnte die Hypothese nicht bestätigt werden (p-Wert: 0,994).

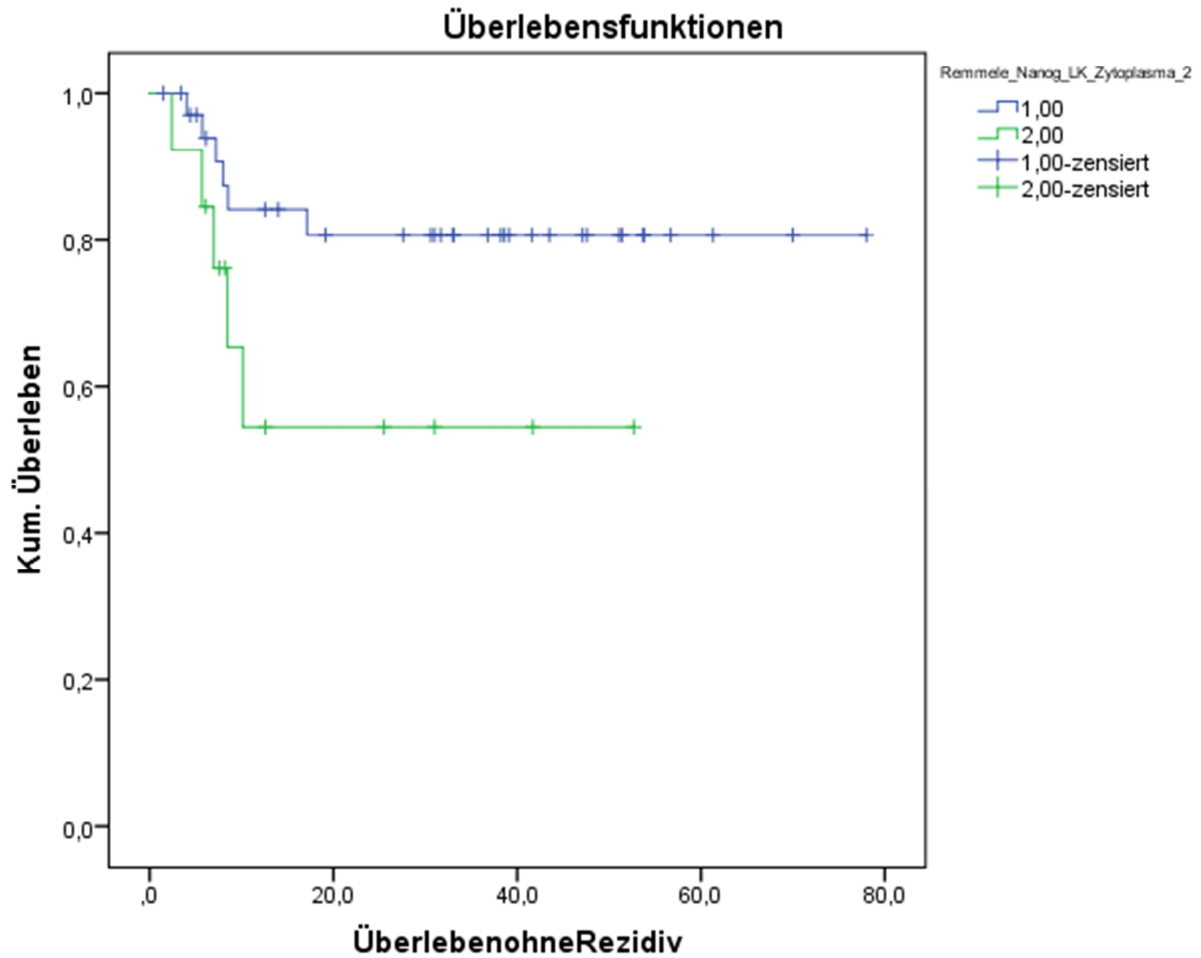


Abbildung18: Lokalrezidivkurve für Patienten mit einer Expression von Nanog (Remmele_2: low = blau und high = grün) im Zytoplasma der Zelle im befallenen Lymphknoten

Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit

Remmele_2 im Lymphknoten im Zytoplasma	Mittelwert ^a			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Nanog low	64,531	4,936	54,857	74,205
Nanog high	28,365	6,708	15,217	41,513
Gesamt	58,142	4,865	48,607	67,677

Tabelle 21: Mittlere lokalrezidivfreie Zeit für Patienten mit einer Expression von Nanog im Zytoplasma (Low und high)

Variablen in der Gleichung

	Signifikanz	HR	95,0 % Konfidenzinterv. für HR	
			Untere	Obere
pT	,412			
pT(1)	,468	,509	,082	3,158
pT(2)	,890	,000	,000	2,010E+51
pT(3)	,114	,127	,010	1,646
pN	,999			
pN(1)	,978	2209,616	,000	2,366E+244
pN(2)	,972	3656,759	,000	5,920E+205
UICC	,991			
UICC(2)	,991	,193	,000	2,921E+130
gender	,565	1,601	,322	7,972
Diagnosealter	,559	,978	,906	1,055
Grading	,208			
Grading(1)	,999	,843	,000	1,631E+168
Grading(2)	,989	,071	,000	1,388E+167
Remmele_Nanog_LK_Zytopla sma_2	,016	7,769	1,461	41,308

Tabelle 22: Cox-Regression für Patienten mit einer Expression von Nanog im Zytoplasma

4.2.Lymphknotenrezidiv

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma im Tumorzentrum

Im Tumorzentrum bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von Nanog im Kern oder im Zytoplasma und der Entstehung eines Lymphknotenrezidivs. Dies wurde mittels einer univariaten (p-Wert: Kern: 0,468, Zyto: 0,519) Analyse geprüft.

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma an der Tumorinvasionsfront

Auch an der Invasionsfront konnte keine Korrelation zwischen der Expression von Nanog im Kern oder im Zytoplasma und der Erkrankung an einem Lymphknotenrezidiv hergestellt werden, welche die Hypothese bestätigt (p-Wert: Kern: 0,260, Zyto: 0,293).

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma im befallenen Lymphknoten

Ebenfalls keine Signifikanz war im befallenen Lymphknoten für die Korrelation zwischen Expression von Nanog im Kern oder im Zytoplasma und einem Lymphknotenrezidiv zu erkennen. Dies wurde anhand einer univariaten Kaplan-Meier-Analyse und des Log-Rank-Tests geprüft (p-Wert: Kern: 0,973, Zyto: 0,072).

4.3. Fernrezidiv

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma im Tumorzentrum

Für die Expression von Nanog im Kern oder im Zytoplasma und die Entstehung eines Fernrezidivs ergab sich mittels der univariaten Kaplan-Meier-Analyse und des Log-Rank-Tests keine signifikante Korrelation (p-Wert: Kern: 0,534, Zyto: 0,273).

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma an der Tumorinvasionsfront

Auch an der Invasionsfront ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Expression von Nanog im Kern oder im Zytoplasma und der Entstehung eines Fernrezidivs mittels der Kaplan-Meier-Analyse und des Log-Rank-Tests (p-Wert: Kern: 0,266, Zyto:0,700).

Die Expression von Nanog-Kern und Zytoplasma im befallenen Lymphknoten

Im befallenen Lymphknoten ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse durch die univariate Kaplan-Meier-Analyse und den Log-Rank-Test (p-Wert: Kern: 0,058, Zyto: 0,167).

V. Die Korrelation der Expression der Tumormarker untereinander

1. Die Expression der Marker im Zentrum des Tumors zur Expression an der Tumorfront

1.1. CD44

Ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD44 im Tumorzentrum und an der Invasionsfront bestätigte sich (Tabelle 23). Wenn die Expression an der Tumorfront hoch war, war diese auch an der Invasionsfront hoch (p-Wert: 0,000). 77 Fälle waren konkordant. In 26 Fällen zeigte sich eine heterogene Expression.

Kreuztabelle

Remmele_2 im Tumorzentrum		Remmele_2 an der Invasionsfront		Gesamt
		CD44 low	CD44 high	
CD44	low	49	18	67
CD44	high	8	28	36
Gesamt		57	46	103

Tabelle 23: Patienten mit einer Expression von CD44 (Remmele_2: low und high) in der Invasionsfront in Korrelation zum Tumorzentrum

1.2. Nanog

Auch für Nanog galt (Tabelle 24), dass die Expression des Markers im Zytoplasma an der Tumorfront hoch war, wenn sie auch im Tumorzentrum hoch war (p-Wert: 0,000). 90 Fälle waren konkordant. In 12 Fällen zeigte sich eine heterogene Expression. Diese Korrelation zeigte sich auch im Kern (Tabelle 25) der Zelle (p-Wert: 0,023). Hier waren 95 Fälle konkordant und Vier zeigten eine heterogene Expression.

Kreuztabelle

Remmele_2 im Tumorzentrum im Zytoplasma	Remmele_2 an der Invasionsfront im Zytoplasma		Gesamt
	Nanog low	Nanog high	
Nanog low	69	6	75
Nanog high	6	21	27
Gesamt	75	27	102

Tabelle 24: Patienten mit einer Expression von Nanog (Remmele_2: low und high) im Zytoplasma der Zelle

Kreuztabelle

Remmele_2 im Tumorzentrum im Kern	Remmele_2 an der Invasionsfront im Kern		Gesamt
	Nanog low	Nanog high	
Nanog low	93	5	98
Nanog high	2	2	4
Gesamt	95	7	102

Tabelle 25: Patienten mit einer Expression von Nanog (Remmele_2: low und high) im Kern der Zelle im Tumorzentrum in Korrelation zur Invasionsfront

2. Die Expression des Tumormarkers im Lymphknoten in Korrelation zur Expression im Tumorzentrum

2.1. CD44

Je höher die Expression im Tumorzentrum ausfiel, umso höher war diese auch im Lymphknoten. Diese Korrelation konnte signifikant belegt werden (Tabelle 26). Der p-Wert lag bei 0,000.

Kreuztabelle

Remmele_2 im Tumorzentrum	Remmele_2 im LK		Gesamt
	CD44 low	CD44 high	
CD44 low	26	3	29
CD44 high	3	6	9
Gesamt	29	9	38

Tabelle 26: Patienten mit einer CD44 Expression (Remmele_2: low und high) im Tumorzentrum in Korrelation zum befallenen Lymphknoten

2.2. Nanog

Diese Korrelation lies sich nicht für die Expression von Nanog im Kern (p-Wert: 1,000) und im Zytoplasma (p-Wert: 0,090) nicht nachweisen

3. Die Expression des Tumormarkers im Lymphknoten in Korrelation zur Expression an der Invasionsfront des Tumors

3.1. CD44

Die Expression von CD44 war an der Invasionsfront hoch, wenn sie auch im LK hoch war. Dies ließ sich signifikant mit einem p-Wert von 0,000 (Tabelle 27) nachweisen.

Kreuztabelle

Remmele_2 an der Invasionsfront		Remmele_2 im LK		Gesamt
		CD44 low	CD44 high	
CD44	low	22	2	24
CD44	high	7	7	14
Gesamt		29	9	38

Tabelle 27: Patienten mit einer CD44 Expression (Remmele_2: low und high) an der Invasionsfront des Tumors in Korrelation zum befallenen Lymphknoten

3.2. Nanog

Für Nanog gab es keine eindeutige Korrelation zwischen der Expression von Nanog im Lymphknoten und der Expression an der Invasionsfront.

4. Korrelation zwischen Nanog Kern und Zytoplasma

Es ließ sich keine Korrelation zwischen Nanog im Kern und im Zytoplasma erkennen, weder im Tumorzentrum (p-Wert: 1,000) noch an der Invasionsfront (p-Wert: 1,000), noch im befallenen Lymphknoten (p-Wert: 0,055).

5. Die Expression von CD44 in Korrelation zur Expression von Nanog

Für die Expression von Nanog im Zytoplasma oder im Kern und CD44 im Tumorzentrum (p-Wert: CD44-Nanog Kern: 0,618, CD44-Nanog Zyto: 0,507) der Invasionsfront (p-Wert: CD44-Nanog Kern: 0,073, CD44-Nanog Zyto: 0,825) oder im befallenen Lymphknoten (p-Wert: CD44-Nanog Kern: 1,000, CD44-Nanog-Zyto: 0,363) stellte sich kein signifikanter Zusammenhang dar.

VI. Diskussion

Das Plattenepithelkarzinom ist der sechst häufigste Tumor weltweit, welcher sich wegen seiner schwierigen Diagnose in niedrigen Stadien sehr schnell verbreitet (Siegel et al. 2012). Jährlich treten weltweit 355.000 Todesfälle und 633.000 neue Erkrankungen auf (Jemal et al. 2011), wobei die 5-Jahres-Prognose für diese Tumorart 50 % beträgt (Ferlay et al. 2015).

Da bisherige Therapien, wie Resektion und Strahlentherapie, den Krankheitsverlauf sowie die Prognose des Patienten nicht wesentlich verbessern konnten, sollen anhand von Tumormarkern neue, effektivere und vor allem individuellere Therapieansätze gefunden werden. Mit dieser Arbeit sollte zunächst der Zusammenhang zwischen der Prognose eines Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Hals-Kopf-Bereich und der Expression von CD44 sowie Nanog überprüft werden, um daraus später die Therapie zu individualisieren.

CD44 ist ein Zelloberflächenglycoprotein (Naor et al. 1997). Eine Hauptaufgabe des Proteins ist die Zelladhäsion und Migration (Turley et al. 2002). Studien belegen bereits, dass im Tumorgewebe ungewöhnliche CD44 Expressionsmuster vorhanden sind, welche die epithelial-mesenchymale Interaktion stören und für die Invasion des Tumors, die Metastasenbildung, die Rezidivrate und die Therapieresistenz verantwortlich sind (Chen et al. 2011 a). Außerdem wurde bereits sehr früh erkannt, dass ungewöhnliche Transkripte von CD44 im Tumor vorhanden sind, welche eher weniger im gesunden Epithel exprimiert werden (Stamenkovic et al. 1989, Stamenkovic et al. 1991). Das Protein unterstützt Tumormigration, -wachstum und -invasion durch CD44-Signaltransduktionswege (Turley et al. 2002). Auch das Zusammenspiel von CD44 und bestimmter Liganden ist für die Tumorentwicklung von großer Bedeutung (Arpicco et al. 2013, Ganesh et al. 2013 a, Bassi et al. 2011, Ganesh et al. 2013 b).

Außerdem wird vermutet, dass CD44 auch mit der Metastasierung des Tumors zusammenhängt, da es viele Parallelen zwischen der Lymphozyten-Migration und dem Prozess der Metastasierung gibt (Goodison et al. 1999).

Nanog ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor (Chambers et al. 2003) und dient vor allem der Pluripotenz der Stammzellen (Mitsui et al. 2003). Im Karzinom wurde durch die höhere Expression von Nanog bereits eine schlechtere Überlebensprognose, sowie Progression, Metastasen und Rezidiven des Primärtumors bewiesen (Kong et al. 2010, Chiou et al. 2008).

1. Signifikante, aussagekräftige Ergebnisse CD44

In dieser Arbeit konnte mittels der Kombination aus univariater und multivariater Cox-Regression gezeigt werden, dass die tumorabhängige Überlebenswahrscheinlichkeit (DSS, p-Wert: 0,035) und die progressionsfreie Überlebenszeit (DFS, p-Wert: 0,011) der Patienten mit der Expression von CD44 korreliert. CD44 low ergab für die Patienten eine höhere tumorabhängige Überlebenswahrscheinlichkeit und eine niedrigere Wahrscheinlichkeit an einem Rezidiv zu erkranken. Die mittlere tumorabhängige Überlebenswahrscheinlichkeit betrug 62,6 Monate (Standardfehler: 3,9 Monate) und die mittlere progressionsfreie Zeit betrug 57,2 Monate (Standardfehler: 4,1 Monate). CD44 high ergab für die Patienten eine niedrigere tumorabhängige Überlebenswahrscheinlichkeit und eine höhere Wahrscheinlichkeit an einem Rezidiv zu erkranken. Die mittlere tumorabhängige Überlebenswahrscheinlichkeit betrug 43,6 Monate (Standardfehler: 3,9 Monate) und die mittlere progressionsfreie Zeit betrug 37,2 Monate (Standardfehler: 4,3 Monate). Diese Beobachtung galt nur im Zentrum des Tumors, nicht aber an der Invasionsfront oder im befallenen Lymphknoten.

Ebenso wurde durch die multivariate Cox-Regression bewiesen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung an einem Lokalrezidiv steigt, sobald CD44 high im Tumorzentrum exprimiert wurde (p-Wert: 0,037). Die mittlere lokalrezidivfreie Zeit betrug 63,7 Monate (Standardfehler: 4,2 Monate) für die Expression low und 46,9 Monate (Standardfehler: 4,0 Monate) für die Expression high.

Von den klinischen Parametern des Tumors korrelierte nur die Größe des Tumors (T-Stadium) mit der Expression von CD44. Diese Beobachtung konnte nur an der Invasionsfront gemacht werden (p-Wert: 0,019).

UICC hingegen ergab eine negative Korrelation. Für UICC 1 und 2 war überwiegend CD44 high exprimiert, für 3 und 4 überwiegend CD44 low (p-Wert: 0,018). Diese Beobachtung konnte nur im Tumorzentrum gemacht werden.

Die übrigen Parameter, wie das Grading, das N-Stadium, das Alter und Geschlecht des Patienten sowie L1- und Pn1-Status hatten keinen Einfluss auf die CD44 Expression.

Die Studie bewies somit die Korrelation von CD44 und der Überlebenswahrscheinlichkeit (DSS) des Patienten, der Rezidivwahrscheinlichkeit (DFS), dem T-Stadium sowie eine negative Korrelation mit dem UICC-Stadium. Diese Ergebnisse konnten auch von bereits durchgeführten Studien gestützt werden. Das Abnehmen der Überlebenswahrscheinlichkeit bei einer hohen Expression von CD44v3 wurde beispielsweise in der Studie von *Sagawa, et al., 2016* gezeigt (Sagawa et al. 2016). Nach *Wu, et al., 2015* wurde bestätigt, dass die Rezidivwahrscheinlichkeit bei einer hohen Expression von CD44v in fortgeschrittenen Tumoren deutlich zunimmt (Wu et al. 2015).

Es wurde anhand vieler verschiedener Tumorarten belegt, dass auch die Progression des Tumors im Zusammenhang mit der Expression von CD44 steht. In anderen Studien wurde zusätzlich die Wahrscheinlichkeit einer Metastasenentstehung durch eine höhere Expression von CD44 belegt (Kaufmann et al. 1995, Miwa et al. 1996).

Ebenso gibt es aber auch Studien, welche keine Korrelation zwischen der Expression von CD44 und der Überlebenswahrscheinlichkeit, der Progression sowie des Wachstums von einem Tumor bestätigen können (Kaboodkhani et al. 2016, Friedrichs et al. 1995). Ursachen für diese negativen Resultate der Studien könnten eine mangelnde Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, eine zu kleine Kollektivgröße oder eine mangelnde Spezifität der immunhistochemischen Färbung sein. In der statistischen Auswertung spielt auch die Ausschließung der Störfaktoren eine große Rolle, welche ebenfalls für ein falsch negatives Ergebnis verantwortlich sein können.

Weiterhin ist die Betrachtung der Tumorzellen in unterschiedlichen Regionen des Tumors von großer Bedeutung. Für die Korrelation zwischen der Prognose und der Rezidivwahrscheinlichkeit waren hier eindeutig die Zellen im Tumorzentrum verantwortlich. Für die Korrelation zur Tumorgöße waren die Zellen an der Invasionsfront des Tumors von größerer Bedeutung. Wenn also nur Zellen an einer Lokalisation betrachtet werden oder diese einfach gemeinsam, ohne Differenzierung, betrachtet werden, dann kann auch das ein entscheidender Fehler sein, welcher zu einem falschen Ergebnis führen kann.

Für diese Arbeit wurde zunächst ein Kollektiv mit Patientenfällen von 1992 – 2010 angelegt. Die Färbungen der älteren Fälle waren teils sehr undifferenziert und schwer auswertbar. Dies hängt vermutlich mit dem teilweise hohen Alter der Proben zusammen, da das neue Kollektiv 2007 – 2012 viel exakter ausgewertet werden konnte.

Außerdem wurden in dieser Arbeit anfangs für die statistische Auswertung zu viele und kleine Untergruppen gewählt. Diese Faktoren können das Ergebnis stark beeinflussen und somit falsch negativ werden lassen.

Da in vielen Studien der Zusammenhang zwischen einer CD44 Expression und der Prognose des Tumorpatienten aber bereits bewiesen wurde, ist die Vermutung, dass CD44 als Prognosemarker nicht geeignet ist, eher auszuschließen.

Auch kann überlegt werden, ob für eine genauere Aussage CD44 in seine Isoformen unterteilt werden muss. Jede Isoform von CD44 könnte eine bestimmte „Aufgabe“ im Tumor erledigen und somit entweder Auswirkung auf die Aggressivität, das Wachstum, die Metastasenbildung oder die Rezidiventstehung haben. Unter dieser Annahme würden Tumoren mit verschiedenen CD44 Isoformen unterschiedlich mit CD44 korrelieren. Es wäre auch möglich, dass nur Korrelationen zwischen der Expression von CD44 und der Prognose des Patienten entstehen, wenn nur ungewöhnliche Transkripte von CD44 vorliegen, wie es von Stamenkovic, et al., 1989 und 1991 beschrieben wurde (Stamenkovic et al. 1989, Stamenkovic et al. 1991).

Ein weiterer Grund für negative Ergebnisse kann sein, dass für viele Studien der Tumor nicht gesondert in laryngeale, pharyngeale und orale Bereiche des Tumors eingeteilt wurde, sondern alle Bereiche des Tumors zusammen betrachtet wurden. Einige Studien beweisen aber bereits, dass diese Aufteilung sinnvoll ist, da nur pharyngeale und laryngeale Tumoren eine positive Korrelation mit CD44, orale Tumoren eher eine negative Korrelation ergeben (Negi et al. 2012, Friedrichs et al. 1995, Lindquist et al. 2012).

Für diese Studie konnte CD44 weder in verschiedene Isoformen unterteilt werden, noch konnten Tumoren an verschiedenen Lokalisationen, wie pharyngeal, laryngeal und oral,

getrennt voneinander betrachtet werden, da die Untergruppen ansonsten zu klein für eine aussagekräftige Auswertung gewesen wären. Das könnte erklären, warum in der Studie keine Korrelation mit der Metastasenbildung besteht.

2. Signifikante, aussagekräftige Ergebnisse für Nanog

Mit dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen der Expression von Nanog und dem tumorabhängigen Überleben (DSS) und dem progressionsfreien Überleben (DFS) bewiesen werden. Für das Gesamtüberleben (OS) wurde durch die univariate Analyse ein signifikantes Ergebnis erzielt, welches aber durch die multivariate Analyse widerlegt wurde.

Durch die univariate Kaplan-Meier-Analyse, den Log-Rank-Test (p-Wert: 0,015) und eine multivariate Cox-Regression (p-Wert: 0,016) wurde bewiesen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung an einem Lokalrezidiv steigt, sobald Nanog stärker (high) im Zytoplasma exprimiert wurde. Die mittlere lokalrezidivfreie Zeit für Nanog low betrug 64,6 Monate (Standardfehler: 4,9 Monate) und für Nanog high 28,5 Monate (Standardfehler: 6,7 Monate).

Diese Beobachtung konnte nur im befallenen Lymphknoten gemacht werden.

Eine weitere Beobachtung konnte über das Eindringen des Tumors in das Lymphgefäß gemacht werden. War Nanog im Zytoplasma an der Invasionsfront (p-Wert: 0,015) oder im befallenen Lymphknoten (p-Wert: 0,022) hoch exprimiert, so war der L1-Status häufiger positiv als in Fällen mit einer geringen Expression von Nanog.

Für das Grading konnte eine Signifikanz für die Expression von Nanog im Kern im befallenen Lymphknoten erkannt werden. Die Expression stieg mit zunehmendem Grading (p-Wert: 0,024).

Keine weiteren Zusammenhänge konnten zwischen Nanog und den klinischen Faktoren des Tumors, wie T-Stadium, UICC-Stadium, N-Stadium, Grading sowie Alter und Geschlecht des Patienten und dem Pn1-Status hergestellt werden.

Auffällig ist hier, dass nur die Betrachtung von Nanog im Zytoplasma der Zelle, nicht aber im Kern, eine Aussage ergab.

In anderen Studien erbrachte vor allem die Expression von Nanog im Nukleus eine Aussage über die Prognose und das Voranschreiten des Tumors (Chiou et al. 2008, Destro Rodrigues et al. 2017). Solange der Transkriptionsfaktor Nanog aktiv ist, hat er sein Aufgabengebiet auch eher im Nukleus als im Zytoplasma.

Für diese Arbeit wurde nur der Remmele_2 Score betrachtet, wie es in den meisten Studien üblich ist (Remmele, Stegner 1987). Es gibt aber auch Studien mit anderen Auswertungsverfahren, welche zu positiven Korrelationen führen. In der Studie =von *Destro Rodrigues, et al., 2017* wurde nur anhand der Prozentzahl der gefärbten Zellen ausgewertet (Luo et al. 2012).

Der Einfluss von Nanog auf die Überlebenswahrscheinlichkeit, die Metastasenentstehung, die Progression und auf die Rezidiventstehung wurde laut *Kong, et al., 2010* und *Chiou, et al., 2008* bereits nachgewiesen (Kong et al. 2010, Chiou et al. 2008).

Auch wurde seine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung bereits erforscht. Die Epithel-Mesenchymal-Transition, welche zu den Aufgabengebieten von Nanog gehört, führt zur Invasion von Tumoren (Aoi et al. 2008, Yu et al. 2007).

Außerdem bilden Stammzellen, in welchen Nanog Zellen zurückführen kann, Reservoirs, von welchen aus Rezidive entstehen können (Kong et al. 2010).

Aufgrund von diesen bereits durchgeführten, positiven Studien und der Funktion von Nanog, kann angenommen werden, dass auch Nanog ein relevanter Prognosemarker für Karzinome und in diesem Fall speziell für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich ist.

Allgemein war Nanog viel schwieriger und ungenauer auszuwerten als CD44. Zum einen sind die Färbungen viel undifferenzierter und zum anderen gibt es viel weniger Studien, welche eine bestimmte Auswertungsmethode dazu vorschlagen. Viele Studien beschreiben gar keine oder nur ungenaue Methoden der Auswertung für die Nanog-Expression. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich bereits bei der Etablierung des Antikörpers, welcher dann auch gewechselt werden musste um auswertbare Ergebnisse zu erhalten (Zweiter Antikörper: Nanog(D7364) XP Rabbit mAb #4903; Erster Antikörper: Nanog(1E6C4)Mouse mAb #4893). Ebenso wie für CD44 wurde auch hier das Kollektiv erneuert und die statistischen Gruppen vergrößert.

Auffällig für Nanog war die Erkenntnis, dass die Färbungen im Karzinom nicht so verteilt ausfielen, wie im normalen Referenzepithel. Die dysplastische Zellschicht ergab den Wert 4 = > 80 % der Kerne positiv und den Wert 3 = stark, die Zellschicht darunter ergab > 80 % schwach/mittel nukleär positiv, die Zellschicht darüber war negativ. Das zeigt, dass Nanog ein sehr guter Marker für Dysplasien ist.

Für Nanog kann genauso wie für CD44 bemerkt werden, dass in dieser Studie der Tumor nicht an verschiedenen Lokalisationen, wie pharyngeal, laryngeal und oral, gesondert betrachtet wurde.

3. Tumormarker untereinander

Wenn die Marker CD44 (p-Wert: 0,000), wie auch Nanog (Kern: p-Wert: 0,023, Zyto: 0,000) im Tumorzentrum hoch exprimiert wurden, wurden diese auch an der Invasionsfront hoch exprimiert. Dasselbe galt für die Expression im Zentrum und im befallenen Lymphknoten für CD44 (p-Wert: 0,000). Ebenso war dies für CD44 an der Invasionsfront und im befallenen Lymphknoten der Fall (p-Wert: 0,000).

4. Klinischer Ausblick

In naher Zukunft soll die Medizin immer mehr personalisiert und Therapien individualisiert werden. Neben dem Hauptprognosemarker TNM sollen auch andere Prognoseindikatoren gefunden werden, da dieser in manchen Fällen eine begrenzte Präzision besitzt.

Ein neuer Indikator ist die Invasionstiefe des Tumors. *Yamashina, et al., 2013* erforschte mit seiner Studie den Zusammenhang zwischen der Invasionstiefe und dem Metastasenrisiko bzw. dem Überleben. Es wurden innerhalb von 50 Monaten Patienten mit einem gleich behandelten HNSCC Tumor beobachtet. Dabei verstarben 0,4 % der Patienten, deren Tumor sich in der Lamina propria oder im Epithel befand. Weiterhin verstarben 1,4 % der Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren bis in die Mucosa muscularis. War der Tumor bereits in der Submucosa, unterlagen 9,6 % dieser Patienten ihrer Krankheit. Die Sterberate innerhalb von fünf Jahren lag für Patienten mit einem Tumor im Epithel/Lamina propria bei 0,4 %, für Patienten mit einem Tumor in der Mucosa muscularis bei 8,7 %, sowie bei Tumoren in der Submucosa bis 0,2 mm bei 7,7 % und größer als 0,2 mm bei 36,3 % (*Yamashina et al. 2013*).

Ein weiterer Indikator ist das Tumor-Budding. Darin geht es um die Präsenz einzelner Tumorzellen oder Tumorcluster (weniger als fünf Tumorzellen) an der Invasionsfront, welche ihre kohäsive Eigenschaften verloren haben (*Almangush et al. 2014, Karamitopoulou et al. 2013, Almangush et al. 2013*).

In vielen Tumorarten, wie auch im HNSCC, wurden Korrelationen zwischen Tumor-Budding und der Prognose des Patienten dargestellt. Im oralen SCC stieg die Anzahl der stromalen Myofibroblasten in Korrelation zur Aktivität des Tumor-Buddings (*Marangon et al. 2014*).

In einer Studie von *Sobral, et al., 2011* beeinflussten diese Fibroblasten die Tumorpheriferation und -invasion (*Sobral et al. 2011*). Davon waren auch die Metastasierung und das Überleben des Patienten abhängig (*Marsh et al. 2011, Bello et al. 2011, Salo et al. 2014*).

Nach *Luo, et al., 2012* besteht im Nasopharyngealen SCC ein Zusammenhang zwischen Tumor-Budding und dem T-Stadium, den Lymphmetastasen, der lymphatischen sowie vaskulären Invasion und dem Überleben. Je höher die Aktivität des Buddings, umso schlechter die Prognose des Patienten (*Luo et al. 2012*).

Im Brustkrebs konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Budding und der epithelial-mesenchymale Transition (EMT) festgestellt werden (*Liang et al. 2013*).

Durch diesen Vorgang können Epithelzellen wieder zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften werden. Diese sogenannten Stammzellen regulieren Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin herunter und sind für die Invasion des Tumors, die Metastasenbildung, die Rezidivrate und die Therapieresistenz verantwortlich. Genau diese Zellen exprimieren auch CD44 und Nanog, womit der Zusammenhang zu dieser Arbeit wieder gegeben ist (*Chen et al. 2011 a*).

Eine erhöhte Expression von CD44 kann den Ausbruch sowie die Invasion des Tumors fördern, bedeutet ein höheres Metastasen- und Rezidivrisiko, macht den Tumor resistenter gegen Chemo- und Radiotherapie, bedeutet ein höheres T- Stadium und macht die Prognose insgesamt schlechter für den Patienten (Negi et al. 2012, Joshua et al. 2012).

Für Tumoren mit einer geringen Expression von CD44 kann auch weiterhin die adjuvante Therapie gewählt werden. Wenn allerdings CD44 sehr hoch exprimiert wird, wäre es eine Möglichkeit die Targeted Therapie anzuwenden, um Therapieresistenzen zu umgehen und den Tumor gezielter zu heilen. In einigen Studien wurde bereits versucht den Tumor durch Hyaluronsäure Oligomere zu therapieren, da eine gestörte HA-CD44 Interaktion die Apoptose der Tumorzellen fördert (Arpicco et al. 2013, Ganesh et al. 2013 a, Bassi et al. 2011, Ganesh et al. 2013 b) und das Tumorwachstum hemmt (Zeng et al. 1998).

Außerdem wurde eine Therapie durch eine Blockade bestimmter Protein-Bindungsstellen, z. B. für Ankyrin, Proteine der ERM Familie oder Selektin, im Glykoprotein CD44 angewendet, um den Signaltransduktionsweg zur Tumorentwicklung zu hemmen (Dimitroff et al. 2001, Turley et al. 2002, Shirure et al. 2015).

Ebenso bedeutet eine Überexpression von Nanog in einem Tumor, eine erhöhte Zellmigration, eine erhöhte vaskuläre und muskuläre Invasion des Tumors (Habu et al. 2015).

Weiterhin besteht ein erhöhtes Risiko für Metastasen und Rezidive sowie eine erhöhte Resistenz auf Chemotherapie. Für Tumore mit einer Chemotherapieresistent sollte die Targeted Therapie angewendet werden (Huang et al. 2014).

Kumar, et al., 2014 beschrieb in seiner Studie die Downregulation von Nanog mithilfe von Suberoylanilide Hydroxamic Acid. Die Folge war, dass der Tumor nicht mehr an Größe gewann, keine Metastasen mehr bildete und seine Resistenz gegen Chemotherapien verlor (Kumar et al. 2015).

Eine Zulassung für solche Targeted Therapien liegt noch nicht vor und muss noch durch weitere Studien untersucht und belegt werden.

VII. Zusammenfassung

Da Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich trotz Therapie eine schlechte Prognose haben, sollen nun alternative Behandlungsmöglichkeiten anhand spezifischer Tumor/Prognosemarker erforscht werden. Mit dieser Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen der Expression von Nanog sowie CD44 und der Prognose des Tumors untersucht werden.

Es wurden Tumorproben von 180 Patienten, wovon 88 befallenen Lymphknoten hatten, untersucht. Die Expression von Nanog sowie CD44 wurde im Tumorzentrum, an der Invasionsfront und falls gegeben in dem befallenen Lymphknoten betrachtet.

Dazu wurde erst ein TMA hergestellt und dann wurden Zellen, welche Nanog und CD44 exprimieren durch eine sekundäre Antikörperfärbung immunhistochemisch sichtbar gemacht.

Unter dem Lichtmikroskop konnten die gefärbten Zellen dann nach Stärke der Färbung und Anzahl der gefärbten Zellen eingeteilt werden. Für die Intensität der Färbung gab es vier Gruppen: 0 = negativ, 1 = schwach gefärbt, 2 = mittelstark gefärbt, 3 = stark gefärbt. Für die Anzahl der Zellen wurden fünf Gruppen festgelegt. 0 = keine Zellen gefärbt, 1 = unter 20 % der Zellen gefärbt, 2 = unter 50 % der Zellen gefärbt, 3 = unter 80 % der Zellen gefärbt und 4 = über 80 % der Zellen gefärbt.

Für die statistische Auswertung mit SPSS wurden kleinere Gruppen mit einem Remmele-Score erstellt. Dafür werden Intensität und Anzahl der Zellen multipliziert und in Gruppen eingeteilt. 0 = 0 – 3, 1 = 4 – 8, 2 = 9 – 12. Da diese Gruppen noch immer etwas zu klein für eine sinnvolle Auswertung waren, wurde Gruppe 0 und 1 zu einer Gruppe zusammengefasst: Low: 0 – 8, High 9 – 12.

Es konnte für CD44 eine Korrelation zwischen der Expression im Tumorzentrum und der Überlebenswahrscheinlichkeit (DSS) festgestellt werden (p-Wert: 0,035). Für die Expression CD44 high galt eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten, als für diese, welche eine Expression CD44 low besaßen. Außerdem ergab sich für die Expression CD44 high im Tumorzentrum eine höhere Rezidivrate (DFS) als für CD44 low (p-Wert: 0,011). Nach genauerer Untersuchung der Rezidive wurde bewiesen, dass Lokalrezidive mit der Expression von CD44 im Tumorzentrum korrelierten (p-Wert: 0,037). Ebenfalls für eine hohe Expression von CD44, aber diesmal an der Invasionsfront, ergab sich ein höheres T-Stadium (p-Wert: 0,019). Allerdings ergab sich im Tumorzentrum für eine hohe Expression von CD44 ein geringerer UICC-Stadium (p-Wert: 0,018).

Für Nanog konnte keine Korrelation zwischen der Expression und der Überlebenswahrscheinlichkeit aufgeführt werden. Allerdings traten häufiger Lokalrezidive bei einer Expression von Nanog high in den befallenen Lymphknoten auf (p-Wert: 0,016). Bei einer Expression Nanog high im Lymphknoten (p-Wert: 0,022) und an der Invasionsfront (p-Wert: 0,015) waren die Tumore häufiger bereits in Lymphgefäße infiltriert als bei einer Nanog low Expression. Dies galt für die Expression im Zytoplasma. Außerdem stieg die Expression von Nanog im Kern im befallenen Lymphknoten mit zunehmendem Grading (p-Wert: 0,024).

Somit sind sowohl CD44 als auch Nanog als Prognosemarker für Plattenepithelkarzinome geeignet und es können in Zukunft individuelle Therapieansätze für Tumoren, welche diese Marker exprimieren, entwickelt werden.

VIII. Literaturverzeichnis

Alho, A.M., Underhil, C. B. The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. *J Cell Biol* 1989; 108; 1557 – 1565

Almangush, A., Bello, I.O., Keski-Santti, H., Mäkinen, L.K., Kauppila, J.H., Pukkila M., Hagström, J., Laranne, J., Tommola, S., Nieminen, O., Soini, Y., MD, Kosma, V.M., Koivunen, P., Grénman, R., Leivo, I., Salo, T. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck* 2013; 36; 811 – 818.

Almangush, Alhadi, Salo, Tuula, Hagstrom, Jaana & Leivo, Ilmo. Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma – a systematic review. *Histopathology* 2014; 65; 587 – 594

Al-Saraff M. Treatment of Locally Advanced Head an Neck Cancer: Historical an Critical Review, *Cancer Control* 2002; 9(5); 387 – 399

Andl, T., Kahn, T., Pfuhl, A., Nicola, T., Erber, R., Conradt, C., Klein, W., Helbig, M., Dietz. A., Weidauer, H., Bosch, F.X. Ethiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamos cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res* 1998; 58; 5 – 13

Antequera, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters: *Cell Mol. Life Sci* 2003; 60; 1647 – 1658

Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., Yamanaka, S.. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008; 321; 699 – 702

Arpicco, S., De Rosa, G., Fattal, E. Lipid-based nanovectors for targeting of CD44-overexpressing tumor cells. *J Drug Deliv* 2013

Banerji, S., Day, A. J., Kahmann, J. D. and Jackson, D. G. Characterization of a functional hyaluronan-binding domain from the human CD44 molecule expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 1998; 14(3); 371 – 381

Barnes, L., Eveson, J., Reichart, P., Sidransky, D. World health organization classification of tumours: Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of head and neck tumors 2005

Bassi, P.F., Volpe, A., D'Agostino, D., Palermo, G., Renier, D., Franchini, S., Rosato, A., Racioppi, M. Paclitaxel-hyaluronic acid for intravesical therapy of bacillus Calmette-Guerin refractory carcinoma in situ of the bladder: results of a phase I study. *J Urol* 2011; 185; 445-9.

Bates, R. C., Edwards, N. S., Burns, G. F. and Fisher, D. E. A CD44 survival pathway triggers chemoresistance via lyn kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt in colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61(13); 5275 – 5283

Bello, I.O., Vered, M., Dayan, D., Dobriyan, A., Yahalom, R., Alanen, K., Nieminen, P., Kantola, S., Läärä, E., Saloaf, T. Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer. *Oral Oncol.* 2011; 47; 33 – 38

Bennett, K.L., Modrell, B., Greenfield, B., Bartolazzi, A., Stamenkovic, I., Peach, R., Jackson, D.G., Spring, F., Aruffo, A. Regulation of CD44 binding to hyaluronan by glycosylation of variably spliced exons. *J Cell Biol* 1995; 128; 673 – 685

Birch, M., Mitchell, S., Hart, I.R. Isolation and characterization of human melanoma cell variants expression high and low levels of CD44. *Cancer Res* 1991; 51; 6660 – 6667

Blelloch, R., Wang, Z., Meissner, A., Pollard, S., Smith, A., Jaenisch, R. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus: *Stem Cells* 2006; 24; 2007 – 2013

Bonner, J.A., Harari, P.M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D.M., Cohen, R.B., Jones, C.U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M.S., Baselga, J., Yousoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E.K., Ang, K.K.

Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell-carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 345; 567 – 578

Booth, H. A. F. and Holland, P. W. Eleven daughters of Nanog *Genomics* 2004; 84; 229 – 238

Bourguignon, L.Y.W, Zhu, D., Zhu, H. CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenetic signaling and tumor progression (in process citation) *Front Biosci* 1998;3; D 637 – 649

Bourguignon, L.Y.W., Earled, C., Wong, G., Spevak, C.C., Krueger, K. Stem cell marker (Nanog) and Stat-3 signaling promote MicroRNA-21 expression and chemoresistance in hyaluronan/Cd44- activated head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oncogene* 2012; 31(2); 149 – 160

Bowman, G.P., Wong, G., Hodson, I., Sathya, J., Russell, R., McAlpine, L., Skingley, P., Levine, M.N. Influence of cigarette smoking on the efficacy of radiation therapy in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328; 159 – 163

Boyer, L.A., Lee T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L. Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R. and Young, R.A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122(6); 947 – 956

Boyle, J.O., Hakim, J., Koch, W., van der Riet, P., Hruban, R.H., Roa, R.A., Correo, R., Eby, Y.J., Ruppert, J.M., Sidransky, D. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53; 4477 – 4480

Brown, T. A., Bouchard, T., St John, T., Wayner, E. and Carter, W. G. Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol* 1991; 113(1); 207 – 221

Cardesa, A., Gale, N., Nadal, A., Zidar, N. Squamous cell carcinoma. In: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathologie and*

Genetics of Head and Neck Tumours Edited by Leon Barnes, John W. Eveson, Peter Reichart, David Sidransky 2005; 118 – 121

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells *Cell* 2003; 113(5); 643 – 655

Chen, Ch., Wei, Y., Hummel, M., Hoffmann, T.K., Gross, M., Kaufmann, A.M., Albers, A.E. Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE* 2011 a; 6(1); e16466

Chen, Ch., Zimmermann, M., Tinhofer, I., Kaufmann, A.M., Albers, A.E. Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE* 2011 b; 6(1); e16466

Cheng, C., Yaffe, M.B., Sharp, P.A.; A positive feedback loop couples Ras activation and CD44 alternative splicing. *Genes Dev* 2006; 20; 1715 – 1720

Chiou Shih Hwa, Cheng-Chia Yu, Chi-Yang Huang, Shu-Chun Lin, Chung-ji Liu, Tung-Hu Tsai, Shiu-Huey Chou, Chian-Shiu Chien, Hung-Hai Ku, Jeng-Fan LO. Positive Correlation of Oct-4 and Nanog on Oral Cancer Stem-Like Cells and High-Grade Squamous Cell Carcinoma *Clin Cancer Res* 2008; 14; 4085 – 4095

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B, Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., Wahl, G.M.. Cancer stem cells- perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66; 9339 – 9344

Clay, M. R., Tabor, M., Owen, J. H., Carey, T. E., Bradford, C. R., Wolf, G. T., Wicha, M. S., Prince, M. E. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck* 2010; 32(9); 1195 – 1201

Cooper, D. L., Dougherty, G.J. To metastasize or not? Selection of CD44 splice sites. *Nat Med* 1995; 1; 635 – 637

Dalerba, P., Cho, R.W., Clarke, M.F. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007; 58; 267 – 284

Darr, H., Mayshar, Y., Benvenisty, N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 2006; 133(6); 1193 – 1201

Day, A. J. and Sheehan, J. K. Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11(5); 617 – 622

DeGrendele, H. C., Estess, P., Siegelmann, M.H. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 1997 a; 278; 672 – 675

DeGrendele, H. C., Kosfiszter, M., Estess, P., Siegelman, M.H. CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *J Immunol* 1997 b; 159; 2549 – 2553

Destro Rodrigues, M.F., Sedassari, B.T., Esteves, C.M., de Andrade, N.P., Altemani, A., de Sousa, S.C., Nunes, F.D. Embryonic Stem Cells Markers Oct4 and Nanog Correlate With Perineural Invasion in Human Salivary Gland Mucoepidermoid Carcinoma *Oral Pathol Med.* 2017; 46(2); 112 – 120

Dimitroff, C. J., Lee, L. Y., Rafili, S., Fuhlbrigge, R. C., Sackstein, R. CD44 is a Major E- Selectin Ligand on Human Hematopoietic Progenitor Cells. *J Cell Biol* 2001; 153(6); 1277 – 1288

Dougherty GJ, Landorp PM, Cooper DL, Humphries, R.K. Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte “homing” receptor expressed by hemopoietic cells. *J Exp Med* 1991; 174; 1 – 5

Duval, D., Trouillas, M., Thibault, C, Dembele, D., Diemunsch, F., Reinhardt, B., Mertz, A.L., Dierich, A., Boeuf, H. Apoptosis and differentiation commitment: novel insights revealed by gene profiling studies in mouse embryonic stem cells. *Cell Death Differ* 2006; 13; 564 – 575

Ehrenfeld, M., Prein, J., Jundt, G. Tumoren und tumorähnliche Läsionen im Mund-Kiefer-Gesichts-Bereich In :Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Norbert Schwenzer, Michael Ehrenfeld, Thieme 2010; 4. Auflage; 56 – 163

Ermak, G., Jennings, T., Boguniewicz, A., Figge, J. Novel CD44 messenger RNA isoforms in human thyroid and breast tissues feature unusual sequences rearrangements. Clin Cancer Res 1996; 2; 1251 – 1254

Estess, P., DeGrendele, H.C., Pascual, V., Siegelman M.H. Functional activation of lymphocyte CD44 in peripheral blood is a marker of autoimmune disease activity. J Clin Invest 1998; 102; 1173 – 1182

Falk, R. T., Pickle, L.W., Brown, L.M., Mason, T.J., Buffler, P.A., Fraumeni. J.F. Jr. Effect of smoking and alcohol consumption n laryngeal cancer risk in costal Texas. Cancer Res 1989; 49; 4024 – 4029

Fasseen, A.E., Schragar, J.A., Klein, D.J., Oegema, T.R., Couchman, J.R., McCarthy, J.B. A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. J Cell Biol 1992; 116; 521 – 531

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015; 136(5):86; E359 – 386

Ferlito, A., Rinaldo, A. The pathology and managment of subglottic cancer. Eur Arch Otorhinolaryngeol 2000; 257; 168 – 173

Forastiere, A., Koch, W., Trotti, A., Sidransky D. Head and neck cancer. N Engl J Med 2001; 345; 1890 – 1900

Freberg, C.T., Dahl, J.A., Timoskainen, S., Collas, P. Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. Mol Biol Cell 2007; 18; 1543 – 1553

Friedrichs, K., Franke, F., Lisboa, B.W., Kügler, G., Gille, I., Terpe, H.J., Hölzel, F., Maass, H., Günthert, U. CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer *Cancer Res.* 1995; 55(22); 5424 – 5433

Gale, N., Pilch, B.Z., Sidransky, D., Westra, W.H., Califano, J. Epithelial precursor lesions. In: World Health Organization Classification of Tumours. Pathologie and Genetics, Head and Neck Tumours Edited by Leon Barnes, John W. Eveson, Peter Reichart, David Sidransky 2005; 140 – 143

Gale, N., Zidar, N. Benigne und potentiell maligne Läsionen des Plattenepithels und Plattenepithelkarzinom. In: „Pathologie-Kopf-Hals-Region-Weichtumoren der Haut“, Remmele, W., Klöppel, G., Cardesa, A.(Hrsg.), Springer Verlag, 2009; 3. Auflage; 3 – 46

Ganesh S, Iyer AK, Morrissey DV, Amiji MM. Hyaluronic acid based self-assembling nanosystems for CD44 target mediated siRNA delivery to solid tumors. *Biomaterials* 2013; 34; 3489 – 502.

Ganesh, S., Iyer, A.K., Weiler, J., Morrissey, D.V., Amiji, M.M. Combination of siRNA-directed gene silencing with cisplatin reverses drug resistance in human non-small cell lung cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013; 2; e110.

Gansauge, F., Gansauge, S., Zobywalski, A., Scharnweber, C., Link, K.H., Nussler, A.K., Beger, H.G. Differential expression of CD44 splice variants in human pancreatic adenocarcinoma and normal pancreas. *Cancer Res* 1995; 55; 5499 – 5503

Gillson, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W.H., Wu, L., Zahurak, M.L., Daniel, R.W., Viglione, M., Symer, D.E., Shah, K.V., Sidransky, D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92; 209 – 720

Goldstein, L.A., Zhou, D. F. H., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F., Butcher, E. C. A human lymphocyte homingreceptor, the

hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link protein. Cell 1989; 56; 1063 – 1072

Goldstein, .LA., Butcher, E. C. Identification of mRNA that encodes an alternative form of H-CAM (CD44) in lymphoid and nonlymphoid tissues. Immunogenetics 1990; 32; 389 – 397

Goodfellow, P.N., Banting, G., Wiles, M.V., Tunnacliffe, A., Parkar, M., Solomon, E., Dalchau, R., Fabre, J.W. The gene MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. Eur J Immunol 1982; 12; 659 – 663

Goodison, S., Urquidi, V., Tarin, D., CD44 cell adhesion molecules. J Clin Pathol: Mol Pathol 1999; 52; 189

Graham, S., Dayal, H., Rohrer, J., Swanson, M., Sultz, H., Shedd, D., Fischman, S. Dentition, diet, tobacco and alcohol in the epidemiology of oral cancer. J Natl Cancer Inst 1977; 59; 1611 – 1618

Grau, J. J., Cuchi, A., Traserra, J., Firvida, J.L., Arias, C., Blanch, J. L., Estape, J., Follow-up study in head and neck cancer: cure rate according to tumor location and stage. Oology 1997; 54(1); 38 – 42

Green, S.J., Tarone, G., Underhill, C.B. Aggregation of macrophages and fibroblasts is inhibited by a monoclonal antibody to the hyaluronate receptor. Exp Cell Res 1988; 178; 224 – 232

Gu, G., Yuan, J., Wills M., Kasper S. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo. Cancer Res 2007; 67; 4807 – 4815

Habu, N., Imanishi, Y., Kameyama, K., Shimoda, M., Tokumaru, Y., Sakamoto, K., Fujii, R., Shigetomi, S., Otsuka, K., Sato, Y., Watanabe, Y., Ozawa, H., Tomita, T., Fujii, M., Ogawa, K. Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma. BMC Cancer 2015; 15; 730

Hanley, W. D., Napier, S.L., Burdick, M.M., Konstantopoulos, K., Sackstein, R. CD44 on LS174T colon carcinoma cells possesses E-selectin ligand activity. *Cancer Res* 2005; 65(13); 5812 – 5818

Hardingham, T.E. and Fosang, A.J. Proteoglycans: many forms and functions. *FASEB J.* 1992; 6; 861 – 870

Hart, A. H., Hartley, L., Parker, K., Ibrahim, M., Looijenga, L.H., Pauchnik, M., Chow, J.W, Robb, L. The pluripotency homeobox gene Nanog is expressed in human germ cell tumors. *Cancer* 2005; 104(10); 2092 – 2098

Hartano, S.Y., Tada, M., Kimura, H., Yamaguchi, S., Kono, T., Nakano, T., Suemori, H., Nakatsuji, N. & Tada, T. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mechanism of Development* 2005; 122; 67 – 79

Harvey, R.P. NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev. Biol* 1996; 178; 203 – 216

Hauser, Dr. Nick, Prof. Michael K. Hohl, Interdisziplinäres Brustzentrum, Frauenklinik, Kantonsspital Baden: Prognostische und prädikative Faktoren. *Senologie up-to-date* 3008; 28 – 31

Haynes, B.F., Telen, M. J., Hale, L. P., Denning, S.M. CD44: a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell- activation. *Immunol Today* 1989; 10; 423 – 428

Herrlich P, Morrison H, Sleeman J, Orian-Rousseau V, König H, Weg-Remers S, Ponta H. CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor- suppressing cofactor *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000; 910; 106 – 120

Hoei-Hansen, C. E., Almstrup, K., Nieösen, J. E., Brask Sonne, S., Graern, N., Skakkebaek, N.E., Leffers, H., Rajpert- De Meyts, E . Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumour. *Histopathology* 2005; 47(1); 48 – 56

Hoei-Hansen, C.E., Kraggerud, S. M., Abeler, V. M., Kaern, J., Rajpert-De Meyts, E., Lothe, .RA. Ovarian dysgerminomas are characterised by frequent KIT mutations and abundant expression of pluripotency markers. *Mol Cancer* 2007; 2; 6 – 12

Hofmann, M., Rudy, W., Zöller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich, P., Günthert, U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1991; 51; 5292 – 5297

Hong, R.L., Pu, Y.S., Chu, J.S., Lee, W.J., Chen, Y.C., Wu, C.W. Correlation of expression of CD44 isoforms and E-cadherin with differetiation in human urothelial cell lines and transitional cell carcinoma. *Cancer Lett* 1995; 89; 81 – 87

Horst, E., Meijer, C.J.L.M., Radaszkiewicz, T., Ossekoppele, G.J., Van Krieken, J.H.J. and Pals, S. Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large cell lymphoma. Expression of a lymphotic homing receptor (CD44, LFA-1(CD11a/18) and ICAM-1 (CD54) *Leukemia* 1990; 4; 595 – 599

Houck, J. R., Medina, J. E. Management of cervical lymph nodes in squamous carcinomas oft eh ehad and neck. *Semin Surg Oncol.* 1995; 1(3); 228 – 239

Huang, Chuan-En, Yu, Cheng-Chia, Hu, Fang-Wie, Chou, Ming-Yung, Tsai, Lo-Lin. Enhanced Chemosensitivity by Targeting Nanog in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15; 14935 – 14948

Hussex, D. H., Latourette, H. B., Panje, W. R. Head and neck cancer. An analysis oft he incidence, patterns of treatment, and survival at the University of Iowa. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 1991; 152; 2 – 16

Ihrler, S., Weiler, C. Tumorentitäten und pathologische Grundlagen In: „Manual Kopf-Hals-Malignome“, Mast, G., Zimmermann, F., Ihrler, S., Matthias, C., Kolk, A., (Hrsg.) W. Zuckerschwerdt Verlag, München, 2014; 5. Auflage; 1 – 8

Iida, N., Bourguignon, L. Y. CD44 splice variants associated with human breast cancers. *J Cell Physiol* 1995; 162; 127 – 133

Ilangumaran, S., Briol, A. and Hoessli, D. C. "CD44 selectively associates with active Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn in glycosphingolipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood lymphocytes." *Blood* 1998; 91(10); 3901 – 3908.

Jain, M., He, Q., Lee, W. S., Kashiki, S., Foster, L.C., Tsai, J.C., Lee, M.E., Haber, E. Role of CD44 in the reaction of vascular smooth muscle cells to arterial wall injury. *J. Clin Invest* 1996; 97(3); 596 – 603 (corrected in 98: (3) 877)

Jalkanen, S., Jalkanen, M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 1992; 116; 817 – 825

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman D. Global Cancer Statistics. *Ca-Cancer J Clin.* 2011; 61(2); 69 – 90

Jordan, C.T., Guzman, M.L., Noble, M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006; 355; 1253 – 1261

Joshua, B., Kaplan, M.J., Doweck, I., Pai, R., Weissman, I.L., Prince, M.E., Ailles, L.E. Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck.* 2012; 34(1); 42 – 49

Kaboodkhani, R., Karimi, E., Khorsandi Ashtiani, M.T., Kowkabi, S., Firouzifar, M.R., Yazdani, F., Yazdani, N. Evaluation of the Correlation between CD44, Tumor Prognosis and the 5-Year Survival Rate in Patients with Oral Tongue SCC. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2016 Nov; 28(89); 407 – 411.

Karamitopoulou, E., Zlobec, I., Gloor, B., Kondi-Pafiti, A., Lugli, A., Perren, A. Loss of Raf-1 kinase inhibitor protein (RKIP) is strongly associated with high-grade tumor budding and correlates with an aggressive phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *J Transl Med.* 2013; 11(311); 1 – 11

Kaufmann, M., Heider, K.H., Sinn, H.P., von Minckwitz, G., Ponta, H., Herrlich, P. CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet*. 1995; 345; 615 – 619

Knutson, J.R., Iida, J., Fields, G.B., McCarthy, J.B. CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes. *Mol Biol Cell* 1996; 7; 383 – 396

Kohda, D., Morton, C.J., Parker, A.A., Hatanaka, H., Inagaki, F.M., Campbell, I.D., Day, A.J. Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration. *Cell* 1996; 86; 767 – 775

Kong Dejuan, Sanjeev Banerjee, Aamir Ahmad, Yiwei Li, Zhiwei Wang, Seema Sethi, Fazlul H. Sarkar. Epithelial to Mesenchymal Transition is Mechanistically Linked with Stem Cell Signatures in Prostate Cancer Cells, *Plos One* 2010; 5(8); e 12445: 1 – 14

Kumar, B., Yadav, A., Lang, J.C., Teknos, T.N., Kumar, P. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) reverses chemoresistance in head and neck cancer cells by targeting cancer stem cells via the downregulation of nanog. *Genes & Cancer* 2015; 6(3-4); 169 – 181

Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S. Y., Suemori, H., Nakatsuji, N and Tada, T. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25; 2475 – 2485

Lamerz, R. SCCA (Squamous cell carcinoma antigen) In: Labor und Diagnose, Lothar Thomas, TH- Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 2005; 6. Auflage; 1351 – 1355

Lang, S., Wollenberg, B., Dellian, M., Steuer-Vogt, M.K., Schwenzer, K., Sautier, W., Chucholwski, M., Eckel, R., Faas, I., Wilmes, E., Ehrenfeld, M., Arnold, W., Kastenbaue, E., Holzel, D. Klinische und epidemiologische Daten zu Malignomen des Kopf-Hals-Bereichs. *Laryngo-Rhino-Otologie* 2002; 81(7); 499 – 508

Leemans, C. R., Tiwari, R., Nauta, J. J., van der Waal, I., Snow, G.B. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer* 1993; 71(2); 452 – 456

Lesley, J., English, N., Perschl, A., Gregoroff, J., Hyman, R. Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor, CD44, show differences in glycosylation. *J Exp Med* 1995; 182; 431 – 437

Levasseur, D.N., Wang, J., Dorschner, M.O., Stamatoyannopoulos, J.A., Orkin, S.H. Oct4 dependence on chromatin structure within the extended Nanog locus in ES cells. *Genes & Devel.* 2008; 22(5); 575 – 580

Liang, F., Cao, W., Wang, Y., Li, L., Zhang, G., Wang, Z. The prognostic value of tumor budding in invasive breast cancer. *Pathol. Res. Pract.* 2013; 209; 269 – 275.

Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E., Xu, Y. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 2005; 7(2); 165 – 171

Lindquist, D., Ahrlund-Richter A., Tarján M., Tot T., Dalianis T. Intense CD44 expression is a negative prognostic factor in tonsillar and base of tongue cancer. *Anticancer Res.* 2012; 32(1); 153 – 61

Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Borque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K.Y., Sung, K. W., Lee, C.W., Zhao, X. D., Chiu K. P., Lipovich L., Kuznetsov V. A., Robson P., Stanton L. W., Wie C. L., Ruan, Y., Lim, B., Ng, H.H. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells: *Nat. Genet.* 2006; 38; 431 – 440

Loh, Y. H., Zhang, W., Chen, X., George, J., Ng H.H. Jmjd and Jmjd histone H3 lysine 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev.* 2007; 21; 2545 – 2557

Lokeshwar, V. B., Fregien, N., Bourguignon, L.Y. Ankyrin-binding domain of CD44 (GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J. Cell Biol* 1994; 126; 1099 – 1109

Lordick, F., Krauß, J., Jäger, D. Nationales Centrum für Tumorerkrankungen, Medizinische Onkologie, Universitätsklinikum Heidelberg. Tumormarker und Biomarker bei Hals-Kopf-Tumoren. *HNO* 2008; 56; 881 – 885

Luo, W.R., Gao, F., Li, S.Y., Yao, K.T. Tumour budding and the expression of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology* 2012; 61; 1072 – 1081.

Mackay, C.R., Terpe, H.J., Stauder, R., Marston, W.L., Stark, H., Günthert, U. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 1994; 124; 71 – 82

Maier, H., DeVries, N., Snow, G.B. Occupational factors in the aetiology of head and neck cancer. *Clin Otolaryngol* 1991; 16; 406 – 412

Marangon, Junior, Rocha, Valéria Nazaré, Leite, Camila Ferreira, Ferreira de Aguiar, Maria Cássia, Souza, Paulo Eduardo Alencar and Horta, Martinho Campolina Rebello. Laminin-5 gamma 2 chain expression is associated with intensity of tumor budding and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2014; 43(3); 199 – 204

Marhaba, R., Bourouba, M., Zöller, M. CD44v6 promotes proliferation by persisting activation of MAP kinases. *Cellular Signaling* 2005; 17; 961 – 973

Marsh D., Suchak K., Moutasim K.A., Vallath, S., Hopper, C., Jerjes, W., Upile, T., Kalavrezos, N., Violette, S.M., Weinreb, P.H., Chester, K.A., Chana, J.S., Marshall, J.F., Hart, I.R., Hackshaw, A.K., Piper, K. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J. Pathol.* 2011; 223; 470 – 481

Maula, S. M., Luukkaa, M., Grénman, R., Jackson, D., Jalkanen, S., Ristamäki, R. Intratumoral Lymphatics Are Essential for the Metastatic

Spread and Prognosis in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck Region *Cancer Res* 2003; 63; 1920 – 1926

Merletti, F., Boffetta, P., Ciccone, G., Mashberg, A., Terracini, B. Role of tobacco and alcoholic beverages in the etiology of cancer of the oral cavity/oropharynx in Torino, Italy. *Cancer Res* 1989; 49; 4919 – 4924

Michaels, L., Hellquist, H.B. *Ear, nose and throat histopathology*, Springer London 2nd ed, pp 1 – 551

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113(5); 631 – 642

Miwa, T., Watanabe, A., Yamada, Y., Shino, Y., Yamada, T., Yamashita, J., Matsuda, M., Nakano, H. Progression in gastric carcinoma relative to the ratio of CD44 epithelial variant transcript to CD44 hematopoietic variant transcript. *Cancer*. 1996 Jan; 77(1); 25 – 29

Mohamadzadeh, M., DeGrendele, H., Arizpe, H., Estess, P., Siegelman, M. Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J Clin Invest* 1998; 101; 97 – 108

Morrison, M. D. Is chronic gastroesophageal reflux a causative factor in glottic carcinoma. *Otolaryngol Head and Neck Surg* 1988; 9; 370 – 373

Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*. 1997; 71; 241 – 319

Neame, P.J., Barry, F.P. The link proteins. *Experientia* 1993; 49; 393 – 402

Neame, P.J., Christner, J.E, Baker, J.R. The primary structure of Link protein from rat chondrosarcoma proteoglycan aggregate. *J. Biol. Chem.* 1986; 261; 3519 – 3535

Negi, L.M., Talegaonkar, S., Jaggi, M., Ahmad, F. J., Iqbal, Z., Khar, R.K. Role of CD44 in tumour progression and strategies for targeting. *J Drug Target.* 2012 , 20(7); 561 – 73

Nelson, A. D., Grandis J.R. The Role of CD44 in HNSCC. *Cancer Biology & Therapy* 2007; 6(1); 125 – 126

Nicholson, R. I., Gee, J. M., Harper, M.E. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37(4); 9 – 15

Oh, J. H., Do, H. J., Yang, H. M., Moon, S. Y., Cha, K. Y., Chung, H. M., Kim, J. H. Identification of a putative transactivation domain in human Nanog. *Exp. Mol. Med.* 2005; 37; 250 – 254

Osman, I., Sherman, E., Singh, B., Venkatraman, E., Zelefsky, M., Bosl, G., Scher, H., Shah, J., Shaha, A., Kraus, D., Cordon-Cardo, C., Pfister, DG. Alteration of p53 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck; impact on treatment outcome in patients treated with larynx preservation intent. *J Clin Oncol* 2002; 20; 2980 – 2987

Pan, G. and Pei, D. The stem cell pluripotency factor nanog activates transcription with two unusually potent subdomains at its C-terminus. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(2); 1401 – 1407

Pan, G., Li J., Zhou, J., Zheng, H., Pei, D. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J.* 2006; 20; 1730 – 1732

Pan, G., Thomson, J. A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research* 2007; 17; 42 – 49

Parkin, D. M., Pisani, P., Ferlay, J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80; 827 – 841

Parnes, S.M. Asbestos and cancer of the larynx: is there a relationship? *Laryngoscope* 1990; 100; 254 – 261

Perkins, S. J., Nealis, A.S., Dudhia, J. and Hardingham, T.E. Immunoglobulin fold and tandem repeat structures in proteoglycan N-terminal domains and Link protein. *J Mol Biol* 1989; 206; 737 – 753

Pigorsch, St., Röper, B., Wypior, H., Zimmermann, F. Allgemeine Grundsätze der Strahlentherapie: In: „Manual Kopf-Hals-Malignome“, Mast, G., Zimmermann, F., Ihrler, s., Matthias, C., Kolk, A., (Hrsg) W. Zuckerschwerdt Verlag, München, 2014; 5. Auflage; 82 – 94

Ponta, H., Sherman, L., Herrlich, P.A. CD44 from adhesion molecules to signaling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4; 33 – 45

Presland, R.B., Jurevic, R.J. Making sense of the epithelial barrier: whatmolecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal andepidermal tissues. *J Dent Educ* 2002; 66; 564 – 574.

Pyle, A.D., Lock, L.F, Donovan, P.F. Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival. *Nature Biotechnol* 2006; 24; 344 – 350

Remmele W., Stegner H.E. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (irs) for immunohistochemical estrogen receptor detection (er-ica) in breast cancer tissue. *Pathologe* 1987; 8; 138 – 140.

Remmert, S., Rottmann, M., Reichenbach, M., Sommer, K., Friedrich, H. J. Lymphknotenmetastasierung bei Kopf-Hals-Tumoren. *Laryngo-Rhino-Otologie*. 2001; 80(1); 27 – 35

Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2011/2012. Häufigkeiten und Trends 2015*; 10. Ausgabe; 1 – 156, Kapitel 3.0 (S.18 – 20), 3.1 (S.20 – 26), 3.2 (S. 26 – 30), 3.3 (S. 30 – 34), 3.9 (S. 54 – 58)

Rodda, D. J., Chew, J., Lim, L. H., Loh ,Y. H., Wang, B., NG, H. H., Robson, P. Transcriptional regulation of Nanog by Oct4 and Sox2: *J. Biol. Chem* 2005; 280; 24731 – 24737

Rogers, S.N., Brown, J.S., Woolgar, J.A., Lowe, D., Magennis, P., Shaw, R.J., Sutton, D., Errington, D., Vaughan, D. Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral Oncology* 2009; 45; 201 – 211

Sagawa, K., Uwa, N., Daimon, T., Sakagami, M., Tsujimura, T. Expression of CD44 variant isoforms, CD44v3 and CD44v6, are

associated with prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *J Laryngol Otol.* 2016 Sep; 130(9); 843 – 849

Salo, T., Vered, M., Bello, I.O., Nyberg, P., Bitua, C.C., Hurvitzeg, A.Z., Dayane, D. Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call for new therapeutic approaches. *Exp. Cell Res.* 2014; 325; 58 – 64.

Sandeep Goel, Mayako Fujihara, Naojiro Minami, Masayasu Yamada and Hiroshi Imai. Expression of NANOG, but not POU5F1, points to the stem cell potential of primitive germ cells in neonatal pig testis. *Reproduction* 2008; 135; 785 – 795

Santagata, S., Ligon, K., Hornick, J.L. Embryonic stem cell transcription factor signatures in the diagnosis of primary and metastatic germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2007; 31; 836 – 845

Schmelzle, R., Heiland, M., Schwenzer, N. Erkrankungen der Mundschleimhaut: In: *Chirurgische Grundlagen*, Schwenzer, N., Ehrenfeld, M. Thieme, 2008; 4. Auflage; 307 – 349

Screaton, G. R., Bell, M. V., Bell, J. I. and Jackson, D. G. "The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat." *J Biol Chem* 1993; 268(17); 12235 – 12238

Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U. and Bell, J. I. "Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(24); 12160 – 12164

Seigel, G.M., Hackam, A.S., Ganguly, A., Mandell, L.M., Gonzalez-Frenandez, F. Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. *Mol Vis* 13 2007; 13; 823 – 832

Sherman, L., Sleeman, J., Dall, P., Hekele, A., Moll, J., Ponta, H., Herrlich, P. The CD44 proteins in embryonic development and in cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213; 249 – 269

Shirure, V.S., Liu, T., Delgadillo, L.F., Cuckler, C.M., Tees, D.F., Benencia, F., Goetz, D.J., Burdick, M.M. CD44 variant isoforms expressed by breast cancer cells are functional E-selectin ligands under flow conditions. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015; 308(1); C68 – 78

Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. Cancer statistics, 2012 *CA: Canc J Clinical* 2012; 62(1); 10 – 29

Sobral, L.M., Bufalino, A., Lopes, M.A., Graner, E., Salo, T., Coletta, RD. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncol.* 2011; 47(9); 840 – 846

Southgate, J., Trejdosiewicz, L.K., Smith, B., Selby, P.J. Patterns of splice variant CD44 expression by normal human urothelium in situ and in vitro and by bladder- carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1995; 62; 449 – 456

Spitz, M.R. Epidemiology and Risk Faktors for Head and Neck Cancer, *Seminars in Oncology* 1996; 21; Nr 3; 281 – 288

Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J.M., Seed, B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 1989; 56; 1057 – 1062

Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M., Seed, B. The hematopoietic and epithelial forms of Cd44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate- bearing cells. *EMBO J* 1991; 10; 343 – 348

Suzuki, A., Raya, A., and Kawakami, Y. Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein- induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 2006; 103; 10294 – 10299

Sy, M. S., Guo, Y. J., Stamenkovic, I. Inhibition of tumor growth in vivo with a soluble CD44-immunoglobulin fusion protein. *J Exp Med* 1992; 176; 623 – 627

Taher, T. E., Smit, L., Griffioen, A. W., Schilder-Tol, E. J., Borst, J. and Pals, S. T. "Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. Association with p56lck in T lymphocytes." *J Biol Chem* 1996; 271(5); 2863 – 2867

Terpe, H. J., Stark, H., Prehm, P., Günthert, U. CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithel of non malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry* 1994; 101; 79 – 89

Thariat, J., Yildirim, G., Mason, K.A., Garden, A.S., Milas, L., Ang, K.K. Combination of radiotherapy with EGFR antagonists for head and neck carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2007; 12; 99 – 110

Thiery, J. P. Epithelial-mesechymal transitions in tumour progression. *Nat Rec Cancer* 2002; 2; 442 – 454

Thomas, L., Byers, H.R., Vink, J., Stamenkovic, I. CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate- coated substrate. *J Cell Biol* 1992; 971 – 977

Tolg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., Ponta, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res* 1993; 21; 1225 – 1229

Trochon, V., Mabilat, C., Bertrand, P., Legrand, Y., Smadja-Joffe, F., Soria, C., Delpech, B., Lu, H. Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer* 1996; 66; 664 – 668

Turley, E. A., Noble, P. W., Bourguignon, L. Y. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 2002; 277; 4589 – 4592

Ue, T., Yokozaki, H., Kitadai, Y., Yamamoto, S., Yasui, W., Ishikawa, T., Tahara, E. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998; 79; 127 – 132

Underhill, C., Dorfmann, A. The role of hyaluronic acid in intercellular adhesion of cultured mouse cells. *Exp Cell Res* 1978; 117; 155 – 164

Wainwright, D., Sherman, J., Sleeman, J., Ponta, H., Herrlich P. A splice variant of CD44 expressed in the rat apical ectodermal ridge contributes to limb outgrowth. *Ann NY Acad Sci* 1996; 785; 345 – 349

Wang, S. H., Tsai, M.S., Chiang, M.F. & LI, H. A novel NK-type homeobox gene, ENK (early embryo specifik NK), preferentially

expressed in embryonic stem cells. *Gene Expression Patterns* 2003; 3; 99 – 103

Weber, A., Tannapfel, A. Prognosefaktoren bei Kopf-Hals-Karzinomen. In *HNO* 2002; 50(1); 35 – 42

Wen, Q. H., Miwa, T., Yoshizaki ,T., Nagayama, I., Furukawa, M., Nishijima, H. Prognostic value of EGFR and TGF-alpha in early laryngeal cancer treated with radiotherapy. *Laryngoscope* 1996; 106; 884 – 888

Wheeler, R. H., Spencer, S., Buchsbaum, D., Robert, F. Monoclonal antibodies as potentiators of radiotherapy and chemotherapy in the management of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 1999; 11; 187 – 190

Wittekind C., Bertolini J. Tnm-system 2010. *Der Onkologe* 2010; 16; 175 – 180

Wittekind, Ch. TNM – Klassifikationen maligner Tumoren. WILEY-VCH. 2017; 8. Auflage; 1 – 73

Wolff, K. D., Follmann M., Nast A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Deutsches Ärzteblatt International* 2012; 109; 829.

Wu, C.L., Chao, Y.J., Yang, T.M., Chen, Y.L., Chang, K.C., Hsu, H.P., Shan, Y.S., Lai, M.D. Dual role of CD44 isoforms in ampullary adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2015; (15); 903

Wu, Q., Chen, X., Zhang, J., Loh, Y. H. Low, T. Y., Zhang, W., Zhang, W., Sze, S.K., Lim, B. and NG, H.H. Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem Cells: *J. Biol. Chem* 2006; 281(34); 24090 – 24094

Yamashina, T., Ishihara, R., Nagai, K., Matsuura, N., Matsui, F., Ito, T., Fujii, M., Yamamoto, S., Hanaoka, N., Takeuchi, Y., Higashino, K., Uedo, N., Iishi, H. Long-Term Outcome and Metastatic Risk After Endoscopic Resection of Superficial Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2013; 108; 544 – 551

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A . Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318; 7 – 1920

Yu, Q., Toole, B.P., Stamenkovic, I. Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function. *JExp Med* 1997; 186; 1985 – 1996

Zawadzki, V., Perschl, A., Rosel, M., Hekele, A., Zöller, M. Blockade of metastasis formation by CD44-receptor globulin. *Int J Cancer* 1998; 75; 919 – 924

Zeng, C., Toole, B.P., Kinney, S.D., Kuo, J.W., Stamenkovic, I . Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers. *Int J Cancer* 1998; 77; 396 – 401

Zhong, X. and Jin, Y. Critical Roles of Coactivator p300 in Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation and Nanog Expression: *J. Biol. Chem* 2009; 282(14); 9168 – 9175

Zhu, D., Bourguignon, L.Y. The ankyrin-binding domain of CD44s is involved in regulating hyaluronic acid-mediated functions and prostate tumor cell transformation. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998; 126; 209 – 222

IX. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Aufbau des CD44 Gens (Goodison et al. 1999).....	12
Abbildung 2: CD44 Protein-Struktur (Goodison et al. 1999)	13
Abbildung 3: CD44 Interaktionen (Ponta et al. 2003).....	14
Abbildung 4: Tumormigration, Wachstum und Invasion durch CD44- Signaltransduktionswege (Turley et al. 2002).....	17
Abbildung 5: Struktur des Nanog- Gens (Booth, Holland 2004).....	18
Abbildung 6: Vergleich Nanog und NKx2.3 (Mitsui et al. 2003).....	19
Abbildung 7: Netzwerk des Nanog- Proteins (Boyer et al. 2005).....	21
Abbildung 8: Regulation der Nanog Expression (Pan, Pei 2005).....	22
Abbildung 9: Die immunhistochemische Auswertung der Tumorgewebeproben, des Normalgewebes (3,3`Diaminbenzidine (DAB) mit Hämatoxylin als Gegenfärbung) sowie der Negativkontrolle: A: Ausprägung der CD44- Expression im gesundes Plattenepithel in 20-facher Vergrößerung, B: starke, membranständige CD44- Expression im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, C: mittelstarke, membranständige CD44- Expression im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, D: schwache, membranständige CD44- Expression im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, E: Negativkontrolle in 5-facher Vergrößerung.....	32
Abbildung 10: Die immunhistochemische Auswertung der Tumorgewebeproben, des Normalgewebes (3,3`Diaminbenzidine (DAB) mit Hämatoxylin als Gegenfärbung) sowie der Negativkontrolle: A: Ausprägung der Nanog- Expression im gesundes Plattenepithel in 20-facher Vergrößerung, B: starke, nukleäre Nanog- Expression im Tumorgewebe in 20- facher Vergrößerung, C: mittelstarke, nukleäre Nanog- Expression im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, D: schwache, nukleäre Nanog- Expression im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, E: starke Nanog- Expression im Zytoplasma im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, F: mittelstarke Nanog- Expression im Zytoplasma im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, G: schwache Nanog- Expression im Zytoplasma im Tumorgewebe in 20-facher Vergrößerung, H: Negativkontrolle in 5-facher Vergrößerung.....	34

Tabellen:

Tabelle 1: Lokalisationen des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich (Wittekind 2017)	5
Tabelle 2: pT-Klassifikation (Primärtumor) (Ihrler, Weiler 2014)	7
Tabelle 3: pN- Klassifikation (außer bei Nasopharynx) (Ihrler, Weiler 2014)	7
Tabelle 4: pN-Klassifikation beim Nasopharynx (Wittekind 2017)	8
Tabelle 5: pM-Klassifikation (Fernmetastase bei allen Lokalisationen) (Ihrler, Weiler 2014).....	8
Tabelle 6: Verteilung der klinischen Daten (*Kombinierte Rezidive: Patienten mit mehreren Rezidiven nochmals extra aufgelistet)	29
Tabelle 7: Verteilung der CD44-Expression	38
Tabelle 8: Patienten mit T-Stadium 0-4 und einer Expression von CD44 low und high) an der Invasionsfront des Tumors.....	39
Tabelle 9: Patienten mit UICC-Stadium 1 – 4 und einer Expression von CD44 (low und high) im Tumorzentrum.....	40
Tabelle 10: Mittelwerte und Standardfehler für das tumorabhängige Überleben	44
Tabelle 11: Mittelwerte und Standardfehler für das progressionsfreie Überleben.....	45
Tabelle 12: Cox-Regression für das tumorabhängige Überleben.....	46
Tabelle 13: Cox-Regression für progressionsfreies Überleben an der Invasionsfront.....	47
Tabelle 14: Mittelwerte und Standardfehler für das Entstehen eines Lokalrezidivs	49
Tabelle 15: Cox-Regression für das Entstehen eines Lokalrezidivs	50
Tabelle 16: Verteilung der Nanog-Expression	53
Tabelle 17: Patienten mit Grading1-3 und einer Expression von Nanog (low und high) im Kern der Zelle im befallenen Lymphknoten.....	55
Tabelle 18: Patienten mit L1 (0,0: L0; 1,0: L1) (0,0: nicht eingedrungen, 1,0: eingedrungen) und einer Expression von Nanog (low und high) im Zytoplasma der Zelle an der Invasionsfront.....	57
Tabelle 19: Patienten mit L1-Status (0,0: nein, 1,0:ja) und einer Expression von Nanog (low und high) im Zytoplasma der Zelle im befallenen Lymphknoten	58
Tabelle 20: Mittelwerte und Standardfehler für die Gesamtüberlebenszeit	60
Tabelle 21: Mittlere lokalrezidivfreie Zeit für Patienten mit einer Expression von Nanog im Zytoplasma (Low und high)	62

Tabelle 22: Cox-Regression für Patienten mit einer Expression von Nanog im Zytoplasma	63
Tabelle 23: Patienten mit einer Expression von CD44 (Remmele_2: low und high) in der Invasionsfront in Korrelation zum Tumorzentrum	65
Tabelle 24: Patienten mit einer Expression von Nanog (Remmele_2: low und high) im Zytoplasma der Zelle	66
Tabelle 25: Patienten mit einer Expression von Nanog (Remmele_2: low und high) im Kern der Zelle im Tumorzentrum in Korrelation zur Invasionsfront	66
Tabelle 26: Patienten mit einer CD44 Expression (Remmele_2: low und high) im Tumorzentrum in Korrelation zum befallenen Lymphknoten.....	67
Tabelle 27: Patienten mit einer CD44 Expression (Remmele_2: low und high) an der Invasionsfront des Tumors in Korrelation zum befallenen Lymphknoten	68

X. Publikationen

- 1))Boxberg M., Jesinghaus M., Dorfner C., Mogler C., Drecoll E., Warth A., Steiger K., Bollwein C., Meyer P., Wolff KD., Kolk A., Weichert W. Tumour budding activity and cell nest size determine patient outcome in oral squamous cell carcinoma: proposal for an adjusted grading system. *Histopathology* (2017 Jun;70(7), Epub 2017 Mar 28) S.1125 – 1137
- 2) Boxberg M, Götz C, Haidari S, Dorfner C, Jesinghaus M, Drecoll E, Boskov M, Wolff KD, Weichert W, Haller B, Kolk A. Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphologic parameters and clinicopathological factors. *Histopathology* (2018 Feb 22. [Epub ahead of print])

XI. Danksagung

Diese Arbeit wurde an der Technischen Universität München angefertigt.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater apl. Prof. Dr. Dr. Andreas Kolk für die Überlassung dieses Themas und die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Melanie Boxberg für die konstruktive Zusammenarbeit und ihre wertvollen Hinweise, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt auch PD Dr. Marcus Kremer und Frau Karin Mengele der Frauenklinik der Technischen Universität München, die im Rahmen einer konstruktiven wissenschaftlichen Zusammenarbeit Untersuchungsmaterialien von effizienter Qualität zur Verfügung stellten.

Herrn Dr. Bernhard Haller vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München gilt ein großer Dank für die statistische Beratung und Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, die mir eine umfassende schulische Ausbildung und das Zahnmedizinstudium ermöglichten.

Ein großer Dank gilt meinem Mann Adrian für seine allgegenwärtige Unterstützung, Liebe und für seine stete Ermunterung zur Vollendung dieser Arbeit.