

Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik
Technische Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Arnold)

**Die prognostische Relevanz der Zellzyklusregulationsproteine P21, P27
und P53 sowie der Apoptoserate bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-
Halsbereichs**

Eva-Tessina Becker

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Arnold
 2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 18.06.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.10.2003 angenommen.

Gewidmet
meinen Eltern Renate und Jost Becker
und meiner Nonna Irmgard Becker

Die prognostische Relevanz der Zellzyklusregulationsproteine P21, P27 und P53 sowie der Apoptoserate bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
2	Zielsetzung.....	8
3	Material und Methoden.....	9
3.1	Patientenkollektiv.....	9
3.2	Immunhistochemie.....	10
3.2.1	Unspezifische Gewebepreparation.....	11
3.2.2	Primärantikörper.....	11
3.2.3	ABC-Peroxidase-Methode.....	12
3.2.4	Sichtbarmachen der Immun-Sandwich-Reaktion.....	13
3.2.5	Alkalische Phosphatase-Antialkalische Phosphatase (APAAP)-Methode.....	13
3.3	In-situ-NICK-Translation.....	15
3.4	Kontrollversuche und Auswertung der Präparate.....	17
3.4.1	Auswertung der Apoptose-Färbung.....	17
3.4.2	Auswertung der immunhistochemischen Darstellung von P21.....	18
3.4.3	Auswertung der immunhistochemischen Darstellung von P27.....	19
3.4.4	Auswertung der immunhistochemischen Doppelfärbung von P21 und P53.....	19
3.5	Statistische Analyse der Ergebnisse.....	20
4	Ergebnisse.....	21
4.1	Apoptose.....	21
4.2	P21.....	23
4.3	P27.....	26
4.4	P53.....	28
4.5	Klinische Patientendaten.....	30
5	Diskussion.....	34

5.1	Diskussion der Methoden.....	34
5.1.1	Immunhistochemie	34
5.1.2	In-situ-NICK-Translation.....	35
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	35
5.2.1	Grundlagen zum Ablauf des Zellzyklus	36
5.2.2	Apoptose	37
5.2.3	P21	41
5.2.4	P27	47
5.2.5	P53	50
5.2.6	P21, P27 und P53 und Prognose.....	52
5.2.7	Apoptose und Prognose	58
5.3	Schlussfolgerungen	59
6	Zusammenfassung	61
7	Literaturverzeichnis	63
8	Anhang.....	80
9	Danksagung.....	83
10	Lebenslauf.....	84

1 Einleitung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereichs sind vorwiegend in Mundhöhle, Pharynx und Larynx lokalisiert und gehören mit einer Inzidenz von rund 500 000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit zu den sechsthäufigsten Malignomen (Weber A. et al. 2002). In Deutschland stehen Malignome des Kopf-Halsbereichs bei der männlichen Bevölkerung an vierter Stelle der Häufigkeitsverteilung, wobei Kehlkopfkrebs der häufigste bösartige Tumor der Kopf-Halsregion ist (Schlesinger-Raab A. et al. 2003). Krebserkrankungen von Mundhöhle und Rachen stehen derzeit bei Männern hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit an achter Stelle. Im Jahr 1998 kam es bei Männern schätzungsweise zu 7800 Krebs-Neuerkrankungen im Bereich von Mundhöhle und Rachen sowie zu 2500 neuen Fällen von Kehlkopfkrebs. Bei Frauen war die Inzidenz geringer. Dennoch erkrankten etwa 3000 Frauen an Mundhöhlen- bzw. an Oro- oder Hypopharynxmalignomen und ca. 400 an Larynxkarzinomen. Im Jahr 1999 starben insgesamt rund 3730 Männer sowie 1200 Frauen an Mund- und Rachenkarzinomen und 1340 Männer bzw. 190 Frauen an Kehlkopfkrebs (Deutsches Krebsregister 2002). Während die Inzidenz von Kopf-Halstumoren und die Sterblichkeit bei Männern nach einem Anstieg in den 80er Jahren seit Anfang der 90er Jahre konstant bleiben, nehmen sie bei Frauen kontinuierlich zu (Deutsches Krebsregister 2002). Dies wird in erster Linie durch ein verändertes Rauchverhalten bei Frauen erklärt. Die Überlebensrate und Prognose der Patienten ist nach heutigem Wissensstand von solchen äusseren Risikofaktoren abhängig. Dazu gehören neben Tabak- und Alkoholkonsum auch Alter, Geschlecht, soziales Umfeld und geographische Lage. Diese exogenen Einflüsse erklären jedoch die interindividuell stark variierende Überlebenszeit der Patienten nicht ausreichend. Daher wird seit geraumer Zeit nach weiteren Faktoren gesucht, die an der Tumorentstehung beteiligt sind und massgeblich die Prognose der Patienten beeinflussen. Dabei wird genetisch prädisponierenden Faktoren mehr und mehr Bedeutung beigemessen. Eine Vielzahl von Untersuchungen sind vorgenommen worden, um Marker zu identifizieren, die auf molekularer Ebene an der Krebsentstehung beteiligt sind und Aussagen zum Krankheitsverlauf bzw. zur Prognose von Patienten mit Kopf-Halstumoren zulassen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Faktoren gelegt, die für die Steuerung von Zellteilung und Gewebewachstum verantwortlich sind. Dazu gehört in erster Linie das Tumorsuppressorgen p53¹, dem eine wichtige Kontrollfunktion bei der Zellproliferation zugeschrieben wird. Desweiteren waren Zellzyklusregulationsproteine

¹ Gene werden im folgenden Text klein geschrieben, Proteine gross.

von Interesse, darunter insbesondere die Cyclin-Kinase-Inhibitoren P21 und P27. Ihr Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf wurde an verschiedenen Tumorerkrankungen untersucht und mit Tumorentstehung und -verhalten in Verbindung gebracht. Nicht zuletzt wurde von vielen Autoren einer veränderten Apoptoserate eine Rolle als prognostisch wichtiger Parameter zugeschrieben.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Tumorinduktion scheint auf molekularer Ebene eine Dysregulation des Zellzyklus zu sein (Hunter T. et al. 1994; Tsihlias J. et al. 1999). Der Zellzyklus unterteilt sich in vier verschiedene Phasen (M-, G1-, S- und G2-Phase), die von proliferierenden Zellen in normalem Epithel nacheinander durchlaufen werden. Ausdifferenzierte Zellen treten in die G0-Phase über. Hier verbleiben sie entweder dauerhaft oder treten, durch mitogene Faktoren vermittelt, wieder in den Zellzyklus ein (Koolman J., Röhm K.-H. 1994). Damit die Zellteilung nach diesem festgelegten Schema ablaufen kann, ist ein differenziertes Zusammenspiel verschiedener Proteine und Proteinkomplexe nötig. Hieran beteiligt sind Cyclin-abhängige Kinasen/cyclin-dependent kinases (CDKs). CDKs werden von Cyclinen aktiviert und von Cyclin-Kinase-Inhibitoren/cyclin-kinase-inhibitors (CKIs) gehemmt. Zu den CKIs gehören die Proteine P21 und P27. Beide Proteine ermöglichen nach DNA-Schädigung einen Arrest zu unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus (Abbildung 1). Während dieser Pause können Schäden des Genoms eliminiert werden, ehe die Zellteilung fortgesetzt wird. Damit wird die Vermehrung geschädigter Zellen verhindert. Neben der negativen Regulation des Zellzyklus kommt beiden Proteinen eine Rolle bei der Differenzierung von Zellen zu. P21 ist zudem über Bindung an PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ , indirekt an der DNA-Replikation und an der Reparatur geschädigter DNA beteiligt (Zhang H. et al. 1993). Neuere Untersuchungen schreiben P21 darüber hinaus eine Schutzfunktion vor stressinduzierter Apoptose zu (Gartel A.L. et al. 2002). Von p21 weiss man, dass es von dem Wildtyp von P53 (wt-P53) aktiviert wird, nicht jedoch von mutiertem P53. Auf diesem Weg vermittelt P21 die zellzyklusregulierenden Funktionen von P53 und reflektiert somit den funktionellen Status von P53. P21 wird jedoch auch auf p53-unabhängigen Wegen aktiviert.

Wie bereits erwähnt, hat das Tumorsuppressorgen p53 eine wichtige Kontrollfunktion. P53 wird als Antwort auf Stress und DNA-Schäden vermehrt exprimiert und vermittelt als Transkriptionsfaktor die Aktivierung einer Vielzahl von Genen. Dazu gehören Gene, deren Produkte für einen Zellzyklusarrest zuständig sind oder die an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind, wie zum Beispiel p21. Daneben vermittelt P53 den programmierten Zelltod, die Apoptose. Apoptose ist im Gegensatz zu Nekrose ein aktiver

Prozess, den Zellen u.a. als Schutzmechanismus vor der Vervielfältigung mutierten Erbguts vollziehen. Wird ein DNA-Schaden einer Zelle erkannt, kommt es zu einer Fragmentierung ihres Genoms und zu einer Abschnürung der übrigen Zellbestandteile in sogenannte apoptotic bodies. Diese werden ohne begleitende Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes phagozytiert und abgebaut. Die mutierte Zelle ist damit eliminiert. Bei Karzinomzellen ist dieser Schutzmechanismus gestört, es kommt nicht zu Apoptose und mutierte Zellen können sich ungehindert vermehren.

Genmutationen dieser Regulationsproteine, ihre veränderte Expression oder gestörte Funktion führen zu Veränderungen im Zellzyklus. Die Folge ist eine für Tumoren typische veränderte Proliferations- und Apoptoserate, eine Immortalisation von Zellen, invasives Wachstum und Angiogenese. Dabei muss man davon ausgehen, dass die Tumorentstehung nicht auf einer Mutation eines einzigen Gens beruht. Vielmehr werden auf dem Weg von der gesunden Zelle zur Tumorzelle verschiedene Gene durch Mutation aktiviert bzw. inaktiviert. Die hier aufgeführten Proteine sind also nur als Teil eines komplexen Systems zu betrachten, in dem sie im Rahmen der Karzinogenese jeweils mit weiteren Regulationsfaktoren interagieren.

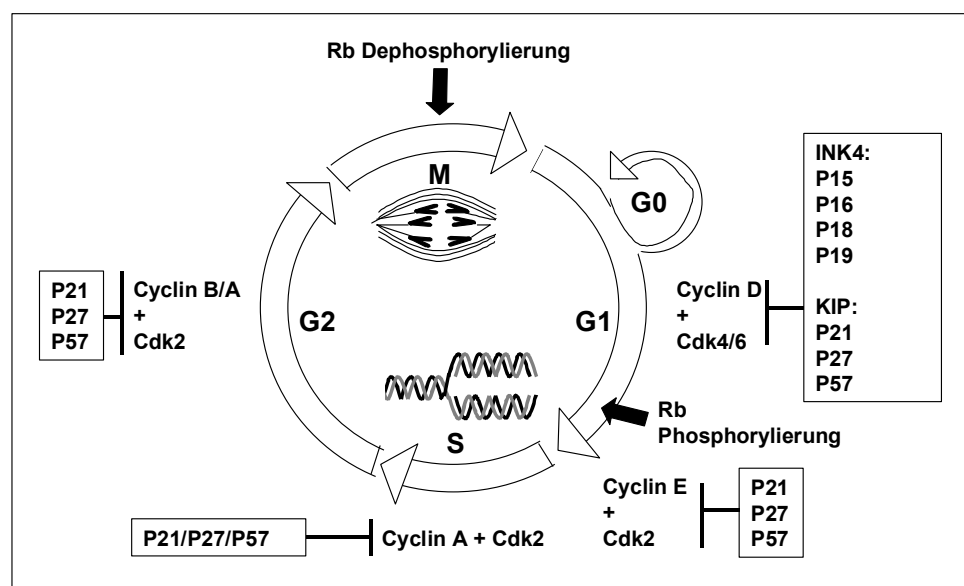


Abbildung 1
Regulations-
faktoren des
Zellzyklus
(nach
Tsihlias J. et
al. 1999)

Bei der Krebsentstehung ist eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 für viele Autoren von besonderer Bedeutung (Crowe D.L. et al. 2002). Dem p53-Gen wird schon länger eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Zellzyklus zugeschrieben. So hat für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen die Adenom-Karzinom-Sequenz (Cho K.R. et al. 1992) als Tumorprogressionsmodell Bedeutung erlangt. Die Transformation von Normalgewebe zu einem Adenom und schliesslich zum Karzinom wird hiernach als Folge

einer Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen aufgefasst, nämlich der Aktivierung von Onkogenen und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Der entscheidende Schritt für die maligne Umwandlung vom benignen Adenom zum Karzinom ist die Mutation bzw. der Verlust des p53- Suppressorgens. Aber auch bei einer Vielzahl anderer Tumoren lassen sich p53-Mutationen nachweisen, die in den meisten Fällen eine prognostische Bedeutung haben. So geht mit zunehmender Häufigkeit von p53-Mutationen meist eine schlechtere Prognose einher. Dies trifft zum Beispiel auf Karzinome von Magen, Leber, Mamma und Lunge zu (Lee H.S. et al. 2003; Staib F. et al. 2003; Borresen-Dale A.L. 2003; Grossi F. et al. 2003). Das p53-Gen scheint das am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen bei Krebserkrankungen des Menschen zu sein (Sakai E. et al. 1992; Somers K.D. et al. 1992). Heute geht man davon aus, dass bei über 60% der Malignome eine p53-Mutation vorliegt (Fogel S. et al. 1996; Woods D.B. et al. 2001). Die restlichen Tumore, die wt-p53 enthalten, zeigen häufig eine defizitäre P53-Antwort. Im Hinblick auf Malignome des Kopf-Halsbereichs konnten Kashiwazaki et al. bei 79% der untersuchten Plattenepithelkarzinome und bei 36% der Dysplasien p53-Mutationen nachweisen (Kashiwazaki H. et al. 1997). Obgleich bei der Mehrzahl der Tumoren eine Überexpression bzw. Alteration von P53 festzustellen ist, wird dieser bei Kopf-Halskarzinomen in den bisherigen Arbeiten eine unterschiedliche prognostische Relevanz beigemessen (Saunders M.E. et al. 1999). In einigen Studien war eine p53-Mutation bzw. P53-Akkumulation mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer kürzeren Überlebenszeit korreliert (Shin D.M. et al. 1996; Narayana A. et al. 1998). Demgegenüber konnte in anderen Arbeiten kein Zusammenhang zur Überlebensrate der Patienten hergestellt werden (Koch W.M. et al. 1996; Homma A. et al. 1999).

Auch die Expression von P21 wurde bisher in einer Vielzahl von Studien evaluiert. Bei den untersuchten Tumoren zeigt die P21-Expression ein heterogenes Bild, so zum Beispiel bei Karzinomen von Pankreas, Cervix, Schilddrüse, Mamma und Kolon (Fernandez P.L. et al. 2002; Van de Putte G. et al. 2003; Soda G. et al. 1999; O'Hanlon D.M. et al. 2002; Wouters B.G. et al. 1997). Auch zur P21-Expression in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs gibt es diverse Studien. Die Mehrzahl der Kopf-Halstumoren zeigt eine P21-Überexpression (Erber R. et al. 1997). Diese Überexpression war meist mit Proliferationsmarkern positiv korreliert. Hinsichtlich der prognostischen Relevanz von P21 kommen die Autoren jedoch zu völlig kontroversen Ergebnissen.

Bei einer Vielzahl von malignen Tumoren lässt sich ein Verlust von P27 in unterschiedlichem Ausmass nachweisen, so zum Beispiel bei Adenokarzinomen, Tumoren des zentralen Nervensystems oder bei Lymphomen (Nitti D. et al. 2002; Piva R. et al.

1997; Erlanson M. et al. 1998). In bisherigen Untersuchungen an malignen Tumoren kommt dem P27-Verlust eine unterschiedlich grosse Rolle hinsichtlich der Prognose zu. Meist geht eine niedrige P27-Expression bzw. ein P27-Verlust mit einem erhöhten Rezidivrisiko und/oder mit einer verminderten Überlebenszeit der Patienten einher. Umgekehrt war die Präsenz von P27 mit einer verbesserten Überlebenszeit verbunden. Ein unabhängiger prognostischer Wert von P27 konnte bisher an Lungen-, Mamma- und Prostatakarzinomen sowie an Malignomen des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen werden (Yatabe Y. et al. 1998; Tsihilas J. et al. 1999; Cote R.J. et al. 1998; Mori M. et al. 1997; Palmqvist R. et al. 1999). Bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich konnte die P27-Expression bei 18% bis 62% der Fälle immunhistochemisch dargestellt und mit der Überlebenszeit korreliert werden. Die Autoren kommen dabei jedoch zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen. Zu der prognostischen Relevanz von P27 bei Karzinomen im Kopf-Halsbereich gibt es bisher keine einheitlichen Angaben.

2 Zielsetzung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereichs stehen bei den malignen Tumorerkrankungen weltweit an sechster Stelle. Eine frühzeitige Entdeckung und Diagnosestellung dieser Tumoren sowie verbesserte Therapiemethoden haben in den letzten Jahrzehnten nur zu einer geringen Zunahme der Überlebenszeit geführt (Shin D.M. et al. 1996). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Karzinomen im Bereich von Mundhöhle und Rachen heute bei etwa 50% (Männer 43%, Frauen 56%) und gehört damit nach wie vor zu den niedrigsten unter den häufigsten Krebserkrankungen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate von Larynxkarzinomen ist mit ca. 70% (Männer 71%, Frauen 73%) geringfügig günstiger. Häufigste Ursache für ein Versagen der primären Therapie ist die Entwicklung von Rezidiven oder Zweitkarzinomen (Shin D.M. et al. 1996). Die Aggressivität und demzufolge der Krankheitsverlauf ist bei den jeweiligen Tumoren trotz ähnlicher Morphologie interindividuell meist sehr verschieden, was im einzelnen Fall eine prognostische Voraussage und dementsprechend eine Anpassung des Therapieschemas erschwert (Cordon-Cardo C. et al. 1995). Zudem gibt es bisher für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich keine zuverlässigen Tumormarker, was eine frühzeitige Diagnose und Verlaufskontrolle erschwert (Weber A. et al. 2002).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Stellenwert von molekularen Faktoren im Hinblick auf eine mögliche Prognoseabschätzung bei Tumorerkrankungen im Kopf-Halsbereich zu untersuchen. Dadurch soll ermöglicht werden, zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung Hochrisikopatienten zu erkennen, deren Prognose durch ein schärferes Therapiekonzept, wie zum Beispiel frühzeitige adjuvante Radio- bzw. Radiochemotherapie, oder durch eine engmaschige Nachkontrolle verbessert werden kann. Zudem könnten solche Biomarker in der Nachsorge Verwendung finden. Dadurch soll auf Dauer die Überlebensrate von Patienten mit Kopf-Halstumoren weiter verbessert werden.

An 98 Patienten, die an Plattenepithelkarzinomen von Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx erkrankt waren, wurde die Expression der Proteine P53, P21 und P27 und die Apoptoserate ermittelt und untersucht, ob sich Hinweise auf die Prognose der Patienten ableiten lassen. Desweiteren sollte die Wertigkeit dieser Proteine als zukünftige Tumormarker bzw. Prognosefaktoren evaluiert werden. Dazu korrelierten wir die Interaktion der oben genannten Proteine und die Apoptoserate der Tumoren mit klinischen Parametern wie Überlebenszeit, Therapieform, TNM-Klassifikation, Primärlokalisation, onkologischen Ereignissen, Alter und Geschlecht.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Die Grundlage für die vorliegende Arbeit bildeten Plattenepithelkarzinome aus den Bereichen Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx von insgesamt 98 Patienten/innen, die sich im Zeitraum zwischen den Jahren 1992 bis 1997 einer Behandlung unterzogen und im Rahmen einer prospektiven Multizenterstudie zwischen den Kliniken und Polikliniken für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Technischen Universität München, der Universität Regensburg und der Universität Göttingen erfasst wurden. In die Untersuchung eingeschlossen wurden Patienten/innen mit histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen der Stadien I bis IV aus den Bereichen Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx, um ein möglichst breites Spektrum an Kopf-Halsmalignomen zu erfassen. Aufgenommen wurden nur die Fälle, in denen der Tumor als chirurgisch sanierbar eingestuft wurde, d.h. die Möglichkeit zu folgendem operativen Vorgehen sollte gegeben sein: Exstirpation des Primärtumors in toto, Neck dissection bei allen Karzinomen > T1 von Mundhöhle und Oropharynx sowie bei allen Stadien von Hypopharynx- und Larynxkarzinomen. Patienten/innen mit histologisch gesicherten Halslymphknotenmetastasen ($pN \geq 1$) erhielten eine postoperative Radiatio in kurativer Absicht (2 Gy pro Tag bei einer Wochendosis von 10 Gy ad insgesamt 68 Gy).

Vorhandene Fernmetastasen oder vorausgegangene Malignome, ausgenommen Basaliome der Haut, stellten Ausschlusskriterien dar, ebenso wie die im folgenden genannten anamnestischen Faktoren: Schwangerschaft, schwere arterielle Hypertonie, gestörte Nieren- oder Leberfunktion, ausgeprägte Hypertriglyzerinämie, Hypercholesterinämie oder Hyperkalzämie, schwerer Diabetes mellitus, frühere immunstimulierende Therapien, hämatologische oder rheumatische Systemerkrankungen, regelmässige antiphlogistische Therapie, Allergien, die eine regelmäßige Einnahme von Antihistaminika erfordern oder eine bekannte HIV- Infektion.

Die Patienten wurden randomisiert und erhielten eine Randomisationsnummer. Jedem resezierten Tumorpräparat wurde eine Histologienummer zugeteilt. Folgende Patientenparameter wurden ausserdem in dieser Arbeit berücksichtigt: Geburtsdatum, Geschlecht, Randomisationsdatum (Zeitpunkt der ersten Vorstellung in der Klinik), Therapie (Operation = op bzw. Operation und Nachbestrahlung = or), Status (erstes onkologisches Ereignis, d.h. Ereignisse, die nach der Primärbehandlung während der Nachbeobachtung auftraten: Censoring = C, Recurrence = R, Secondary Carcinom = S,

Metastasis = M, Death = D), Zeit bis zum Eintreten des ersten onkologischen Ereignisses (Time), Tod, Zeit bis zum Tod (Time-D), Primärlokalisierung des Tumors, anatomische Ausbreitung des Primärtumors als postoperative histopathologische Klassifikation (pT) und Fehlen oder Vorhandensein und Ausbreitung von regionären Lymphknotenmetastasen (pN). Im Rahmen der Nachsorge wurden die Patienten engmaschig einbestellt und untersucht. Die erhobenen Daten wurden jährlich anhand eines standardisierten Follow-up-Bogens dokumentiert.

Das chirurgisch resezierte Tumorgewebe wurde formalinfixiert, routinemässig aufbereitet und in Paraffin eingebettet. Zu jedem Präparat wurde ein histopathologisches Gutachten erstellt.

In die statistische Auswertung gingen Daten von insgesamt 88 Patienten ein. 10 Patienten mussten aus der Studie ausgeschlossen werden, da zu wenig Gewebe zur vollständigen Untersuchung aller experimentellen Parameter vorlag.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 8 (9,1%) Frauen im Alter von 43 bis 70 Jahren und 80 (90,9%) Männern im Alter von 34 bis 77 Jahren zusammen. Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme lag das Durchschnittsalter des weiblichen Kollektivs bei 52,75 Jahren, das des männlichen bei 54,68 Jahren.

Die Tumoren verteilten sich hinsichtlich ihrer Lokalisation in ihrer Häufigkeit wie folgt: 7 Karzinome (7,95%) entstammten der Mundhöhle, 19 (21,59%) dem Oropharynx, 16 (18,19%) dem Hypopharynx und 46 (52,27%) dem Larynx. Eine Übersicht gibt Tabelle 20.

Das Staging mit Bestimmung des Tumorstadiums erfolgte in Anlehnung an die aktuelle Version des TNM (tumor-node-metastasis) staging system der International Union Against Cancer (UICC).

3.2 Immunhistochemie

Zum ortsrichtigen Nachweis der Proteine P21 und P27 wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex- (ABC-) Methode angewendet (Hsu S.M. et al. 1981), die im molekularbiologischen Labor der Hals-Nasen-Ohrenklinik des Klinikums rechts der Isar, München, modifiziert und an das vorliegende Untersuchungsmaterial optimal angepasst wurde. Die Expression des Proteins P53 im Rahmen der Doppelfärbung mit dem P21-Protein wurde über die Alkalische Phosphatase- Antialkalische Phosphatase (APAAP)-Technik zur Darstellung gebracht.

3.2.1 Unspezifische Gewebepreparation

Von dem formalinfixierten und paraffineingebetteten Tumorgewebe wurden an einem Schlittenmikrotom jeweils 1-2µm dicke Schnitte gewonnen, auf Superfrost-Plus-Objektträger (Fa. Menzel) aufgezogen und über Nacht bei 59°C getrocknet, um ein gutes Anhaften der Präparate zu gewährleisten.

Im Anschluss an die Entparaffinierung durch Xylol (2 x 10 Min.) erfolgte eine Rehydrierung über die absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 75%, 50%, jew. 5 Min.).

Sollte die Detektion mittels der ABC-Peroxidase-Methode durchgeführt werden, musste die endogene Peroxidaseaktivität der Präparate blockiert werden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Dazu wurden die Schnitte im Rahmen der Rehydrierung aus dem absoluten Alkohol in H₂O₂-Methanol (15-20 Min.) gestellt. Erst dann durchliefen sie die weiteren Schritte der Rehydrierung. Anschließend wurde mit Aqua dest. gespült (3 x 5 Min.).

Zur Freilegung der antigenen Determinanten wurden die Präparate in TUF (target-unmasking- fluid, Fa. Kreatech Diagnostics, Verhältnis 1:3) für die P21- bzw. in target retrieval solution (pH 6, Fa. Dako) für die P27-Detektion sowie für die Doppelfärbung von P53 und P21 in der Mikrowelle aufgekocht (P21: 4 x 5 Min., P27, P53 und P21: 6 x 5 Min. bei 470 Watt) und nach schonender Abkühlung in PBS (phosphate buffered saline) im Rahmen der ABC-Methode bzw. bei der APAAP-Technik in TRIS-Puffer gespült (10 Min.).

Nun wurden die Schnitte in der feuchten Kammer mit FCS (fetal calf serum, 10%ig in PBS für die ABC-Methode bzw. in BSA 0,1% für die APAAP-Technik) beschichtet und über 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die in dem Serum enthaltenen Proteine lagern sich an stark geladenes Gewebe an und sättigen die für den Antikörper unspezifischen Bindungsstellen ab. Auf diese Weise kann die Hintergrundfärbung reduziert oder ganz verhindert werden.

3.2.2 Primärantikörper

Nach dieser Vorbehandlung kann der spezifische Primärantikörper gegen die entsprechenden Proteine (P21, P27 und P53) aufgetragen werden. Verdünnung, Dauer und Temperatur der Inkubation müssen für jeden Antikörper gesondert ermittelt werden. Aus den Voruntersuchungen ergaben sich die in Tabelle 1 aufgeführten Parameter, mittels derer sich ein für den jeweiligen Antikörper optimales Resultat, d.h. eine spezifische sowie deutliche Anfärbung bei möglichst geringer Hintergrundfärbung erzielen liess.

Antikörper	Verdünnung (in PBS 0,1M, pH 7,2-7,4)	Inkubationsdauer	Inkubationstemperatur
P21 Einzelfärbung	1:25	≥18 h	Raumtemperatur (RT)
P21 Doppelfärbung	1:75	≥18 h	RT
P27 Einzelfärbung	1:150	ÜN (über Nacht), anschliessend 1 h	Kühlschrank 4°C RT
P53 Doppelfärbung	1:25	≥20 h	RT

Tabelle 1 Optimale, individuelle Reaktionsbedingungen für die jeweiligen Antikörper.

Alle verwendeten Antikörper waren monoklonale Maus- Anti- Human- Immunglobuline. Der P53-Antikörper (Dako DO-7, Code M7001) bindet an ein Epitop zwischen den Aminosäuren 19 und 26 am N-Terminus des menschlichen P53-Proteins und erkennt sowohl unveränderten P53-Wildtyp als auch mutiertes P53-Protein. Der P21WAF1/Cip1-Antikörper (Dako SX 118, Code M7202) reagiert sowohl mit einem 21 kDa-Protein von MCF-7-Zellen als auch mit einem 21 kDa-Band im Lysat von SAOS- Zellen, die mit dem vollständigen P21-Protein transfiziert wurden. Der Antikörper reagiert ebenso mit P21-Protein von Mäusen. Im Gegensatz dazu kommt es beim P27Kip1-Antikörper (Dako SX 53G8, Code M7203) zu keiner Kreuzreaktion mit Maus-P27. Dieser Antikörper erkennt und präzipitiert mit dem P27Kip1-Antigen aus menschlichen Mammakarzinom-Zelllinien.

3.2.3 ABC-Peroxidase-Methode

Basierend auf den Wechselwirkungen zwischen dem niedermolekularen Vitamin Biotin und dem Glykoprotein Avidin erfolgte die Detektion bei dieser Technik durch alternierendes Auftragen von biotinyliertem Antikörper und Avidin-Biotin-Peroxidase-(ABC-) Komplex (Fa. Vektor, Burlingame, USA). Über einen gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichteten biotinylierten Sekundärantikörper wird der Primärantikörper mit dem vorgeformten Avidin-Biotin-Enzymkomplex verbunden. Durch wiederholtes Durchlaufen dieses Zyklus erreicht man eine Amplifikation des Signals und somit eine Sensitivitätssteigerung, da ein Avidin- bzw. Streptavidinmolekül mit seiner hohen Affinität für Biotin bis zu vier solcher Moleküle binden kann und sich somit mehrere Peroxidasemoleküle über eine baumartig verzweigte Antikörperstruktur auf einem einzelnen Primärantikörper aufbauen.

Mit dieser Methode erfolgte der immunhistochemische Nachweis der Proteine P21 und P27 in der jeweiligen Einzelfärbung.

In der feuchten Kammer wurden die Testschnitte bei Raumtemperatur erst über jeweils 30 Minuten, dann über jeweils 15 Minuten mit Biotin- α -mouse-Ak und ABC-Elite-Komplex inkubiert. Vor jedem neuen Inkubationsschritt mussten überschüssige Antikörper durch Spülen der Schnitte in PBS entfernt werden, wobei dem Puffer Brij-Detergens (Sigma 430 AG 6) zur Herabsetzung der Oberflächenspannung der Präparate zugegeben wurde.

3.2.4 Sichtbarmachen der Immun-Sandwich-Reaktion

Die Enzymaktivität der Peroxidase wird dazu genutzt, ein geeignetes Substrat in einen Farbstoff zu überführen. Hier wurde der komplexgebundenen Peroxidase AEC (Aminoethylkarbazol) als solches angeboten, das man entweder als frisch zubereitetes Gemisch oder als fertig erhältliches Reagenz (AEC + High sensitivity substrate chromogen, ready to use, Fa. Dako) zugeben kann. In beiden Fällen muss die Farbentwicklung fortwährend unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Das AEC wird unter Katalyse der Peroxidase durch das zugesetzte Wasserstoffperoxyd oxidiert, wodurch am Ort der Reaktion als Produkt ein unlöslicher roter Farbstoff anfällt. Alternativ zu AEC kann DAB (Diaminobenzidine)-Farblösung verwendet werden.

Nach Abspülen der Substratreste unter fließendem Leitungswasser (ca. 10 Min.) erfolgte die Kerngegenfärbung in Hämalaun, um auch die Zellen, deren Kerne negativ für den Primärantikörper waren, optisch darzustellen. Bis zum Eintreten der Bläuung wird erneut in lauwarmen Leitungswasser gespült.

Das Eindecken der Schnittpräparate erfolgte mit Kaysers Glycerin-Gelatine als hydrophilem Medium, um ein Lösen des Farbstoffs zu vermeiden. Dazu wurde die Gelatine in der Mikrowelle bei 470 Watt für 25 Sekunden erwärmt. Die Präparate wurden zuletzt mit warmem Leitungswasser gespült, um durch Temperaturangleichung an die Gelatine eine möglichst gute Verbindung zwischen Medium, Wasserüberstand und Objektglas zu ermöglichen. Die Objektträger wurden einzeln aus dem warmen Wasserbad herausgenommen und mit jeweils 4–5 Tropfen Gelatine versehen. Das Objektglas musste zügig unter Zuhilfenahme einer Präparatenadel aufgebracht werden, um der Entstehung von Luftblasen unter dem Objektglas vorzubeugen.

3.2.5 Alkalische Phosphatase-Antialkalische Phosphatase (APAAP)-Methode

Bei der APAAP- Methode wird ein formgeformter Enzym-Anti-Enzym-Komplex aus dem Antigen Alkalische Phosphatase und dem dagegen gerichteten Antikörper verwendet.

Stammen der Primärantikörper und der APAAP-Komplex aus der gleichen Tierspezies (hier Maus), können sie direkt von dem Sekundärantikörper miteinander verbunden werden. Verwendet man hingegen einen von einer anderen Tierspezies abstammenden Erstantikörper, muss dieser vorweg durch Inkubation mit einem gegen diese Spezies gerichteten Antikörper für den Sekundärantikörper erkennbar gemacht werden. Zum Beispiel wird ein von Kaninchen abstammender Primärantikörper durch Inkubation mit Maus-Anti-Kaninchen-Antikörper für den Sekundärantikörper als Maus-Antikörper maskiert und fungiert somit als Bindungsstelle.

In unseren Vorversuchen zur Doppelfärbung von P53 und P21 lieferte diese Technik die besten Resultate.

Die Schnitte wurden wie in Abschnitt 3.2.1 (unspezifische Gewebepreparation) beschrieben behandelt. Bei der APAAP-Methode musste PBS durch TRIS-Puffer ersetzt werden, da Phosphationen bei dieser Methode stören würden. Lediglich die Primärantikörper wurden in PBS angesetzt. Während der Rehydrierung wurde auf das Einstellen der Präparate in H₂O₂ verzichtet, da bei dieser Technik alkalische Phosphatase statt Peroxidase als Antigen verwendet wird und letztere somit nicht blockiert werden musste. Zudem hat sich durch Ansetzen von FCS in BSA 0,1% statt in PBS und durch Verlängerung der Inkubationsdauer für diesen Schritt auf 1,5 Stunden die Hintergrundfärbung weiter reduzieren lassen. Als erster Primärantikörper wurde P21 (Verdünnung, Inkubationsdauer und –temperatur siehe Tabelle 1) aufgebracht. In den Testreihen hatte sich diese Reihenfolge der beiden Primärantikörper bewährt, da bei umgekehrtem Vorgehen das Substrat von P21 (NBT) die bereits stattgefundenen Anfärbung von P53 (mittels Neu-Fuchsin) überdeckt hatte. Nach Ende der Inkubationsdauer wurden die Schnitte in TRIS gespült (Zusatz von Brij-Detergens reduzierte auch hier die Oberflächenspannung und erleichterte das Auftragen der Detektionsreagentien). Nun erfolgte der alternierende Auftrag von Brücken-Antikörper und APAAP-Komplex (beide in TRIS angesetzt). Als optimal erwies sich ein dreifacher Durchgang mit jeweils absteigender Inkubationsdauer (Tabelle 2).

Reagenz	Verdünnung	Dauer 1.Schritt (Minuten, RT)	Dauer 2.Schritt (Minuten, RT)	Dauer 3.Schritt (Minuten, RT)
Brücken-Ak	1:150	30	20	10
APAAP-Komplex	1:100	30	20	10

Tabelle 2 Detektion von P21 im Rahmen der APAAP-Methode.

Im Anschluss wurden die Präparate in der feuchten Kammer direkt mit NBT (NBT substrate, ready-to-use, Fa Dako, ca. 5 Tropfen/Schnitt) beschickt und im Dunkeln 25 Minuten inkubiert. Lichteinfall hätte bei diesem Substrat eine Farbreaktion verhindert. Mikroskopische Kontrollen sicherten ein ausreichendes Farbergebnis. War dieses erreicht, wurden die Schnitte 10 Minuten in TRIS-Puffer gespült, dann 10 Minuten in TRIS pH 4,7 – 4,9 eingestellt. Durch den sauren pH liessen sich unspezifisch gebundene und ungefärbte Antikörper eliminieren. Nach einer 45 minütigen Inkubation mit FCS in BSA 0,1% konnte P53 als zweiter Primärantikörper aufgebracht werden (Verdünnung, Inkubationsdauer und –temperatur siehe Tabelle 1). Nach Spülen mit TRIS bzw. TRIS+Brij erfolgte die Detektion analog der von P21, allerdings mussten Brücken-Antikörper und APAAP-Komplex für das hier verwendete weniger sensitive Substrat Neu-Fuchsin geringer verdünnt werden (Tabelle 3).

Reagens	Verdünnung	Dauer 1.Schritt (Minuten, RT)	Dauer 2.Schritt (Minuten, RT)	Dauer 3.Schritt (Minuten, RT)
Brücken-Ak	1:75	30	20	10
APAAP-Komplex	1:50	30	20	10

Tabelle 3 Detektion von P53 im Rahmen der APAAP-Methode.

Nach Spülen in TRIS-Puffer wurden pro Schnitt 200µl Neu-Fuchsin (Fuchsin-substrate-chromogen system, Fa. Dako, jew. 1 Tropfen Substrat zusammen 1 Minute ansetzen, dann 600 µl Fuchsinpuffer dazugeben und umgehend verwenden) aufgebracht und mikroskopisch kontrolliert, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war. Dann wurden die Schnitte wie oben beschrieben gewässert und mit Gelatine eingedeckt. Eine Gegenfärbung mit Hämalaun ist bei einer Doppelfärbung nicht nötig, da es durch die multiplen Reaktionsschritte neben einer leichten unvermeidlichen Hintergrundfärbung auch zu einer leichten Anfärbung der an sich antikörpernegativen Kerne kommt.

3.3 In-situ-NICK-Translation

Den für die Apoptose charakteristischen Zerfall der DNA in Einzel- und Doppelstrangfragmente macht man sich bei der in-situ-NICK-Translation zunutze. Durch enzymatische Ankopplung von markierten Nukleotiden an freie 3`-OH-Enden der DNA-Fragmente durch DNA-Polymerase können diese Strangbrüche („nicks“) ortstypisch markiert und lichtmikroskopisch identifiziert werden. Die DNA-Polymerase I besteht aus 928 Aminosäuren und setzt sich aus drei verschiedenen funktionellen Domänen mit enzymatischer Aktivität zusammen: dem carboxyterminalen Bereich mit DNA-

Polymerase-Funktion, einer 3'-5'-Exonuclease im mittleren Bereich und einer 5'-3'-Exonuclease im aminoterminalen Abschnitt. Durch Behandlung mit Protease (Trypsin) lässt sich die 5'-3'-Exonuclease abspalten. Das grössere Fragment enthält die DNA-Polymerase und die 3'-5'-Exonuclease und wird nach dem Entdecker der Protease-Reaktion als Klenow-Fragment bezeichnet. Während die DNA-Polymerase monomere Deoxynucleotidphosphate zu Polynucleotidketten verknüpft, erkennt und entfernt die 3'-5'-Exonuclease nicht komplementäre Nucleotide aus der DNA (Korrekturlesefunktion). In einem neuen Syntheseschritt können nun passende Nucleotide durch die DNA-Polymerase eingebaut werden. Die 5'-3'-Exonuclease arbeitet in umgekehrter Richtung. Sie spaltet ausschliesslich von komplett doppelsträngiger DNA vom 5'-Ende her einzelne Nucleotide oder kurze Oligonucleotide ab und trägt somit zur Reparatur geschädigter DNA bei. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass Bakterienmutanten mit Polymerasen ohne 5'-3'-Exonuclease-Aktivität deutlich empfindlicher gegenüber mutagenen Faktoren wie ultravioletter Strahlung, Röntgenstrahlen oder Chemikalien sind. Die bei einer Nick-Translation verwendete DNA-Polymerase katalysiert die Anlagerung von komplementären Nucleotiden in Einzelstrangbrüche von Doppelstrang-DNA, wenn der andere DNA-Strang intakt als Matritze vorliegt (Abbildung 2).

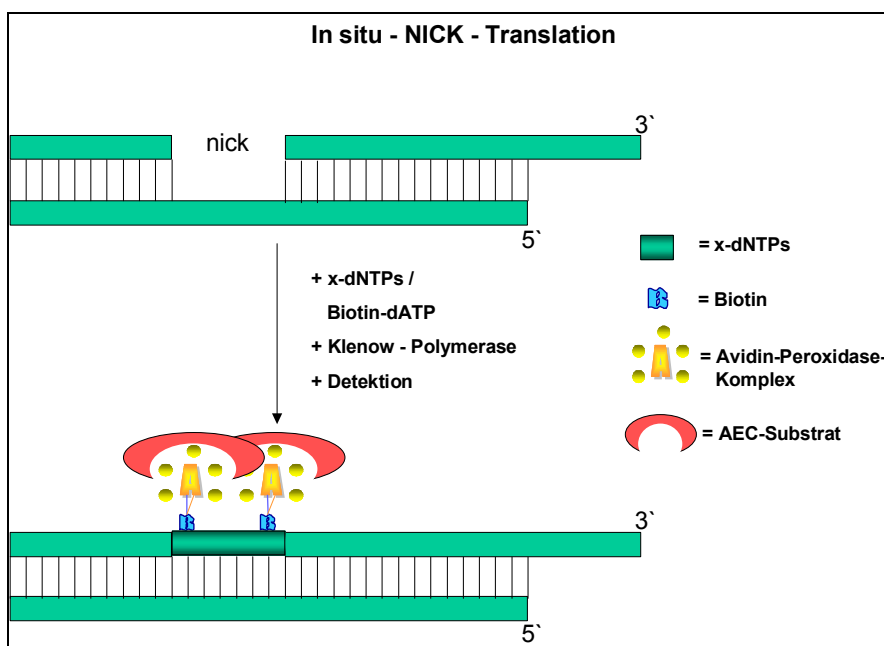


Abbildung 2 In-situ-NICK-Translation (<I.Wiest)

Wie bei den immunhistochemischen Methoden wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Durch enzymatische Vorbehandlung mit Proteinase K (40µl 0255 Proteinase K ad 50ml PBS über 15 Minuten bei Raumtemperatur) wurde die Plasmamembran permeabilisiert. Dies erlaubte den in den folgenden Reaktionsschritten benötigten

exogenen Enzymen ein Eindringen in die Zelle. Daran anschliessend wurden die Schnitte für 10 Minuten in 3% H₂O₂ zur Blockade der endogenen Peroxidase eingestellt. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten musste jeweils gründlich mit Aqua dest. gespült werden. Die bei der NICK-Translation verwendete Klenow-Polymerase bedarf eines bestimmten Salzmilieus, das durch 10 minütige Inkubation mit 1x NICK-Puffer (10x NICK-Puffer, Rezept im Anhang) erreicht wurde. Für die eigentliche NICK-Translation wurde ein Reaktionsgemisch hergestellt aus drei verschiedenen Deoxynucleosid-Triphosphaten (dNTPs: dGTP, dCTP, dTTP), biotinyliertem deoxy-Adenosin-Triphosphat (dATP), NICK-Puffer, A.dest und Klenow-Polymerase (Rezept im Anhang). Jedes Präparat wurde nach Abkippen des NICK-Puffers mit 40µl dieser Lösung in der feuchten Kammer beschickt und bei 37°C für 65 Minuten inkubiert. Hierbei lagerten sich unmarkierte dNTPs (dGTP, dCTP, dTTP) wie auch markiertes dATP in Strangbrüche an ihre jeweiligen Basenpartner der intakten Einzelstrang-DNA an und wurden durch DNA- (Klenow-) Polymerase zu einem komplementären zweiten DNA-Strang verbunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde diese Reaktion durch 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Terminationspuffer (Rezept im Anhang) gestoppt. Mittels FCS 1% (in PBS) wurden unspezifische Bindungsstellen abgedeckt (10 Minuten bei RT). Zur Detektion wurden die Schnitte mit Extravidinperoxidase (Avidin-Peroxidase-Komplex, Rezept im Anhang) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit PBS-Puffer ein neutrales Milieu hergestellt. Die Visualisation erfolgte hier mit DAB-Substrat (Sigma, D4293), das durch Peroxidase in einen rotbraunen Farbstoff überführt wird. Diese Reaktion wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach ausreichender Anfärbung wurden die Präparate fließend gewässert. Die Gegenfärbung nichtapoptotischer Kerne durch Methylgrün erforderte eine Senkung des pH-Milieus mittels Acetatpuffer 0,1M in den sauren Bereich (pH 4,0). Um ein Lösen der Farbkomplexe zu vermeiden, wurden die Präparate bei dieser Methode dehydriert (2x N-Butanol, dann 2x Xylol, jeweils ca.5 Minuten) und mit Eukitt als lipophilem Medium eingedeckt.

3.4 Kontrollversuche und Auswertung der Präparate

3.4.1 Auswertung der Apoptose-Färbung

In Anlehnung an Arbeiten von Welkoborsky H.J. et.al. (1995) wurden von jedem Präparat jeweils zehn High-Power-Fields eines Tumors ohne Kenntnis der klinischen und pathologischen Parameter ausgewertet. Am Lichtmikroskop (Fa. Zeiss) wurden in 10facher Vergrößerung die Apoptosezellen pro Blickfeld ausgezählt und in Relation zur Anzahl

nichtapoptotischer Zellkerne in diesem Areal gesetzt. Von jedem Präparat wurden zehn für den Tumor representative Bereiche ausgewertet. Für die statistische Auswertung wurde aus den erhaltenen Werten für jedes Präparat ein Mittelwert gebildet und in Prozent angegeben.

3.4.2 Auswertung der immunhistochemischen Darstellung von P21

Die Auswertung am Lichtmikroskop erfolgte zweifach doppelblind nach einem einheitlichen Beurteilungsschema. In semiquantitativer Auszählung wurden die Präparate gemäss der Häufigkeit ihrer positiven Tumorzellkerne vier verschiedenen Gruppen zugeordnet, wie in Tabelle 4 gezeigt wird.

(+)	eingeschränkt positiv	vereinzelt positive Kerne	
+	einfach positiv	wenig positive Kerne oder Tumorareale /-nester mit wenigen positiven Kernen	(≤ 15%)
++	zweifach positiv	häufig positive Kerne	(≤ 40%)
+++	dreifach positiv	grosse Anzahl positiver Kerne	(≥ 40%)

Tabelle 4 Auswertung der immunhistochemischen Darstellung der Expression von P21 und P27 in der Einzelfärbung.

Unabhängig von der Intensität der Anfärbung wurde jede immunreaktive Zelle als positiv gewertet.

Bedingt durch die grosse Inhomogenität der P21-Expression erscheint eine grobe Unterteilung in normale und aberrante Expression, wie sie von anderen Autoren vorgenommen wird, nicht sinnvoll (El-Deiry W.S. et al. 1995). In unsere Auswertung ging von jedem Protein die jeweils semiquantitativ ermittelte Expression ein. Im Zweifelsfall wurden die Präparate der jeweils niedrigeren Gruppe zugeordnet. In der statistischen Auswertung liessen sich die Gruppe von Tumoren, die nur vereinzelt P21-positive Zellen aufwiesen, zu der Gruppe P21-negativer Tumoren rechnen, ohne daraus Abweichungen vom Ergebniss zu riskieren.

Neben der oben aufgeführten Quantität der Anfärbung wurde ihre Qualität (Intensität) dokumentiert, die Verteilung positiver Kerne auf das Tumorareal insgesamt (Homogenität im Tumor), die Stärke der Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe sowie Besonderheiten der einzelnen Schnitte. Ausserdem wurde die Reaktivität von Zellen in normalem und in dysplastischem Epithel, soweit im Präparat vorhanden, erfasst.

Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Kolonkarzinomgewebe diente als externe Positivkontrolle für P21. Als Negativkontrolle wurde auch hier der Primärantikörper durch Non-Immune-Serum der Maus ersetzt.

3.4.3 Auswertung der immunhistochemischen Darstellung von P27

Die Expression von P27 wurde nach dem für P21 dargestellten Schema beurteilt (Tabelle 4). Insgesamt war die Reaktivität der Tumorzellen für P27 geringer ausgeprägt als die für P21.

Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Mammakarzinomgewebe lief als Positivkontrolle bei der immunhistochemischen Darstellung von P27 mit. Als Negativkontrolle wurde auch hier der Primärantikörper durch Non-Immune-Serum der Maus ersetzt. Als interne Positivkontrolle für den P27-Antikörper dienten Lymphozyten und Plasmazellen, die bekanntermassen P27-Protein exprimieren (Ciaparrone M. et al. 1998).

3.4.4 Auswertung der immunhistochemischen Doppelfärbung von P21 und P53

Für die semiquantitative Auswertung der P21- und P53-Proteine legten wir der Unterteilung der Quantität in Gruppen die in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführten Abstufungen zugrunde:

P53

(+)/+	einfach positiv	moderater Anteil P53-positiver Tumorzellen	(< 50%)
++	zweifach positiv	starke P53-Expression	(50-70%)
+++	dreifach positiv	die meisten Tumorzellen exprimieren P53	(> 70%)

Tabelle 5 Auswertung der immunhistochemischen Darstellung der Expression von P53.

P21

(+)/+	einfach positiv	Vereinzelt P21-positive Zellkerne	(< 20%)
++	zweifach positiv	Mittelstarke P21-Expression	(20-60%)
+++	dreifach positiv	ein Grossteil der Tumorzellen ist positiv für P21	(> 60%)

Tabelle 6 Auswertung der immunhistochemischen Darstellung der Expression von P21 in der Doppelfärbung.

3.5 Statistische Analyse der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels SPSS Version 11.5.

Die Analyse der Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der immunhistochemischen Expression der Proteine P21, P27 und P53 bzw. von der Apoptoserate erfolgte univariat mit der Methode nach Kaplan-Meier (Kaplan E.L. et al. 1958). Die Überlebenszeit (Time) wurde definiert als Zeitspanne in Wochen ab dem Therapiebeginn bis zum Eintritt des ersten onkologischen Ereignisses, sprich eines Rezidivs (Recurrence), einer Lymphknoten- oder Fernmetastase (Metastasis) oder eines Zweitkarzinoms (Secondary Ca), bzw. bis zum Ende der Beobachtungszeit (Censoring, Stichtag: 15.9.99) oder bis zum Tod (Time_D).

Bei der Analyse von P21 und der Primärlokalisation war es aufgrund der Fallzahlen notwendig, Patienten mit Tumoren in benachbarten anatomischen Regionen zusammenzufassen, wie zum Beispiel Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome, obwohl bekannt ist, dass Unterschiede im biologischen Verhalten bestehen.

Der Test auf Unterschiede wurde mit dem Log-rank-Test durchgeführt.

Regressionsanalysen (Proportional Hazard Modell von Cox, Cox D. 1972) wurden verwendet, um festzustellen, welche Faktoren alleine oder in Kombination das Gesamtüberleben beeinflussten.

Der optimale Cutt-off wurde mit der CART-Methode (Classification and Regression Trees) ermittelt (Breimann L. et al. 1984).

Mit Chi-Square-Tests wurden die einzelnen experimentell ermittelten Faktoren auf ihre Korrelation hin untersucht.

Als Rangkorrelationskoeffizient wurde Spearmans rho verwendet. Als statistisch signifikant wurden nur Ergebnisse betrachtet, die eine Signifikanzgrenze von 5% aufwiesen ($p \leq 0,05$). Bei einem Korrelationskoeffizienten $5\% < p < 10\%$ sprachen wir von einer Tendenz. Die Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Apoptose

Es wurden Plattenepithelkarzinome von 92 Patienten auf ihre Apoptoserate untersucht. In 11 Tumoren (11,96%) liessen sich keine Apoptosezellen visualisieren. In den übrigen Präparaten waren insgesamt wenig apoptotische Zellen detektierbar. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen an den Tumorzellen insgesamt reichte von 0,05% bis zu einem Maximum von 3,11% in einem Fall.

Die Verteilung innerhalb der Präparate war sehr inhomogen. Apoptosezellen stellten sich vereinzelt, in Gruppen oder flächig über einzelne Tumoreale verteilt dar.

Unterteilte man die Apoptoserate in Quartile oder nahm man den Medianwert als cut-off, liess sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Apoptoserate und der Überlebenszeit der Patienten herstellen. Mit einem nach der CART-Methode ermittelten optimalen cut-off von 0,55% ergab sich unabhängig von der Primärlokalisierung folgende Verteilung: 20 Tumoren hatten eine Apoptoserate $<0,55\%$, 61 Präparate $\geq 0,55\%$. Patienten mit einer Apoptoserate $<0,55\%$ hatten insgesamt eine bessere Überlebenszeit. Auch kam es weniger häufig zu onkologischen Ereignissen. Eine niedrige Apoptoserate war auf einem statistisch signifikanten Level mit einer besseren Überlebenszeit verbunden ($p=0.04$). Die Apoptoserate in Abhängigkeit von der Überlebenszeit zeigen Tabelle 7 und Abbildung 3.

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
Apoptoserate	$<0,55\%$	20	3	17	85
	$\geq 0,55\%$	61	26	35	57,38
Total		81	29	52	64,2

Tabelle 7 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von dem prozentualen Anteil der Apoptosezellen an den Tumorzellen insgesamt.

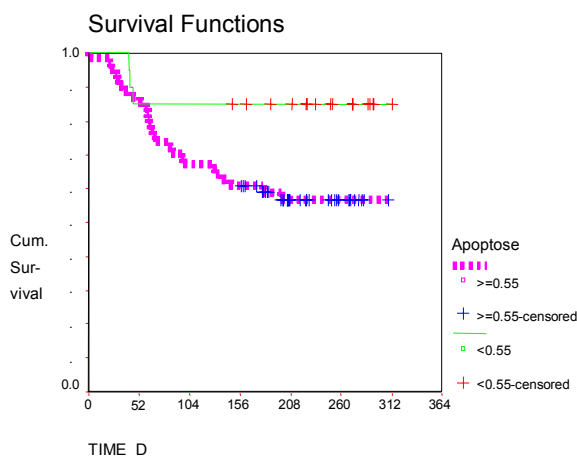


Abbildung 3 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Apoptoserate

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Apoptoserate und der Expression der Proteine P21 (Tabelle 8 und Abbildung 4), P27 (Tabelle 9 und Abbildung 5) und P53 (Tabelle 10 und Abbildung 6) bestand nicht.

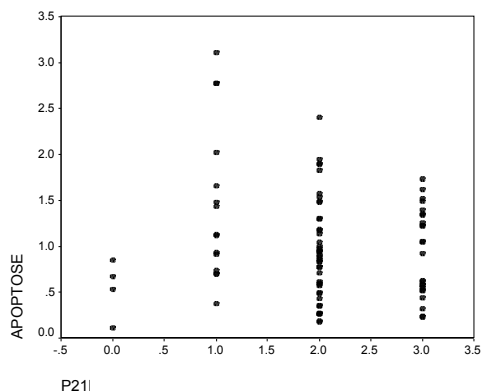


Abbildung 4 Apoptose und P21

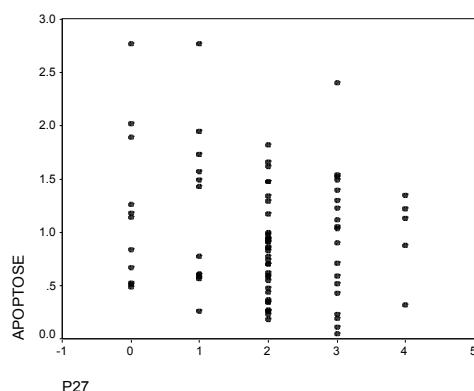


Abbildung 5 Apoptose und P27

			Apoptose	P21
Spearman`s rho	Apoptose	Correlation Coefficient	1000	-0,075
		Sig. (2-tailed)		0,491
		n	87	86
P21	Apoptose	Correlation Coefficient	-0,075	1000
		Sig. (2-tailed)	0,491	
		n	86	96

Tabelle 8 Zwischen der Apoptoserate und der P21-Expression besteht keine statistisch signifikante Korrelation ($p=0,5$).

			Apoptose	P27
Spearman`s rho	Apoptose	Correlation Coefficient	1000	-0,101
		Sig. (2-tailed)		0,365
		n	87	83
P27	Apoptose	Correlation Coefficient	-0,101	1000
		Sig. (2-tailed)	0,365	
		n	83	94

Tabelle 9 Zwischen der Apoptoserate und der P27-Expression besteht keine statistisch signifikante Korrelation ($p=0,4$).

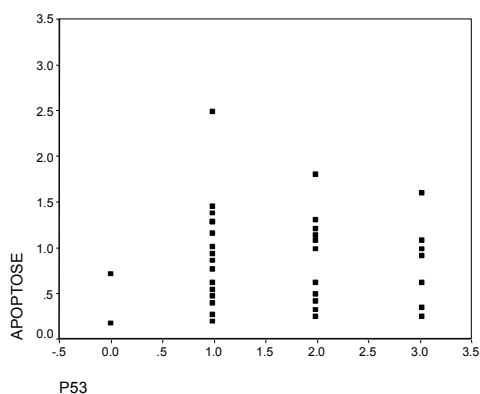


Abbildung 6 Apoptose und P53

			Apoptose	P53
Spearman`s rho	Apoptose	Correlation Coefficient	1000	0,029
		Sig. (2-tailed)		0,858
		n	87	40
P53	P53	Correlation Coefficient	0,029	1000
		Sig. (2-tailed)	0,858	
		n	40	42

Tabelle 10 Zwischen der Apoptoserate und der P53-Expression besteht keine statistisch signifikante Korrelation ($p=0,9$).

4.2 P21

An Plattenepithelkarzinomen von insgesamt 94 Patienten untersuchten wir die Expression von P21. Die Anzahl P21-positiver Zellkerne war bei weitem grösser als die Anzahl apoptotischer Zellen. Vier Tumoren (4,3%) waren P21-negativ. In 16 Präparaten (17%) konnten wir vereinzelt P21-positive Zellkerne nachweisen. Tumorareale mit wenig positiven Kernen ($\leq 15\%$) fanden wir in knapp der Hälfte des Kollektivs, nämlich in 48 Fällen (51,1%). In 25 Karzinomen (26,6%) war P21 häufig detektierbar, d.h. der prozentuale Anteil P21-positiver Zellen an der Gesamtheit der Tumorzellen betrug bis zu 40%. In lediglich einem Präparat (1%) fiel eine massive P21-Expression mit weit mehr als 40% P21-positiven Zellen auf. Die Häufigkeitsverteilung der P21-Expression veranschaulicht Abbildung 7.

Im gesunden Gewebe exprimierten v.a. intermediäre Epithelschichten wie das Stratum spinosum P21. In oberflächlichen oder basalen Zellschichten waren kaum P21-positive Zellen nachweisbar. Auch in Plattenepithelkarzinomen mit z.T. noch erhaltenem Aufbau waren P21-positive Zellen tendenziell eher in suprabasal gelegenen Zellschichten nachweisbar. Insgesamt war die P21-Verteilung in den Tumoren aber heterogen.

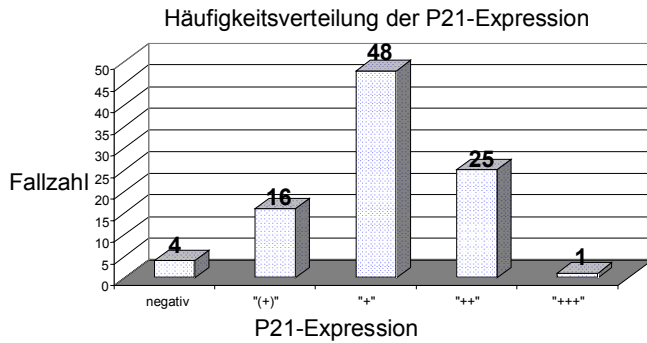


Abbildung 7

Die P21-Expression der Tumoren wurde mit der Überlebenszeit sowie mit der Apoptoserate und der Expression der Proteine P27 und P53 korreliert. Dabei liess sich die Gruppe mit vereinzelt positiven Zellen zu

der Gruppe negativer Tumoren rechnen, ohne Abweichungen bei der statistischen Auswertung zu riskieren.

Betrachtete man den Zusammenhang zwischen der P21-Expression und der Überlebenszeit am Gesamtkollektiv (n=94), so ging mit steigender P21-Expression tendenziell eine bessere Überlebenszeit einher. Dieser Zusammenhang war jedoch nicht statistisch signifikant (p=0,55; Tabelle 11 und Abbildung 8).

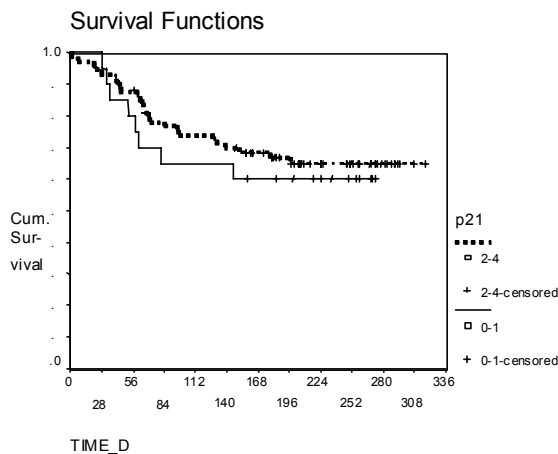


Abbildung 8 Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und P21

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
P21	0-1	20	8	12	60,00
	2-4	74	25	49	66,22
Total		94	33	61	64,89

Tabelle 11 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der P21-Expression (p=0,55).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der P21-Expression und der Überlebenszeit ergab sich erst mit zusätzlicher Betrachtung der Primärlokalisation. Die Überlebenszeit von Patienten mit Kehlkopftumoren war unabhängig von weiteren

Parametern besser als die von Patienten mit Tumoren der übrigen Lokalisationen (Abbildung 9). Nach Ausschluss von Larynxkarzinomen war die Expression von P21 bei dem Kollektiv von Patienten mit Tumoren aus Mundhöhle, Oro- und Hypopharynx auf einem statistisch signifikanten Level mit der Überlebenszeit korreliert ($p=0,0004$; Abbildung 10 und Tabelle 12).

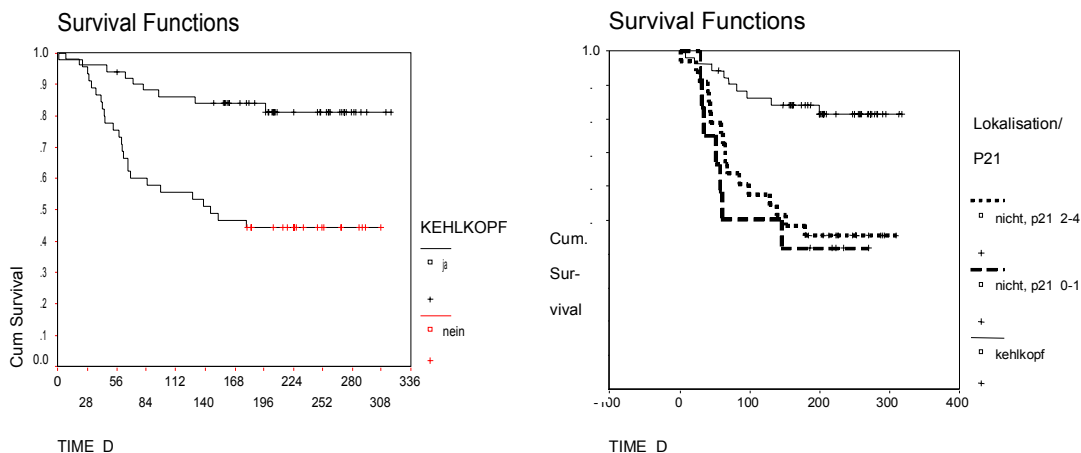


Abbildung 9 Gesamtüberleben und Primärlokalisierung Larynx

Abbildung 10 Gesamtüberleben und P21-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
Kehlkopf (KK)		51	9	42	82,35
nicht KK	P21 0-1	12	7	5	41,67
nicht KK	P21 2-4	33	18	15	45,45
Total		96	34	62	64,58

Tabelle 12 Statistisch positive Korrelation der P21-Expression mit der Überlebenszeit von Patienten mit Karzinomen aus den Bereichen Mundhöhle, Oro- und Hypopharynx ($p=0,0004$).

Wie bereits oben erwähnt, war die P21-Expression unabhängig von der Apotoserate. Zwischen diesen beiden Parametern liess sich keine Korrelation nachweisen (Tabelle 8 und Abbildung 4).

Den Zusammenhang zwischen der Expression von P21 und der von P27 zeigen Tabelle 13 und Abbildung 11. Tendenziell waren mit steigender P21-Expression mehr P27-positive Zellen detektierbar. Die positive Korrelation war statistisch signifikant, aber nicht eng ($p=0,06$).

Die Expression von P21 und P53 visualisierten wir in einer Doppelfärbung und untersuchten den Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen. Hier konnten wir eine positive Korrelation herstellen. Der Zusammenhang war nicht eng, aber statistisch signifikant ($p=0,02$; vergleiche Tabelle 14 und Abbildung 12).

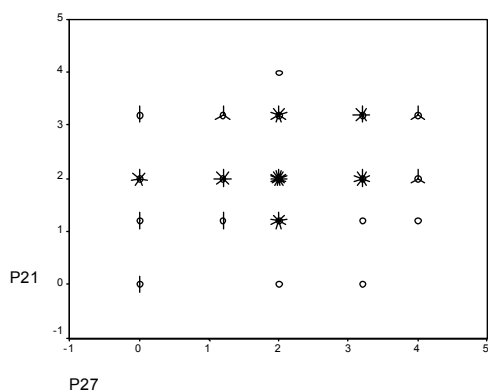


Abbildung 11 P21 und P27

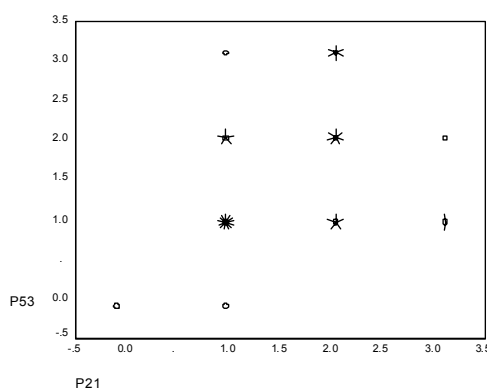


Abbildung 12 P21 und P53

			P27	P21
Spearman`s rho	P27	Correlation Coefficient	1000	0,196
		Sig. (2-tailed)		0,061
		n	94	92
	P21	Correlation Coefficient	0,196	1000
		Sig. (2-tailed)	0,061	
		n	92	96

Tabelle 13 Zwischen der Expression der Proteine P21 und P27 besteht tendenziell eine positive Korrelation (p=0,06).

			P53	P21
Spearman`s rho	P53	Correlation Coefficient	1000	0,395
		Sig. (2-tailed)		0,019
		n	42	40
	P21	Correlation Coefficient	0,395	1000
		Sig. (2-tailed)	0,019	
		n	40	92

Tabelle 14 Zwischen der Expression der Proteine P21 und P53 besteht eine statistisch signifikante Korrelation (p=0,02).

4.3 P27

Die Expression von P27 wurde an Plattenepithelkarzinomen von 85 Patienten untersucht. Bei der Auswertung der Präparate fiel auf, dass die Expression von P27 insgesamt geringer als die von P21 war. An 13 Tumoren (15,3%) liess sich kein P27-Protein nachweisen. In 11 Präparaten (12,9%) waren nur vereinzelt P27-positive Zellkerne darstellbar. Tumoreareale mit wenig positiven Kernen ($\leq 15\%$) fanden wir in 36 Fällen (42,4%). Eine häufige P27-Expression zeigten 18 Karzinome (21,2%). Hier waren bis zu 40% der

Tumorzellen P27-positiv. Zu einer starken P27-Expression mit mehr als 40% P27-positiven Zellen kam es bei sieben Präparaten (8,2%).

Damit bildeten Tumoren, die wenig P27-exprimierende Zellen aufwiesen („einfach positiv“), mit 36 Präparaten ähnlich der Häufigkeitsverteilung von P21 die grösste Gruppe. Die restlichen Präparate (n=49) waren relativ homogen auf die übrigen P27-Gruppen verteilt. Die Häufigkeitsverteilung der P27-Expression veranschaulicht Abbildung 13.

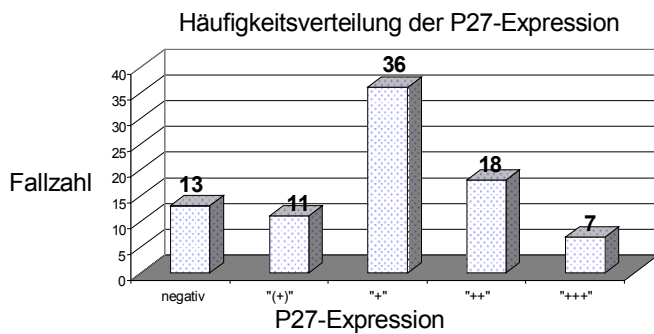


Abbildung 13

Die Lokalisation P27-exprimierender Zellen in normalem Epithel entsprach in etwa der Verteilung von P21, wobei sich P27 tendenziell in oberflächlicheren Epithelschichten darstellte. In den Tumoren imponierte eine uneinheitliche P27-Expression.

Die Überlebenszeit des Gesamtkollektiv war unabhängig von der P27-Expression. Bei der Analyse der Ergebnisse liessen sich weder ein statistisch signifikanter Zusammenhang noch eine Tendenz ableiten, wie Tabelle 15 und Abbildung 14 zeigen (p=0,96).

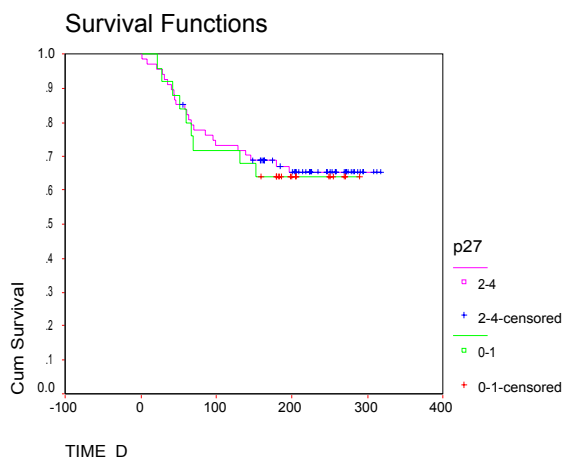


Abbildung 14 Gesamtüberleben und P27

Auch bei der Betrachtung der P27-Expression im Hinblick auf die Apoptoserate (Tabelle 9; Abbildung 5) und die P53-Expression (Tabelle 16; Abbildung 15) ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den jeweiligen Parametern.

Jedoch zeichnete sich tendenziell eine positive Korrelation zu der Expression von P21 ab, wie schon auf bei den Erläuterungen zu P21 erwähnt wurde (Tabelle 13; Abbildung 11).

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
P27	negativ	13	4	9	69,23
	1	11	4	7	63,64
	2	36	11	25	69,44
	3	18	7	11	61,11
	4	7	2	5	71,43
Total		85	28	57	67,06

Tabelle 15 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der P27-Expression (p=0,96).

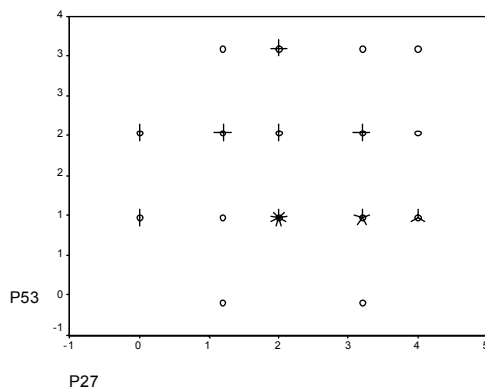


Abbildung 15 P53 und P27

			P27	P53
Spearman's rho	P27	Correlation Coefficient	1000	-0,077
		Sig. (2-tailed)		0,629
		n	94	42
	P53	Correlation Coefficient	-0,077	1000
		Sig. (2-tailed)	0,629	
		n	42	42

Tabelle 16 Zwischen der Expression der Proteine P27 und P53 lässt sich auf statistischer Ebene kein Zusammenhang herstellen (p=0,63).

4.4 P53

Die P53-Expression wurde mittels einer Doppelfärbung mit P21 an Plattenepithelkarzinomen von 42 Patienten visualisiert. In zwei Präparaten (4,76%) liess sich kein P53-Protein nachweisen. Eine geringe P53-Expression fanden wir bei 20 Karzinomen (47,62%), d.h. hier waren weniger als 50% der Tumorzellen positiv für P53.

Zwischen 50-70% P53-positive Zellen zeigten 13 Tumoren (30,95%). In sieben Fällen (16,67%) exprimierten über 70% der Tumorzellen P53. Die Häufigkeitsverteilung der P53-Expression ist in Abbildung 16 dargestellt.

In basal lokalisierten Schichten von gesundem Epithel waren wenig P53-positive Zellen nachweisbar. Die P53-Expression nahm mit zunehmender Dedifferenzierung des Gewebes zu. In Karzinomen variierte die Verteilung von P53 sowohl innerhalb der einzelnen Tumorbereiche als auch zwischen den verschiedenen Präparaten.

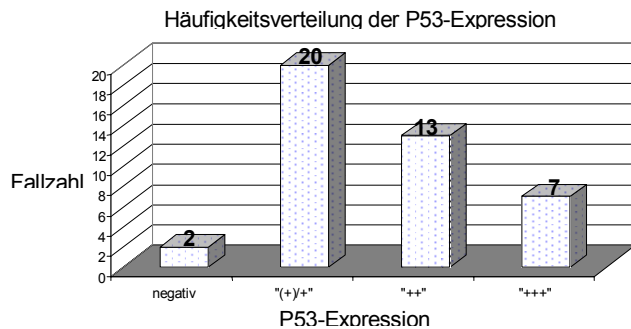


Abbildung 16

Der Vergleich der P53-Expression mit der Überlebenszeit aller Patienten ergab keinen statistisch signifikanten Zusammenhang ($p=0,12$; Tabelle 17 und Abbildung 17). Auch nach Unterteilung des Kollektivs in Patienten mit Kehlkopftumoren

und Patienten mit Tumoren der übrigen Lokalisationen brachte die P53-Expression keine prognostischen Hinweise.

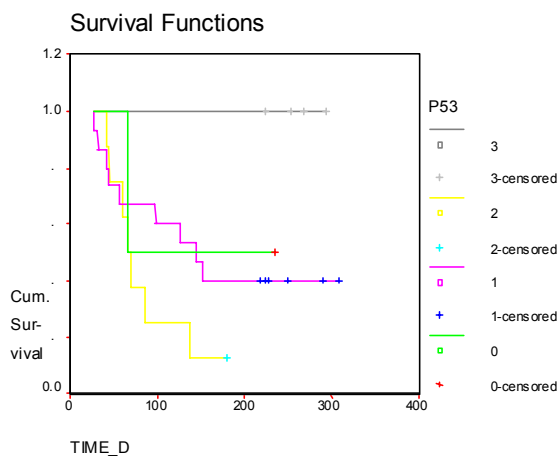


Abbildung 17
Gesamtüberleben und P53

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
P53	negativ	2	1	1	50,00
	1	20	9	11	55,00
	2	13	8	5	38,46
	3	7	0	7	100,00
Total		42	18	24	57,14

Tabelle 17 Das Gesamtüberleben zeigt keine Abhängigkeit von der P53-Expression ($p=0,12$).

Ein statistischer Zusammenhang zwischen der P53-Expression und der Apoptoserate (Tabelle 10; Abbildung 6) bzw. der Expression von P27 (Tabelle 16; Abbildung 15) war nicht gegeben. Lediglich mit der P21-Expression bestand eine positive Korrelation, die bereits im Ergebnisteil von P21 erwähnt wurde (Tabelle 14; Abbildung 12).

4.5 Klinische Patientendaten

Von insgesamt 88 Patienten lagen uns nicht nur alle klinischen Daten, sondern auch vollständige Ergebnisse der experimentell untersuchten Parameter vor.

In der univariaten Analyse waren Therapieform, Status (Progression), Primärlokalisierung, T- und N-Stadium signifikant mit der Überlebenszeit korreliert. Demgegenüber spielten Alter und Geschlecht der Patienten für die Überlebenszeit keine Rolle.

Gesamtüberleben

Die Mindestdauer der Beobachtung betrug 148 Wochen. Bei einer Beobachtungszeit von 148 Wochen überlebten 75% der Patienten 96 Wochen (Standard Error 33%). Nach 312 Wochen kam es bei 30 Patienten (34,1%) zu einem onkologischen Ereignis. 58 Patienten (65,9%) wurden lediglich beobachtet (Abbildung 18).

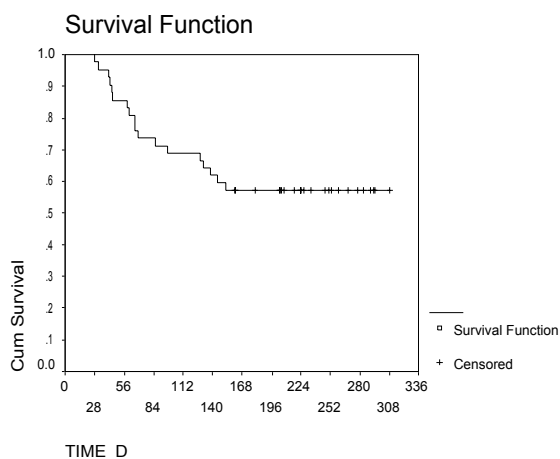


Abbildung 18
Gesamtüberleben

Therapieform

Die 27 Patienten, welche nur operiert und keiner adjuvanten Radiatio zugeführt wurden, hatten eine bessere Prognose als die 61 Patienten, welche postoperativ bestrahlt wurden ($p=0,0007$; Abbildung 19). Auch kam es in der Gruppe ohne adjuvante Strahlentherapie bei nur zwei Fällen (7,41%) zu einem onkologischen Ereignis (Tabelle 18).

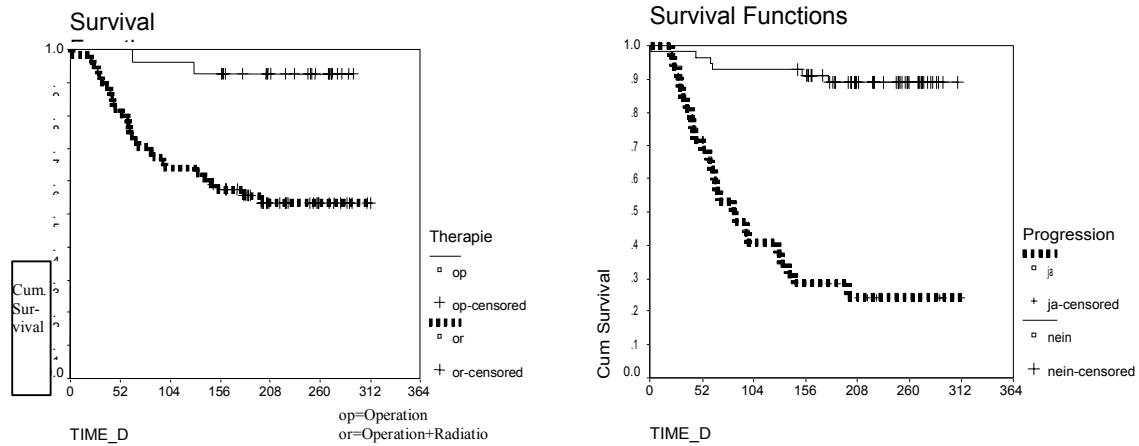


Abbildung 19 Gesamtüberleben und Therapieform; Abbildung 20 Gesamtüberleben und Progression

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
Therapie	Operation +Radiatio	61	28	33	54,10
	Operation	27	2	25	92,59
Total		88	30	58	65,91

Tabelle 18 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Therapieform

Progression

Erwartungsgemäss hatten 56 Patienten, bei denen es nicht zu einer Progression der Krebserkrankung kam, eine deutlich bessere Prognose als 32 Patienten mit fortschreitendem Tumorleiden ($p \leq 0,0001$; Tabelle 19; Abbildung 20).

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
Progression	nein	56	6	50	89,29
	ja	32	24	8	25,00
Total		88	30	58	65,91

Tabelle 19 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von einer Tumorprogression

Primärlokalisierung

In Abhängigkeit von der Lokalisation der Primärtumoren bestanden statistisch signifikante Unterschiede in der Gesamtüberlebenszeit ($p \leq 0,0001$). Patienten mit Larynxkarzinomen hatten die höchste Überlebenszeit (Abbildung 9; Tabelle 20). Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen hatten eine bessere Prognose als Patienten mit Tumoren des Oro- und Hypopharynx, welche keine grossen Unterschiede der Überlebenszeiten aufwiesen.

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
Lokalisation	Mundhöhle	7	3	4	57,14
	Oropharynx	19	12	7	36,84
	Hypopharynx	16	9	7	43,75
	Larynx	46	6	40	86,96
Total		88	30	58	65,91

Tabelle 20 Primärlokalisierung und Gesamtüberleben

T- und N-Stadium

Mit zunehmender Tumorausdehnung (T-Stadium 1-4) verschlechterte sich die Überlebenszeit der Patienten statistisch signifikant ($p=0,01$; Tabelle 21; Abbildung 21).

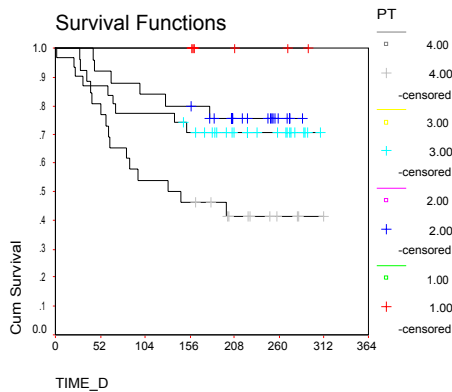


Abbildung 21 Gesamtüberleben und T-Stadium

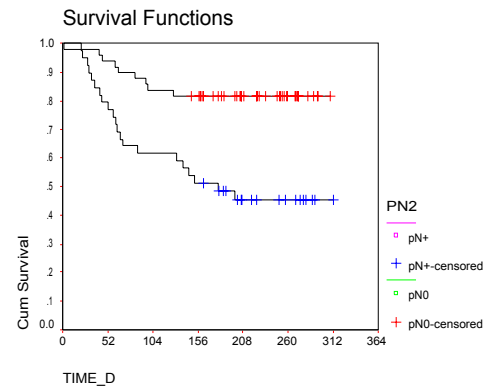


Abbildung 22 Gesamtüberleben und N-Stadium

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
T-Stadium	1	6	0	6	100,00
	2	25	6	19	76,00
	3	31	9	22	70,97
	4	26	15	11	42,31
Total		88	30	58	65,91

Tabelle 21 Gesamtüberleben und T-Stadium

Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) hatten eine bessere Überlebenszeit als Patienten mit Lymphknotenmetastasen (pN+). Dieses Ergebnis war statistisch signifikant ($p=0.0005$; Tabelle 22; Abbildung 22).

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
Lymphknotenfiliae	nein	49	9	40	81,63
	ja	39	21	18	46,15
Total		88	30	58	65,91

Tabelle 22 Befall lokaler Lymphknoten und Prognose

Alter

Teilte man das Alter der Patienten in Quartile, bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit der Patienten ($p=0,51$; Tabelle 23).

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
Alter in Jahren	<49	24	8	16	66,67
	49-<56	27	12	15	55,56
	56-<60	17	5	12	70,59
	≥ 60	20	5	15	75,00
Total		88	30	58	65,91

Tabelle 23 Alter und Überlebenszeit

Geschlecht

Bei einem deutlichen Ungleichgewicht zugunsten der männlichen Patienten ($n=80$) liess sich kein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Überlebenszeit nachweisen ($p=0,18$; Tabelle 24). Tendenziell hatten Frauen eine bessere Prognose.

		Total	Anzahl Ereignis	Anzahl Censored	Prozent Censored
Geschlecht	männlich	80	29	51	63,75
	weiblich	8	1	7	87,50
Total		88	30	58	65,91

Tabelle 24 Geschlecht und Überlebenszeit

Fazit

In der multivariaten Analyse (Cox Regression) blieben nach Prüfung aller Variablen lediglich der pN-Status und die Primärlokalisierung der Tumoren die einzigen unabhängigen Faktoren, die das Überleben der Patienten signifikant beeinflussen. Die übrigen untersuchten Variablen konnten keinen zusätzlichen statistisch signifikanten Beitrag liefern.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie lassen sich Proteine über Antikörperbindung im Gewebe nachweisen. Das hat den Vorteil, dass Proteine ortsspezifisch visualisiert werden können. Neben Aussagen zu Vorkommen und Lokalisation eines bestimmten Proteins in der Zelle gibt diese Methode über die Färbeintensität auch Hinweise zur Quantität der Proteinexpression. Einige Autoren sehen zum Beispiel einen Zusammenhang zwischen der P27-Expression eines Gewebes und der Intensität der Anfärbung P27-positiver Zellen. Venkatesan T.K. et al. (1999) fiel an Läsionen der Mundhöhle eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Frequenz P27-positiver Zellkerne und deren Intensität auf. Auch an nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen wurde eine solche Beobachtung gemacht (Yatabe Y. et al. 1998). Allerdings war die Intensität nicht von zusätzlichem prädiktiven Wert. Zum Funktionsstatus eines Proteins lassen sich durch immunhistochemische Detektion jedoch keine oder nur indirekt Aussagen treffen. So bindet zum Beispiel der von uns verwendete P53-Antikörper sowohl an wt-P53 als auch an mutiertes P53-Protein. Das Expressionsmuster sagt damit primär nichts über die Funktion des Proteins aus. Die Funktion von wt-P53 kann durch verschiedene Ereignisse gestört sein. Missense-Mutationen oder die Bindung an Proteine von DNA-Tumoviren, wie zum Beispiel an das Large-T-Antigen des SV40-Virus, an das E1B-Antigen des Adenovirus Typ5 (Sarnow P. et al. 1982) oder an das E6-Protein von HPV-16 und -18 (Werness B.A. et al. 1990) können einen Funktionsverlust von P53 zur Folge haben. Dies führt zu einer Stabilisierung und damit zu einer Zunahme der Halbwertszeit des Phosphoproteins (Vogelstein et al. 1992). Eine Bindung an das SV40-Large-T-Antigen führt zum Beispiel zu einer Verlängerung der P53-Halbwertszeit von 6-20 Minuten auf mehrere Stunden (Kapranos N. et al. 2001). P53 akkumuliert damit im Zellkern und kann immunhistochemisch in erhöhter Konzentration im Tumor nachgewiesen werden. Obgleich diese immunhistochemisch ermittelte Überexpression als indirekter Hinweis auf eine p53-Mutation gewertet werden kann, ist sie dennoch nicht beweisend. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass ein enger Zusammenhang zwischen der P53-Überexpression und der Mutationsrate besteht (Fogel S. et al. 1996). Darüberhinaus existiert die These, wt-P53 sei durch seine kurze Halbwertszeit immunhistochemisch gar nicht nachweisbar (Kapranos N. et al. 2001). Auch die Lokalisation in der Zelle gibt indirekt Hinweise zum Funktionsstaus. So ist P53 als

Transkriptionsfaktor an die Lokalisation im Zellkern gebunden. Ist P53 immunhistochemisch im Zytoplasma nachweisbar, kann dies auf einen defekten Transportmechanismus von P53 hindeuten. Der Import in den Zellkern ist möglicherweise durch Schäden des Import-Signals im C-terminalen Ende des Gens begründet oder durch ein gestörtes Transportsystem der Zelle. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass immunhistochemische Methoden gut mit molekularbiologischen Techniken korrelieren (Calzolari A. et al. 1997).

5.1.2 In-situ-NICK-Translation

Die in-situ-NICK-Translation zum Nachweis apoptotischer Zellen mittels enzymatischer Markierung ihrer fragmentierten DNA hat bereits in diversen anderen Untersuchungen reproduzierbare Ergebnisse gebracht und stellt eine sensitive und spezifische Methode dar (Mainwaring P.N. et al. 1998). Dennoch kann in seltenen Fällen Apoptose ohne DNA-Fragmentation stattfinden. Solche Zellen entgehen der Detektion. Auf der anderen Seite kann es auch im Rahmen von Nekrose und exzessivem DNA-Abbau zu einer Fragmentation von DNA kommen. Eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose ist in solchen Fällen nur unter Zuhilfenahme morphologischer Unterscheidungskriterien möglich.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Bei der Karzinogenese scheinen genetisch praedisponierende Faktoren und äussere Einflüsse in wechselseitige Beziehung zu treten und so einen Tumor zu induzieren. Man geht heute davon aus, dass sich Plattenepithelkarzinome ähnlich dem oben beschriebenen Modell der Adenom-Karzinomsequenz bei kolorektalen Karzinomen als mehrstufiger Prozess aus histologisch definierten Vorstufen entwickeln (Weber A. et al. 2002). Durch die chronische Exposition gegenüber exogenen Noxen kommt es nach einer initialen Entzündungsreaktion zu dysplastischen Gewebeveränderungen und damit einhergehend zu einer Akkumulation genetischer Veränderungen. Auf molekularbiologischer Ebene finden anfangs noch Regenerations- und Reparaturprozesse statt. Dauert die exogene Zellschädigung an oder sind entsprechende genetische Veränderungen eingetreten, erschöpfen sich die zelleigenen Reparaturmechanismen. Die Zelle kann sich nicht regenerieren und das Genom wird nicht mehr fehlerfrei repliziert. DNA-Schäden gehen damit auf Tochterzellen über, die vermehrt gebildet werden, um den Epithelschaden zu ersetzen. Dies führt zu einer irreversiblen Fixierung der genetischen Veränderungen (Weber A. et al. 2002).

Die vermehrte Zellteilung stellt jedoch nicht nur einen Kompensationsmechanismus des Organismus dar, sondern kann auch auf einer Dysregulation des Zellzyklus beruhen, wenn es zu einem Funktionsverlust von Genen gekommen ist, die das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zellabbau im Organismus regulieren. Heute geht man davon aus, dass eine Schädigung mehrerer Gene und Proteine für eine Fehlregulation des Zellzyklus ursächlich ist, was über eine unkoordinierte Proliferation eine Entstehung von Neoplasien verursacht und zu deren Progression beiträgt (Hunter T. et al. 1994; Tsihlias J. et al. 1999).

5.2.1 Grundlagen zum Ablauf des Zellzyklus

Der Zellzyklus unterteilt sich in vier verschiedene Phasen, die nacheinander durchlaufen werden. Die eigentliche Teilung einer Zelle in zwei Tochterzellen mit identischem Erbgut findet in der M (Mitose)-Phase statt. Daran schliesst sich die G1 (gap1)-Phase an, in der die Zelle durch Synthese von RNA und Proteinen wächst. Gegen Ende der G1-Phase wird die DNA-Replikation vorbereitet, die in der S (synthesis)-Phase erfolgt. Der Zyklus schliesst sich nach Durchlaufen der G2 (gap2)-Phase mit einem Wiedereintritt in die M-Phase. Ausdifferenzierte Zellen treten in die G0-Phase über. Hier verbleiben sie entweder dauerhaft oder treten, durch mitogene Faktoren vermittelt, wieder in den Zellzyklus ein (Koolman J., Röhm K.-H. 1994). Innerhalb des Zellzyklus muss die Zelle zwei kritische Kontrollpunkte überwinden, die entscheidend für ihre genomische und strukturelle Integrität sind: einmal vor der Replikation der DNA gegen Mitte/Ende der G1-Phase, zum anderen in der G2-Phase kurz vor der eigentlichen Zellteilung.

Der Ablauf des Zellzyklus wird wesentlich von Cyclin-anhängigen Kinasen/cyclin-dependent kinases (Cdks) bestimmt, die von Cyclinen aktiviert und von Cyclin-Kinase-Inhibitoren/cyclin-kinase-inhibitors (CKIs) gehemmt werden (Murray A.W. et al. 1993; Nurse P. 1990; Sherr C.J. 1993; Morgan D.O. 1995; Ekholm S.V. et al. 2000). Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Cyclinen identifiziert. Sie wurden in fünf Klassen unterteilt (Cyclin A-E) und ihr Auftreten bestimmten Phasen im Zellzyklus zugeordnet. Cyclin C, Cyclin D1-3 und Cyclin E erreichen ihr Aktivitätsmaximum in der G1-Phase und steuern damit den Übertritt in die S-Phase des Zellzyklus. Demgegenüber werden die Cycline A und B1-2 erst in der S- und G2-Phase aktiv und ermöglichen so den Übergang zur Mitose (Cordon-Cardo C. 1995). Entsprechend viele Cdks wurden bisher beschrieben. Im Komplex mit Cyclinen als regulatorischer Untereinheit stellen sie die katalytische Untereinheit dar und werden in entsprechenden Phasen des Zellzyklus aktiv. So werden Cdk 4 und Cdk 6 in der G1-Phase von Cyclin D1 aktiviert. Der von Cyclin E vermittelte Eintritt in die S-Phase wird erst durch Komplexbildung mit Cdk 2 möglich. Cdk 2 wird

während der S-Phase auch von Cyclin A aktiviert, und der Beginn der Mitose wird von Cyclin B-Cdk 2 (-Cdk 1)-Einheiten veranlasst (Cordon-Cardo C. 1995, Abbildung 1). Liegen Schäden in der DNA vor, kann durch Hemmung der Cyclin/Cdk-Proteinkomplexe durch CKIs ein Zellzyklusarrest zur Reparatur der DNA-Schäden ausgelöst werden. CKIs sind Proteine, deren Funktion die Regulation der Zellproliferation ist, sei es bei der Entwicklung und Differenzierung normaler Zellen oder nach genotoxischen Einflüssen. CKIs interagieren direkt oder indirekt mit Cyclin/Cdk-Komplexen. Man unterteilt sie in zwei verschiedene Familien. Zu CKIs der CIP/KIP (Kinase inhibitor protein)-Familie gehören $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ und $p57^{KIP2}$, die universell an Cdks binden können. Allerdings haben sie eine Präferenz für Komplexe, die Cdk 2 enthalten (Zhang H. et al. 1993; Harper J.W. et al. 1995). CKIs der INK4-Familie (inhibitor of cyclin-dependent kinase 4: $p15^{INK4B}$, $p16^{INK4A}$, $p18^{INK4C}$ und $p19^{INK4D}$) regulieren negativ Komplexe zwischen Cyclin D und Cdk 4 bzw. Cdk 6 (Abbildung 1).

5.2.2 Apoptose

5.2.2.1 Mechanismus und Funktion von Apoptose

Die Homöostase im menschlichen Organismus ist charakterisiert durch eine Balance zwischen Proliferation und Absterben von Zellen. Wird dieses Gleichgewicht zugunsten der Proliferationsrate gestört, kommt es zur Tumorentstehung und -progression. Die physiologische Form des Zelltods nennt man Apoptose. Als sogenannter programmierter Zelltod ist Apoptose an nahezu allen physiologischen und pathologischen Prozessen im Körper beteiligt, so zum Beispiel an der Entwicklung und Alterung des Menschen oder an Erkrankungen wie Krebs und Autoimmunkrankheiten, die durch eine unnatürliche Verminderung von Apoptose mitverursacht werden (Vaux D.L. et al. 1999; Gastman B.R. 2001). Umgekehrt spielt eine exzessive Steigerung apoptotischer Prozesse bei degenerativen Krankheitsbildern wie M. Alzheimer eine bedeutende Rolle (Thompson C.B. 1995).

Die Beschreibung der physiologischen Form des Zelltods hat eine lange Geschichte und reicht mit Beobachtungen der regressiven Veränderungen des Ductus arteriosus bis auf Galen zurück (Clarke P.G. et al. 1996). Doch wurde dem physiologischen Zelluntergang lange keine besondere Bedeutung beigemessen. Erst um 1960 wurde der vorhersehbare Ablauf des Absterbens von Zellen als programmierter Zelltod bezeichnet. Die fundamentale Bedeutung des Sterbens von Zellen als Teil der Entwicklung und Differenzierung des Organismus begann sich abzuzeichnen. 1972 schliesslich prägten Forscher den Begriff Apoptose, um den geplanten Zelltod von dem unkoordinierten

Absterben von Zellen, der Nekrose, die zum Beispiel bei Ischämien oder Entzündungen auftritt, abzugrenzen (Gastman B.R. 2001).

Apoptose ist durch typische morphologische Veränderungen charakterisiert. Die Zelle schrumpft und verliert den Kontakt zu anderen Zellen. Das wesentliche Merkmal der Apoptose ist die systematische Fragmentierung des Genoms. Das Chromatin kondensiert und die DNA wird in bestimmte Abschnitte unterteilt, wodurch die apoptotische Leiterstruktur der DNA entsteht. Die Zellbestandteile werden von der Zellmembran umschlossen und als sogenannte Apoptotic bodies abgeschnürt. Apoptotic bodies werden umgehend von umliegenden Zellen phagozytiert. So ist eine Einzelzelle zugrunde gegangen, ohne dass eine entzündliche Reaktion des umgebenden Gewebes verursacht worden wäre. Dies ist eines der Hauptunterscheidungsmerkmale zur Nekrose. Nekrose betrifft meistens mehrere benachbarte Zellen und ist von einer Entzündung begleitet.

Die phänotypischen Merkmale der Apoptose waren längst bekannt, als in den 80er Jahren eine Arbeitsgruppe drei massgeblich am Apoptosemechanismus beteiligte Gene am Nematoden *Caenorhabditis elegans* ausmachen konnte, die im Lauf seiner Entwicklung das zeitlich spezifische und ortstypische Absterben von genau 131 Zellen regulieren (Ellis H.M. et al. 1986). Erst jetzt begann man Erkenntnisse über den Regulationsmechanismus der Apoptose zu gewinnen. In der Entwicklung von *C. elegans* führen die Produkte der Gene *ced-3* (Cell death abnormal) und *ced-4* zu Apoptose, wohingegen das Genprodukt von *ced-9* diese hemmt. Die Produkte der *ced*-Gene sind Kaspasen (Cystinproteasen), die in der Zelle als inaktive Vorstufen (Zymogene)

vorliegen und bei Bedarf durch Proteolyse aktiviert werden. *Ced-3* löst Apoptose aus und wird durch *Ced-4* aktiviert. Der proapoptotische Effekt von *Ced-4* wird durch *Ced-9* gehemmt. Diese negative Regulation durch *Ced-9* kann wiederum durch Bindung von *EGL-1* (EGg Laying defective 1) aufgehoben werden, einem Mitglied der *bcl-2* (B-cell leukemia/lymphoma 2) –Superfamilie und Aktivator von Apoptose. Obgleich eine Vielzahl weitere an der Apoptose beteiligte Faktoren gefunden wurden,

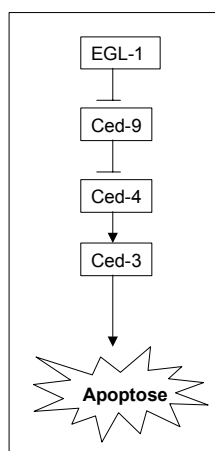


Abbildung 23

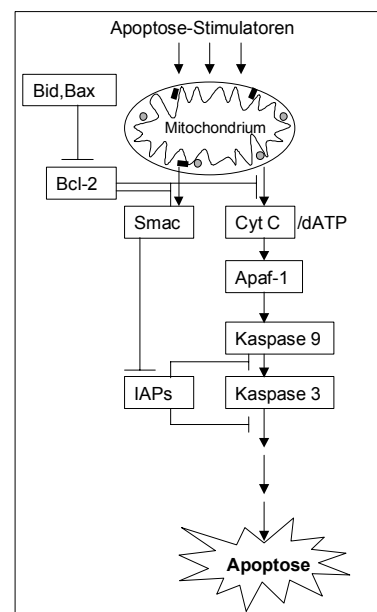


Abbildung 24

stellt das Genmodell von *C. elegans* noch immer die Basis des Verständnisses von der Regulation der Apoptose dar (Gastman B.R. 2001; Abbildung 23).

Apoptose kann über zwei Signalwege initiiert werden. Zum einen über einen extrinsischen Weg, bei dem Rezeptoren auf der Zelloberfläche das Signal zum Zelltod vermitteln. Wichtiger für diese Arbeit ist der intrinsische Weg, da heute als gesichert gilt, dass dieser in Krebszellen inaktiviert ist (Shi Y. 2001). Bei dem intrinsischen Weg spielen Veränderungen von Mitochondrien eine massgebliche Rolle. Eine Vielzahl von Stimuli können von Mitochondrien vermittelte Apoptose auslösen, so zum Beispiel eine Aktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p53 oder Onkogenen wie cMyc, DNA-Schäden, Chemotherapeutika, ultraviolette Strahlen oder Nährstoffmangel (Shi Y. 2001).

Zu einem Funktionsverlust der Mitochondrien kommt es über eine Aktivierung von Mitgliedern der bcl-2-Superfamilie (bcl-2 hat in Sequenz und Funktion Homologien zu Ced-9 und EGL-1 von *C. elegans*). Sie bewirken eine Permeabilitätsänderung der äusseren mitochondrialen Membran, was einen Austritt von Cytochrom C in das Zytosol zur Folge hat. Das setzt über eine Aktivierung von Proteinen, die als Apafs (Apoptosis protease-activating factors) bezeichnet werden, die Zelltodkaskade in Gang. In Gegenwart von Cytochrom C (Apaf-2) kann Kaspase-9 (Apaf-3, entspricht Ced-3 von *C. elegans*) mit Apaf-1 (Apaf-1 entspricht Ced-4 von *C. elegans*) und ATP oder dATP einen Komplex bilden, das sogenannte Apoptosom. Das Apoptosom ist ein allosterischer Faktor für die katalytische Aktivität von Kaspase 9, die allein nur wenig proteolytisch aktiv ist. Über diverse weitere Faktoren werden letztendlich Nukleasen aktiviert, die das Genom in für Apoptose typische nukleosomale Fragmente spalten (Abbildung 24).

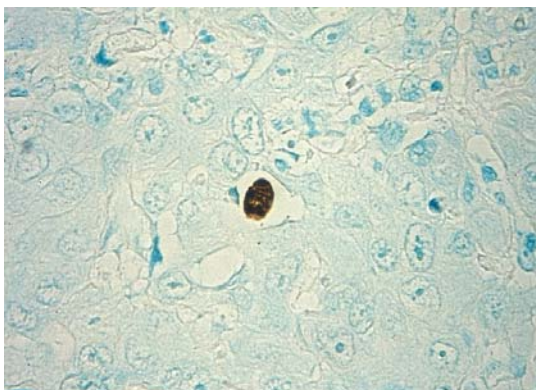
Apaf-1 und Kaspase-9 spielen beim Menschen gerade bei P53-vermittelter Apoptose eine bedeutende Rolle. Das Signal zur Apoptose gibt das Tumorsuppressorprotein P53 durch Aktivierung von PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), welches durch Interaktion mit bcl-2 dessen antiapoptotischen Effekt aufhebt. Dies führt zu einem raschen Ablauf des Zelltodprogramms, wie an kolorektalen Krebszellen gezeigt werden konnte (Shi Y. 2001). Umgekehrt wurde an Plattenepithelkarzinomen beobachtet, dass ein Funktionsverlust von P53 eine verminderte Apoptoserate zur Folge hat (Gastman B.R. 2001).

Die Regulation von Proliferation und Zelltod ist komplex und hängt von der Einwirkung einer hohen Anzahl konkurrierender Faktoren ab, die entsprechend viele Signalwege beeinflussen (Stewart B.W. 1994). Obgleich der Basismechanismus der Apoptose beim

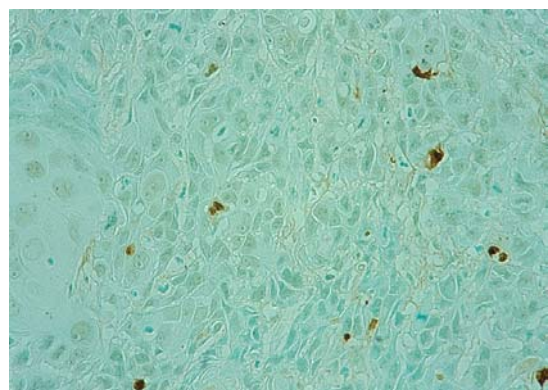
Menschen mittlerweile bekannt ist, bleiben dennoch viele Fragen zur Zelltodmaschinerie ungeklärt.

5.2.2.2 Verteilung apoptotischer Zellkerne im Gewebe

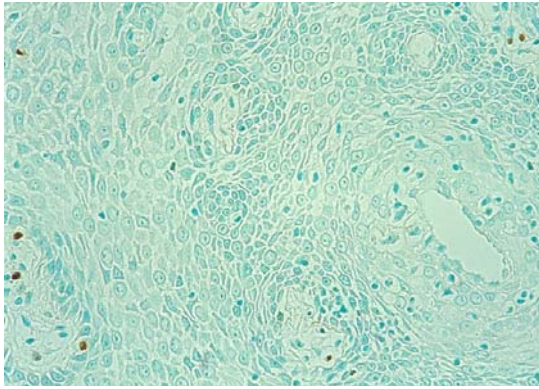
Im Gegensatz zu einem hohen Anteil apoptotischer Zellen bei anderen Tumorentitäten, wie z.B. kolorektalen Adenomen und Karzinomen, stellten sich in der vorliegenden Untersuchung insgesamt nur sehr vereinzelt apoptotische Zellkerne im Tumor dar. Die niedrige Apoptoserate deckt sich jedoch mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen (Koh J.Y. et al. 1998, Xie X. et al. 1999; Stoll C. et al. 2000). So untersuchten Stoll C. et al. den Apoptoseindex an 156 Gewebeproben von 107 Patienten mit Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinomen. In über der Hälfte der untersuchten Präparate lag der PCD (Programmed cell death)-Index unter 0,5%. Die maximale Rate von 5% zeigte nur ein Präparat. Die niedrige Apoptoserate war dabei unabhängig von der Tumorlokalisation (Stoll C. et al. 2000). In unserer Arbeit reichte der Anteil von apoptotischen Zellkernen an der Gesamtheit der Tumorzellen der Präparate von nicht detektierbar bis hin zu einem Maximum von 3% in einem Fall. In die Auswertung einbezogen wurden nur Zellkerne innerhalb tumorösen Gewebes, die eindeutig apoptotischen Veränderungen unterworfen waren. Nekrotische Zellen gingen nicht in die Auszählung ein. Die Verteilung innerhalb des Gewebes war sehr inhomogen. Weder in normalem Epithel noch in Karzinomen liess sich ein einheitliches Verteilungsmuster oder eine Verteilungstendenz ersehen. Apoptosezellen waren vereinzelt im untersuchten Gewebe verteilt, gruppiert oder aber sie stellten sich als fischzugartiges Band im Tumor dar. Diese Beobachtungen liessen sich in keinen sinnvollen Zusammenhang zu der Morphologie oder der histopathologischen Einteilung der Tumoren bringen. Eine Inhomogenität in der Verteilung apoptotischer Zellen in den Tumoren stellten auch andere Autoren fest. Stoll C. et al. lagen teilweise mehrere Paraffinblöcke eines Primarius vor. Die Autoren konnten einen Unterschied des PCD (Programmed cell death)-Index von bis zu 1% zwischen den verschiedenen Tumorbereichen nachweisen (Stoll C. et al. 2000).



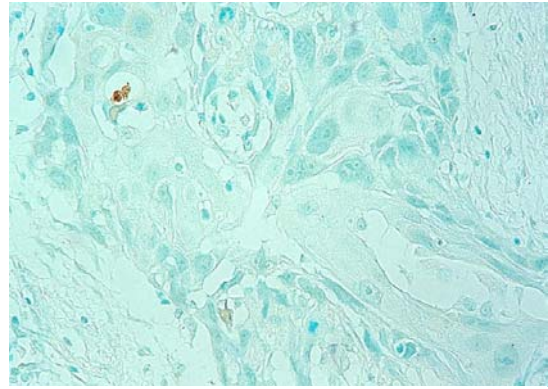
A) Apoptosezelle (x40)



B) Tumoreal mit relativ vielen apoptotischen Zellen (x20)



C) Apoptosezellen vereinzelt über den Tumor verteilt (x10)



D) Tumor ohne Apoptosezellen (braun: Nekrose; x20)

5.2.3 P21

5.2.3.1 Struktur, Funktion und Regulation von P21

Das p21-Gen ($p21^{WAF1}$, wild-type p53 activated fragment 1) ist auf Chromosom 6p21.2 lokalisiert und kodiert für ein 21kDa Protein (El-Deiry W.S. et al. 1993). Da verschiedene Arbeitsgruppen P21 unabhängig voneinander in unterschiedlichen Systemen erforschten, wird das Protein nach der jeweiligen ihm zugedachten Funktion auch als Cip1 (cdk-interacting protein 1, Harper J.W. et al. 1993; Xiong Y. et al. 1993), Sdi1 (senescent cell-derived inhibitor 1, Noda A. et al. 1994), Mda6 (melanoma differentiation associated gene 6, Jiang H. et al. 1993) oder CAP20 (cdk2/cyclin complexes in mouse fibroblasts associated tightly with a 20K protein, Gu Y. et al. 1993) bezeichnet.

P21 wird den CKIs der KIP-Familie zugerechnet. Diese haben eine kondensierte Region im aminoterminalen Ende (NH_2 -Terminus) ihres Gens, mit der sie universell an Cyclin/cdk-Komplexe binden und diese inhibieren. So ist diese Region zum Beispiel bei p27 zu 42% homolog zu der von p21 (Toyoshima H. et al. 1994). Das carboxyterminale Ende ($COOH$ -Terminus) der KIP-Proteine ist in Länge und Funktion jeweils verschieden (Chen J. et al. 1995; Luo Y. et al. 1995). Hier befinden sich bei P21 die Bindungsstelle für PCNA (Proliferating cell nuclear antigen, Zhang H. et al. 1993) sowie Signalsequenzen für die Lokalisation im Zellkern (Poon et al. 1998; Zhou B.P. et al. 2001). Der p21-Promotor beinhaltet zwei P53-Bindungsstellen, die notwendig für eine P53-vermittelte Antwort auf DNA-Schäden sind (El-Deiry W.S. et al. 1995).

P21 wird infolge Stress in gesunden wie in maligne entarteten Zellen exprimiert. Dies kann P53-abhängig oder P53-unabhängig geschehen. Man geht davon aus, dass P21 durch seinen hemmenden Einfluss auf die Zellteilung eine wichtige Rolle bei der Differenzierung, Reifung und malignen Transformation von Zellen spielt (Macleod K.F. et al. 1995). Ebenso scheint P21 an der Regulation der Apoptose beteiligt zu sein (Gartel A.L.

et al. 2002). Das Protein beeinflusst also direkt oder indirekt Signalwege, die an der Tumorentstehung beteiligt sind.

Die Hauptfunktion von P21 ist nach heutigem Wissensstand die Vermittlung eines Zellzyklusarrests. P21 agiert in diesem Zusammenhang v.a. mit zwei verschiedenen Faktoren, die beide für die Zellzyklusprogression essentiell sind, nämlich mit Cyclin/cdk-Komplexen und mit dem DNA-Replikationsfaktor PCNA. Kritische Ereignisse wie die Exposition gegenüber DNA-schädigenden Stoffen, Nährstoffmangel, Hypoxie oder der Einfluss von Differenzierungssignalen vermitteln eine Überexpression von p21 (Zeng Y.X. et al. 1996; Steinmann R.A. et al. 1994). Über die Bindung an Cyclin/cdk-Komplexe kann P21 einen Stop in der G1-, G2- oder S-Phase verursachen (Niculescu A.R. et al. 1998; Sherr C.J. et al. 1999). Auch ein Einwirken von Röntgen- oder UV-Strahlen bewirkt einen vorübergehenden G1-Arrest (Suardet L. et al. 1996; Gorospe M. et al. 1998). Während der Zellzykluspausen können Schäden des Genoms eliminiert werden, ehe die Zellteilung fortgesetzt wird. Damit wird die Vermehrung alterierter Zellen verhindert. Dass ein Zellzyklusarrest P21-vermittelt ist, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass es in Zellen mit zwei defekten p21-Allelen (p21^{-/-} Zellen) nach Einwirkung von Röntgenstrahlen zu keinem G1-Arrest kommt (Brugarolas J. et al. 1995). Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass P21 als Antwort auf exogene oder endogene Faktoren ein Fortschreiten des Zellzyklus über einen G1-checkpoint hinaus verhindert und so als Tumorsuppressorprotein agiert. Diese Annahme findet Bestätigung im Tiermodell. Zwar gedeihen Mäuse, die zwei defekte p21-Allele haben, normal und entwickeln nicht häufiger spontan Neoplasien als P21-positive Tiere (Deng C. et al. 1995). Allerdings sind sie nicht in der Lage, nach Exposition gegenüber DNA-schädigenden Einflüssen einen Zellzyklusarrest auszulösen, in dem die DNA repariert werden kann (Mc Donald E.R. et al. 1996). Dadurch haben sie ein erhöhtes Risiko, induziert Tumoren zu entwickeln (Deng C. et al. 1995). Tiere mit nur einem geschädigten p21-Allel gedeihen normal und sind nicht anfälliger gegenüber einer Tumorinduktion. Offenbar ist ein intaktes p21-Allel ausreichend, um Cyclin/cdk-Komplexe zu inhibieren (Niculescu A.R. et al. 1998).

In gesunden Zellen ist P21 in quarternären Komplexen mit PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), Cyclinen und cdks im Zellkern lokalisiert (Zhang H. et al. 1993; Xiong Y. et al. 1993). Diese Komplexbildung scheint nötig zu sein, um eine ungehinderte Proliferation normaler Zellen zu unterbinden. In Krebszellen konnte eine solche Komplexbildung bisher nicht nachgewiesen werden (Zhang H. et al. 1993). PCNA spielt als Untereinheit der DNA-Polymerase δ eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation und -Reparatur. Über die Bindung an PCNA kann P21 die Assoziation von PCNA mit der

DNA-Polymerase δ verhindern (Podust V.N. et al. 1995). Eine DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase δ wird damit unmöglich (Waga S. et al. 1994; Gibbs E. et al. 1997). Es hat sich gezeigt, dass p21^{-/-} Zellen mit einem defekten DNA-Reparaturmechanismus diesen Defekt nach Transfektion mit einem Fragment, das für die PCNA-Bindungsdomäne kodiert, kompensieren können (Mc Donald E.R. et al. 1996). Trotz dieser Ergebnisse wird eine Beteiligung von P21 bei der DNA-Synthese und -Reparatur in der Literatur kontrovers diskutiert und als notwendig (Mc Donald E.R. et al. 1996), unnötig (Adimoolam S. et al. 2001) oder hinderlich (Cooper M.P. et al. 1999) bewertet.

Der funktionelle Zusammenhang von P21 und Apoptose ist bis heute umstritten. Da es auch in P21-negativen Zellen zur Apoptose kommt und nach Bestrahlung hohe Apoptoseraten auffallen, liegt die Annahme nahe, dass P21 für Apoptose nicht notwendig ist (Deng C. et al. 1995; Caelles C. et al. 1994). Neuere Untersuchungen weisen sogar darauf hin, dass P21 eine Schutzfunktion vor stressinduzierter Apoptose ausübt (Gartel A.L. et al. 2002). Diese Funktion steht auf den ersten Blick im Gegensatz zur Funktion von P21 als Tumorsuppressorprotein. Für einen kontraapoptotischen Effekt von P21 sprechen eine Vielzahl von Befunden. So hat sich gezeigt, dass p21-defizitäre Kolontumoren deutlich sensitiver gegenüber einer Strahlentherapie sind als Tumoren mit intakter P21-Funktion (Wouters B.G. et al. 1997). Auch wird in p21^{-/-} Zellen durch Chemotherapeutika wie zum Beispiel Doxorubicin Apoptose ausgelöst (Waldmann T. et al. 1996), wohingegen eine P21-Induktion in Gliomzellen zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin-vermittelter Apoptose führt (Ruan S. et al. 1998). Demgegenüber kann nach einer P21-Inaktivierung durch Kaspase-3 ähnliche Proteasen/caspase-3 like proteases in Krebszellen, die sich zuvor in einem Zellzyklusarrest befanden, Apoptose ausgelöst werden (Zhang Y. et al. 1999). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass das P21-Protein Zellen nach Strahlen- oder Chemotherapeutika-Exposition vor Apoptose schützt, indem es einen Zellzyklusarrest auslöst, in dem DNA-Schäden repariert oder durch den sie verhindert werden können (Gartel A.L. et al. 2002). So induzieren z.B. Adeno-assoziierte Viren Apoptose in Zellen, die einen Mangel an P53 und P21 aufweisen. Demgegenüber sterben Zellen mit intakter P53- und P21-Funktion nicht ab, sondern zeigen einen Anstieg der P53-Aktivität und der P21-Expression und pausieren in der G2-Phase des Zellzyklus (Raj K. et al. 2001). In dieser Pause wird das Genom des Adeno-assoziierten Virus entfernt. Dann erst setzt die Zelle die Zellteilung fort. Ist die P53- und P21-Antwort defekt, kann die Zelle nicht in der G2-Phase pausieren und es kommt zu Apoptose (Vogelstein B. et al. 2001). Folglich schützt ein P21-vermittelter G2-Arrest nach DNA-Schäden vor Apoptose. Desweiteren existieren noch eine Menge direkter Mechanismen, über die P21 Apoptose

verhindern kann. Dazu gehören direkte Interaktionen mit am Apoptosemechanismus beteiligten Proteinen oder die Lokalisation von P21 im Zytoplasma, wo es mit weiteren für die Apoptose notwendigen Faktoren reagieren kann.

Die negative Regulation des Zellzyklus stellt auch einen ersten Schritt der terminalen Zelldifferenzierung dar (Harada K. et al. 2000). Demzufolge kommt P21 in gesunden Zellen eine Rolle bei der Differenzierung von Zellen zu. Nach Stimulation durch Differenzierungssignale konnte in verschiedenen Geweben p21-mRNA nachgewiesen werden, so z.B. in Monozyten- oder Leber-Zelllinien (Steinman R.A. et al. 1994). Auch an Melanozyten, Muskelzellen und peripheren Nervenzellen konnte beobachtet werden, dass Differenzierungssignale wie MyoD oder NGF (nerve growth factor) über einen P21-Anstieg einen Zellzyklusarrest vermitteln (Jiang H. et al. 1994; Halevy O. et al. 1995; Billon N. et al. 1996). Zugleich wurde durch die vermehrte P21-Expression verhindert, dass es in den sich differenzierenden Zellen zu Apoptose kam (Wang J. et al. 1996).

Ein Funktionsverlust von P21 scheint selten auf einer p21-Mutation zu beruhen. In bisherigen Untersuchungen konnten selten Alterationen im p21-Gen nachgewiesen werden, so z.B. bei Lungen- und Blasenkrebs oder beim Burkitt-Lymphom (Sjalander A. et al. 1996; Kawasaki T. 1996; Bhatia K. et al. 1995). Für Kopf-Halstumoren existieren bisher keine Berichte über p21-Alterationen. Vielmehr scheint die Lokalisation des Proteins in der Zelle entscheidend für seine intakte Antwort zu sein. Die Funktion als CKI kann P21 nur im Zellkern ausüben. In Tumorgewebe ist P21 jedoch häufig im Zytoplasma nachweisbar (Barboule N. et al. 1998). Dies könnte Folge einer Schädigung, Abspaltung oder Phosphorylierung des carboxyterminalen Endes des p21-Gens sein, das Signalsequenzen für die Lokalisation im Zellkern enthält (Poon R.Y. et al. 1998; Zhou B.P. et al. 2001). P21 wäre damit im Zytoplasma inaktiv. Jedoch liegt P21 im Zytoplasma auch in aktiver Form vor und agiert mit anderen Effektorproteinen. So kann P21 zum Beispiel an ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) binden, dieses inhibieren und so Apoptose verhindern (Asada M. et al. 1999).

Von p21 weiss man, dass es von wt-P53 aktiviert wird (El-Deiry W.S. et al. 1994), nicht jedoch von mutiertem P53. Auf diesem Weg vermittelt P21 die zellzyklusregulierenden Funktionen von P53 und reflektiert somit den funktionellen Status von P53. P21 wird jedoch auch auf P53-unabhängigen Wegen aktiviert (Michieli P. et al. 1994; Gartel A.L. et al. 1999). Es gibt sogar Hinweise dafür, dass die P21-Expression in den meisten Geweben zum grössten Teil P53-unabhängig erfolgt (Macleod K. et al. 1995; Parker S. et al. 1995). Neben der Aktivierung der Expression durch P53-abhängige oder unabhängige Faktoren

wird das Proteinlevel auch posttranskriptionell über den Proteinabbau auf Proteinebene bestimmt (El-Deiry W.S. et al. 1995). Erber R. et al. konnten in einer Studie an Kopf-Halstumoren zeigen, dass bei der Mehrzahl der Karzinome eine P21-Überexpression vorliegt. Dabei entsprach die Menge an p21-mRNA in den Tumorzellen der von gesunden Zellen, wie die Autoren durch in-situ-Hybridisierung belegen konnten. Die Akkumulation von P21 musste also durch posttranskriptionale Mechanismen verursacht worden sein (Erber R. et al. 1997). In gesundem Epithel variiert die P21-Expression periodisch und ist zu den kritischen Phasen des Zellzyklus, nämlich in der G1-Phase und gegen Ende der G2-Phase, am höchsten (Li Y. et al. 1994).

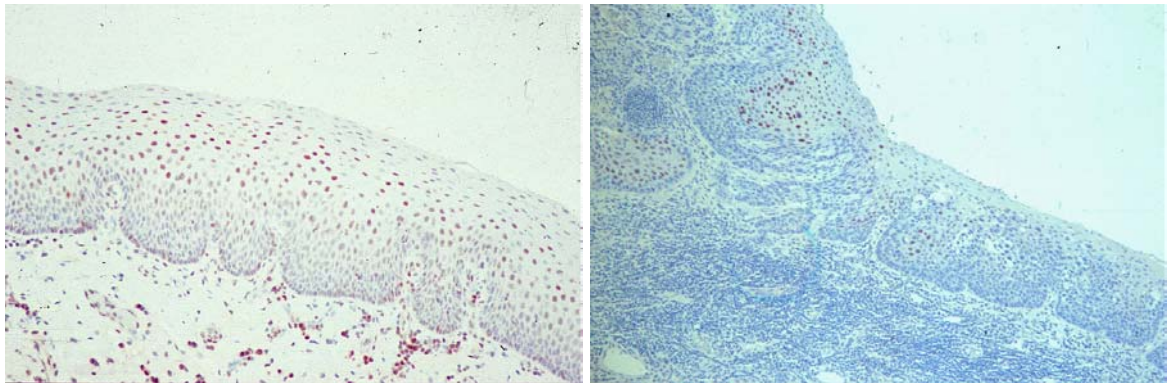
5.2.3.2 P21-Verteilung im Gewebe

Wie schon von anderen Autoren berichtet, kam in der vorliegenden Arbeit eine P21-Expression in normalem Epithel regelmässig vor (Choi H.R. et al. 2003). In normalem Epithel zeigten v.a. die Kerne der intermediären Epithelschicht, des Stratum spinosum eine P21-Expression. In der Basalzellschicht und im Stratum superficiale liessen sich kaum mehr P21-positive Zellkerne nachweisen. Diese Beobachtung passt zusammen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (El-Deiry W.S. et al. 1995; Di Cunto F. et al. 1998; Xie X. et al. 2002; Choi H.R. et al. 2002). Di Cunto et al. sehen dieses Verteilungsmuster durch die Rolle von P21 bei der Differenzierung von Keratinozyten bedingt. Zu Beginn der Differenzierung steigt der P21-Gehalt der Zellen an. Mit zunehmendem Differenzierungsstadium der Keratinozyten nimmt die Menge von P21 wieder ab. Heute nimmt man an, dass die P21-Expression am stärksten in terminal differenzierten Zellen und in Gewebe mit einem hohem Zellturnover und einer dementsprechend hohen Proliferationsrate ist (Macleod K. et al. 1995).

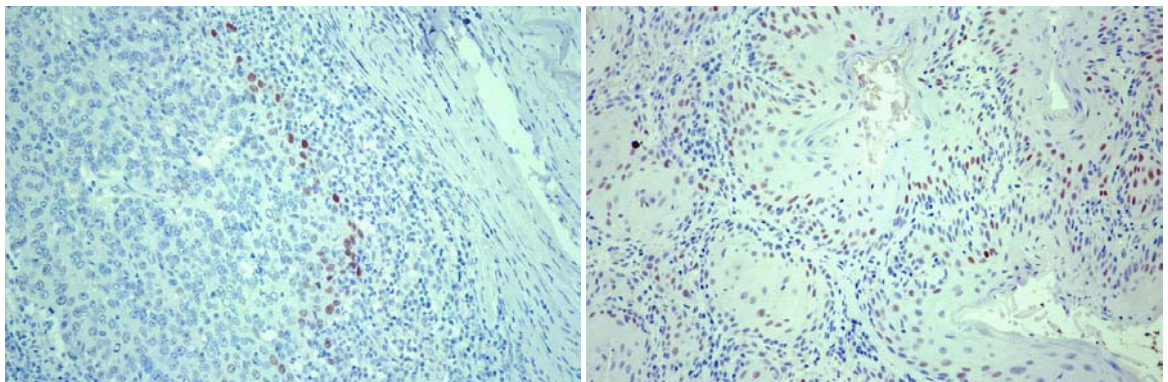
In dysplastischem Epithel und in Plattenepithelkarzinomzellen konnten wir eine quantitativ variierende P21-Expression nachweisen. Das Verteilungsmuster variierte ebenfalls und schien auch hier von dem Differenzierungsgrad und der Proliferationsrate der Zellen abhängig zu sein. Solange ein regulärer Epithelaufbau in dysplastisch verändertem Epithel noch nachweisbar war, entsprach das P21-Verteilungsmuster weitestgehend dem in normalem Epithel.

In tumorösem Gewebe liess sich kein einheitliches Verteilungsmuster des P21-Proteins nachweisen. Sowohl innerhalb eines Präparats als auch unter den jeweiligen Tumoren variierten die Anzahl P21-positiver Zellkerne und die Intensität der Expression stark. Man konnte jedoch beobachten, dass bei einer grossen Anzahl von Tumoren, in denen die normale Epithelschichtung z.T. noch erhalten war, P21-positive Kerne tendenziell eher in

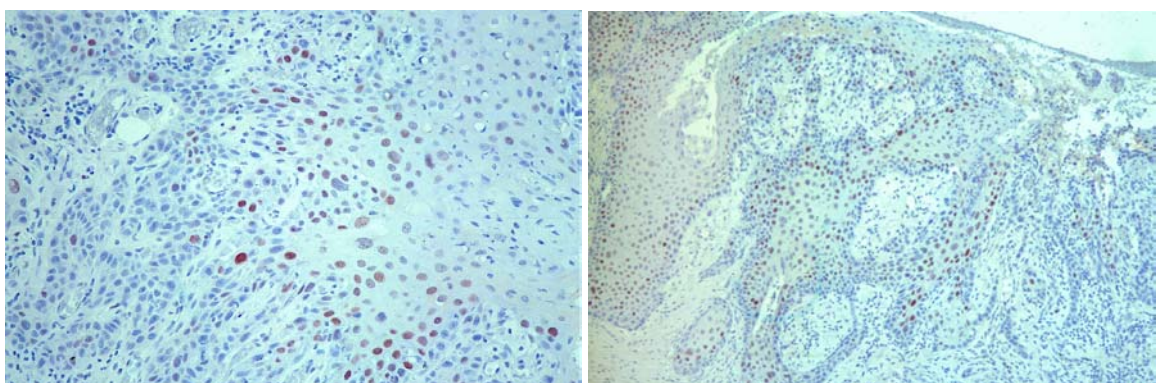
suprabasal gelegenen Zellschichten vorhanden waren. In den Bereichen von Hornperlen gab es vermehrt P21-positive Zellen. In unorganisierten Tumoren hingegen imponierte ein heterogenes Verteilungsmuster dieses Proteins. Studien, welche die P21-Expression im Tumor mit Proliferationsmarkern wie zum Beispiel Ki-67 oder PCNA verglichen, sahen eine positive Korrelation zwischen diesen Parametern (Erber R. et al. 1997). Sie schliessen daraus, dass Tumorzellen, in denen P21 nachweisbar ist, proliferieren. Eine hohe P21-Expression wäre also gleichbedeutend mit einer hohen Proliferationsrate in den Tumoren.



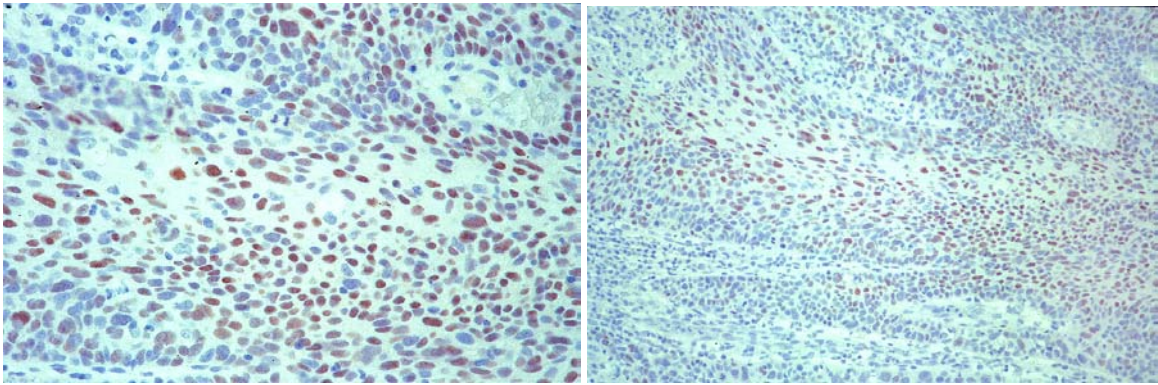
A)P21-Verteilung in normalem/dysplastischem Epithel (x20). B)P21-Expression im Karzinom mit noch teilweise erhaltener Schichtung (x10).



C+D)Wenig P21-positive Zellen („einfach positiv“; x40 und x20).



E+F)Mässige P21-Expression („zweifach positiv“; x20 und x10).



G+H)Starke P21-Expression, >40% der Tumorzellen sind positiv („dreifach positiv“, x40 und x20).

5.2.4 P27

5.2.4.1 Struktur, Funktion und Regulation von P27

P27 wurde erstmals 1994 beschrieben (Polyak K. et al. 1994). Das p27-Gen wird auf Chromosom 12p13 lokalisiert (Ponce-Castaneda M.V. et al. 1995). Es besteht aus zwei Exons (kodierende Gensegmente) und einem Intron (nichtkodierendes Segment). Das Protein hat ein Molekulargewicht von 27 kDa. Bei seiner Entdeckung wurde es komplexgebunden mit Cyclin E/Cdk2 an Zellen nachgewiesen, deren Wachstum mittels TGF- β , Lovastatin oder durch Zellkontakt gehemmt war (Polyak K. et al. 1994; Slingerland J.M. et al. 1994). Da eine Aktivierung von Cdk2 durch Cyclin E den Auslöser für einen Übergang von der G1-Phase in die S-Phase darstellt, vermutete man, dass dieser Schritt an den wachstumsgehemmten Zellen durch Bindung von P27 verhindert worden war. Man sprach P27 daher die Rolle als CKI zu. Unter den CKIs rechnet man es wie auch P21 und P57 zu der KIP (Kinase inhibitor protein)-Familie. Es wird in der G0- und G1-Phase aktiv. Das Hauptziel von P27 ist die Hemmung von Cdks der G1-Phase, insbesondere von Cyclin E/Cdk2-Komplexen. Aber auch Cyclin D/Cdk4- bzw. Cdk6-Komplexe werden von P27 inhibiert. So wird ein Übergang von der G1-Phase in die S-Phase und damit ein Fortschreiten des Zellzyklus verhindert.

Die absolute Menge von p27-mRNA bleibt während des gesamten Zellzyklus konstant. Jedoch variieren Menge und Stabilität des P27-Proteins durch Translation und Proteinabbau. Das P27-Level ist in ruhenden Zellen der G0-Phase hoch, wird im Verlauf der G1-Phase reduziert und erreicht das Minimum in der S-Phase. Die Reduktion von P27 erfolgt im Wesentlichen über Ubiquitin-vermittelte Proteolyse und Proteinabbau (Pagano M. et al. 1995; Shirane M. et al. 1999).

P27 spielt eine Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass mitogene Wachstumsfaktoren den P27-Gehalt in Zellen deutlich reduzieren. Hingegen steigt die P27-Menge bzw. P27-Aktivität als Antwort auf Differenzierungssignale an (Chen Y.J. et al. 1999). Den selben Effekt haben ein Kontaktverlust zur extrazellulären Matrix zur Folge oder Faktoren, die das Wachstum hemmen, wie zum Beispiel TGF- β (Koff A. et al. 1993). Vergleiche zwischen der Expression von P27 und der von Proliferationsmarkern, wie z.B. Ki67, zeigten bei einigen Geweben eine negative Korrelation, wie Studien an Tumoren des zentralen Nervensystems (Piva R. et al. 1997) oder an Lymphomen (Sanchez-Beato M. et al. 1997; Erlanson M. et al. 1998) ergaben. Bei den meisten malignen Tumoren epithelialen Ursprungs lässt sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der P27-Expression und der Proliferationsrate der Tumoren herstellen.

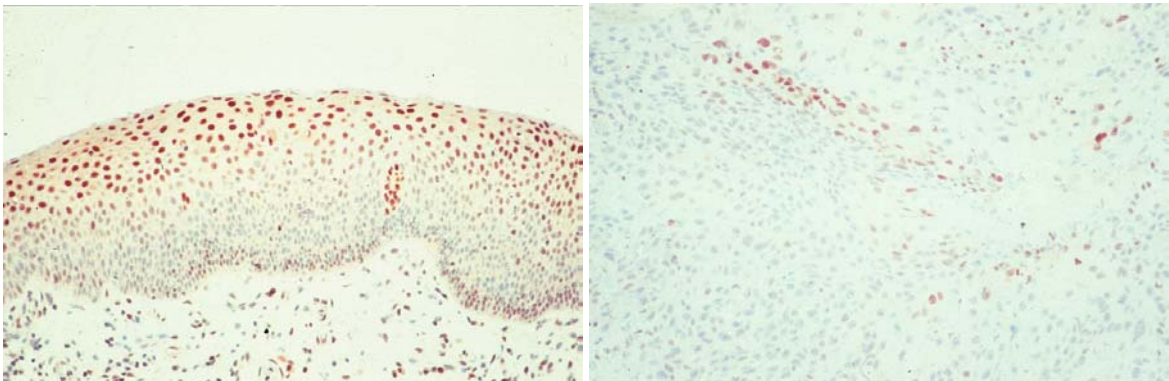
Im Tierversuch wurde beobachtet, dass p27-knockout-Mäuse Organhyperplasien entwickeln. Obgleich p27-haploinsuffiziente Tiere (Tiere mit einem mutierten p27-Allel) nicht häufiger de-novo Neoplasien entwickeln als Tiere mit einem p27^{+/+} Genotyp, sind sie doch empfindlicher gegenüber Tumorinduktion durch chemische Karzinogene oder Bestrahlung (Fero M.L. et al. 1998). In humanen Malignomen kann häufig eine Deletion eines p27-Allels nachgewiesen werden. Das verbleibende Allel ist jedoch meist intakt, höchst selten findet man hier eine Mutation (Kawamata N. et al. 1995; Ponce-Catsaneda M.V. et al. 1995). Es scheint daher unwahrscheinlich, dass ein P27-Funktionsverlust bei menschlichen Neoplasien auf einer inaktivierenden Mutation des verbleibenden Allels beruht. Eine Reduktion oder ein Verlust von P27, der sich bei einer Vielzahl maligner Tumoren in unterschiedlichem Ausmass nachweisen lässt, ist daher eher auf eine posttranslationale Dysregulation zurückzuführen, zum Beispiel auf eine pathologisch verstärkte Proteolyse des P27-Proteins.

5.2.4.2 P27-Verteilung im Gewebe

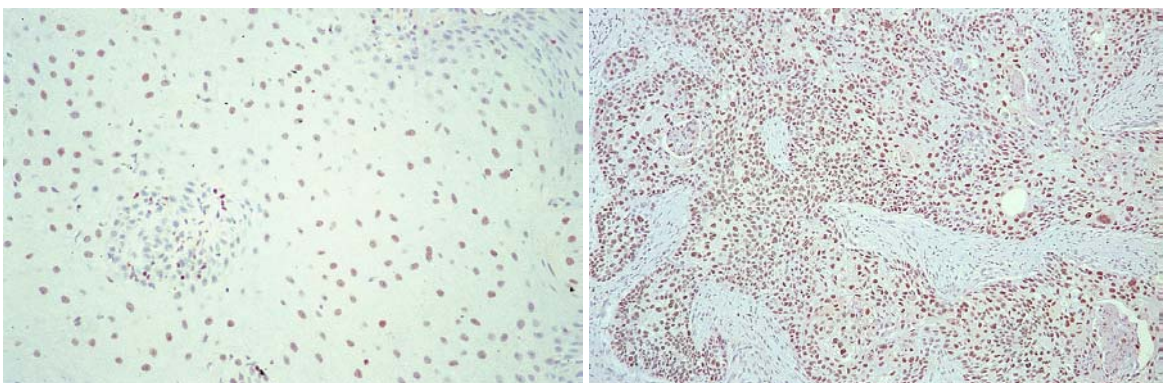
In normalem Gewebe werden grosse Mengen von P27 exprimiert. P27 lässt sich in gesundem Gewebe v.a. in ausdifferenzierten Zellen von Epithel und Schleimhaut sowie in ruhenden Lymphozyten nachweisen (Erlanson M. et al. 1998). In oraler Schleimhaut zum Beispiel befinden sich P27-positive Zellkerne v.a. in suprabasal gelegenen Epithelschichten. Die Basalzellschicht ist kaum positiv für P27 (Choi H.R. et al. 2003). Ähnliche Beobachtungen konnten wir in unserer Untersuchung machen. Allerdings waren auch in tiefer gelegenen Epithelschichten P27-positive Zellkerne nachweisbar, fast nie jedoch in den ganz oberflächlichen. Insgesamt entsprach das Verteilungsmuster von P27 in

normalem oder dysplastischem Epithel im wesentlichen der P21-Verteilung. Quantitativ war die P27-Expression insgesamt geringer als die von P21. Insbesondere in Dysplasien oder Karzinomgewebe wurde P27 häufig nicht oder nur gering exprimiert. Diesbezüglich decken sich unsere Beobachtungen mit der Literatur. Eine vorwiegende Verteilung von P27 auf gut differenzierte Tumorzellnester, wie sie von anderen Autoren beschrieben wurde, konnten wir nicht nachvollziehen (Choi H.R. et al. 2003).

Eine verminderte P27-Expression wurde bereits bei verschiedenen Malignomen beobachtet, so z.B. bei Adenokarzinomen, Tumoren des zentralen Nervensystems oder bei Lymphomen (Nitti D. et al. 2002; Piva R. et al. 1997; Erlanson M. et al. 1998). In einer Studie an normalem, dysplastischem und karzinomatösem Gewebe der Mundhöhle konnte gezeigt werden, dass die P27-Expression von Dysplasien zu Karzinomen hin abnimmt (Shintani S. et al. 2002; Choi H.R. et al. 2003). Die Autoren schliessen daraus auf einen Funktionsverlust von P27 in einem frühen Stadium der Karzinomentstehung.



A)P27-Verteilung in normalem/dysplastischem Epithel (x20). B)Geringe Anzahl inhomogen verteilter P27-positiver Zellen im Karzinom („einfach positiv“; x20).



C)Mittelgradige P27-Expression im Karzinom („zweifach positiv“; x20). D)Massive Anfärbung P27-positiver Tumorzellen („dreifach positiv“; x10).

5.2.5 P53

5.2.5.1 Struktur, Funktion und Regulation von P53

Das p53-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert. Es kodiert für ein 53kDa Phosphoprotein, das aus 393 Aminosäuren besteht (Levine A.J. et al. 1991). Lane und Crawford entdeckten das P53-Protein 1979 komplexgebunden an das Large-T-Antigen des SV40-Virus (Marshall C.J. 1991). Das p53-Gen ist mittlerweile das am besten untersuchte Tumorsuppressorgen. Es kann in drei funktionelle Abschnitte unterteilt werden. Das aminoternale Ende enthält Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Mdm2. Im mittleren Teil ist eine DNA-Bindungsdomäne lokalisiert, mit der P53 an spezifische P53-Antwortelemente der Doppelstrang-DNA bindet. Hier kommt es beim Menschen bevorzugt zu Mutationen. Das carboxyterminale Ende enthält regulatorische Domänen. Hier liegen zum Beispiel Signalsequenzen für den Import des Proteins in den Zellkern oder DNA-Bindungsstellen, die bevorzugt mit DNA-Strangbrüchen assoziieren.

Die Hauptfunktion des Tumorsuppressorgens p53 ist die Inhibition einer unkontrollierten Proliferation von Zellen. Dies wird über Signalwege erreicht, die einen Zellzyklusarrest oder Apoptose vermitteln. Beide Wege haben das Ziel, aberrante Zellen zu eliminieren. P53 ist ein Transkriptionsfaktor, der als Tetramer an DNA bindet und so eine Vielzahl von Genen aktiviert oder deren Aktivierung unterdrückt (El-Deiry W.S. 1998; Murphy M. 1999). Diese Funktion ist an eine Lokalisation von P53 im Zellkern gebunden. Die von P53 aktivierten Gene, wie z.B. p21^{WAF/CIP1}, Mdm2 oder Bax, lassen sich ihrer Funktion entsprechend grob in zwei Gruppen einteilen: eine Gruppe vermittelt einen Zellzyklusarrest oder DNA-Reparatur, die andere vermittelt Apoptose (Vousden K.H. 2000).

Ein Verlust von p53 geht mit einer verstärkten Disposition für Tumorentstehung einher. Die Funktion von p53 als Tumorsuppressorgen wird durch Tiermodelle bestätigt. p53-knock-out-Mäuse (p53^{-/-}) entwickeln bis zu ihrem zehnten Lebensmonat in nahezu 100% Tumoren, vorwiegend Sarkome oder Lymphome (Donehower L.A. 1996). Karzinome treten allerdings selten auf. Bei heterozygoten Tieren (p53^{+/-}) entstehen erst später und weniger häufig Tumore. Typischerweise bilden sich hier Osteosarkome und Weichteilsarkome (Donehower L.A. 1996).

In gesunden Zellen muss die P53-Aktivität genau reguliert werden. Dies geschieht in erster Linie auf Proteinebene, nämlich über die Stabilität des Proteins, seine Lokalisation in der Zelle, posttranslationale Modifikationen oder Konformationsänderungen, die die DNA-Bindungsfähigkeit beeinflussen (Hupp T.R. et al. 1992; Woods D.B. et al. 2001). Die

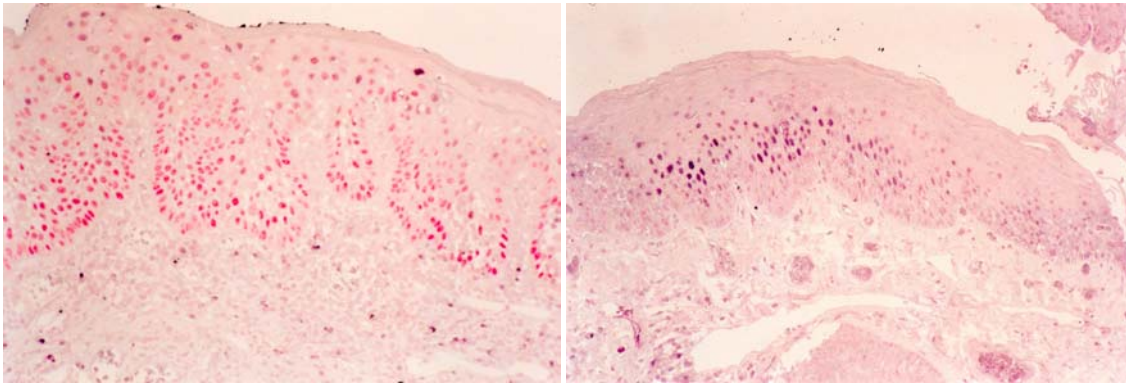
Regulation über Transkriptionsfaktoren wie HOX A5 (Raman V. et al. 2000) oder NF- κ B (Webster G.A. et al. 1999) und über Mechanismen, die die p53-Translation beeinflussen, spielen eher eine untergeordnete Rolle (Woods D.B. et al. 2001). Die Menge an exprimiertem Protein wird in erster Linie über Phosphorylierung reguliert. Während nach der Mitose der P53-Gehalt in den Zellen niedrig ist, steigt er in der G1-Phase an. In der S-Phase wird P53 durch Phosphorylierung inaktiviert (Bischoff J.R. et al. 1990).

DNA-Schäden, Hypoxie oder Stimulation durch Onkogene führen zu einer Akkumulation von P53 im Zellkern. Dies ist möglich durch zeitgleiche Hemmung der Interaktion von P53 und MDM2 und durch Aktivierung von p14^{ARF}, das die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von MDM2 inhibiert.

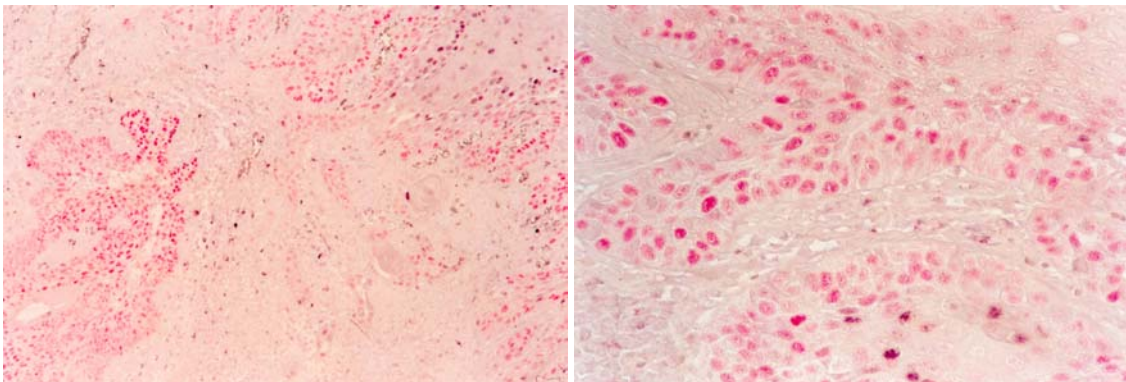
5.2.5.2 P53-Verteilung im Gewebe

An 42 zufällig ausgewählten Schnitten wurde die P53-Expression neben der P21-Expression mittels einer Doppelfärbung untersucht, um mögliche Interaktionen zwischen P21 und P53 mitzuerfassen. Bei oben beschriebener Lokalisation der P21-Proteine waren in normalem verhornenden Epithel wenig Zellen positiv für P53. Wie auch von anderen Autoren beschrieben, waren diese häufig in der Basalzellschicht lokalisiert (Choi H.R. et al. 2003). Mit dysplastischer Gewebeveränderung nahm die P53-Expression zu und erreichte die stärkste Expressivität in tumorösem Gewebe. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen (Stoll C. et al. 2000) variierte die P53-Expression in der vorliegenden Arbeit nicht nur zwischen den verschiedenen Tumorpräparaten. Die Expression war auch inhomogen auf verschiedene Bereiche eines Tumors verteilt. Nur in einem bestimmten, scheinbar vom Reifegrad der Zellen abhängigen Anteil der Karzinomzellen war P53 nachweisbar. In fingerförmigen Tumor-Invasions-Fronten (TIF) mit z.T. noch erhaltener epithelialer Schichtung visualisierte die Doppelfärbung für P53 und P21 relativ regelmässig ein typisches Verteilungsmuster dieser Proteine: die Basalzellen der Tumorzapfen waren fast alle P53-positiv, wohingegen die P53-Konzentration in reiferen Zellschichten abnahm. Hier wurde vorwiegend P21 exprimiert. Dieses Verteilungsmuster war jedoch nicht in allen Tumoren nachweisbar. Zudem liess sich wiederholt eine Ko-Expression beider Proteine in Tumorzellen darstellen. Ursächlich dafür könnte neben Unregelmässigkeiten bei der Bearbeitung der Präparate eine Änderung der P53-Expression während der Tumorprogression sein. Stoll et al. sehen diese Inhomogenität als Hinweis auf eine multifokale Karzinogenese (Stoll C. et al. 2000). Die Beobachtung, dass Basalzellen von normalem und dysplastischem Gewebe, das den Tumor

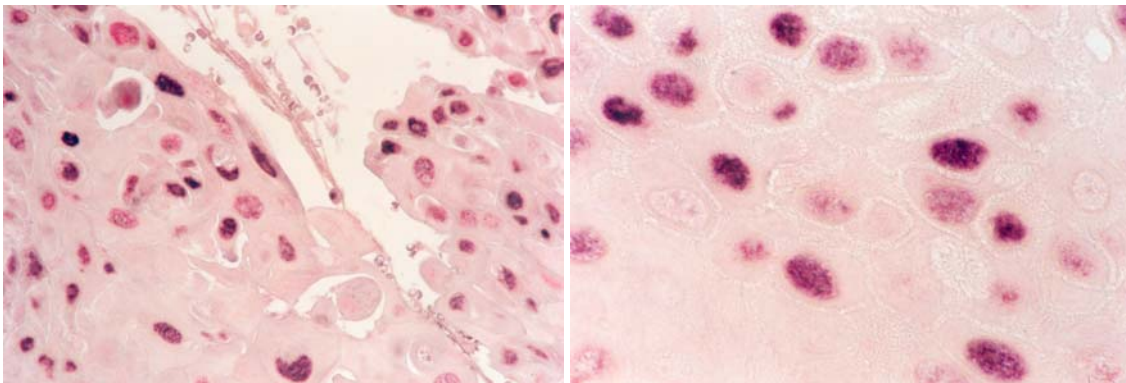
umgibt, P53 exprimieren, machten auch andere Autoren (Fogel S. et al. 1996). Sie werteten dies als Marker für ein frühes Stadium der Karzinogenese.



A)P53 wird vorwiegend in den basalen Zellschichten exprimiert (x20). B)Suprabasale Zellen exprimieren vermehrt P21 (x20).



C+D)Zellen von Tumorinvasionsfronten färben sich intensiv P53-positiv an (x10 und x40).



E+F)Tumorareale mit P53-positiven (rosa) und P21-positiven Zellen (dunkelviolet). In manchen Zellkernen werden beide Proteine nebeneinander exprimiert (x40 und x100).

5.2.6 P21, P27 und P53 und Prognose

Eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 ist die häufigste Alteration bei Krebserkrankungen des Menschen (Hollstein M. et al. 1994; Fogel S. et al. 1996; Woods D.B. et al. 2001). Bei Tumoren, die wt-p53 enthalten, liegt meist ein Defekt in der P53-Antwort vor (Woods D.B. et al. 2001). Bei einer Vielzahl maligner Tumoren hat die P53-

Expression bzw. der Funktionsstatus von P53 einen prädiktiven Wert hinsichtlich der Tumorprogression und der Prognose der Patienten. So gilt ein Funktionsverlust von P53 zum Beispiel bei kolorektalen Karzinomen als fester Bestandteil der Krebsentstehung (Cho K.R. et al. 1992). Auch bei Karzinomen von Magen, Leber, Mamma und Lunge spielt P53 als Prognosefaktor eine Rolle (Lee H.S. et al. 2003; Staib F. et al. 2003; Borresen-Dale A.L. 2003; Grossi F. et al. 2003). Hinsichtlich Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs gibt es widersprüchliche Angaben.

In der vorliegenden Untersuchung stand die P53-Expression in keinem Zusammenhang mit der Tumorprogression oder der Überlebenszeit der Patienten. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Reihe von Untersuchungen an Kopf-Halstumoren, in denen sich die P53-Expression als Prognosefaktor nicht geeignet erwies (Koch W.M. et al. 1996; Nylander K. et al. 1998, Homma E. et al. 1999; Pena J.C. et al. 1999, Stoll C. et al. 1998 und 2000).

Auf der anderen Seite gibt es Studien, die einen prognostischen Wert für P53 belegen. Shin et al. untersuchten immunhistochemisch die P53-Expression an 69 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich (Shin D.M. et al. 1996). Die Patientengruppe, deren Tumoren P53-positiv waren, hatte die schlechtere Prognose. Sowohl die Überlebenszeit als auch die Zeit bis zum Auftreten von Rezidiven oder Zweitkarzinomen war im Vergleich zu den P53-negativen Patienten deutlich reduziert. Die Autoren schreiben damit P53 eine Rolle als Marker für Hochrisikopatienten zu. Narayana A. et al. (1998) untersuchten die P53-Expression an Kehlkopftumoren und fanden einen positiven Zusammenhang zwischen einer P53-Akkumulation und einer verkürzten Überlebenszeit.

Worin könnten diese widersprüchlichen Aussagen begründet sein? Eine Ursache könnte in der Interaktion mit anderen Zellzyklusregulationsproteinen liegen. Da p21 ein wichtiges Downstream-Gen von p53 ist, vermutete man, dass besonders der Zusammenhang zwischen P53 und P21 die Prognose der Patienten beeinflussen könnte. In der vorliegenden Arbeit war die P21-Expression positiv mit der P53-Expression korreliert. Dieses Ergebnis war zwar statistisch signifikant, aber der Zusammenhang war nicht eng ($p=0,02$). Bei der Durchsicht der Präparate fiel zudem eher ein inkonstantes Expressionsmuster der beiden Proteine auf. Zum Beispiel war eine mässige P21-Expression sowohl in P53-negativen Präparaten wie auch in Tumoren nachweisbar, die eine hohe Anzahl P53-positiver Zellkerne aufwiesen. Dies spricht eher für eine P53-unabhängige Expression von P21. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Kapranos et al., welche die P53-Expression in Abhängigkeit von der Expression von P21 und P27 an Kopf-Halstumoren untersuchten

und aus dem Zusammenspiel der einzelnen Proteine keine weiteren Informationen gewinnen konnten (Kapranos N. et al. 2001). Eine von dem P53-Nachweis unabhängige P21-Expression konstatierten auch andere Autoren, so zum Beispiel an Larynxkarzinomen (Nadal A. et al. 1997) und an Karzinomen im Mundhöhlenbereich (Tatemoto Y. et al. 1998; Yook J.I. et al. 1998). Diese Ergebnisse sind übertragbar auf Karzinome anderer Organe, wie Studien zu Ovarial-, Mamma- und Magenkarzinomen belegen (Barboule N. et al. 1998; Barbareschi M. et al. 1996; Yasui W. et al. 1996).

Von P21 weiss man, dass es von wt-P53 aktiviert wird (El-Deiry W.S. et al. 1994), nicht jedoch von mutiertem P53. Auf diesem Weg vermittelt P21 die zellzyklusregulierenden Funktionen von P53 und reflektiert somit den funktionellen Status von P53. Daneben belegen diverse Untersuchungen die Existenz von P53-unabhängigen Aktivierungswegen (Michieli P. et al. 1994; Gartel A.L. et al. 1999). So wird P21 zum Beispiel in Zellen von P53-negativen Mäusen exprimiert (Michieli P. et al. 1994). Auch der Mangel an Nährstoffen, Kontaktinhibition oder Zellalterung führen zu einer P21-Expression, die nicht von einem P53-Anstieg begleitet ist (Zeng Y.X. et al. 1996). Es gibt sogar Hinweise dafür, dass die P21-Expression in den meisten Geweben zum grössten Teil P53-unabhängig erfolgt (Macleod K. et al. 1995; Parker S.B. et al. 1995). Faktoren wie TGF- β (Michieli P. et al. 1994; Datto M.B. et al. 1995), TNF- α (Yoshida K. et al. 1997), INF- γ (Arany I. et al. 1996), MyoD (Halevy O. et al. 1995) und NGF (Nerve Growth Factor, Billon N. et al. 1996) können eine P53-unabhängige P21-Expression induzieren (Zeng Y.X. et al. 1996; Harada K. et al. 2000).

Dennoch proklamieren manche Autoren einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Proteinen. Aber auch diesbezüglich existieren widersprüchliche Aussagen. Zum Beispiel schien die kumulative Überlebensrate von Patienten mit P53-negativen und P21-positiven Tumoren in einer Studie an Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle höher zu sein als die von Patienten mit anderem P53/P21-Status, wenn auch die P21-Expression statistisch nicht mit der von P53 korreliert war (Kudo Y. et al. 1999). Demgegenüber war in einer anderen Studie zu Mundhöhlenkarzinomen ein P53+/P21+ -Status mit einer schlechteren Prognose verknüpft (Yanamoto et al. 2002).

p21-Genmutationen sind weniger häufig als p53-Mutationen. Es wurde berichtet, dass bei Patienten mit einem mutierten p21-Gen selten zugleich eine p53-Mutation vorliegt (Shiohara M. et al. 1994). Dies unterstreicht die Tatsache, dass die Karzinomentstehung auf einer Fehlregulation des Zellzyklus beruht, diese jedoch durch Mutation verschiedener Gene hervorgerufen werden kann.

Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich haben bei weit über der Hälfte der untersuchten Tumoren eine Überexpression von P21 gezeigt (Erber R. et al. 1997; Yuen P.W. et al. 2000). Der prognostischen Relevanz von P21 messen die verschiedenen Autoren jedoch eine unterschiedliche Wertigkeit zu.

In einer Studie an Kopf-Halstumoren konnten die Autoren zeigen, dass die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit P21-positiven Karzinomen ähnlich der von Patienten mit P21-negativen Tumoren war (Tatemoto Y. et al. 1998). Allerdings war die P21-Expression in dieser Arbeit mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen korreliert. Dieser Zusammenhang liess sich in unserer Arbeit nicht herstellen. Jedoch konnten wir am Gesamtkollektiv beobachten, dass die Überlebenszeit bei Patienten mit einer höheren P21-Expression tendenziell besser war als die der Patienten mit niedriger P21-Expression. Diese Beobachtung war jedoch nicht statistisch signifikant. Nun schlossen wir Patienten mit Larynxkarzinomen aus den Betrachtungen aus, da diese bekanntermassen eine deutlich bessere Prognose im Vergleich zu Patienten mit Primärtumoren der übrigen Lokalisationen haben, was zum Beispiel aus dem spärlichen Lymphabfluss im Bereich der Glottis resultieren kann. Hier sind ca. 60% aller Larynxkarzinome lokalisiert. Neben dem niedrigen Metastasierungspotential ist eine frühzeitige Diagnosestellung infolge Heiserkeit ein weiterer Grund für die bessere Prognose glottischer Malignome (Bonkowsky V. et al. 2003).

Die Untersuchung der P21-Expression am übrigen Patientenkollektiv zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Überlebenszeit von Patienten mit P21-positiven Tumoren und der von Patienten mit P21-negativen Tumoren. Mit zunehmender Positivität für P21 stieg auch die Überlebensrate der Patienten an. Diese Beobachtung konnten Kapranos et al. an Patienten mit Tumoren im Stadium III ebenso machen. Alle Patienten mit Stadium III-Tumoren wurden in dieser Studie einer Chemotherapie zugeführt. Die Patienten mit hoher P21-Expression hatten die bessere Überlebensrate. Die Autoren führten dies auf ein von P21-vermitteltes besseres Ansprechen auf die Chemotherapie zurück (Kapranos N. et al. 2001). Im Gegensatz dazu steht die oben angeführte Rolle von P21 bei der Apoptose. Sieht man P21 als einen Inhibitor der Apoptose, müssten Patienten mit hoher P21-Expression eher Therapieversager sein. Das bessere Ansprechen auf Chemotherapie von Patienten mit einer hohen P21-Expression wird jedoch auch durch Studien belegt, die an Tumoren anderer Organe durchgeführt wurden, so zum Beispiel an Ovarialkarzinomen (Costa M.J. et al. 1999). Im Gegensatz zur Arbeit von Kapranos et al. (2001), die P21 ausschliesslich eine Rolle als Prognosefaktor bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren zuschreiben, ist in unserer Untersuchung der

prädiktive Wert von P21 nicht an das Tumorstadium geknüpft. Eher spielt die Primärlokalisierung der Tumoren eine Rolle für die Kapazität von P21 als Prognosefaktor, wie der Vergleich zwischen der Auswertung der P21-Expression am Gesamtkollektiv und der an der Gruppe von Patienten mit Primären in Mundhöhle, Oro- und Hypopharynx zeigt. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch eine Untersuchung zur P21-Expression an Plattenepithelkarzinomen der Zunge. Auch in dieser Arbeit war eine hohe P21-Expression mit einer besseren Prognose korreliert. Der Zusammenhang zwischen der P21-Expression und der Überlebenszeit war dabei noch grösser, wenn man die Betrachtung auf Patienten mit P53-negativen Tumoren beschränkte (Xie X. et al. 2002). Widersprüchlicher werden die Angaben in der Literatur zum prognostischen Wert der P21-Expression bei Tumoren von Hypopharynx und Larynx. In einer Untersuchung an Plattenepithelkarzinomen des Sinus piriformis hatten die Patienten mit P21-positiven Tumoren zwar eine längere Überlebenszeit als Patienten mit einer geringen P21-Expression. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant. Bei den meisten Studien zu Larynxkarzinomen konnten die Autoren keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der P21-Expression und der Überlebensrate ausmachen (Jin Y.T. et al. 1998; Hirvikoski P. et al. 1999; Pruneri G. et al. 1999; Osman I. et al. 2002). Lediglich zu anderen Parametern liessen sich Bezüge herstellen. So war eine niedrige P21-Expression invers mit der Tumordifferenzierung und dem Tumorstadium (Hirvikoski P. et al. 1999) oder mit einem positiven Halslymphknotenstatus korreliert (Pruneri G. et al. 1999). Dennoch existieren auch Studien, die eine Rolle von P21 als Prognosefaktor bei Kehlkopftumoren proklamieren. Hier wird jedoch eine zu den oben genannten Ergebnissen kontroverse Aussage aufgestellt. Jeannon J.P. et al. untersuchten die P21-Expression an Larynxkarzinomen von 60 Patienten und fanden hohe P21-Level mit einer niedrigen Überlebensrate korreliert (Jeannon J.P. et al. 2000). Auch Erber R. et al. stellten einen Zusammenhang zwischen einer hohen P21-Expression und einer kurzen Überlebenszeit her (Erber R. et al. 1997). Allerdings begründet sich diese Studie auf Daten von lediglich 42 Patienten.

Die kontroversen Aussagen zur Rolle von P21 als Prognosefaktor können durch verschiedene Ursachen begründet sein. Es hat sich in unserer Studie gezeigt, dass der prognostische Wert von P21 deutlich grösser ist, wenn Patienten mit Larynxkarzinomen aus den Betrachtungen ausgeschlossen werden. Die Vermutung liegt nahe, dass P21 bei Tumoren verschiedener Regionen bzw. Histologie nicht der gleiche Stellenwert hinsichtlich der Prognose zukommt. So deutete eine niedrige P21-Expression bei Karzinomen von Lunge, Mamma, Prostata, Gastrointestinaltrakt, Blase und Cervix auf eine schlechte Prognose hin, nicht jedoch bei kolorektalen und hepatozellulären

Adenokarzinomen oder bei Pankreaskarzinomen (Pruneri G. et al. 1999). Daneben spielen sicher methodische Faktoren eine Rolle, wie zum Beispiel unterschiedlich grosse Untersuchungskollektive und/oder verschiedene Beurteilungsschemata der Positivität von Tumoren.

In bisherigen Untersuchungen an malignen Tumoren wird der P27-Expression eine unterschiedlich grosse Rolle hinsichtlich der Prognose beigemessen. Obgleich p27-Mutationen in humanen Neoplasien selten sind, ist das P27-Level in malignen Tumoren häufig reduziert (Kawamata N. et al. 1995; Choi H.R. et al. 2003). Ein Verlust von P27 zeigte in Studien an Lungen- (NSCL, Ishihara S. et al. 1999), Mamma- (Steeg S. et al. 1997) und Prostatakarzinomen (Fernandez P.L. et al. 2002) sowie an Malignomen des Gastrointestinaltrakts (Nitti D et al. 2002) vielversprechende Kapazität als Indikator für eine schlechte Prognose. Auch für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereichs postulieren einige Autoren eine prognostische Relevanz von P27. Fan G.K. et al. untersuchten immunhistochemisch die P27-Expression an 109 Larynxkarzinomen und fanden bei Patienten mit P27-positiven Tumoren eine signifikant höhere 5-Jahres-Überlebensrate als bei Patienten mit P27-negativen Tumoren. Zudem bestand eine inverse Korrelation zwischen der P27-Expression und der Tumogrösse, dem Tumorstadium und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen. In dieser Arbeit war P27 der stärkste Prognosefaktor von allen untersuchten Parametern (Fan G.K. et al. 1999). Zu entsprechenden Ergebnissen kommen weitere Autoren, welche die P27-Expression an Kehlkopfkarzinomen untersuchten (Tamura N. et al. 2001; Pruneri G. et al. 1999). Aber nicht nur in Untersuchungen an Larynxkarzinomen war P27 von prognostischem Wert. In einer Studie an 94 Karzinomen der Zunge traten bei Patienten mit einem P27-Verlust häufiger Lymphknotenmetastasen auf und die Tumoren waren meist einem T3- oder T4-Stadium zuzurechnen. Demzufolge hatten Patienten mit niedriger P27-Expression eine schlechtere Prognose (Mineta H. et al. 1999). Zu ähnlichen Resultaten kamen weitere Autoren, die die P27-Expression an Plattenepithelkarzinomen von Mundhöhle, Oro- und Hypopharynx untersuchten (Venkatesan T.K. et al. 1999; Mineta H. et al. 1999). In Übereinstimmung mit diesen Studien beobachteten auch wir eine Abnahme der P27-Expression in karzinomatösem Gewebe gegenüber der in gesundem Epithel. Die P27-Expression brachte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine prognostischen Hinweise. Betrachtete man die P27-Expression allein, so ergab sich kein Zusammenhang mit der Zeit bis zum Eintreten eines onkologischen Ereignisses bzw. mit der Überlebenszeit insgesamt. Auch zu den übrigen untersuchten Parametern wie Alter, Geschlecht, T- und N-Stadium und Therapieform liess sich keine Verbindung herstellen. In Kombination mit der

Expression von P53 bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Prognose von Patienten mit einer hohen P27-Expression und der von Patienten mit einer niedrigen P27-Expression. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Kapranos et al. überein, die weder für P27 allein noch in der Zusammenschau mit P21 und P53 einen statistisch signifikanten Wert für P27 hinsichtlich der Prognose ermitteln konnten (Kapranos N. et al. 2001). Auch Liu M. et al., welche die P27-Expression an einer Reihe von Larynx- und Hypopharynxkarzinomen untersuchten, konnten lediglich eine Korrelation zu der Tumordifferenzierung herstellen, nicht jedoch zu der Überlebenszeit der Patienten (Liu M. et al. 2003). In unserer Untersuchung bestand zwar tendenziell ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von P27 und P21. Die Kombination dieser beiden Proteine brachte jedoch keinen prognostischen Hinweis. Im übrigen sind Studien zur prognostischen Relevanz von P27 an Kopf-Halstumoren in der Literatur rar. Jedoch gibt es Studien zu anderen Tumorentitäten, die der P27-Expression ebenfalls keine prognostische Relevanz beimessen. Zum Beispiel war in Untersuchungen an Magen- oder Pankreaskarzinomen ein P27-Verlust in keinen Zusammenhang mit den übrigen klinischen und pathologischen Daten zu bringen (Feakins R.M. et al. 2000 und 2003).

5.2.7 Apoptose und Prognose

Mit einem cut-off von 0,55% zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Apoptoserate der Tumoren und der Überlebenszeit der Patienten ($p=0,04$). Dabei hatten diejenigen Patienten eine bessere Überlebensrate, deren Karzinome eine Apoptoserate $<0,55\%$ aufwiesen, d.h. eine niedrige Apoptoserate ging mit einer besseren Prognose einher. Zu einem gegenteiligen Ergebnis kommen Grabenbauer G.G. et al., welche die Apoptoserate von Oropharynxkarzinomen im Zusammenhang mit Proliferationsmarkern im Hinblick auf die Prognose nach einer adjuvanten Strahlentherapie betrachteten. Hier waren eine niedrige Apoptoserate und ein hoher Proliferationsindex mit einem ungünstigen Verlauf assoziiert (Grabenbauer G.G. et al. 2003). Auch Mandal et al. konnten an Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle eine direkte Korrelation zwischen der Apoptoserate und dem TNM-Stadium sowie eine inverse Korrelation zum histologischen Grading herstellen. Jedoch bestand kein Bezug zur Überlebensrate (Mandal A.K. et al. 2001). Stoll et al. untersuchten den Apoptoseindex an Plattenepithelkarzinomen von Mundhöhle und Oropharynx. Diese Autoren konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zu der Überlebenszeit oder der rezidivfreien Periode der Patienten herstellen (Stoll C. et al. 2000).

5.3 Schlussfolgerungen

In normalem Epithel waren P21-positive Zellen v.a. in den Zellschichten lokalisiert, die sich zwischen den basalen P53-positiven und den mehr oberflächlich gelegenen P27-positiven Zelllagen befanden. In dieser Arbeit konnten wir ein paradoxes Expressionsmuster der untersuchten Proteine beobachten. Die Expression von P53 und P21 nahm mit zunehmender karzinomatöser Veränderung des Gewebes zu, während die P27-Expression geringfügig abnahm. Apoptotische Zellen liessen sich insgesamt nur sehr vereinzelt und inhomogen verteilt im Tumorgewebe nachweisen. Diese Feststellung stimmt mit denen anderer Studien überein (Fan Z. et al. 1997; Stoll C. et al. 2000; Choi H.R. et al. 2003).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass von den vier in dieser Arbeit untersuchten Parametern lediglich die Apoptoserate und die P21-Expression als Prognosefaktoren für Patienten mit Kopf-Halstumoren in Frage kommen. Beide Faktoren waren statistisch signifikant mit der Überlebenszeit korreliert. Der prädiktive Wert von P21 war bei Tumoren aus den Bereichen Mundhöhle, Oropharynx und Hypopharynx deutlich besser als bei Larynxkarzinomen. Je höher die P21-Expression in den Tumoren war, desto besser war die Prognose der Patienten. Patienten mit einer niedrigen Apoptoserate hatten eine bessere Prognose als Patienten mit einer hohen Anzahl apoptotischer Zellen. Zwischen der Apoptoserate und der P21-Expression liess sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang herstellen. Die Proteine P53 und P27 konnten weder allein noch in Verbindung mit anderen Parametern einen Hinweis auf die Prognose der Patienten geben.

Betrachtet man die übrigen in dieser Studie untersuchten Parameter, so blieben in der multivariaten Analyse lediglich die Primärlokalisierung der Tumoren und der Lymphknotenstatus als unabhängiger prädiktiver Wert bestehen. So hatten Patienten mit Larynxkarzinomen eine deutlich bessere Prognose gegenüber Patienten mit Karzinomen der Bereiche Mundhöhle, Oro- oder Hypopharynx. Die 5-Jahres-Überlebensrate war bei Patienten mit Kehlkopftumoren signifikant höher.

Damit können aus der vorliegenden Arbeit folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

Es ist davon auszugehen, dass die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich ein Prozess ist, der sich in mehreren Schritten vollzieht und auf einer Akkumulation von verschiedenen genetischen Veränderungen beruht.

Obgleich mittlerweile eine Vielzahl der beteiligten genetischen Veränderungen identifiziert wurden, ist ihre prognostische Bedeutung nach wie vor unklar. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse tragen zwar zu einem besseren Verständnis der Entstehung und des

Verhaltens von malignen Tumoren bei. Entscheidungen über eine adäquate Therapie oder eine Abschätzung der Prognose lassen sich allerdings anhand der untersuchten Parameter nicht treffen. Bisher konnte für keinen molekularbiologischen Parameter übereinstimmend eine valide prognostische Bedeutung nachgewiesen werden.

Klinische Daten wie der Allgemeinzustand des Patienten sowie das Tumorstadium nach der UICC-Klassifikation stellen nach wie vor die einzigen gesicherten Prognosefaktoren dar.

6 Zusammenfassung

Eine Dysregulation des Zellzyklus kann über unkontrollierte Zellproliferation zur Krebsentstehung beitragen. Eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus wird dem Tumorsuppressorgen p53 zugeschrieben, das infolge eines DNA-Schadens vermehrt exprimiert wird und über die direkte oder indirekte Aktivierung weiterer Zellzyklusregulationsproteine wie P21 oder P27 einen Zellzyklusarrest oder einen aktiven Untergang von Zellen, d.h. Apoptose verursacht. Die Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren (CKIs) P21 und P27 werden z.T. auch P53-unabhängig aktiviert und können über Bindung an Cyclin/cdk-Komplexe den Zellzyklus z.T. irreversibel in der G1-, G2- oder S-Phase unterbrechen. So kann eine Vermehrung geschädigter Zellen auf verschiedene Weise verhindert werden.

An 88 Plattenepithelkarzinomen der Stadien I-IV aus den Bereichen Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx wurde immunhistochemisch mittels der ABC-Peroxidase-Methode die Expression der Proteine P21 und P27 bestimmt. Die P53-Expression wurde in einer Doppelfärbung mit P21 an 42 Präparaten in der APAAP-Technik immunhistochemisch visualisiert. Durch die in-situ-NICK-Translation wurde an 81 Tumoren der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen ermittelt. Die Auswertung der Proteinexpression erfolgte nach einem einheitlichen Beurteilungsschema, das die Präparate gemäss der Häufigkeit ihrer positiven Zellkerne vier verschiedenen Gruppen zuordnete (gering (+) bis stark positiv +++).

Anhand der Patientendaten wurde der Zusammenhang zwischen der Expression der einzelnen Proteine bzw. der Apoptoserate und der Überlebenszeit statistisch untersucht. Die Überlebenszeit wurde nach der Kaplan-Meier-Methode berechnet.

Von den vier in dieser Arbeit untersuchten Parametern kamen lediglich die Apoptoserate und die P21-Expression als Prognosefaktoren für Patienten mit Kopf-Halstumoren in Frage. So hatten Patienten mit einer niedrigen Apoptoserate eine bessere Prognose als Patienten mit einer hohen Anzahl apoptotischer Zellen. Die Überlebenszeit nahm ausserdem mit steigender P21-Expression zu. Patienten mit einer hohen P21-Expression hatten eine bessere Prognose als Patienten mit geringem P21-Nachweis. Dabei war der prädiktive Wert von P21 bei Tumoren aus den Bereichen Mundhöhle, Oropharynx und Hypopharynx deutlich besser als bei Larynxkarzinomen. Die Proteine P53 und P27 konnten weder allein noch in Verbindung mit anderen Parametern Hinweise auf die Prognose der Patienten geben. Auch unter den jeweiligen untersuchten Parametern liess sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang herstellen.

Betrachtet man die übrigen in dieser Studie untersuchten Parameter, so blieben in der multivariaten Analyse lediglich die Primärlokalisation und der Lymphknotenstatus als unabhängiger prädiktiver Wert bestehen. So hatten Patienten mit Larynxkarzinomen und einem negativem Halslymphknotenstatus eine deutlich bessere Prognose als Patienten mit Karzinomen der Bereiche Mundhöhle, Oro- oder Hypopharynx bzw. als Patienten mit Halslymphknotenfiliae.

7 Literaturverzeichnis

Arany I., Brysk M.M., Calhoun K.H., Tying S.K.

Differentiation and INF gamma regulate WAF1/Cip1 transcription in p53-dependent and p53-independent pathways in epithelial cells.

In Vivo 10 (1996) 119-123.

Asada M., Yamada T., Ichijo H., Delia D., Miyazono K., Fukumuro K., Mizutani S.

Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation.

EMBO J. 18 (1999) 1223-1234.

Barbareschi M.

Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas.

Appl Immunohistochem 4 (1996) 106-116.

Barbareschi M., Caffo O., Doglioni C. Fina P., Marchetti A., Buttitta F., Leek R., Morelli L., Leonardi E., Bevilacqua G., Dalla Palma P., Harris A.L.

p21^{WAF/Cip1} immunohistochemical expression in breast carcinoma: correlations with clinicopathological data, oestrogen receptor status, MIB1 expression, p53 gene and protein alterations and relapse free survival.

Br J Cancer 74 (1996) 208-215.

Barboule N., Baldin V., Jo S., Visal S., Valette A.

Increased level of p21^{WAF/CIP1} in human ovarian tumors is associated with increased expression of cdk2, cyclin A and PCNA.

Int J Cancer 76 (1998) 891-896.

Bhatia K., Fan S., Spangler G., Weintraub M., O'Connor P.M., Judde J.G., Magrath I.

A mutant p21 cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from a Burkitt's lymphoma.

Cancer Res 55 (1995) 1431-1435.

Billon N., van Grunsven L.A., Rudkin B.B.

The CDK inhibitor p21^{WAF/CIP1} is induced through a p300-dependent mechanism during NGF mediated neuronal differentiation of PC12 cells.

Oncogene 13 (1996) 2047-2054.

Birchall M.A., Schock E., Harmon B.V., Gobe G.

Apoptosis, mitosis, PCNA and bcl-2 in normal, leucoplakic and malignant epithelia of the human oral cavity: prospective, in vivo study.

Oral Oncol 33 (1997) 419-425.

Bischoff J.R., Friedmann P.N., Marshak D.R., Prives C., Beach D.

Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2.

Proc Natl Acad Sci USA 87 (1990) 4766-4770.

Bonkowsky V., Wollenberg B., Siefert A., Zimmermann F.

Manual Kopf-Hals-Malignome.

Malignome des Kehlkopfs.
W. Zuckschwerdt Verlag München, 2003, 3. Auflage, 163-171.

Borresen-Dale AL.
TP53 and breast cancer.
Hum Mutat 21 (2003) 292-300.

Breimann L., Friedman J., Olshen R., Stone C.
Classification and regression trees (CART).
Chapman and Hall, New York, 1984.

Brugarolas J., Chandrasekaran C., Gordon J.I., Beach D., Jacks T., Hannon G.J.
Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency.
Nature 377 (1995) 552-557.

Caelles C., Helmberg A., Karin M.
p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes.
Nature 370 (1994) 220-223.

Calzolari A., Chiarelli I., Bianchi S., Messerini L., Gallo O., Porfirio B., Mattiuz P.L.
Immunohistochemical vs. molecular biology methods. Complementary techniques for effective screening of p53 alterations in head and neck cancer.
Am J Clin Pathol 107 (1997) 7-11.

Chen J., Jackson P.K., Kirschner M.W., Dutta A.
Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA.
Nature (Lond.) 374 (1995) 386-388.

Chen Y.J., Lin J.K., Lin-Shiau S.Y.
Proliferation arrest and induction of CDK inhibitors p21 and p27 by depleting the calcium store in cultured C6 glioma cells.
Eur J Cell Biol 78 (1999) 824-831.

Cheng Y.L., Lee S.C., Harn H.J., Chen C.J., Chang Y.C., Chen J.C., Yu C.P.
Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p53 and p16 in resected non-small cell lung cancer.
Eur J Cardiothorac Surg 23 (2003) 221-8.

Cho K.R., Vogelstein B.
Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence.
Cancer 70 (1992) 1727-31.

Choi H.R., Tucker S.A., Huang Z., Gillenwater A.M., Luna M.A., Batsakis J.G., El-Naggar A.K.
Differential expressions of cyclin-dependent kinase inhibitors (p27 and p21) and their relation to p53 and Ki-67 in oral squamous tumorigenesis.
Int J Oncol 22 (2003) 409-414.

Ciaparrone M., Yamamoto H., Yao Y., Scambato A., Cattoretti G., Tomita N., Monden T., Rotterdam H., Weinstein I.B.

Localisation and expression of p27^{KIP1} in multistage colorectal carcinogenesis.
Cancer Research 58 (1998) 114-122.

Cooper M.P., Balajee A.S., Bohr V.A.
The C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair in vitro and in vivo.
Mol Biol Cell 10 (1999) 2119-2129.

Cordon-Cardo C.
Mutation of cell cycle regulators.
Am J Pathol 147 (1995) 545-560.

Costa M.J., Hansen C.L., Walls J.E., Scudder S.A.
Immunohistochemical markers of cell cycle control applied to ovarian and primary peritoneal surface epithelial neoplasms: p21^{WAF/Cip1} predicts survival and good response to platinum-based chemotherapy.
Hum Pathol 30 (1999) 640-647.

Cote R.J., Shi Y., Groshen S., Feng A.C., Cordon-Cado C., Skinner D., Lieskovosky G.
Association of p27Kip1 levels with recurrence and survival in patients with stage C prostate carcinoma.
J Natl Cancer Inst 90 (1998) 916-920.

Cox D.
Regression models and life-tables.
Stat Soc Br 34 (1972) 187-220.

Crowe D.L., Hacia J.G., Hsieh C.-L., Sinha U.K., Rice D.H.
Molecular pathology of head and neck cancer.
Histology and Histopathology 17 (2002) 909-914.

Datto M.B., Li Y., Panus J.F., Howe D.C., Xiong Y., Wang X.F.
Transforming growth factor induces cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism.
Proc Natl Acad Sci USA 92 (1995) 5545-5549.

Deng C., Zhang P., Harper J.W., Elledge S.J., Leder P.
Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control.
Cell 82 (1995) 675-684.

Di Cunto F., Topley G., Calautti E., Hsiao J., Ong L., Seth P.K., Dotto G.P.
Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control.
Science 280 (1998) 1069-1072.

Donehower L.A.
The p53-deficient mouse: A model for basic and applied cancer studies.
Semin Cancer Biol 7 (1996) 269-278.

Ekholm S.V., Reed S.I.
Regulation of G1-cyclin dependent kinases in the mammalian cell cycle.
Curr Opin Cell Biol 12 (2000) 676-684.

El-Deiry W.S.
Regulation of p53 downstream genes.
Semin Cancer Biol 8 (1998) 345-357.

El-Deiry W.S., Harper J.W., O'Connor P.M.
WAF/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis.
Cancer Res 54 (1994) 1169-1174.

El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., Vogelstein B.
WAF-1, a potential mediator of p53 tumour suppression.
Cell 75 (1993) 817-825.

El-Deiry W.S., Tokino T., Walsmann T., Oliner J.D., Velculescu V.E., Burrell M., Hill D.E., Healy E., Rees J.L., Hamilton S.R., Kinzler K.W., Vogelstein B.
Topological control of p21 (WAF1/CIP1) expression in normal and neoplastic tissues.
Cancer Res 55 (1995) 2910-2919.

Erber R., Klein W., Andl T., Enders C., Born A.I., Conradt C., Bartek J., Bosch F.X.
Aberrant p21(CIP1/WAF1) protein accumulation in head and neck cancer.
Int J Cancer 74 (1997) 383-389.

Erlanson M, Portin C, Linderholm B, Lindh J, Roos G, Landberg G.
Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications.
Blood. 92 (1998) 770-7.

Fan G.K., Fujieda S., Sunaga H., Tsuzuki H., Ito N., Saito H.
Expression of protein p27 is associated with progression and prognosis in laryngeal cancer.
Laryngoscope 109 (1999) 815-820.

Fan Z., Shang B.Y., Lu Y., Chou J.L., Mendelson J.
Reciprocal changes in p27^{Kip1} and p21^{Cip1} in growth inhibition mediated by blockage or overstimulation of epidermal growth factor receptors.
Clin Cancer Res 3 (1997) 1943-1948.

Feakins R.M., Ghaffar A.H.
p27(Kip1) expression is reduced in pancreatic carcinoma but has limited prognostic value.
Hum Pathol 43 (2003) 385-390.

Feakins R.M., Mulcahy H.E., Quaglia A., Jawhari A., Zhang Z., Patche S.E.
p27(Kip1) loss does not predict survival in patients with advanced gastric carcinoma.
Cancer 89 (2000) 1684-1691.

Fernandez PL, Hernandez L, Farre X, Campo E, Cardesa A.
Alterations of cell cycle-regulatory genes in prostate cancer.
Pathobiology 70 (2002) 1-10.

Fero M.L., Randel E., Gurley K.E., Roberts J.M., Kemp C.J.
The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression.
Nature. 396 (1998) 177-80.

Fogel S., Ahomadegbe J.C., Barrois M., Le Bihan M.L., Douc-Rasy S., Duviillard P., Armand J.P., Riou G.
High incidence of p53 mutations in primary and metastatic head and neck tumors. Frequent protein overexpression in normal epithelium.
Bull Cancer 83 (1996) 227-233.

Fu L., Minden M.D., Benchimal S.
Translational regulation of human p53 gene expression.
EMBO J 15 (1996) 4392-4401.

Gartel A.L., Tyner A.L.
The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis.
Molecular cancer therapeutics 1 (2002) 639-649.

Gartel A.L., Tyner A.L.
Transcriptional regulation of the p21 (WAF1/CIP1) gene.
Exp. Cell Research 246 (1999) 280-289.

Gastman B.R., Snyderman C.H.
Apoptosis and its clinical impact.
Head Neck 23 (2001) 409-25.

Gibbs E., Kelman Z., Gulbis J.M., O'Donnell M., Kuriyan J., Burgers P.M., Hurwitz J.
The influence of proliferating cell nuclear antigen-interacting domain of p21(Cip1) on DNA synthesis catalyzed by the human and *Saccharomyces cerevisiae* polymerase delta holoenzymes.
J Biol Chem 272 (1997) 2373-2381.

Gorospe M., Wang X., Holbrook N.J.
p53-dependent elevation of p21 WAF1 expression by UV light is mediated through mRNA stabilization and involves a vandate-sensitive regulatory system.
Molec Cell Biol 18 (1998) 1400-1407.

Grabenbauer G.G., Suckorada O., Niedobitek G., Rodel F., Iro H., Sauer R., Rodel C., Schultze-Mosgau S., Distel L.
Imbalance between proliferation and apoptosis may be responsible for treatment failure after postoperative radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oropharynx.
Oral Oncol 39 (2003) 459-69.

Greenblatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M., Harris C.C.
Mutations in the p53 tumor suppressor gene, clues to cancer etiology and molecular pathogenesis.
Cancer Research 54 (1994) 4855-4878.

Grossi F., Loprevite M., Chiamondia M., Ceppa P., Pera C., Ratto G.B., Serrano J., Ferrara G.B., Costa R., Boni L., Ardizzoni A.

Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancers.
Eur J Cancer 39 (2003) 1242-1250.

Gu Y., Turck C.W., Morgan D.O.
Inhibition of cdk2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit.
Nature 366 (1993) 707-710.

Halevy O., Novitch B.G., Spicer D.B., Skapek S.X., Rhee J., Hannon G.J., Beach D., Lassar A.B.
Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21^{WAF1/Cip1} by MyoD.
Science 267 (1995) 1018-1021.

Harada K., Ogden G.R.
An overview of the cell cycle arrest protein, p21(WAF1).
Oral Oncol 36 (2000) 3-7.

Harper J.W., Adami G.R., Wie N., Keyomarsi K., Elledge S.J.
The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin dependent kinases.
Cell 75 (1993) 805-816.

Harper J.W., Elledge S.J., Keyomarsi K., Dynlacht B., Tsai L., Zhang P., Dobtowolski S., Bai C., Connel-
Crowley L., Swindell E., Fox M.P., Wie N.
Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21.
Mol Biol Cell 6 (1995) 387-400.

Hengst L., Dulic V., Slingerland J.M., Lees E., Reed S.I.
A cell-cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases.
Proc Natl Sci USA 91 (1994) 5291-5295.

Hengst L., Reed S.L.
Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle.
Science 271 (1996) 1861-1864.

Hirvikoski P., Kellokoski JK, Kumpulainen EJ, Virtaniemi JA, Johansson RT, Kosma VM.
Downregulation of p21/WAF1 is related to advanced and dedifferentiated laryngeal squamous cell
carcinoma.
J Clin Pathol. 52 (1999) 440-444.

Hollstein M., Rice K., Greenblatt M.S., Soussi T., Fuchs R., Surlie T., Hovig E., Smith-Sorensen B.,
Montesano R., Harris C.C.
Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines.
Nucleic Acids Res 22 (1994) 3551-3555.

Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C.
p53 mutations in human cancers.
Science 253 (1991) 49-53.

Homma A, Furuta Y, Oridate N, Nakano Y, Kohashi G, Yagi K, Nagahashi T, Yagi K, Nagahashi T, Fukuda
S, Inoue K, Inuyama Y.
Prognostic significance of clinical parameters and biological markers in patients with squamous cell

carcinoma of the head and neck treated with concurrent chemoradiotherapy.
Clin Cancer Res 5 (1999) 801-806.

Hsu S.M., Raine L.
 Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry.
J Histochem Cytochem 29 (1981) 1349-1353.

Hunter T., Pines J.
 Cyclins and cancer.II: Cyclin D and cdk inhibitors come of age.
Cell 79 (1994) 573-582.

Hupp T.R., Meek D.W., Midgley C.A., Lane D.P.
 Regulation of the specific DNA binding function of p53.
Cell 71 (1992) 875-886.

Ishihara S., Minato K., Hoshino H., Saito R., Hara F., Nakajima T., Mori M.
 The cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer: its immunohistochemical evaluation using biopsy specimens.
Lung Cancer 26 (1999) 187-194.

Jeannon J.P., Soames J., Lunec J., Awwad S., Ashton V., Wilson J.A.
 Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1) and p53 tumour suppressor gene in laryngeal cancer.
Clin Otolaryngol & Allied Sciences 25 (2000) 23-27.

Jiang H., Fisher P.B.
 Use of a sensitive and efficient subtraction hybridisation protocol for the identification of genes differentially regulated during the induction of differentiation in human melanoma cells.
Molec Cell Different 1 (1993) 285-299.

Jiang H., Lin J., Su Z., Collart F.R., Huberman E., Fisher P.B.
 Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21^{WAF1/Cip1} expression in the absence of p53.
Oncogene 9 (1994) 3397-3406.

Jin YT, Kayser S., Kemp B.L., Ordonez N.G., Tucker S.L., Clayman G.L., Goepfert H., Luna M.A., Batsakis J.G., El-Naggar A.K.
 The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma.
Cancer 82 (1998) 2159-2165.

Kaplan E.L., Meier P.
 Nonparametric estimation form incomplete observations.
J Am Stat Assos 53 (1958) 157-181.

Kapranos N., Stathopoulos G.P., Manolopoulos L., Kokka E., Papadimitriou C., Bibas A., Yiotakis J., Adamopoulos G.

p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value.
Anticancer Res 21(1B) (2001) 521-528.

Kashiwazaki H., Tonoki H., Tada M., Chiba I., Sindoh M., Totsuka Y., Iggo R., Moriuchi T.
 High frequency of p53 mutations in human oral epithelial dysplasia and primary squamous cell carcinoma detected by yeast functional assay.
Oncogene 15 (1997) 2667-2674.

Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin KS, Nakamaki T, Takeuchi S, Hatta Y, Simpson J, Wilczynski S.
 Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies.
Cancer Res 55 (1995) 2266-2269.

Kawasaki T., Tomita Y., Bilim V., Takeda M., Takahashi K., Kumanishi T.
 Abrogation of apoptosis induced by DNA-damaging agents in human bladder cancer cell lines with p21/WAF1/Cip1 and/or p53 gene alterations.
Int J Cancer 68 (1996) 501-505.

Koch W.M., Brennan J.A., Zahurak M., Goodman S.N., Westra W.H., Schwab D., Yoo G.H., Lee D.J., Forastiere A.A., Sidransky D.
 p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma.
J Natl Cancer Inst. 88 (1996) 1580-1586.

Koff A., Ohtsuki M., Polyak K., Roberts J.M., Massague J.
 Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclinE-dependent kinase by TGF-beta.
Science 260 (1993) 536-539.

Koh J.Y., Cho N.P., Kong G., Lee J.D., Yoon K.
 p53 mutations and human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma: correlation with apoptosis.
Br J Cancer 78 (1998) 354-359.

Koolman J., Röhm K.-H.
 Taschenatlas der Biochemie.
 Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994.

Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends.
 Herausgeber Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut, Dachdokumentation Krebs.
 3. Auflage. Saarbrücken, 2002.

Kudo Y., Takata T., Ogawa I., Sato S., Nikai H.
 Expression of p53 and p21CIP1/WAF1 proteins in oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas.
Oncol Rep 6 (1999) 539-545.

Lee H.S., Lee H.K., Kim H.S., Yang H.K., Kim W.H.
 Tumor suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis.
J Pathol 200 (2003) 39-46.

- Levine A.J., Momand J., Finlay C.A.
The p53 tumor suppressor gene.
Nature 351 (1991) 453-456.
- Li Y., Jenkins C.W., Nichols M.A., Xiong Y.
Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF/CIP1}.
Oncogene 9 (1994) 2261-8.
- Liu M., Lawson G., Delos M., Jamart J., Chatelain B., Remacle M., Marbaix E.
Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx.
Eur Arch Otorhinolaryngol 260 (2003) 28-34.
- Luo Y., Hurwitz J., Massague J.
Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21.
Nature 375 (1995) 159-161.
- Macleod K.F., Sherry N., Hannon G., Beach D., Tokino T., Kinzler K., Vogelstein B., Jacks T.
P53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation and DNA damage.
Genes and Development 9 (1995) 935-944.
- Mainwaring P.N., Ellis P.A., Detre S., Smith I.E., Dowsett M.
Comparison of in situ methods to assess DNA cleavage in apoptotic cells in patients with breast cancer.
J Clin Pathol 51 (1998) 34-37.
- Mandal A.K., Verma D., Mohanta P.K., Saha R., Maeda T., Sugino T., Sujuki T., Tanaka M.
Prognostic significance of apoptosis in squamous cell carcinoma of oral cavity with special reference to TNM stage, histological grade and survival.
Indian J Pathol Microbiol 44 (2001) 257-259.
- Marshall C.J.
Tumor suppressor genes.
Cell 64 (1991) 313-326.
- Mc Donald E.R., Wu G.S., Waldmann T., El-Deiry W.S.
Repair defect in p21^{WAF1/Cip1} -/- human cancer cells.
Cancer Res 56 (1996) 2250-2255.
- Michieli P., Chedid M., Lin D., Pierce J.H., Mercer W.E., Givol D.
Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway.
Cancer Res 54 (1994) 3391-3395.
- Mineta H., Miura K., Suzuki I., Takebayashi S., Amano H., Araki K., Harada H., Ichimura K., Wennerberg J.P., Dictor M.R.
Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma.
Cancer 85 (1999) 1011-1017.

Mineta H., Miura K., Suzuki I., Takebayashi S., Misawa K., Ueda Y., Ichimura K.
p27 expression correlates with prognosis in patients with hypopharyngeal cancer.
Anticancer Res 19 (1999) 4407-4412.

Moragn D.O.
Principles of CDK regulation.
Nature (Lond.) 374 (1995) 131-134.

Mori M., Mimori K., Shiraishi T., Tanaka S., Ueo H., Sugimachi K., Akiyoshi T.
p27 expression and gastric carcinoma.
Nat med 3 (1997) 593.

Murphy M., Ahn J., Walker K.K., Hoffman W.H., Evans R.M., Levine A.J., George D.L.
Transcriptional repression by wild type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a.
Genes Dev 13 (1999) 2490-2501.

Murray A.W., Hunt T.
The cell cycle: an introduction.
New York, Freeman, 1993.

Nadal A., Jares P., Cazorla M., Fernandez P.L., Sanjuan X., Hernandez L., Pinyol M., Aldea M., Mallofre C., Traserra J., Campo E., Cardesa A.
p21^{WAF/Cip1} expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinomas of the larynx.
J Pathol 183 (1997) 156-163.

Narayana A., Vaughan A.T., Gunaratne S., Kathuria S., Walter S.A., Reddy S.P.
Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma?
Cancer. 82 (1998) 286-291.

Niculescu A.R., Chen X., Smeets M., Hengst L., Prives C., Reed S.I.
Effects of p21 (Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication.
Mol Cell Biol 18 (1998) 629-643.

Nitti D, Belluco C, Mammano E, Marchet A, Ambrosi A, Mencarelli R, Segato P, Lise M.
Low level of p27(Kip1) protein expression in gastric adenocarcinoma is associated with disease progression and poor outcome.
J Surg Oncol 81 (2002) 167-175.

Noda A., Ning Y., Venable S.F., Pereria-Smith O.M., Smith J.R.
Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen.
Exp Cell Res 211 (1994) 90-98.

Nurse P.
Universal control mechanism in regulating onset of M-phase.
Nature 344 (1990) 503-508.

Nylander K., Schildt E.B., Erikson M., Roos G.
 PCNA, Ki-67, p53, bcl-2 and prognosis in intraoral squamous cell carcinoma of head and neck.
Anal Cell Pathol 14 (1998) 101-110.

O'Hanlon D.M., Kiely M., Mac Conmara M., Al-Azzawi R., Connolly Y., Jeffers M., Keane F.B.
 An immunohistochemical study of p21 and p53 expression in primary node positive breast carcinoma.
Eur J Surg Oncol 28 (2002) 103-107.

Osman I., Sherman E., Singh B., Venkatraman E., Zelefsky M., Bosl G., Scher H., Shah J., Shaha A., Kraus D., Cordon-Cardo C., Pfister D.G.
 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. 20 (2002) 2980-2987.

Pagano M., Tam S.W., Theodoras A.M., Beer-Romero P., Del Sal G., Chau V., Yew P.R., Draetta G.F., Rolfe M.
 Role of the ubiquitine proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27.
Science 269 (1995) 682-685.

Palmqvist R., Stenling R., Oberg A., Landberg G.
 Prognostic significance of p27(Kip1) expression in colorectal cancer: a clinico-pathological characterization.
J Pathol 188 (1999) 18-23.

Parker S.B., Eichele G., Zhang P., Rawls A., Sands A.T., Bradley A., Olson E.N., Harper J.W., Elledge S.J.
 p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells.
Science 267 (1995) 1024-1027.

Pena J.C., Thompson C.B., Recant W., Vokes E.E., Rudin C.M.
 Bcl-xL and Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of head and neck.
Cancer 85 (1999) 164-170.

Piva R., Cavalla P., Bortolotto S., Cordera S., Richiardi P., Schiffer D.
 p27/kip1 expression in human astrocytic gliomas.
Neurosci Lett. 243 (1997) 127-30.

Podust V.N., Podust L.M., Goubin F. Ducommun B., Hubscher U.
 Mechanism of inhibition of proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA synthesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21.
Biochemistry 34 (1995) 8869-8875.

Polyak K., Kato J.Y., Solomon M.J., Sherr C.J., Massague J., Roberts J.M., Koff A.
 p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest.
Genes Dev. 8 (1994) 9-22.

Polyak K., Lee M.H., Erdjument-Bromage H., Koff A., Roberts J.M., Tempst P., Massague L.
 Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular

antimitogenic signals.

Cell 78 (1994) 59-66.

Ponce-Castaneda M.V., Lee M.H., Latres E., Polyak K., Lacombe L., Montgomery K., Mathew S., Krauter K., Sheinfeld J., Massague J.

p27Kip1, chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors.

Cancer Res 55 (1995) 1211-1214.

Poon R.Y., Hunter T.

Expression of a novel form of p21^{WAF/CIP1} in UV-irradiated and transformed cells.

Oncogene 16 (1998) 1333-1343.

Pruneri G., Pignataro L., Carboni N., Buffa R., Di Finizio D., Cesana B.M., Neri A.

Clinical relevance of expression of the CIP/KIP cell-cycle inhibitors p21 and p27 in laryngeal cancer.

J Clin Oncol. 17 (1999) 3150-3159.

Raj K., Ogston P., Beard P.

Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity.

Nature 412 (2001) 914-917.

Raman V., Martensen S.A., Reismann D., Evron E., Odenwald W.F., Jaffee E., Marks J., Sukumar S.

Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumors.

Nature 405 (2000) 974-978.

Ruan S., Okcu M.F., Ren J.P., Chiao P., Andreeff M., Levin V., Zhang W.

Overexpressed WAF1/Cip1 renders glioblastoma cells resistant to chemotherapy agents 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin.

Cancer Res 58 (1998) 1538-1543.

Sakai E., Tsuchida N.

Most human squamous cell carcinoma in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes.

Oncogene 7 (1992) 927-933.

Sanchez-Beato M., Saez A.I., Martinez-Montero J.C., Sol Mateo M., Sanchez-Verde L., Villuendas R., Troncione G., Piris M.A.

Cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 in lymphoid tissue: p27KIP1 expression is inversely proportional to the proliferative index.

Am J Pathol. 151 (1997) 151-60.

Sarnow P., Ho Y.S., Williams J., Levine A.J.

Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells.

Cell 28 (1982) 387-394.

Saunders M.E., Mac Kenzie R., Shipman R., Fransen E., Girbert R., Jordan R.C.

Patterns of p53 gene mutations in head and neck cancer: fulllength gene sequencing and results of primary radiotherapy.

Clin Cancer Res 5 (1999) 2455-2463.

Schlesinger-Raab A., Lang S., Steuer-Vogt M.K., Hölzel D.
Manual Kopf-Hals-Malignome.
Zur Epidemiologie der Kopf-Hals-Malignome.
W. Zuckschwerdt Verlag, München, 2003, 3. Auflage, 3-14.

Sherr C.J.
Mammalian G1-cyclins.
Cell 73 (1993) 1059-1065.

Sherr C.J., Roberts J.M.
CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.
Genes Dev 13 (1999) 1501-1512.

Sherr C.J., Roberts J.M.
Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases.
Genes Dev. 9 (1995) 1149-1163.

Shi Y.
A structural view of mitochondria-mediated apoptosis.
Nat Struct Biol. 8 (2001) 394-401.

Shin D.M., Lee J.S., Lippmann S.M., Lee J.J., Tu Z.N., Choi G., Heyne K., Shin H.J., Ro J.Y., Göpfert H.,
Hong W.K., Hittelman W.N.
p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell
carcinoma.
J Natl Cancer Inst 88 (1996) 519-29.

Shintani S., Milhara M., Nakahara Y., Kiyota A., Ueyama Y., Matsumura T., Wong D.T.
Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral
cavity.
Oral Oncol 38 (2002) 235-243.

Shiohara M., El-Deiry W.S., Wada M., Nakamaki T., Takeuchi S., Yang R., Chen D.L., Vogelstein B.,
Koeffler H.P.
Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies.
Blood 84 (1994) 3781-3784.

Shirane M., Harumiya Y., Ishida N., Hirai A., Miyamoto C., Hatakeyama S., Nakayama K., Kitagawa M.
Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic
processing.
J Biol Chem 274 (1999) 13886-13893.

Sjalander A., Birgander R., Rannug A., Alexandie A.K., Tornling G., Beckmann G.
Association between the p21 codon 31 A1 (Arg) allele and lung cancer.
Hum Hered 46 (1996) 221-225.

Slingerland J.M., Hengst L., Pan C.H., Alexander D., Stampfer M.R., Reed S.I.
A novel inhibitor of cyclin-cdk activity detected in transforming growth factor β -arrested epithelial cells.
Mol Cell Biol 14 (1994) 3683-3694.

Soda G., Antonaci A., Bosco D., Nardoni S., Melis M.
Expression of bcl-2, c-erb B-2, p53 and p21 (waf1-cip1) protein in thyroid carcinomas.
J Expression Clin Cancer Res 18 (1999) 363-367.

Somers K.D., Merrick M.A., Lopez M.E., Schlechter G.L., Casey G.
Frequent p53-mutations in head and neck cancer.
Cancer Res 52 (1992) 5997-6000.

Staib F., Hussain S.P., Hofseth L.J., Wang X.W., Harris C.C.
TP53 and liver carcinogenesis.
Hum Mutat 21 (2003) 201-216.

Steeg P.S., Abrams J.S.
Cancer prognostics: past, present and p27.
Nat Med. 3 (1997) 152-154.

Steinmann R.A., Hoffman B., Iro A., Guillof C., Liebermann D.A., El-Houseini M.E.
Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation.
Oncogene 9 (1994) 3389-3396.

Stewart B.W.
Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical and cellular indicators.
J. Natl. Cancer Inst. 86 (1994) 1286-1296.

Stoll C., Baretton G., Ahrens C., Löhrs U.
Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma.
Virchows Arch 436 (2000) 102-108.

Stoll C., Baretton G., Löhrs U.
The influence of p53 and associated factors on the outcome of patients with oral squamous cell carcinoma.
Virchows Arch 433 (1998) 427-433.

Suardet L., Li C.A., Little J.B.
Radio-induced modulation of transforming growth factor beta 1 sensitivity in a p53 wild-type human colorectal-cancer cell line.
Int J Cancer 68 (1996) 126-131.

Tamura N, Dong Y, Sui L, Tai Y, Sugimoto K, Nagahata S, Tokuda M.
Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is related to cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas.
J Laryngol Otol 115 (2001) 400-406.

Tatemoto Y., Osaki T., Yoneda K., Yamamoto T., Veta E., Kimura T.
Expression of p53 and p21 proteins in oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis

and response to chemoradiotherapy.
Pathol Res Pract 194 (1998) 821-830.

Thompson C.B.
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.
Science 267 (1995) 1456-1462.

Toyoshima H., Hunter T.
p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21.
Cell 78 (1994) 67-74.

Tsihlias J., Kapusta L., Slingerland J.
The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer.
Annu Rev Med 59 (1999) 401-423.

Van de Putte G., Holm R., Lie A.K., Trope C.G., Kristensen G.B.
Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis.
Gynecol Oncol 89 (2003) 140-147.

Vaux D.L., Korsmeyer S.J.
Cell death in development.
Cell 96 (1999) 254-254.

Venkatesan T.K., Kuropkat C., Caldarelli D.D., Panje W.R., Hutchinson J.C., Chen S., Coon J.S.
Prognostic significance of p27-expression in carcinoma of the oral cavity and oropharynx.
Laryngoscope 109 (1999) 1329-1333.

Vogelstein B., Kinzler K.W.
Achilles`heel of cancer?
Nature 412 (2001) 865-866.

Vogelstein B., Kinzler K.W.
p53 function and dysfunction.
Cell 70 (1992) 523-526.

Vousden K.H.
p53:death star.
Cell 101 (2000) 691-694.

Waga S., Hannon G., Beach D., Stillman B.
The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA.
Nature 369 (1994) 574-578.

Waldmann T., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B.
Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking WAF1/Cip1.
Nature 381 (1996) 713-716.

Wang J., Walsh K.
Resistance to apoptosis conferred by cdk inhibitors during myocyte differentiation.
Science (Wash.D.)273 (1996) 359-361.

Weber A., Tannapfel A.
 Prognosefaktoren bei Kopf-Hals-Karzinomen.
 HNO 50 (2002) 35-42.

Webster G.A., Perkins N.D.
 Transcriptional cross talk between NF kappaB and p53.
 Moll Cell Biol 19 (1999) 3485-3495.

Welkoborsky H.P., Hinni M., Dienes H.P., Mann W.J.
 Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometrie, tumor front grading, and proliferation markers.
 Ann Otol Rhinol Laryngol 104 (1995) 503-510.

Werness B.A., Levine A.J., Howley P.M.
 Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53.
 Science 248 (1990) 76-79.

Whyte D.A., Broton C.E., Shillitoe E.J.
 The unexplained survival of cells in oral cancer: what is the role of p53?
 Oral pathology and medicine 31 (2002) 125-133.

Woods D. B., Vousden K.H.
 Regulation of p53 function.
 Experimental Cell Research 264 (2001) 56-66.

Wouters B.G., Giaccia A.J., Denko N.C., Brown J.M.
 Loss of p21 WAF1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis-independent mechanism.
 Cancer Res 54 (1997) 4703-4706.

Xie X., Clausen O.P.F., Boysen M.
 Prognostic significance of p21^{WAF1/Cip1} expression in tongue squamous cell carcinomas.
 Arch Otolaryngol Head Neck Surg 128 (2002) 897-902.

Xie X., De Angelis P., Clausen O.P., Boysen M.
 Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas.
 Oral Oncol 35 (1999) 502-509.

Xiong Y., Hannon G.J., Zang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D.
 P21 is a universal inhibitor of cyclin kinase.
 Nature 366 (1993) 701-704.

Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Mizuno A.
 p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors.
 Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 94 (2002) 593-600.

Yasui W., Akama Y., Kuniyasu H., Yokozaki H., Semba S., Shimamoto F., Tahara E.
 Expression of cyclin dependent kinase inhibitor p21^{WAF/Cip1} in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the

stomach: relationship with p53 status and proliferative activity.

J Pathol 180 (1996) 122-128.

Yasui W., Kudo Y., Semba S., Yokozaki H., Tahara E.

Reduced expression of cyclin –dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas.

Jpn Cancer Res 88 (1997) 625-629.

Yatabe Y., Masuda A., Koshikawa T., Nakamura S., Kuroishi T., Osada H., Takahashi T., Mitsudomi T.

p27KIP1 in human lung cancers: differential changes in small cell and non-small cell carcinomas.

Cancer Res 58 (1998) 1042-1047.

Yook J.I., Kim J.

Expression of p21-WAF1/Cip1 is unrelated to p53 tumor-suppressor gene status in oral squamous cell carcinomas.

Oral Oncology 34 (1998) 198-203.

Yoshida K., Murohashi I., Bessho M., Hirashima K.

p53-independent induction of p21 (WAF1/Cip1) during differentiation of HL-60 cells by tumor necrosis factor alpha.

Experimental hematology 25 (1997) 166.

Yuen P.W., Lam K.Y., Choy J.T., Ho W.K., Wei W.I.

Clinicopathological significance of p53 and p21 expression in the surgical treatment of laryngeal carcinoma.

Anticancer Res. 20 (2000) 4863-4866.

Zeng Y.X., El-Deiry W.S.

Regulation of p21 WAF1/Cip1 expression by p53-independent pathways.

Oncogene 12 (1996) 1557-1564.

Zhang H., Xiong Y., Beach D.

Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes.

Mol Biol Cell 4 (1993) 897-906.

Zhang Y., Fujita N., Tsuruo T.

Caspase-mediated cleavage of p21 WAF1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis.

Oncogene 18 (1999) 1131-1138.

Zhou B.P., Liao Y., Xia W., Spohn B., Lee M.H., Hung M.C.

Cytoplasmic localisation of p21^{WAF/CIP1} by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells.

Nat Cell Biol 3 (2001) 254-252.

8 Anhang

In-situ-NICK-Translation

1. Entparaffinieren, Rehydrieren (2x jew. 10` RT Xylol, dann absteigende Alkoholreihe)
a. dest.
2. 15` RT (Raumtemperatur) 0,0002% Proteinase K (40µl 0,25% PK ad 50ml PBS, 10` RT Vorinkubation)
a. dest.
3. 10` RT 3% H₂O₂
a. dest.
4. 10` RT 1x NICK Puffer, 100 µl pro Schnitt, feuchte Kammer
10x NICK Puffer (-70°C):

TRIS 1M	1000µl
MgCl 1M	100µl
β-Mercaptoethanol 13M	15µl
BSA 20mg/ml	10µl
a. dest.	875µl

nur abkippen!
5. 65` 37°C NICK-Translation

je 0,8µl dNTPs	2,4µl
10x NICK Puffer	4,0µl
Biotin-7-dATP	2,0µl
a. dest.	29,6µl
Klenow-Pol. 2U/µl <u>2,0µl</u>	40,0µl pro Schnitt
6. 15` RT Terminationspuffer

NaCl	8,8g
NaCitrat	<u>4,4g</u>
	ad 500ml H ₂ O
7. 10` RT PBS
8. 10` RT 1% FCS in PBS
9. 5` RT PBS
10. 30` 37°C Extravidinperoxidase (Sigma) 1:50, 100µl pro Schnitt
Verdünnungs (Peroxidase) puffer:

BSA	100mg
Tween 20	50µl
PBS 0,05M	10µl
11. 5` RT PBS
12. DAB (Sigma D 4293) 5ml in 7ml a. dest. Lösen, pro Schnitt 150µl, unter Mikroskop kontrollieren
13. 5` fließend wässern
a. dest
14. 10` RT Acetatpuffer 0,1M pH 4,0
15. 5` RT Methylgrün

Acetatpuffer 0,1M pH 4,0	200µl
Methylgrün	0,4g

a. dest.
16. 5` RT N-Butanol (2x)
17. Xylol (2x), Eindecken

Immunhistochemischer Nachweis von P21

1. Tag:

1. Entparaffinieren, Rehydrieren, Blockade der endogenen Peroxidase (PO):
jew. 10` RT Xylol
3` RT Ethanol 100%
15` RT H₂O₂ Methanol (6ml H₂O₂ auf 200ml Methanol)
3` RT Ethanol 100%
jew. 3` RT Ethanol 96%, 70%, 50%
a. dest.
2. Andauung mittels TUF (target unmasking fluid):
TUF + a. dest. im Verhältnis 1:3 im Wasserbad in der Mikrowelle erhitzen (4x 5` mittlere Leistungsstärke)
3. 10` RT PBS
4. 30` RT FCS, 100µl pro Schnitt, feuchte Kammer
5. 18 Stunden RT P21-Antikörper 1:25 in 0,1M PBS, pH 7,2-7,4

2. Tag:

1. 5` RT PBS+Brij Detergens
2. 30` RT Biotin- α -mouse, 100µl pro Schnitt, feuchte Kammer
5` RT PBS+Brij Detergens
3. 30` RT ABC-System, 100µl pro Schnitt, feuchte Kammer
5` RT PBS+Brij Detergens
4. 15` RT Biotin- α -mouse, 100µl pro Schnitt, feuchte Kammer
5` RT PBS+Brij Detergens
5. 15` RT ABC-System, 100µl pro Schnitt, feuchte Kammer
6. 15` RT PBS
7. Färbung:
Farbansatz: 1 Tbl. AEC (=Amino-ethyl-carbazol) in 12ml DMSO (=Dimethylsulfoxid) auflösen, 10ml H₂O₂ (=Starter) + 200ml PBS + Brij Detergens + HCL (pH 5-6) mischen und Farbansatz dazu geben –optische Kontrolle!
8. Fliessend wässern
9. Gegenfärbung in Hämalaun
10. Eindecken (Kaisers Glycerin Gelatine, erwärmt)

Immunhistochemischer Nachweis von P27

1. Tag:

1. Entparaffinieren, Rehydrieren, Blockade endogener PO:
jew. 10` RT Xylol
3` RT Ethanol 100 %
15` RT H₂O₂+Methanol (6 ml H₂O₂ auf 200 ml Methanol)
3` RT Ethanol 100%
jew. 3` RT Ethanol 96% / 70% / 50%
a. dest.
2. Andauung mittels TUF (target unmasking fluid):
TUF + a. dest. im Verhältnis 1:3 im Wasserbad in der Mikrowelle erhitzen (4x 5` mittlere Leistungsstärke)
a. dest.
3. 10` RT PBS
4. 45-60` RT FCS, 100µl pro Schnitt, feuchte Kammer
5. 1 Stunde 37°C, dann ÜN im Kühlschrank bei 4°C P27-Antikörper 1:150 (in PBS)

2. Tag:

1. 5` RT PBS + Brij
2. 30` RT Biotin- α-mouse, 100µl pro Schnitt, feuchte Kammer
5` RT PBS+Brij Detergens
3. 30` RT ABC-System, 100µl pro Schnitt, feuchte Kammer
5` RT PBS+Brij Detergens
4. 15` RT Biotin- α-mouse, 100µl pro Schnitt, feuchte Kammer
5` RT PBS+Brij Detergens
5. 15` RT ABC-System, 100µl pro Schnitt, feuchte Kammer
6. 15` RT PBS
7. Färbung:
Farbansatz: 1 Tbl. AEC (=Amino-ethyl-carbazol) in 12ml DMSO (=Dimethylsulfoxid) auflösen, 10ml H₂O₂ (=Starter) + 200ml PBS + Brij Detergens + HCL (pH 5-6) mischen und Farbansatz dazu geben –optische Kontrolle!
Alternativ: Dako `High sensitivity substrate chromogen, ready to use` auftropfen, beobachten
8. fließend wässern
9. Gegenfärbung in Hämalalaun
10. Eindecken (Kaisers Glycerin Gelatine, erwärmt)

9 Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. W. Arnold danke ich ganz besonders für die Überlassung dieses wichtigen Themas und für die Gewährung seiner Unterstützung während der gesamten Phase dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. H.P. Niedermeyer danke ich für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und für die konstruktiven Ratschläge.

Ganz besonders danke ich Frau I. Wiest für die Beratung, engagierte Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen sowie bei der Auswertung der Präparate.

Frau Priv. Doz. Dr. med. M.K. Steuer-Vogt danke ich für die Überlassung der Präparate und der klinischen Patientendaten.

Frau Dipl.-Math. R. Bush danke ich für die statistische Beratung und freundliche Unterstützung bei der Bewertung der Ergebnisse.

Herrn M. Stobrawe und Herrn H. Ebenhoch danke ich für die hilfsbereite Unterstützung bei der technischen Ausfertigung der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der Zeit der Doktorarbeit unterstützt und ermutigt haben.

10 Lebenslauf

Eva- Tessina Becker
geboren am 27.02.1974 in Erlangen
Vater: Jost Becker, Diplomingenieur
Mutter: Renate Becker, geb. Flier, Kauffrau

Schulbildung

1980 – 1984	Hermann–Hedenus–Grundschule, Erlangen
1984 – 1993	Albert–Schweitzer–Gymnasium, Erlangen
07.1993	Abitur

Berufsausbildung

10.1993 – 03.1995	Studium der Germanistik und Kunstgeschichte, Friedrich–Alexander–Universität, Erlangen-Nürnberg (FAU)
04.1995 – 04.1998	Studium der Humanmedizin / Vorklinik und erster klinischer Studienabschnitt, FAU
05.1998 – 09.2001	zweiter klinischer Studienabschnitt, Technische Universität, München
11.2001	Studienabschluss

Beruflicher Werdegang

01.2002 – 06.2003	Ärztin im Praktikum (ÄiP) an der Hals-Nasen-Ohrenklinik und -Poliklinik der TU München, Klinikum rechts der Isar
-------------------	--

Wissenschaftliche Aktivitäten

05.2000	Posterpräsentation auf dem 4 th European Congress of Oto–Rhino–Laryngology, Head and Neck Surgery, Berlin
09.2000	Posterpräsentation auf dem 10 th International Congress of the International Association of Oral Pathologists–IAOP, La Antigua, Guatemala
05.2001	Vortrag und Posterpräsentation an der 72. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Hamburg
05.2002	Posterpräsentation mit Kurzvortrag an der 73. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Baden-Baden