

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie

Entwicklung und klinische Etablierung einer intraoperativen zytologischen Diagnostik  
der Knocheninfiltration bei Kopf-Hals-Karzinomen mit Charakterisierung von  $\alpha v \beta 6$   
Integrin als Biomarker invasiver Karzinomzellen

Markus Peter Nieberler

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

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

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff
2. apl. Prof. Dr. Dr. A. Kolk
3. Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier

Die Dissertation wurde am 25.10.2012 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.06.2014 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>4</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1 Kopf-Hals-Karzinome</b> .....	<b>8</b>
2.1.1 Epidemiologie .....	8
2.1.2 Ätiologie .....	9
2.1.3 Klinik .....	11
2.1.4 Diagnostik .....	14
2.1.4.1 Bildgebende Verfahren .....	15
2.1.4.2 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung.....	20
2.1.4.3 Histologische Morphologie .....	23
2.1.4.4 Zytologische Morphologie .....	24
2.1.4.5 Schnellschnittdiagnostik.....	25
2.1.5 Therapie.....	27
2.1.5.1 Chirurgische Therapie.....	28
2.1.5.2 Neck dissection .....	30
2.1.5.3 Rekonstruktive Verfahren.....	35
2.1.5.4 Adjuvante Therapie .....	39
2.1.5.5 Neoadjuvante Therapie.....	44
2.1.5.6 Palliative Therapie.....	48
2.1.6 Prognoseparameter .....	49
<b>2.2 Metastasierung</b> .....	<b>53</b>
<b>2.3 Molekulare Tumorbiologie</b> .....	<b>55</b>
2.3.1 Epitheliale-mesenchymale Transition .....	60
2.3.1.1 Funktion von $\alpha\beta6$ Integrin bei der Invasion von Karzinomzellen.....	64
<b>2.4 Stellenwert einer intraoperativen Karzinomdiagnostik und Darstellung der klinischen Situation.....</b>	<b>67</b>
2.4.1 Stellenwert einer intraoperativen Karzinomdiagnostik.....	67
2.4.2 Vorarbeiten auf dem Gebiet der intraoperativen Beurteilung knöcherner Resektionsränder.....	68
2.4.3 $\alpha\beta6$ Integrin als potentieller Biomarker invasiver Karzinomzellen des Knochenmarks .....	69
<b>3 Ziel und Fragestellung</b> .....	<b>71</b>
<b>4 Material und Methoden.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1 Patienten und Untersuchungsmaterial.....</b>	<b>72</b>

<b>4.2 Laborausstattung und Geräte .....</b>	<b>73</b>
4.2.1 Für Histologie und zytologische Untersuchungen .....	73
4.2.2 Für Immunfluoreszenzzytologie .....	73
<b>4.3 Histologische und immunhistologische Methoden.....</b>	<b>73</b>
4.3.1 Histologie .....	73
4.3.2 Immunhistologie.....	74
4.3.2.1 <i>Antikörper für Immunhistologie</i> .....	75
<b>4.4 Zytologische und Immunzytologische Methoden .....</b>	<b>75</b>
4.4.1 Erstellung der zytologischen Präparate .....	75
4.4.2 Auswertung der zytologischen Präparate .....	76
4.4.3 Zellaufreinigung von Knochenmarkproben .....	77
4.4.4 Erstellung immunzytologischer Präparate .....	78
4.4.4.1 <i>Antikörper für Immunzytologie</i> .....	79
4.4.5 Immunfluoreszenzzytologie .....	79
4.4.5.1 <i>Antikörper für Immunfluoreszenzzytologie</i> .....	80
4.4.5.2 <i>Darstellung und Auswertung der <math>\alpha\beta6</math> Integrin und E-Cadherin</i> <i>Expression</i> .....	82
4.4.5.3 <i>Statistische Auswertung</i> .....	83
<b>4.5 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>83</b>
4.5.1 Proteinisolierung aus Formalin-fixierten und Paraffin- eingebetteten Gewebeproben .....	83
4.5.2 Western blot Analyse .....	84
4.5.2.1 <i>Antikörper für Western blot Analyse</i> .....	85
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>86</b>
<b>5.1 Evaluierung zytologischer Ausstrichpräparate des spongiösen Knochens .....</b>	<b>86</b>
5.1.1 Zytologie spongiöser Knochenproben des Os ilium .....	87
5.1.2 Zytologie spongiöser Knochenbiopsien der Mandibula .....	88
5.1.3 Evaluierung der zytologischen Knochendiagnostik im Rahmen der klinischen Routinediagnostik .....	91
5.1.1 Evaluierung der Zellisolierung und Aufreinigung aus Knochenproben für eine zytologische Knochendiagnostik .....	96
<b>5.2 Biomarker für invasive Karzinomzellen.....</b>	<b>99</b>
5.2.1 $\alpha\beta6$ Integrin als immunologischer Biomarker invasiver Karzinomzellen .....	99
5.2.1.1 <i>Darstellung der <math>\alpha\beta6</math> Integrin Expression invasiver Karzinomzellen</i> .....	104

## Inhaltsverzeichnis

---

<i>im Western Blot Verfahren</i> .....	104
5.2.1.2 <i>Kontrolle der <math>\alpha\beta6</math> Integrin Expression</i> .....	105
5.2.2 <i><math>\alpha\beta6</math> Integrin als immunzytologischer Biomarker invasiver</i> <i>Karzinomzellen</i> .....	107
5.2.2.1 <i><math>\alpha\beta6</math> Integrin und E-Cadherin als Markerproteine für eine Immun-</i> <i>fluoreszenz gestützte Diagnostik invasiver Karzinomzellen</i> .....	109
5.2.2.2 <i>Immunfluoreszenz gestützte Diagnostik invasiver Karzinomzellen</i> .....	113
<i>mit <math>\alpha\beta6</math> Integrin und E-Cadherin</i> .....	113
<b>6 Diskussion</b> .....	<b>118</b>
<b>6.1 Intraoperative zytologische Karzinomdiagnostik</b> .....	<b>120</b>
6.1.1 Stellenwert der Methode im klinischen Kontext .....	120
6.1.1.1 <i>Bedeutung der intraoperativen Knochenzytologie für den Patienten</i> .....	121
6.1.1.2 <i>Die intraoperative Knochenzytologie als diagnostisches Mittel für</i> .....	124
<i>den Chirurgen und den Pathologen</i> .....	124
6.1.1.3 <i>Bedeutung der intraoperativen Knochenzytologie für die Klinik</i> .....	125
<b>6.2 Methode und Technik</b> .....	<b>126</b>
6.2.1 Kritische Aspekte bei der Erstellung der zytologischen Präparate .....	126
6.2.1.1 <i>Kritische Aspekte bei der Probenentnahme</i> .....	127
6.2.1.2 <i>Optimierung der Verarbeitung der Knochenproben</i> .....	128
6.2.1.3 <i>Kritische Aspekte bei der Färbung</i> .....	128
6.2.1.4 <i>Kritische Aspekte bei der zytologischen Beurteilung</i> .....	129
6.2.2 EMT-Markerproteine: Biomarker für invasive Karzinomzellen?.....	130
6.2.2.1 <i>Aspekte der Tumorbilogie: Induktion und Mechanismen der EMT</i> .....	131
6.2.2.2 <i>EMT-Markerproteine: Biomarker für klinische Applikationen?</i> .....	135
6.2.2.3 <i>EMT-Marker als Biomarker für eine immunzytologische Diagnostik</i> .....	140
<b>6.3 Ausblick</b> .....	<b>141</b>
6.3.1 Evaluierung der intraoperativen zytologischen Diagnostik der knöchernen Resektionsränder .....	141
6.3.1.1 <i>Bedeutung der intraoperativen Knochenzytologie für den Patienten</i> .....	142
6.3.1.2 <i>Bedeutung der intraoperativen Knochenzytologie für die Klinik</i> .....	142
6.3.1.3 <i>Evaluierung der immunfluoreszenzzytologischen Markierung</i> .....	142
<i>invasiver Karzinomzellen</i> .....	142
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>143</b>

# 1 Zusammenfassung

Weltweit zählt das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich zu der sechsthäufigsten Tumorentität mit einer Prävalenz von mehr als 500.000 Erkrankten und einer jährlichen Inzidenz von 30.000 Neuerkrankungen pro Jahr. In den letzten Jahren hat sich ein Therapieschema etabliert das rekonstruktive Tumor Chirurgie in Kombination mit prä- oder postoperativer Strahlentherapie und/oder Chemotherapie umfasst. Um Patienten mit Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich einer zeitnahen interdisziplinären Versorgung mit bestmöglicher, funktioneller Rehabilitation zuführen zu können, wird eine Tumorsektion mit primärer Rekonstruktion des Weich- und Hartgewebes in einer operativen Sitzung angestrebt. Die chirurgische Therapie erfordert oftmals plastisch-rekonstruktive Maßnahmen mit körpereigenen, mikrovaskulären Transplantaten, um komplexe anatomische Strukturen aus Weich- und Hartgewebe zu rekonstruieren. Der Ausschluss von residualen Karzinomzellen an den Resektionsrändern des Weichgewebes wird durch intraoperative Schnellschnittdiagnostik sichergestellt. Um eine Karzinominfiltration der knöchernen Resektionsränder histologisch ausschließen zu können, muss das Knochengewebe entkalkt werden. Dieser Prozess kann mehrere Tage in Anspruch nehmen, so dass Karzinomresiduen im Knochengewebe bisher nicht intraoperativ ausgeschlossen werden konnten. Folglich konnte für primäre Rekonstruktionen die Voraussetzung eines mikroskopisch karzinomfreien Transplantatlagers an den knöchernen Resektionsgrenzen nicht erfüllt werden.

In Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der Technischen Universität München erarbeiteten wir eine diagnostische Methode um eine potentielle Karzinominfiltration der knöchernen Resektionsränder im Rahmen des operativen Eingriffs nachweisen zu können. Als vielversprechender, diagnostischer Ansatz konnte eine zytologische Beurteilung von Ausstrichpräparaten spongiösen Knochengewebes erarbeitet, und für die klinische Routinediagnostik etabliert und evaluiert werden.

Einer molekularbiologischen Charakterisierung knocheninfiltrierender Karzinomzellen wurde die Hypothese zu Grunde gelegt, dass Karzinomzellen, die invasiv in mesenchymales Knochengewebe infiltrieren, den Prozess der

## Zusammenfassung

---

Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) durchlaufen, so dass Karzinomzellen durch die Expression von EMT-Markerproteinen gekennzeichnet werden können. An der Invasionfront zu mesenchymalem Tumorstroma und Knochengewebe zeichneten sich Karzinomzellen durch die Expression des EMT-Markerproteins  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin aus. Die molekularbiologische Charakterisierung invasiver Karzinomzellen anhand ihrer spezifischen Proteinexpression wurde für einen ergänzenden diagnostischen Ansatz genutzt, bei dem  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin als immun(fluoreszenz)zytologischer Biomarker invasiver Karzinomzellen im Knochengewebe angewandt werden konnte.

Ziel dieser Studie war es, eine zytologische Schnelldiagnostik von Knochengewebe im Rahmen der klinischen Routinediagnostik auf ihre diagnostische Sicherheit und Wertigkeit zu prüfen. Die klinische Etablierung der intraoperativen zytologischen Beurteilung der knöchernen Resektionsgrenzen ermöglicht die sofortige Sicherung der Karzinomfreiheit auch an knöchernen Resektionsgrenzen und somit ein karzinomfreies Transplantatlager für primäre chirurgische Rekonstruktionen. Durch die Erarbeitung dieser diagnostischen Methode und deren klinische Etablierung soll die Sicherung einer R0-Resektion an den knöchernen Resektionsgrenzen bereits intraoperativ ermöglicht werden und konsekutiv der Reduktion von Rezidiven und Metastasen dienen. Die intraoperative Sicherung eines knöchernen R0-Status soll Nachresektionen im Knochengewebe und operative Zweiteingriffe vermeiden und zur Reduktion der Morbidität und Mortalität der Karzinompatienten einen Beitrag leisten.

## 2 Einleitung

Die intraoperative Beurteilung knöcherner Resektionsränder nach Karzinomresektion stellt eine bislang ungelöste klinische Problematik in der Routinediagnostik dar. Im Rahmen des chirurgischen Therapiekonzepts mit kurativer Intention ist die Schnellschnittdiagnostik eine etablierte und sichere Methode um residuale Karzinomzellen an den Resektionsrändern im Weichgewebe nachzuweisen, bzw. eine Karzinomresektion im gesunden Gewebe zu sichern. Das Knochengewebe stellt jedoch ein mechanisches Hindernis bei der Verarbeitung mit Standardmethoden der Schnellschnittdiagnostik dar. Eine mehrtägige Dekalzifizierung ermöglicht es, Knochengewebe zu schneiden und mit den Techniken der Weichgewebeverarbeitung zu analysieren. Aufgrund der langen Verarbeitungszeit der Knochenproben ist diese Technik für eine intraoperative Diagnostik nicht in Betracht zu ziehen. Diese technische Limitation in der Knochendiagnostik führt zu Schwierigkeiten in der rekonstruktiven Tumorchirurgie. Bei Patienten mit Karzinominfiltration des Knochens und umfangreicher Resektion, ist die sofortige Rekonstruktion der knöchernen Strukturen und des Weichgewebes mit mikrovaskulären Transplantaten das operative Vorgehen der Wahl, um eine zeitnahe, funktionelle und ästhetische Rehabilitation zu ermöglichen. Jedoch ist für eine sofortige Rekonstruktion nach der Tumorresektion die intraoperative Kontrolle aller Resektionsränder unabdingbar. Eine Revision und Nachresektion des infiltrierten Knochens in einer zweiten Operation im voroperierten und eventuell vorbestrahlten Gewebe ist durch Fibrosierung und Narbenbildung, sowohl mit einem erhöhten Operationsrisiko für die mikrovaskuläre Versorgung des Transplantates, als auch mit der Belastung einer zweiten Operation für den Patienten verbunden und fordert entsprechende Klinikressourcen. Bei dem beschränkten Angebot osteo-(myo-)kutaner Transplantate ist die Gefährdung der mikrovaskulären Versorgung nicht vertretbar, so dass für eine sofortige Rekonstruktion eine intraoperative Sicherung der Tumorfreiheit des Knochens gefordert werden muss. Nicht zuletzt ist diese Forderung dadurch motiviert, dass eine primäre Rekonstruktion mit einer höheren Lebensqualität der Tumorpatienten verbunden ist. (Holzle et al, 2007; Maciejewski & Szymczyk, 2007; Markowitz & Calcaterra, 1994) Mehrere Studien konnten belegen, dass die

## Einleitung

---

Situation der Tumorresektionsränder, das Ausmaß der knöchernen Beteiligung und die Ausdehnung der knöchernen Resektion nicht nur die Lebensqualität, sondern auch die Prognose der Patienten beeinflusst. (Munoz Guerra et al, 2003b; O'Brien et al, 2003b; Schliephake et al, 1996; Wong et al, 2000) Bis zum aktuellen Zeitpunkt lässt sich allein durch klinische und radiologische Parameter das Ausmaß der knöchernen Resektion nicht festlegen. (Bremerich et al, 1992; Forrest et al, 1997; Hong et al, 2001; Wolff et al, 2004b) Im Bereich des Unterkieferknochens ist somit die Frage nach einer Teil- oder Segmentresektion nach wie vor Diskussionsgegenstand. (Krause et al, 1992; Munoz Guerra et al, 2003b; Politi et al, 2000; Wolff et al, 2004b)

Mehrere Ansätze wurden beschrieben, um sich dieser Problematik mit einer intraoperativen Schnelldiagnostik für Knochengewebe zu nähern. Die aktuelle Datenlage lässt bisher keine einheitliche Schlussfolgerung mit klaren Richtlinien zu.

Forrest et al. postuliert eine Ausbreitung der Tumordinfiltration entlang des Knochenmarks und beschrieb eine Gefrierschnittdiagnostik des spongiösen Knochens als methodischen Ansatz. (Forrest et al, 1997) Im Vergleich zur konventionellen Diagnostik mit dekalzifizierten Knochenproben wurde durch diesen Ansatz eine Sensitivität von 98% erreicht. Brown et al. hingegen revidierten die Aussage der Ausbreitung entlang des Knochenmarks. (Brown, 2003) Oxford et al. beschrieben eine intraoperative Gefrierschnittdiagnostik des kortikalen Knochens mit einer Sensitivität von 88,9% und einer Spezifität von 100%. (Oxford & Ducic, 2006) Ein weiterer Lösungsansatz wurde von Wysluch et al. dargestellt. Durch Trepanbohrungen wurden Knochenproben gewonnen, die im histologischen Schnellschnittverfahren in 94% der Fälle eine diagnostische Übereinstimmung mit der konventionellen Knochenhistologie zeigten. (Wysluch et al, 2010) Ein ähnlicher Ansatz wurde kürzlich dargestellt, um Knochenmarkbiopsien durch Gefrierschnitttechnik zu evaluieren. In diesen Untersuchungen wurde eine Sensitivität von 50% erreicht. (Bilodeau & Chiosea, 2011) Im Rahmen einer Pilotstudie mit sieben Patienten beschrieb Mahmood et al. die Praktikabilität zytologischer Ausstrichpräparate des spongiösen Knochens mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 100%. (Mahmood et al, 2001)

In der klinischen Routine wurde bisher jedoch keine der genannten Ansätze für die Sicherung der Tumorfreiheit der knöchernen Resektionsränder bei Kopf-Hals-Karzinomen eingesetzt und auf ihre diagnostische Wertigkeit überprüft.

## **2.1 Kopf-Hals-Karzinome**

### **2.1.1 Epidemiologie**

Krebs ist die führende Todesursache der industriellen, entwickelten Länder und die Todesursache Nummer zwei der Entwicklungsländer. Als Gründe für die stetige Zunahme der Krebserkrankungen in den Industrieländern sind die steigende Population und die demographische Entwicklung anzuführen, die durch das steigende Alter der Bevölkerung gekennzeichnet ist. Zusätzlich wird eine Zunahme der Risikofaktoren Rauchen, Bewegungsmangel und westliche Ernährung beschrieben. Weltweit stellen Malignome im Kopf-Hals-Bereich mit 4,8% aller Krebsleiden die vierthäufigsten Tumorneuerkrankungen dar. Darunter ist das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich der sechsthäufigste Tumor mit einer Prävalenz von mehr als 500.000 Erkrankten und einer Inzidenz von 30.000 pro Jahr. Nach ICD-10 (00-C14) werden Kopf-Hals-Karzinome nach ihrer Lokalisation in Mundhöhlenkarzinome (i.e. Lippen-, Zungen-, Gingiva-, Mundboden-, und Gaumenkarzinome), Parotistumore und Pharynxkarzinome (i.e. Tonsillen-, Oropharynx-, Nasopharynx- und Hypopharynxkarzinome) eingeteilt.

Basierend auf statistischen Angaben nach GLOBOCAN 2008, dem Standard der weltweiten Schätzung der Krebsinzidenz und Mortalität durch die „International Agency for Research on Cancer“ (IARC), wurde im Jahr 2008 die weltweite Inzidenz des Lippen- und Mundhöhlenkarzinoms auf über 263.020 geschätzt. (Ferlay J, 2010) In Anlehnung an das Tumorregister München ist die Inzidenzrate beim Mundhöhlenkarzinom mit ca. 12/100.000 männlichen Einwohnern vermerkt, bei Frauen ist eine Inzidenzrate von 7,2/100.000 beschrieben.

Mit einer Inzidenz von ca. 263.900 und 128.000 Todesfällen, die 2008 weltweit registriert wurden, ist das orale Plattenepithelkarzinom die häufigste Entität bei Kopf-Hals-Karzinomen. In der Bundesrepublik Deutschland werden ca. 10.000 Neuerkrankungen pro Jahr verzeichnet.

## **Einleitung**

---

Etwa 5% aller malignen Tumore betreffen die Mundhöhle. Dazu wird der Bereich der Innenwange, das retromolare Dreieck, der Alveolarfortsatz, der harte Gaumen, die Vorderfläche des weichen Gaumens, die vorderen 2/3 der Zunge, der Mundboden, das Vestibulum oris und das nicht keratinisierte Lippenrot gezählt. In 95% der Fälle handelt es sich bei malignen Tumoren der Mundhöhle um Plattenepithelkarzinome. (Saarbrücken 2006; Howaldt et al, 2000; Lo et al, 2003) Im Besonderen sind Männer mit ca. 7500 Fällen pro Jahr betroffen. Damit steht diese Erkrankung an 7. Stelle aller bösartigen Tumore. (Saarbrücken 2006; Lippman et al, 1994)

Bei Frauen ist eine zunehmende Tendenz zu verzeichnen. Das mittlere Alter an Kopf-Hals-Karzinomen zu erkranken, liegt bei Männern zwischen 55 und 65 und bei Frauen zwischen 50 und 75 Jahren. (Saarbrücken 2006; Howaldt et al, 2000) Aufgrund des verhältnismäßig jungen Erkrankungsalters im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen sind bei Männern im Alter zwischen 40-59 Jahren über 10% aller krebsbedingten Sterbefälle auf Malignome im Kopf-Hals-Bereich zurückzuführen.

### **2.1.2 Ätiologie**

Zu den größten Risikofaktoren des oralen Plattenepithelkarzinoms zählen Nikotinabusus, Alkoholkonsum, Betelnusskauen und HPV-Infektion. Die maßgeblichen Risikofaktoren der westlichen Welt sind Nikotinabusus und Alkoholkonsum. Beide Risikofaktoren weisen einen synergistischen Effekt auf. (Blot et al, 1988; Hashibe et al, 2009) Ein chronischer Tabak- oder Alkoholabusus ist mit einem bis zu 6-fachen, bei Kombination beider Risikofaktoren, mit einem bis zu 30-fachen erhöhten Erkrankungsrisiko behaftet. (Talamini et al, 2002) Der synergistische Effekt wird dadurch begründet, dass durch Alkohol die Penetration der Karzinogene und Co-Karzinogene des Rauchs in die Mundschleimhaut erleichtert wird und konsekutiv zu einer starken Risikoerhöhung führt. (Miller, 1974; Rodriguez et al, 2004; Vokes et al, 1993) Polyzyklische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine bewirken durch Integration falscher Nukleotide (z.B. Thymidin statt Guanidin) in die DNA Punktmutationen. (Brunnemann et al, 1991; Nair et al, 1996; Shibuya & Morimoto, 1993)

Für Tabakkonsum konnte eine positive Korrelation mit steigender Dosis

## Einleitung

---

nachgewiesen werden, der auch in rauchfreier Form, zum Beispiel als Kautabak ein erhöhtes Risiko beinhaltet. (Macfarlane et al, 1995; Vokes et al, 1993)

Die steigende Inzidenz bei weiblichen Patienten in den meisten europäischen Ländern reflektiert die Zunahme des endemischen Tabakkonsums. (Garavello et al, 2010) Im Gegensatz dazu ist eine altersunabhängige Abnahme bei Männern und Frauen in den USA und dem Vereinten Königreich zu verzeichnen und ist auf eine Abnahme des Tabakkonsums zurückzuführen. (Garavello et al, 2010; Jemal et al, 2008)

Zusätzlich können mechanische Noxen durch scharfe Zahn- oder Prothesenränder und chronische Entzündungen der Mundschleimhaut, sowie eine mangelnde Mundhygiene als Begleitfaktoren die Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms begünstigen. Neben den beiden Hauptrisikofaktoren kann das Krebsrisiko bei desolatem Gebisszustand um das 7,7-fache ansteigen. (Graham et al, 1977)

Neben Tabakkonsum ist beim Lippenkarzinom die mutagene Wirkung kurzweiliger UV-B Strahlung als Risikofaktor zu nennen. (Spitzer et al, 1975; Wynder et al, 1957) Als epidemiologisch junger, ätiologischer Faktor ist die Infektion mit Papillomaviren für die epidemiologische Entwicklung in Betracht zu ziehen. So konnte eine Assoziation zwischen den Hochrisikoviren HPV-16 und 18 und der Inzidenz des oralen Plattenepithelkarzinoms gezeigt werden. (Hansson et al, 2005; Miller & Johnstone, 2001; Smith et al, 2004a) Dabei ist eine Zunahme der Inzidenz HPV-assoziiierter Lokalisationen des oralen Plattenepithelkarzinoms zu beobachten, die den Oropharynx, die Tonsillen und den Zungengrund betreffen. (Chaturvedi et al, 2008; Conway et al, 2006; Hammarstedt et al, 2006; Marur et al, 2010; Robinson & Macfarlane, 2003; Shiboski et al, 2005) Ein Zusammenhang dieser Lokalisationen in Assoziation mit dem Sexualverhalten wird diskutiert. (D'Souza et al, 2009; Garavello et al, 2010; IARC, 2005; Marur et al, 2010)

Der Anteil dieser Risikofaktoren am Entstehungsrisiko ist regional unterschiedlich. (Blot et al, 1988; D'Souza et al, 2009; Danaei et al, 2005; IARC, 2005; IARC, 2007) Rauchen wird für 42% und starker Alkoholgenuss für 16% der weltweiten Todesrate durch das orale Plattenepithelkarzinom verantwortlich gemacht. In den Industrieländern steigen die relativen Anteile dieser Risikofaktoren auf jeweils 70% und 30%. (Danaei et al, 2005) In Taiwan, Indien

## **Einleitung**

---

und benachbarten Ländern beinhaltet der Konsum rauchfreier Tabakprodukte und Betelnuss, mit und ohne Tabakkonsum, das größte Risiko um am oralen Plattenepithelkarzinom zu erkranken. (Ho et al, 2002; IARC, 2005; Jayalekshmi et al, 2009; Wen et al, 2010) In Südosteuropa nehmen Larynxkarzinome einen Anteil von 40% an den Kopf-Hals-Karzinomen ein und in Süd- und Zentralasien sind 80% aller Kopf-Hals-Malignome Karzinome, die im Bereich der Mundhöhle und des Pharynx lokalisiert sind. In China sind 55% aller Kopf-Hals-Malignome Nasopharynxkarzinome. In Südostasien steigt dieser Anteil auf bis zu 70%. (Danaei et al, 2005)

Genetische Faktoren, die zu einer Entwicklung von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich prädisponieren sind Gegenstand aktueller Forschung. Siehe 2.3.

Klinisch relevante Methoden für ein Screening und zur Identifikation molekularer Risikofaktoren stehen für die Routinediagnostik noch nicht zur Verfügung. (Cheng et al, 2002; Elahi et al, 2003; Elahi et al, 2002; Zheng et al, 2001a; Zheng et al, 2001b) Zweifelsfrei scheint der Serumnachweis von HPV-16 mit dem Risiko assoziiert zu sein, an einem oralen Plattenepithelkarzinom oder Pharynxkarzinom zu erkranken. (Dahlstrom et al, 2003; Herrero et al, 2003)

### **2.1.3 Klinik**

Allgemeinanamnestisch sind Müdigkeit, Leistungsabfall, Appetitlosigkeit und Gewichtsabnahme, die über zwei Wochen anhalten, wichtige Symptome, die einer weiterführenden klinischen Untersuchung bedürfen. (Urken et al, 1991)

Klinisch kann sich ein Plattenepithelkarzinom unterschiedlich präsentieren: Schleimhautdefekte oder eine Ulzeration, Schwellungen im Bereich der Mundhöhle, persistierendes, lokalisiertes Fremdkörpergefühl, unklare Zahnlockerung, Schmerzen, Schluck- und/oder Sprechstörungen mit reduzierter Zungenbeweglichkeit, Veränderung der Okklusion, Taubheitsgefühl an Zunge, Zähnen oder Lippen, unklare Blutungen, cervicale Schwellung, Foetor, leuko- oder erythroplakische Veränderungen der Mundschleimhaut.

Bereits initial kann eine Lymphknotenschwellung imponieren. Trotz eines klinisch unauffälligen Befundes zum Zeitpunkt der Diagnose wird bei bis zu 40% der Patienten eine Metastasierung in Halslymphknoten diagnostiziert. (Byers et al, 1998; Coatesworth & MacLennan, 2002; Nieuwenhuis et al, 2002; Spiro et al,

## Einleitung

---

1996; Akhtar et al, 2007; Cole & Hughes, 1997; Crean et al, 2003; Hao & Tsang, 2002; Henick et al, 1995; Kligerman et al, 1994; McGuirt et al, 1995a; O'Brien et al, 2000; Smith et al, 2004b; Spiro et al, 1988; Turner et al, 1996)

Jede Veränderung der Mundschleimhaut mit Gewebezunahme und/oder Gewebedefekt, Veränderungen der Farbe oder Verhärtungen der Mukosa und Gingiva steht unter Verdacht eines Plattenepithelkarzinoms.

Als Präkanzerosen der Lippen und der Mundhöhle werden leukoplakische Veränderungen mit vermehrter Verhornung und Verdickung des Epithels, die Erythroplasie Queyrat, der Morbus Bowen (Carcinoma in situ) und die Melanosis circumscripta praecancerosa angesehen. Leukoplakien werden bei 5% der Bevölkerung beobachtet. Klinisch stehen die Kriterien der weißen, nicht abwischbaren Beläge im Vordergrund, die sowohl flach, leicht erhaben, als auch exophytisch und papillomatös imponieren können. In Bezug auf die WHO-Klassifikation der Kopf-Hals-Tumore (2005) werden Vorläuferläsionen des Plattenepithelkarzinoms als squamöse, intraepitheliale Neoplasien (SIN) bezeichnet. In Analogie zu den Dysplasiegraden wird eine niedriggradige, mäßiggradige und hochgradige intraepitheliale Neoplasie unterschieden. (London: Royal College of Surgeons of England. 1994; Macfarlane et al, 1992; Wolff & Stellmach, 1995) Eine hochgradige intraepitheliale Neoplasie entspricht einem Carcinoma in situ und ist mit einem Karzinomrisiko von 90% assoziiert. (Wolff & Stellmach, 1995)

Ähnlich dem Morbus Bowen ist die Erythroplasie Queyrat durch eine intraepitheliale Proliferation dysplastischer Zellen gekennzeichnet. Der Übergang von einem Carcinoma in situ in ein invasives Karzinom ist möglich, so dass auffällige, scharf begrenzte Herde im Bereich der Schleimhaut, die sich exudativ, erosiv und hochrot darstellen, engmaschigen klinischen Kontrollen unterzogen werden müssen.

Bei Tumoren der Zunge und der Mundhöhle handelt es sich in bis zu 90% der Fälle um Plattenepithelkarzinome. Weitere Tumorentitäten der Mundhöhle sind adenoidzystische Karzinome und Adenokarzinome, die hauptsächlich aus den kleinen Speicheldrüsen des harten Gaumens hervorgehen, mukoepidermoide Karzinome, maligne Melanome, maligne Lymphome und Weichteilsarkome. Klinisch lassen sich bei oralen Plattenepithelkarzinomen zwei makroskopische Erscheinungsformen unterscheiden: ein exophytisches und ein endophytisches

## Einleitung

---

Wachstumsmuster. Das endophytische Wachstum imponiert häufig als kraterförmiges Ulcus, begrenzt durch einen aufgeworfenen Randwall. Beim exophytischen Karzinomwachstum zeigt sich eine verruköse und höckrige Oberflächenstruktur. Schmerzen und funktionelle Einschränkungen zeigen sich oftmals spät im fortgeschrittenen Tumorstadium mit Nekrosen und schmerzhaften Superinfektionen.

Dennoch sind in den Daten des Münchner Tumorregisters bei vielen Tumorlokalisationen ein relativ hoher Anteil an T1- und T2-Befunden verzeichnet. So werden ca. 30% pT1- und 36% pT2-Karzinome im Bereich der Zunge und der Mundhöhle diagnostiziert. Die Lokalisation des Mundhöhlenkarzinoms hat relevante Konsequenzen auf das therapeutische Vorgehen. In 80% der Fälle sind orale Plattenepithelkarzinome im Bereich des Unterkiefers und in 5% im Bereich des Oberkiefers lokalisiert. In 36% ist der Mundboden betroffen und in 22% die Zunge, wobei bei ausgedehnten Befunden eine klare Abgrenzung der Lokalisationen oftmals nicht möglich ist.

Im Bereich der Lippe werden knapp 60% der Karzinome als pT1 und 28% als pT2 Karzinome diagnostiziert deren Lokalisation in 90% auf die Unterlippe begrenzt ist. Die Diagnosestellung in frühen Tumorstadien kann darauf zurückgeführt werden, dass sich Raumforderungen der Lippen und des Oropharynx durch Fremdkörpergefühl, Dysphonie, Sprach- und Schluckbeschwerden frühzeitig klinisch bemerkbar machen können. Folglich werden Karzinome des Naso- und Hypopharynx in über 50-70% der Fälle erst im pT3 und pT4 Stadium klinisch symptomatisch und dementsprechend im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert.

Im Bereich der Wangenschleimhaut können präkanzeröse Läsionen wie leukoplakische Veränderungen auf die Entstehung einer karzinomatösen Veränderung hindeuten. Im Wangenbereich ist das Plattenepithelkarzinom häufiger in der beweglichen Schleimhaut lokalisiert und imponiert meist als verruköses Karzinom, das 1-2% aller Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs umfasst und in 73% buccal lokalisiert ist. Klinisch-makroskopisch lassen sich diese Befunde als umschriebene, exophytische Raumforderung mit papillärer, verhornender (leukoplakischer) Oberfläche abgrenzen. Eine zerklüftete Oberfläche kann Zeichen von Nekrosen im zentralen Bereich sein. Bei raumfordernden Prozessen im Bereich der Wange mit Infiltration in die

## **Einleitung**

---

Kaumuskulatur kann eine Kieferklemme klinisch führend sein. Plattenepithelkarzinome der Wangenschleimhaut neigen zu einer frühzeitigen lymphogenen Metastasierung.

Karzinome im Bereich der Gingiva des zahntragenden Ober- und Unterkiefers zeigen meist ein verruköses Wachstumsmuster und sind häufig im Molarenbereich lokalisiert. Röntgenologisch ist eine Knochenarrosion nur schwer und eine Knocheninfiltration mit Osteolyse erst spät erkennbar, so dass schmerzlose Zahnlockerungen ein wichtiger klinischer Hinweis auf Beteiligung des Kieferknochens sein können.

Plattenepithelkarzinome des Zungengrundes weisen meist ein endophytisches Wachstumsmuster auf. Bei Beteiligung des Arcus palatoglossus und des Arcus palatopharyngeus wird ein infiltrativer raumfordernder Prozess mit Beteiligung der lateralen Pharynxwand und Infiltration des M. pterygoideus medialis durch eine Kieferklemme klinisch symptomatisch.

### **2.1.4 Diagnostik**

Das initiale Anamnesegespräch kann bereits wichtige Hinweise auf karzinomspezifische Risikofaktoren, im Besonderen Tabak- und Alkoholkonsum liefern. Bei der Inspektion sind neben verrukösen oder endophytischen klinischen Erscheinungsformen die Größe und Lokalisation, Farbe, Oberflächenstruktur, Verschieblichkeit, Konsistenz und Abgrenzbarkeit zu benachbarte Strukturen wichtige diagnostische Kriterien. Palpatorisch imponieren orale Plattenepithelkarzinome meist derbe und hart. Eine mangelnde Verschieblichkeit muss als wichtiges Zeichen der Karzinominfiltration in Nachbarstrukturen gesehen werden. Die klinische Exploration beinhaltet die Palpation der submandibulären, cervicalen, nuchalen und supraclaviculären Lymphknoten im Seitenvergleich.

Obwohl bei raumfordernden Prozessen im Kopf-Hals-Bereich bereits in frühen Stadien der Erkrankung mit funktionellen Einschränkungen, i.e. Sensibilitätsstörungen, Schmerzen, Sprach- und Schluckbeschwerden zu rechnen ist, beträgt der mittlere Zeitraum bis zur Diagnosestellung durchschnittlich 6 Monate. Für eine frühzeitige Diagnosestellung ist die klinische Inspektion und die bioptische oder zytologische Abklärung jeder verdächtigen Gewebeveränderung, die trotz Therapieversuch länger als 14 Tage persistiert, Grundvoraussetzung. Die

Diagnosesicherung erfolgt grundsätzlich durch Probebiopsie. Um Artefakte in der computertomographischen (CT) - oder magnetresonanztomographischen (MRT) Bildgebung zu vermeiden, sollten im Rahmen des Tumorstaging die bildgebenden Verfahren vor einer Probebiopsie zur histologischen Sicherung abgeschlossen sein. Bei Karzinomen im dorsalen Bereich der Mundhöhle und des Zungengrundes ist zum Ausschluss eines Zweitkarzinoms eine panendoskopische Untersuchung für ein vollständiges Tumorstaging angeraten. (Kesting et al, 2009)

### 2.1.4.1 *Bildgebende Verfahren*

Die apparative Diagnostik umfasst eine Schnittbilddiagnostik des Primärbefundes und des lokoregionären Lymphgewebes. Für die Darstellung der lokalen Ausdehnung eines Mundhöhlenkarzinoms sollte eine CT oder MRT durchgeführt werden. Die Überlegenheit der CT oder MRT zur Beurteilung der Ausdehnung des Primärtumors ist nicht geklärt. (Bolzoni et al, 2004b; Van Cann et al, 2008; Wiener et al, 2006a) Sowohl die CT als auch die MRT kann eine adäquate Darstellung der Gewebestrukturen leisten. (Kaanders & Hordijk, 2002; Leslie et al, 1999; Vidiri et al, 2010; Vidiri et al, 2007; Woolgar & Triantafyllou, 2005) Bei zu erwartenden Metallartefakten im Bereich der Mundhöhle besteht die Empfehlung die MRT der CT zur Beurteilung des Primärtumors vorzuziehen. Um die Fragestellung einer Arrosion des kortikalen Knochens zu beantworten, wird die CT empfohlen. (Imaizumi et al, 2006a) Es besteht jedoch keine eindeutige Datenlage, dass die CT der MRT zur Beurteilung der Knocheninvasion durch Karzinome der Mundschleimhaut überlegen ist. (Bolzoni et al, 2004b; Imaizumi et al, 2006b) Für die Beurteilung der Knochenmarkinfiltration wird die MRT empfohlen. (Bolzoni et al, 2004a) Nach aktueller Datenlage kann die Beurteilung einer Karzinominvasion in den Knochen durch einen <sup>18</sup>F-FDG-uptake beim PET-CT nicht verbessert werden. (Goerres et al, 2005; Seitz et al, 2009) Die Kombination verschiedener Untersuchungstechniken, i.e. CT, MRT und PET-CT führte zu einer Verbesserung der Sensitivität in der Diagnostik der Karzinominvasion in den Knochen, jedoch konnte keine signifikante Verbesserung der diagnostischen Aussagekraft erreicht werden. (Gu et al, 2010)

## Einleitung

---

Bei der Rezidivdiagnostik zeigte die FDG-PET eine höhere Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 61-71% im Vergleich zur CT und/oder MRT. (Bongers et al, 2002; Lonneux et al, 2000; Nakamoto et al, 2009) Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die FDG-PET nicht nur in der Diagnostik von Fernmetastasen zuverlässiger ist, sondern dass auch 24-26% mehr Primärtumoren erkannt werden konnten als mit der CT oder MRT. (Johansen et al, 2002; Jungehulsing et al, 2000; Regelin et al, 2002)

Im Rahmen des Stagings des Primärtumors konnte für die Detektion einer Knocheninvasion eine höhere Spezifität der CT und der SPECT (single photon emission computed tomographie) im Vergleich zur PET gezeigt werden. (Goerres et al, 2005)

Die MRT kann für die Darstellung perineuraler, intramuskulärer oder perivaskulärer Tumorausdehnung und für die Beurteilung der Schädelbasis, der Orbita oder der Halswirbelsäule Vorteile bieten. (Wiener et al, 2006b; Woolgar & Triantafyllou, 2005)

Im Vergleich zur CT schnitt die MRT für die Beurteilung cervicaler Lymphknotenmetastasen in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und diagnostischer Genauigkeit besser ab. (Sumi et al, 2007) Die diagnostische Genauigkeit der MRT konnte durch Kombination mit einer FDG-PET Untersuchung erhöht werden. (Ng et al, 2006)

Für die Beurteilung von Veränderungen des Weichgewebes und der Differenzierung zwischen Narbengewebe und radiogener Fibrosierung nach multimodaler Therapie ist die MRT der CT überlegen. Als CT-morphologische Malignitätskriterien gelten zum einen raumfordernde Veränderungen, eine Obliteration interponierender Fettschichten und unterschiedliche Kontrastmittelanreicherungen (Enhancements). Im Gegensatz zur CT, bei der Malignome hinsichtlich ihrer Raumforderung und des unterschiedlichen Enhancements beurteilt werden, sind malignomverdächtige Veränderungen in der MRT durch ein unterschiedliches Relaxationsverhalten und unterschiedliche Signalintensitäten gekennzeichnet. Durch diese Unterscheidung kann das Tumorgewebe von einem peritumorösen Ödem abgegrenzt und vitale von nekrotischen Gewebeanteilen differenziert werden. Vor intravenöser Gabe eines Kontrastmittels (Gadolinium-Chelate) werden sowohl axiale T1- und T2-gewichtete Bilder, als auch T2-gewichtete und fettsaturierte koronare Schichten

## Einleitung

---

erstellt. Im Anschluss werden T1-gewichtete Bilder mit Kontrastmittel angefertigt. T1-gewichtete, fettsaturierte Schnitte sind für die Beurteilung von Speicheldrüsengewebe, der Orbita bei Tumorinfiltration und perineuraler Ausbreitung von Vorteil. (Curtin, 2004) Im Falle fester prothetischer Zahnversorgung oder umfangreicher konservativer Füllungstherapie ist die MRT der CT vorzuziehen, da Streuungsartefakte im Bereich der Kauebene eine suffiziente Beurteilung der umliegenden Strukturen verhindern können.

Eine Weiterentwicklung der MRT-Technik mit einer verbesserten diagnostischen Aussage, vor allem für die Beurteilung von Lymphknotenmetastasen, stellt die diffusionsgewichtete MRT (DWI=diffusion weighted imaging), sowie die Verwendung neuerer Kontrastmittel mit USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron-oxide) Nanopartikel dar. (Anzai, 2004; Sumi et al, 2003)

Die Wahrscheinlichkeit eines Zweitumors in der Lunge steigt mit höherem T-Stadium, weshalb bei T3/T4 Tumoren ein Thorax-CT im Rahmen der Primärdiagnostik empfohlen wird. (Andrle et al, 2009; Kaanders & Hordijk, 2002) Sowohl Lymphknotenmetastasen als auch ein pulmonales Zweitkarzinom können durch die CT mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden. (Arunachalam et al, 2002) Für die Ergänzung oder die Kombination der CT mit einem PET konnten bisher keine Vorteile gegenüber bildgebenden Standardverfahren berichtet werden. (Yen et al, 2005) Obwohl die PET für die Diagnostik von Halslymphknotenmetastasen keinen Vorteil gegenüber der CT oder MRT bietet, konnte für die PET-Diagnostik eine gering höhere Sensitivität für die Detektion von Fernmetastasen im Vergleich zur CT gezeigt werden. (Kyzas et al, 2008)

Im Rahmen des Tumorstaging kann eine Skelettszintigraphie zum Nachweis einer hämatogenen Metastasierung oder einer direkten Infiltration des Skelettsystems dienen. Mit osteotropen Technetium-99m-Diphosphonatverbindungen können Veränderungen des Knochenstoffwechsels mit hoher Sensitivität dargestellt werden. Eine Differenzierung zwischen lokalen Stoffwechseleränderungen durch Primärtumoren, Metastasen, Traumata oder Entzündungen ist nicht möglich, so dass die Szintigraphie mit einer geringen Spezifität behaftet ist. Zusätzlich sind Veränderungen unter 1 cm nicht sicher zu detektieren. Im Falle von osteoplastischen Metastasen sind Veränderungen des Knochenstoffwechsels jedoch früher und mit einer höheren Sensitivität zu

## Einleitung

---

differenzieren als röntgen-morphologische Veränderungen der Knochendichte. Die geringe Spezifität lässt sich teils mit der Mehrphasentechnik und mit der SPECT kompensieren.

Ein erhöhter Stoffwechsel in malignen Zellen lässt sich auch mit der Detektion einer gesteigerten Glykolyse und der erhöhten Expression von Glukose-transportern im Vergleich zu normalem Gewebe darstellen. Die Methode basiert auf der vermehrten Aufnahme von F-18-Desoxyglukose in maligne Zellen. (Haberkorn et al, 1991) Der erhöhte Stoffwechsel malignen Gewebes kann mit der PET (Positronenemissionstomographie) dargestellt werden. (Minn et al, 1995; Minn et al, 1988) Ähnlich wie bei der Szintigraphie stellt sich bei der PET die Problematik der geringen Spezifität und einer geringen Ortsauflösung, so dass für eine genaue örtliche Beurteilung der Tumorausdehnung eine ergänzende CT oder MRT nötig ist. (Dillon & Harnsberger, 1991) Die PET-CT kann sowohl für die Diagnostik eines unbekanntes Primärtumors, zur Bestimmung des Glukosestoffwechsels eines vorbestrahlten Tumors, als auch bei Artefakten durch die CT hilfreich sein. (Babin et al, 2008; Baek et al, 2008; Pauleit et al, 2006) Diese Vorteile sind jedoch für die primäre Diagnostik ohne klinische Relevanz und führen, trotz hoher Sensitivität, zu keiner Verbesserung in der Diagnostik der Primärtumore. (Dammann et al, 2005; Woolgar & Triantafyllou, 2005) Folglich kann die initiale Bildgebung mit CT oder MRT nicht ersetzt werden. (Goerres et al, 2005; Roh et al, 2007; Yen et al, 2005)

Trotz der Einschränkungen wird der Stellenwert der PET im Rahmen des Stagings und der Nachsorge von vielen Autoren positiv bewertet. (Anzai et al, 1996; Baille et al, 1992; Braams et al, 1997; Jabour et al, 1993; Laubenbacher et al, 1995) Die Sensitivität für die Diagnose von Rezidivtumoren wird mit 85-100% angegeben. (Anzai et al, 1996; Braams et al, 1997; Engel et al, 1996; Lapela et al, 1995; Laubenbacher et al, 1995; Nowak et al, 1999)

Auch in der Diagnostik von Lymphknotenmetastasen sind unterschiedliche Daten mit variablen Sensitivitäten zwischen 71% und 91% bekannt. (Braams et al, 1995; Jabour et al, 1993; Laubenbacher et al, 1995; McGuirt et al, 1995b) Die Spezifität ist mit 82-100% beschrieben. (Baille et al, 1992; Braams et al, 1995; Jabour et al, 1993; Laubenbacher et al, 1995; McGuirt et al, 1995b) Einen Vorteil bietet die PET bei der Suche nach Primärtumoren im Rahmen eines CUP-Syndroms. (Jungehulsing et al, 2000) Eine weiterführende Option der Bildgebung

## Einleitung

---

wird durch die Korrelation der funktionellen und der morphologischen Bildgebung erzielt. Die Kombination einer kontrastmittelverstärkten CT mit den Informationen der PET wurde 2001 erstmals klinisch getestet. Mittlerweile ist die PET-CT der alleinigen PET oder der CT bei verschiedenen Tumorentitäten und beim CUP-Syndrom überlegen.

Die höchste Sensitivität bietet die SPECT Untersuchung. Die Kombination der CT mit der MRT weist die höchste Spezifität auf. Die Sonographie kann bei der klinischen Untersuchung der Halslymphknoten eine hilfreiche Unterstützung darstellen und wird mit einer Sensitivität zwischen 70% und 92% und einer Spezifität zwischen 60% und 88% beschrieben. (Vogl et al., 2001) Dabei erreicht die Sonographie in einzelnen Studien eine höhere Sensitivität und Spezifität als die CT oder MRT. (Hohlweg-Majert et al, 2009; Thomsen et al, 2005) Jedoch wird die Zuverlässigkeit des Ultraschall-Staging des Halses durch die geringe Spezifität eingeschränkt. (To et al, 2003) Zusätzlich muss bei der Sonographie die mangelnde Aussagekraft für retropharyngeale und tiefe cervicale Lymphknoten einschränkend erwähnt werden. Dabei werden die Lymphknoten in Ebene II nach Som nicht repräsentativ dargestellt. (Som, 1987; Som, 1996) Da Malignome des Kopf-Hals-Bereichs zu 50-90% in die Level II-V metastasieren, wurde gefordert, dass die Sonographie mit weiterführender Schnittbilddiagnostik ergänzt werden muss. (Som, 1996)

Bei gleichzeitigem Befall mehrerer Regionen der Mundhöhle oder des Pharynx spricht man von multilokulärem Tumorwachstum. Vor dem Hintergrund potentieller synchroner Zweitkarzinome im Bereich des Pharynx oder Larynx sollte die Primärdiagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms durch eine Spiegeluntersuchung oder eine Endoskopie ergänzt werden. (Day & Blot, 1992; Day et al, 2003; de Vries et al, 1986; Kramer et al, 2004)

In fortgeschrittenen Tumorstadien ist eine hämatogene Metastasierung der Lunge, der Leber, der Nebennieren und des Skeletts abzuklären. Folglich sollte eine röntgenologische Untersuchung des Thorax, eine sonographische Beurteilung der Leber und der Nebennieren, sowie eine CT des Oberbauchs ergänzt werden. Die PET Untersuchung hat noch keinen festen Stellenwert als Staging Untersuchung bei Kopf-Hals-Karzinomen eingenommen.

Eine arterielle, digitale Subtraktionsangiographie (DSA) kann sowohl für diagnostische als auch für therapeutische Zielsetzungen nutzbar gemacht

werden. Mit der DSA ist der Perfusionsgrad und die zu- und abführenden Gefäße darstellbar. Diese Informationen lassen sich therapeutisch nutzen, indem tumorversorgende Arterien selektiv embolisiert werden oder Primärtumore und Metastasen einer lokoregionären, intraarteriellen Chemoperfusion zugeführt werden können. Studien konnten mit verschiedenen Chemoschemata gute Ergebnisse in Kombination mit Radiotherapie dokumentieren und berichten von einer Vollremission von bis zu 92% bzw. 95%. (Kerber et al, 1998; Nakasato et al, 2000)

Eine DSA ist zusätzlich als Planungsdiagnostik für die Beurteilung der cervicalen und peripheren Gefäßsituation sehr hilfreich, wenn eine Defektsituation im Kopf-Hals-Bereich mit mikrovaskulären Transplantaten, z.B. mit einem Fibulatransplantat, versorgt werden soll.

Trotz der technischen Fortschritte und der Möglichkeiten in der rekonstruktiven Tumorchirurgie sind bildgebende Verfahren bisher nicht in der Lage eine potentielle Karzinominfiltration des Knochens und deren Ausdehnung für die präoperative Planung exakt zu bestimmen. Noch konnten bisher die knöchernen Resektionsränder intraoperativ auf Karzinomfreiheit untersucht werden, um im Rahmen primärer Rekonstruktionen der Hart- und Weichgewebe ein karzinomfreies Transplantatlager zu gewährleisten.

In dieser Arbeit wird eine Methode für die klinische Routinediagnostik dargestellt und evaluiert, um die diagnostische Lücke einer intraoperativen Beurteilung des knöchernen Resektionsstatus zu schließen.

### 2.1.4.2 *TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung*

Die klinische, apparative und histologische bzw. zytologische Beurteilung muss zu einer umfassenden Diagnostik führen, die es erlaubt Karzinome nach ihrer Größe, ihrer Graduierung und Ausbreitung einzuteilen. Für eine globale Einteilung der Tumore wurde 1997 durch die Union International Contre le Cancer (UICC) eine internationale, einheitliche Klassifikation festgelegt. Nach dieser TNM-Klassifikation werden Tumore entsprechend Ihrer Größe, dem Lymphknotenbefall und ihrer Metastasierung eingeteilt. Dabei wird die Tumorgöße mit T, der Lymphknotenbefall mit N und eine Fernmetastasierung mit M bezeichnet.

## Einleitung

Das resultierende TNM-System wird mit den arabischen Ziffern 0-4 graduiert. Tabelle 1 stellt die UICC Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms dar.

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation nach UICC des oralen Plattenepithelkarzinoms**

<i><b>Kriterium</b></i>	<i><b>Abkürzung</b></i>	<i><b>Erklärung</b></i>
Tumorgröße	Tis	Carcinoma in situ
	T0	kein Primärtumor vorhanden
	T1	Primärtumor mit einem maximalen Durchmesser von 2,0 cm
	T2	Primärtumor > 2,0 < 4,0 cm im größten Durchmesser
	T3	Primärtumor > 4 cm im maximalen Durchmesser
	T4	Primärtumor mit Invasion in Nachbarorgane (z.B. Knochen, Zungenmuskulatur)
	Tx	Primärtumor nicht bestimmbar
Lymphknotenstatus	N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar
	N1	Metastasen in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten < 3 cm
	N2a	Metastasen in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten > 3 cm < 6 cm im maximalen Durchmesser
	N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten < 6 cm im maximalen Durchmesser
	N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten < 6 cm im maximalen Durchmesser
	N3	eine oder mehrere Lymphknotenmetastasen > 6 cm im maximalen Durchmesser
	Nx	regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
Fernmetastasen	M0	keine Fernmetastasen nachweisbar
	M1	Fernmetastasen vorhanden
	Mx	Vorhandensein bzw. Fehlen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
Diagnostischer Sicherheitsfaktor	C1	diagnostisches Standardverfahren (einschließlich konventionellen Röntgenaufnahmen)
	C2	spezielle diagnostische Maßnahmen (z. B. CT, Sonographie, MRT, Biopsie)
	C3	chirurgische Exploration
	C4	Untersuchungsbefund beim definitiven Eingriff (einschließlich kompletter Aufarbeitung des Resektionspräparats)
	C5	Autopsie

## Einleitung

Die Einteilung erfolgt entweder in Bezug auf den Durchmesser in cm oder nach Befall benachbarter anatomischer Strukturen. Die Genauigkeit der Diagnostik im TNM-System wird durch den Certainty-Index (Sicherheitsfaktor) angegeben. Die postoperative Befundung nach histopathologischer Begutachtung des Operationspräparats, wird mit pT, pN und pM beschrieben. Anhand der TNM-Klassifikation lassen sich verschiedene Ausprägungen der T-, N-, und M Klassifikationen in vier Stadien einteilen. Tabelle 2

**Tabelle 2: Stadieneinteilung der American Joint Committee on Cancer (AJCC)**

<b>Staging nach den AJCC-Kriterien</b>			
Stadium	T- Klassifikation	N- Klassifikation	M- Klassifikation
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
IV	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0

Weiterführende Arbeiten konnten einen Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium, der Tumordinfiltrationstiefe, der 5-Jahres Überlebensrate und der Wahrscheinlichkeit eines cervicalen Lymphknotenbefalls am Beispiel des Zungenkarzinoms beschreiben. (Hicks et al, 1998; Yuen et al, 1998; Yuen et al, 2000; Yuen et al, 1998)

**Tabelle 3: Korrelation der Stadieneinteilung mit klinischen Parametern**

<b>Zunge(T)</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>		<b>T4</b>	
Lymphknotenbefall	6%	36%	50%		67%	
Infiltrationstiefe	0-3mm	<5mm	3-9mm	6-10mm	>9mm	>11mm
	10%	30%	50%	40%	65%	50%
	<b>5-Jahres Überlebensrate</b>					
Stadium I und II	64-95%					
Stadium III	40-70%					
Stadium IV	16-25%					

### 2.1.4.3 *Histologische Morphologie*

In 90% der Fälle handelt es sich bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs um verhornende oder nicht verhornende Karzinome. Die histologische Beurteilung ist mit therapeutischen und prognostischen Konsequenzen assoziiert. So werden verruköse Karzinome als gut differenziert, sarkomatoide, basaloide und lymphoepitheliale als gering differenziert eingestuft.

Die histomorphologischen Malignitätskriterien bei hoch differenzierten Karzinomen (G1) zeigen sowohl histologische als auch zytologische Ähnlichkeit mit differenzierten Plattenepithelzellen. Häufige Verhornung mit differenzierbaren Interzellularbrücken und geringer Mitoserate ohne atypische Mitosen oder zellulärer Pleomorphie bilden die Diagnosekriterien.

Bei mäßig differenzierten Karzinomen (G2) ist eine histologische Entfernung vom Ursprungsgewebe ausgeprägter und zeigen eine geringere Verhornung mit weniger Interzellularbrücken. Es liegt eine größere Kernpleomorphie und eine höhere Mitoserate vor.

Bei niedrig differenzierten Karzinomen (G3) finden sich nur wenige Zeichen einer plattenepithelialen Differenzierung. Eine hohe Mitoserate mit atypischen Mitosen und hochgradiger Kernpleomorphie bilden die Entscheidungskriterien, die im Falle von dedifferenzierten Karzinomen, z.B. bei sarkomatoiden Karzinomen, einer immunhistologischen Untersuchung bedarf (CK22, Lu-5, Vimentin positiv). Nicht selten zeigen sich feinsträngige Infiltrationsmuster.

Die verschiedenen histologischen Formen der Plattenepithelkarzinome sind mit klinischen Merkmalen und Besonderheiten assoziiert. Verruköse Karzinome stellen 1-2% aller Kopf-Hals-Karzinome dar und sind vornehmlich buccal lokalisiert. Histologisch zeigt sich ein plumpes, papilläres, gut differenziertes Plattenepithel mit geringgradigen Zellatypien und starker parakeratotischer Verhornung. Im Bereich der erhaltenen Basalmembran zeigt sich ein lokal verdrängendes Wachstum in das Stroma das bei rein verrukösen Karzinomen kein metastatisches Wachstumsmuster aufweist. Eine histologische Abgrenzung zu papillären oder verrukösen Hyperplasie ist nicht problemlos möglich.

Sarkomatoide- oder Spindelzellkarzinome werden in 0,3-1,3% der Fälle im Kopf-Hals-Bereich, meist im Hypopharynx und Larynx lokalisiert, mit einem hohen Malignitätsgrad (G3) gesichert. Histologisch stehen vermehrte Zellpleomorphien

und ein spindelzelliger Zellanteil im Vordergrund. Die Rate an Lymphknotenmetastasen ist mit zirka 30-60% besonders hoch und je nach Lokalisation mit einer hohen Mortalitätsrate von 30-77% assoziiert.

Das basaloide Plattenepithelkarzinom wird bei 1-2% aller Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs diagnostiziert und tritt meistens im Hypopharynx- und Larynxbereich auf. Histologisch ist eine hohe Kernpleomorphie mit einer stark basaloiden Zellkomponente auffällig und mit einem hohen Malignitätsgrad mit schlechter Prognose assoziiert.

Undifferenzierte oder lymphoepitheliale Karzinome sind häufig im Nasopharynx lokalisiert und in europäischen Gegenden selten. In Südostasien jedoch wird diese Entität zu den häufigsten malignen Tumoren gezählt. Eine einheitliche Klassifikation nach WHO wurde 2005 festgelegt, die ein nicht keratinierendes Plattenepithelkarzinom mit einem undifferenzierten oder lymphoepithelialen von einem differenzierten Subtyp abgrenzt und das verhornende/keratinisierende Plattenepithelkarzinom unterscheidet. Histologisch werden synzytiale Epithelverbände mit hoher mitotischer Rate und vesikulären Nuclei beschrieben.

Als pathognomonisch muss eine hohe lymphogene und hämatogene Metastasierung angenommen werden, so dass die erste klinische Manifestation durch zervikale Lymphknotenmetastasen imponieren kann und ein okkultes Primärium im Nasopharynxbereich erst im Verlauf erkannt wird. Ein hoher Malignitätsgrad mit meist fortgeschrittenem Tumorstadium begründet eine ungünstige Prognose mit einer niedrigen 5-Jahresüberlebensrate von 29%.

### 2.1.4.4 *Zytologische Morphologie*

Auch auf zellulärer Ebene lässt eine Beurteilung die Differenzierung zwischen benignen und malignen Veränderungen zu. Anhand von Beurteilungskriterien kann eine Graduierung erfolgen, die nach Malignitätskriterien 1., 2. und 3. Ordnung unterscheidet.

Malignitätskriterien 1. Ordnung beziehen sich auf die Kernmorphologie:

Zu diesen Kriterien zählen eine veränderte Chromatinstruktur, eine veränderte Kern/Plasma-Relation, die Anisokariose (Kerngrößenvariabilität), sowie die Kernpolymorphie (Kernform). Die Chromatinstruktur von Zellkernen ist das wichtigste Malignitätskriterium. Maligne Tumoren sind häufig durch ein grobkörniges oder

## Einleitung

---

verklumptes Chromatin gekennzeichnet und zeigen eine unregelmäßige Verteilung des Heterochromatins, das im Zellkern oft an der Kernmembran lokalisiert ist. Ein typisches Malignitätskriterium ist die Zunahme der Kerngröße mit einem Verhältnis von Kern- zu Zytoplasmadurchmesser, das zugunsten des Zellkerns verschoben ist. (Duesberg et al, 2006) Eine Anisokariose ist der unkontrollierten und gesteigerten Stoffwechselaktivität mit unkoordinierter Zunahme der DNA geschuldet, so dass Karzinomzellen durch stark wechselnde Kerngrößen gekennzeichnet sind. Ein wichtiger Malignitätshinweis, jedoch kein obligates Kriterium, ist die Kernpolymorphie.

Zytoplasmatische und nukleoläre Veränderungen werden als inkonstant betrachtet und als Malignitätskriterien 2. Ordnung klassifiziert. Dazu zählen die Mehrkernigkeit, vermehrte Mitosen und atypisch geformte Nucleoli. Bei Plattenepithelkarzinomen beobachtet man nicht selten, dass das Zytoplasma der Karzinomzellen von neutrophilen Granulozyten umlagert ist. Dies wird als Malignitätskriterium 3. Ordnung klassifiziert. Für die Diagnose eines malignen Tumors sind die Kriterien 2. und 3. Ordnung nicht obligat, sind aber neben den Kriterien 1. Ordnung noch andere Kriterien zutreffend, kann die zytologische Diagnose als gesichert gelten. (Feichter und Dalquen, 2000)

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Messung des DNA-Gehalts. Bei malignen Zellen liegt durch Chromosomenaberrationen und chromosomale Aneuploidie oftmals ein erhöhter DNA-Gehalt vor, der durch Färbemethoden (Feulgen-Färbung) dargestellt und mit Hilfe von DNA-Bildzytometrie quantifiziert werden kann. Daraus können Rückschlüsse auf den Malignitätsgrad der Zellen gezogen werden.

### 2.1.4.5 Schnellschnittdiagnostik

Im Rahmen der präoperativen Diagnostik ist es nicht immer möglich das therapeutische Vorgehen exakt zu planen. Folglich ist es nötig auch intraoperativ auf diagnostische Möglichkeiten zugreifen zu können, um Fragestellungen beantworten zu können, die das weitere intraoperative Vorgehen festlegen. Intraoperative Fragestellungen betreffen auch die Diagnosesicherung falls präoperativ eine Biopsie nicht möglich war oder nicht zu einer Diagnosesicherung beitragen konnte. Bei der Resektion dient die intraoperative histologische

## Einleitung

---

Beurteilung der Resektionsgrenzen der Sicherung der Tumorfreiheit an den Resektionsrändern und der Beurteilung einer möglichen Tumordinfiltration in Leitstrukturen, die für das Ausmaß der Resektion maßgebend ist. Für diesen Zweck wurde die Schnellschnitt- oder Gefrierschnittuntersuchung entwickelt, bei der die Gewebeproben ohne Fixierung eingefroren und mit einem Kryostaten in zirka 3-10 µm Schichten geschnitten werden. Nach kurzer Fixierung mit Ethanol werden die Schnitte einer Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung unterzogen. Bei Entnahme der Schnellschnittproben ist zum einen auf eine genaue Orientierung und Markierung der Proben für den Pathologen zu achten, zum anderen müssen die Proben aus den Tumorsektionsgrenzen, so weit es angrenzende anatomische Strukturen zulassen, eine repräsentative Größe aufweisen und gewebeschonend entnommen werden. Bei einem Abstand von weniger als einem Millimeter zwischen der histologischen Tumorgrenze und dem Resektionsrand ist der Schnitttrand als positiv definiert. Die Einteilung erfolgt nach dem Royal College of Pathologists (RCP). (Bailey et al, 2001; McMahon et al, 2003; Slootweg et al, 2002; Weijers et al, 2002) Bei einem histologisch bestätigten Sicherheitsabstand von 1-3mm ist dieser als knapp definiert, mit mindestens 5mm wird der Resektionsrand als sicher bezeichnet. Eine verfehlte R0-Resektion verschlechtert die Prognose signifikant. (Hicks et al, 1997; Kovacs, 2004; Loree & Strong, 1990; O'Brien et al, 2003a; Parsons et al, 1997; Sessions et al, 2000)

Eine intraoperative Sicherung der Tumorfreiheit an den Resektionsgrenzen muss Maßstab einer jeden chirurgischen Intervention mit kurativer Intention sein und ist Grundlage für weiterführende rekonstruktive Maßnahmen. Bei Beteiligung von Knochengewebe im Resektionsbereich stellt sich das Problem, dass bisher keine diagnostische Methode für die klinische Routinediagnostik verfügbar war, um Tumorfreiheit an knöchernen Resektionsgrenzen zu gewährleisten.

Um den therapeutischen Maßstab auch für knöcherne Resektionsgrenzen aufrecht zu erhalten sind neue Ansätze nötig, um diese Lücke in der klinischen, intraoperativen Diagnostik zu schließen. Diese Problemstellung ist Gegenstand dieser Forschungsarbeit.

### 2.1.5 Therapie

Das Therapiekonzept von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs und des oralen Plattenepithelkarzinoms im Speziellen, soll für jeden Patienten individuell in einer interdisziplinären Tumorkonferenz, unter Beteiligung der Fachdisziplinen Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Pathologie, Strahlentherapie, Onkologie und Radiologie, festgelegt werden. Die Optionen kurativ intendierter therapeutischer Konzepte umfassen: Chirurgische Therapie, Strahlentherapie in einem adjuvanten oder primären Therapiekonzept, eine Strahlentherapie in Kombination mit Chemotherapie, sowie die Kombinationen aus chirurgischer Therapie, Strahlentherapie und Chemotherapie.

Neuere Therapieansätze, durch Antikörper-basierte Immuntherapie oder mit Zytokinen sind derzeit nur von experimenteller Bedeutung.

Die Therapieentscheidung ist abhängig von der Diagnose, der Ausdehnung und der Lokalisation des Primärtumors, der Morbidität und den funktionellen und ästhetischen Einschränkungen vor dem Hintergrund des Allgemeinzustands des Patienten. Es gibt keine stadienadaptierten, prospektiven, randomisierten, kontrollierten Multicenterstudien aus denen ein eindeutiger Vorteil der chirurgischen Therapie oder der Strahlentherapie gefolgert werden kann. (Bahadur et al, 2002; Barzan et al, 2002; Bergqvist et al, 2002; Crampette et al, 1999; Edwards & Johnson, 1999; Giovanni et al, 2001; Lavertu et al, 1998; Leon et al, 2002; Luukkaa et al, 2002; MacKenzie et al, 2000; Medini et al, 1998; Mendenhall et al, 2000a; Mendenhall et al, 2000b; Orus et al, 2000; Paisley et al, 2002; Pfreundner et al, 2003; Porter et al, 1998; Staton et al, 2002; Terrell et al, 1998; Tschudi et al, 2003)

Kleine und oberflächliche Karzinome der Mundhöhle (T1, T2) können sowohl durch ein primäres chirurgisches, als auch durch ein strahlentherapeutisches Konzept behandelt werden. (Iyer et al, 2004; Lefebvre et al, 1994; Panje et al, 1980; Rodgers et al, 1993; Sessions et al, 2000) Bei fortgeschrittenen oralen Karzinomen (T3, T4) wird nach alleiniger Strahlentherapie eine höhere Rezidivrate als bei anderen Karzinomen der Kopf-Hals-Region beobachtet. (Levendag et al, 1996) Als Konsequenz sollten orale Karzinome im

fortgeschrittenem Stadium einem kombinierten chirurgisch/strahlentherapeutischen Konzept zugeführt werden. (Rodgers et al, 1993)

### 2.1.5.1 *Chirurgische Therapie*

Die Entscheidung der Resektionstechnik des Primärtumors, sowie der rekonstruktiven Maßnahmen ist, unter Berücksichtigung der Resektabilität des Tumors, der funktionellen Beeinträchtigungen, vor dem Hintergrund des allgemeinen Gesundheitszustands des Patienten und dessen Wünschen und von der Erfahrung des Operateurs abhängig. Das chirurgische Behandlungskonzept verfolgt zwei Ziele:

Erstens, die vollständige Entfernung des erkrankten Gewebes.

Zweitens, den Erhalt oder die Wiederherstellung der funktionellen anatomischen und morphologischen Integrität.

Ist aufgrund eines fortgeschrittenen Tumorstadiums ein kurativer Ansatz nicht zu erzielen, steht bei einer palliativen Zielsetzung die Verminderung der Funktionseinschränkung, die Linderung von Schmerzen und die Minimierung der Gefahr einer unkontrollierten Tumorarrosionsblutung im Vordergrund.

Das chirurgische Vorgehen unterscheidet dabei zwischen der Exzision, d.h. der chirurgischen Tumorentfernung aus der Oberfläche der Haut oder Schleimhaut und der Extirpation, dem Ausschälen des Tumors aus tieferen Gewebeschichten. Als Exkochleation versteht man die Tumorentfernung aus dem Knochen. Der Begriff Resektion beinhaltet die Tumorentfernung zusammen mit einem Teil des gesunden, umliegenden Gewebes. Eine radikale Tumorsektion ist definiert als Entfernung des Tumors mit einem Sicherheitsabstand im gesunden Gewebe. Im Bereich der Mandibula unterscheidet man eine Teilresektion oder Kastenresektion mit Erhalt der Unterkieferkontinuität von einer Segmentresektion oder Kontinuitätsresektion mit Verlust der Unterkieferkontinuität.

Sollte die Forderung nach Tumorfreiheit der Resektionsränder die Entfernung des Kieferknochens erforderlich machen, sollte durch eine Kastenresektion oder Resektion der Innenspanne versucht werden, die Kontinuität der Mandibula zu erhalten. (Brown et al, 2002; Munoz Guerra et al, 2003a; Namaki et al, 2004; Wolff et al, 2004a) Bei einem makroskopischen Tumorabstand von mehr als 5 mm zur Mandibula und einem negativen Befund einer intraoperativen

## Einleitung

---

Schnellschnittuntersuchung des Periostes, kann kontinuieritätserhaltend reseziert werden. (Abler et al, 2005) Wenn in der Bildgebung und im intraoperativen Befund keine Arrosion der Kortikalis vorliegt, kann selbst bei Beteiligung des Periostes die Kontinuität der Mandibula erhalten werden. (Muscatello et al, 2010) Falls mit bildgebenden Verfahren präoperativ eine Knocheninfiltration bestätigt wurde, sollte eine Kontinuitätsresektion gefordert werden. (Abler et al, 2005) Durch die Rekonstruktion knöcherner Strukturen mit einem Knochentransplantat kann eine Lebensqualität erreicht werden, die mit kontinuieritätserhaltenden Operationstechniken vergleichbar ist. (Rogers et al, 2004)

Die Sicherung der Tumorfreiheit an den Resektionsrändern wird durch die Schnellschnittdiagnostik des Weichgewebes gewährleistet. Für die Sicherung der Tumorfreiheit an den knöchernen Resektionsrändern stand bisher kein Verfahren für die klinische Routinediagnostik zur Verfügung. Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs wird ein Sicherheitsabstand von 1 cm an den weichteiligen und knöchernen Resektionsrändern empfohlen. Eine Ausnahme stellt das Karzinom der Stimmlippen dar, bei dem ein Sicherheitsabstand von 1-3 mm ausreichen sollte. Für die Beschreibung des Resektionsstatus wird die TNM-Klassifikation durch die R-Klassifikation ergänzt. Eine R0-Situation beschreibt den histologisch tumorfreien Resektionsstatus ohne Resttumor. Eine R1-Situation beschreibt einen mikroskopischen Resttumor im Bereich der Tumorresektionsränder. Der R2a-Status ist definiert durch einen makroskopisch sichtbaren Resttumor, der mikroskopisch nicht bestätigt werden kann und ein R2b-Status beschreibt einen makroskopischen Tumorverbleib, der auch mikroskopisch bestätigt werden kann. Durch diese Differenzierung wird die chirurgische Therapie graduiert sowie ein adjuvantes therapeutisches Konzept und die Prognose maßgeblich beeinflusst.

Das erkrankte Gewebe, das bei der chirurgischen Therapie reseziert worden ist, sollte durch plastisch-rekonstruktive Maßnahmen ersetzt werden, um eine bestmögliche zeitnahe, funktionelle und morphologische Rehabilitation zu ermöglichen.

### 2.1.5.2 Neck dissection

Als Neck dissection (ND) wird eine zervikale Lymphadenektomie bezeichnet, die bei Malignomen des Kopf-Hals-Bereichs mit lymphogener Metastasierung die operative Entfernung der lokoregionalen Lymphknoten und Lymphdrainagewege zum Ziel hat.

Der polnische Chirurg F. Jawdynski führte erstmals eine radikale ND durch, die in der chirurgischen Technik dem 18 Jahre später beschriebenen Vorgehen von G.W. Crile glich. (Crile, 1906; Jawdynski, 1888) Die anatomischen Grenzen werden durch den Unterrand der Mandibula, die Clavicula und den Vorderrand des Musculus trapezius und des Musculus sternohyoideus gebildet. Der kontralaterale Venter anterior des Musculus digastricus begrenzt das Level Ia.

Werden klinisch oder radiologisch malignomverdächtige Lymphknoten deutlich, ist die ND mit therapeutischer oder kurativer Intention definiert. Bei inapparentem Lymphknotenstatus ist eine ND als elektiv, prophylaktisch bzw. explorativ im Sinne des Tumorstaging anzusehen. Die Entscheidung zu einer ND sollte vor dem Hintergrund gefällt werden, dass falls von einer elektiven ND Abstand genommen wird, mit einer deutlich eingeschränkten Prognose gerechnet werden muss, da in 20-40% auch bei einem klinisch und radiologisch unauffälligen Lymphknotenstatus (cN0) okkulte Metastasen histologisch gesichert werden können und in vielen Fällen ein extrakapsuläres Wachstum erwartet werden muss. (Akhtar et al, 2007; Byers et al, 1998; Coatesworth & MacLennan, 2002; Cole & Hughes, 1997; Crean et al, 2003; Hao & Tsang, 2002; Henick et al, 1995; Kligerman et al, 1994; McGuirt et al, 1995a; Nieuwenhuis et al, 2002; O'Brien et al, 2000; Smith et al, 2004b; Spiro et al, 1988; Spiro et al, 1996; Turner et al, 1996)

Wird von einer elektiven ND Abstand genommen und es kommt im Verlauf zu einer Metastasierung, reduziert sich die Prognose auch wenn eine radikale ND ergänzt wird ("salvage Neck-dissection"). (Fakih et al, 1989; Grandi et al, 1993; Ho et al, 1992; Lydiatt et al, 1993; McGuirt et al, 1995a; Piedbois et al, 1991; van den Brekel et al, 1998; Vandenbrouck et al, 1980; Yuen et al, 1997)

Folglich sollte bei initialen Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle eine elektive ND auch bei einem cN0 Status durchgeführt werden. (D'Cruz et al, 2009; Dias et al, 2001; Fakih et al, 1989; Grandi et al, 1993; Ho et al, 1992; Huang et al, 2008;

## Einleitung

---

lype et al, 2008; Lydiatt et al, 1993; McGuirt et al, 1995a; van den Brekel et al, 1998; Vandenbrouck et al, 1980; Wolfensberger et al, 2001)

Die Klassifikation der Lymphknotenlevel ist nicht einheitlich, sondern wird sowohl als AHNS/AAO-HNS (American Head and Neck Society/American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery) als auch als DÖSAK (Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich)-Klassifikation verwendet. (Robbins et al, 2002b)

Im Bereich des Halses sind 40% aller Lymphknoten im Körper auf ca. 20% des Körpervolumens konzentriert. Ursprünglich wurde eine topographische Einteilung nach Level vom Head and Neck Service des Sloan Kettering Memorial Cancer Centers vorgeschlagen, die sich am patho-physiologischen Metastasierungsmuster orientiert. (Shah et al, 1981) Nach aktuellem Stand der AHNS/AAO-HNS werden die Lymphknotenareale am Hals in sechs Level eingeteilt, von denen drei in jeweils zwei Sublevel unterteilt werden. (Shah et al, 1981)

Level I wird in Level Ia und Ib unterteilt. Level Ia wird die submentale Region bezeichnet, die nach kranial durch den Unterkieferrand, nach kaudal durch das Os hyoideum und nach lateral durch die medialen Ränder der Venti anteriores der Mm. digastrici begrenzt werden. Das Level Ib ist submandibulär lokalisiert und wird durch den kaudalen Rand des Unterkiefers nach kranial und durch den Venter anterior des M. digastricus und des Cornu magnus des Os hyoideum nach kaudal begrenzt. Die laterale Begrenzung bildet der Venter posterior des M. digastricus und der M. stylohyoideus.

Für das Level II wird eine Unterteilung in Level IIa und Level IIb vorgenommen. Level II wird nach kranial durch die Schädelbasis und nach kaudal durch die Unterkante des Os hyoideum begrenzt. Die mediale Abgrenzung wird durch den M. stylohyoideus definiert. Nach lateral bildet der Hinterrand des M. sternocleidomastoideus die Begrenzung des Levels II. Level IIa ist der anteriore Teil, der durch den Verlauf des N. accesorius nach dorsal begrenzt ist. Das Level IIb ist der posteriore Teil, der nach anterior durch den N. accessorius definiert wird. Das Level III ist der mittlere Teil der jugulären Lymphknotengruppe der kranial durch das Os hyoideum und kaudal durch den Cartilago cricoideus begrenzt ist. Der M. sternohyoideus bildet die mediale Begrenzung. Lateral begrenzt der laterale Rand des M. sternocleidomastoideus das Level III. Nach kaudal wird das Level III durch das Level IV ergänzt, das die kaudojuguläre

## Einleitung

---

Lymphknotengruppe inklusive der Virchow-Drüse im Bereich des kaudalen Drittels der V. jugularis interna umfasst. Nach kranial bildet der Cartilago cricoideus und nach kaudal das Os claviculare die Begrenzung. Nach medial der M. sternohyoideus und nach lateral der laterale Rand des M. sternocleidomastoideus.

Das Level V umfasst die Lymphknotengruppe des posterioren Dreiecks, das analog der horizontalen Unterteilung der Level II und III, in das Level Va und das Level Vb unterteilt wird. Die kraniale Begrenzung bildet der Apex zwischen dem M. sternocleidomastoideus und der anterioren Kante des M. trapezius. Die kaudale Begrenzung bildet das Os claviculare. Nach medial ist die laterale Kante des M. sternocleidomastoideus randbildend und nach lateral die Vorderkante des M. trapezius. Das Sublevel Va beschreibt die medioposteriore Lymphknotengruppe entlang des N. accessorius. Die kaudoposteriore Lymphknotengruppe bis zu den supraklavikulären Lymphknoten ist in Level Vb lokalisiert.

Das Level VI reicht im anterioren Bereich vom Os hyoideum bis zur Incisura jugularis manubrii sterni und wird lateral durch die Aa. carotides communes begrenzt. In diesem Bereich sind die prä- und paratrachealen, präkrikoidalen und perithyreoidalen Lymphknoten lokalisiert. Die ND lässt sich in Bezug auf Ihre Ausdehnung auf die jeweiligen Level und der Entfernung angrenzender anatomischer Strukturen in verschiedene Varianten unterteilen.

Das Ausmaß der ND differenziert sich nach verschiedenen Modifikationen. (Prieto et al, 1993; Robbins et al, 2002a) Die radikale ND (RND) schließt die Entfernung des lymphatischen Gewebes der Level I-V, den Musculus sternocleidomastoideus, den Musculus omohyoideus, die Vena jugularis interna, den Nervus accessorius, inklusive des sensiblen Halsplexus und die Glandulae submandibularis und sublingualis ein. Weitere nicht lymphatische Strukturen sind die Arteria carotis externa, der Nervus hypoglossus und der Nervus vagus. Die Progression des metastatischen Verlaufs und das Muster der lymphogenen Metastasierung ist von der Größe, der Art und der Lokalisation des Primärtumors abhängig, so dass eine Adaptation der RND an den jeweiligen klinischen Kontext sinnvoll erschien, um unnötige Funktionseinbußen und Komplikationen zu reduzieren. (Harish, 2005)

Die modifizierte radikale ND wird in 3 Subtypen unterteilt. Unter Typ I wird eine RND unter Erhalt des Nervus accessorius verstanden. Die Indikation wird bei

## Einleitung

---

Primärtumoren mit N1 oder N2 Status gestellt. Typ II bezieht sich auf Erhalt des Nervus accessorius und des Musculus sternocleidomastoideus. Unter Typ III versteht man zusätzlich eine Schonung der Vena jugularis interna und des Nervus accessorius. Bei extendierten NDs werden zusätzlich die retroauriculären, suboccipitalen und parotidealen, retropharyngealen, mediastinalen oder axillären Lymphknoten entfernt. Bei der RND wird das nicht lymphatische Gewebe bei Befall der jeweiligen Strukturen um die Entfernung der Haut, der A. carotis, der kaudalen Hirnnerven, der Halsmuskulatur, der Parotis, der paraspinalen Muskulatur oder der Halswirbel ergänzt. Als Indikation wird die extrakapsuläre Metastasierung mit Infiltration der jeweiligen Strukturen gesehen. Bei der selektiven oder supraomohyoidalen ND wird das lymphatische Gewebe der Level I-III und die Glandulae submandibularis und sublingualis entfernt. Die Indikation ist bei oralen Plattenepithelkarzinomen und Karzinomen des vorderen Oropharynxbereichs gegeben. Bei der erweiterten Variante wird das Level IV ergänzt, wenn eine Metastasierungstendenz Richtung Level IV, z.B. bei Karzinomen des Weichgaumens, der Zunge, des vorderen Tonsillenpols oder der Retromolarregion vorliegt.

Eine laterale oder antero-laterale ND bezieht sich auf die Level I-IV, ohne Resektion nicht lymphatischer Strukturen bei Oropharynx und Larynxkarzinomen. Im Vergleich dazu bezieht sich die posterolaterale ND auf die Level II-V, die bei Involvierung der dorsalen Pharynxwand und bei Beteiligung der dorsalen Kopfhaut und des Halses berücksichtigt werden.

Die anteriore ND ist indiziert bei Schilddrüsenkarzinomen, T3/T4 Karzinomen der Unterlippe und wird mit anderen ND Varianten kombiniert. Eine superselektive ND oder Lymphknoten *picking* hat explorativen Charakter. Die ND wird in aller Regel zusammen mit der Resektion des Primärtumors durchgeführt. Die Entscheidung ob eine uni- oder bilaterale ND durchgeführt wird, ist von der Lokalisation des Tumors abhängig. Tumore in der Nähe der Mittellinie oder die sich Mittellinien überschreitend mit Tendenz zur Metastasierung auf die kontralaterale Seite ausdehnen, genügen der Indikation zur beidseitigen ND. Eine klassische radikale ND ist nur bei N3-Stadium, bei Infiltration benachbarter Strukturen und bei Rezidivmetastasen nach Bestrahlungstherapie indiziert. Im Falle einer N0-Situation werden verschiedene therapeutische Konzepte dargestellt. Neben der Option engmaschiger klinischer und sonographischer

## Einleitung

---

Verlaufskontrollen, wird eine elektive ND bzw. eine elektive Strahlentherapie angeboten. Eine grundsätzliche Unsicherheit bei einer cN0-Situation ist die Option okkulten bzw. subklinischer Metastasen. So wird in Abhängigkeit der Tumorgröße und Lokalisation ein klinisches und radiologisches N0-Stadium nach pathologischer Evaluierung in bis zu 50% als N+-Stadium diagnostiziert. (Werner, 2002) Eine statistische Entscheidungsanalyse zur Ermittlung der Wahrscheinlichkeit okkulten Metastasen kam zu dem Schluss, dass für eine Prognoseverbesserung in über 20% die Vorteile bei einer SND zu finden sind. (Weiss et al, 1994) Hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der lokoregionären Tumorkontrolle bei einem cN0-Status konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der SND (Level I-III) und der modifizierten radikalen ND oder der RND gefunden werden. (1998; Bocca et al, 1984; Byers, 1985; Johnson, 1994; Leon et al, 2001; Manni & van den Hoogen, 1991; McGuirt et al, 1995a; Molinari et al, 1980; Spiro et al, 1993; Spiro et al, 1996; Bier, 1994; Yu et al, 2006) Dennoch gibt es Empfehlungen zur Erweiterung der ND und Ergänzung der Level IV und V mit adjuvanter Strahlentherapie, wenn bei einer SND ein Befall der Lymphknoten histologisch nachgewiesen wird. (Iype et al, 2008; Liaw et al, 2006)

Als Schlussfolgerung können verlässliche Parameter für ein Scoringsystem zur Prädiktion okkulten Metastasen gefordert werden. Jedoch werden neben der Lokalisation des Primärtumors, dem TNM-Stadium und dem Differenzierungsgrad keine Biomarker zur Prädiktion einer frühzeitigen und aggressiven Metastasierung in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt. Die Diskussion um Therapieoptionen bei einer klinischen und radiologischen N0-Situation ist demnach nicht abgeschlossen. (Hosal et al, 2000; Layland et al, 2005)

Obwohl eine retrospektive Datenerhebung bei der SND und einer N0-Situation keinen Vorteil hinsichtlich der Überlebenszeit im Vergleich zu einer Sekundärtherapie bei Metastasen eruieren konnte, steht außer Frage, dass die SND die pragmatischste Möglichkeit darstellt, um zwischen einer histologischen N0- und einer N+-Situation entscheiden zu können. (Layland et al, 2005) Diese Differenzierung ist die Entscheidungsgrundlage für eine therapeutische ND mit Erweiterung der Level und ist wegweisend für adjuvante Therapieansätze.

### 2.1.5.3 *Rekonstruktive Verfahren*

Nach chirurgischer Tumorablation resultieren Defektsituationen, bei denen die resezierten Strukturen je nach Größe, Form und den betroffenen funktionellen Einheiten im Kopf-Hals-Bereich nicht immer primär durch benachbartes Gewebe rekonstruiert werden können und der Verlust an funktionellem Gewebe nicht ersatzlos rehabilitiert werden kann.

Deshalb müssen operative und adjuvante Therapiekonzepte vor dem Hintergrund der Möglichkeiten einer zeitnahen und funktionellen Rekonstruktion geplant werden. Im Rahmen der Planung sind der topographische, der geometrische und der gewebetypische Charakter, als auch die Größe der Defektsituation Entscheidungskriterien für die rekonstruktiven Optionen.

Ziel primärer rekonstruktiver Maßnahmen ist der Erhalt, bzw. bei sekundären rekonstruktiven Maßnahmen, die Wiederherstellung der Sprech- und Schluckfunktion sowie die Rehabilitation einer physiologischen Gesichtsform und die Sicherung der Atmung. Die rekonstruktiven Optionen beinhalten lokale Lappenplastiken, Fernlappenplastiken, freie Haut-, Schleimhaut- oder Knochentransplantation, muskelgestielte Transplantate sowie mikrovaskulären Gewebetransfer autologen Gewebes.

Um einen Algorithmus für rekonstruktive Maßnahmen zu erstellen, ist eine Defektklassifikation für den Kopf-Hals-Bereich entwickelt worden.

Im Bereich des Unterkiefers wird eine Kasten- oder Innenspangenresektion (rim-resektion) von der Segment- und Kontinuitätsresektion differenziert.

Die Lokalisation und Ausdehnung wird durch das HCL-System wiedergegeben. (Jewer et al, 1989) Diese Berücksichtigt die Einteilung in ein zentrales Segment (C) der Symphysenregion, einschließlich der Eckzahnregion, das laterale Segment (L) des Corpus mandibulae, einschließlich des Processus coronoideus und das hemimandibuläre Segment (H) bis zum Caputulum mandibulae.

Das differenziertere CRBS-System unterteilt die anatomischen Abschnitte in den Condylus, Ramus, Body und die Symphyse. (Urken et al, 1991)

Im Bereich der Mundhöhle lassen sich die anatomischen Funktionseinheiten in Mundboden (anterior, lateral und anteriolateral), Lingula, Vestibulum, Planum buccale, Regio retromandibularis, Arcus palatinus und Regio tonsillaris mit Palatinum molle und Oropharynx differenzieren.

## Einleitung

---

Bei Verlust von Zungengewebe ist zwischen Mukosa und Muskelstrukturen mit motorischen, sensiblen und sensorischen (gustatorischen) Funktionen zu unterscheiden. Der Verlust der jeweiligen Strukturen ist konsekutiv mit Einbußen der Sprachfunktion, des Schluckens, des Geschmacksinns und der Kaufähigkeit verbunden. Der Verlust von Zungengewebe lässt sich in Viertel der Zungenbreite einteilen, so dass zwischen Zungenranddefekten, einer Hemiglossektomie und einer Glossektomie unterschieden werden kann und der Funktionsstatus mit dem verbleibenden Zungengewebe assoziiert ist. (Urken et al, 1994)

Im Bereich des Planum buccale und des Vestibulums lassen sich Gewebedefekte anhand ihrer Lokalisation in labiale oder buccale Defekte differenzieren. Im Bereich der Regio retromandibularis, der Regio tonsillaris und dem Velum palatinae sind die Mm. palatoglosii und palatopharyngei für die Funktion des velopharyngealen Abschlusses maßgebend. Im Bereich des Oropharynx werden laterale und posteriore Wanddefekte differenziert.

Im Bereich der Lippen sind der kompetente Lippenschluss und die Relation der Ober- und Unterlippen, sowie die Lokalisation des Mundwinkels unter Vermeidung einer Mikrostomie wichtige Kriterien bei der Evaluation resultierender Defekte nach Tumorresektion. Für das Tragen eines herausnehmbaren Zahnersatzes ist der Erhalt des Vestibulums wichtig. Bei Defekten der Lippe ist die Form des Defekts, im Sinne einer partiellen, subtotalen oder kompletten Ober- oder Unterlippenresektion, als auch der Quotient aus transversaler Defekt- und Lippenbreite und die Lage ausschlaggebend.

Bei Defekten des Oberkiefers, des Hartgaumens und der Orbita werden Defektsituationen in vier Typen differenziert. Vor dem Hintergrund, dass der Oberkiefer aus zwei Maxillae zusammengesetzt ist und jeder als Hexaeder mit sechs Wänden verstanden werden kann, ist ein Typ I Defekt auf eine oder zwei Wände beschränkt. (Cordeiro & Santamaria, 2000) Eine subtotale Maxillektomie wird als Defekttyp II bezeichnet, wenn die kaudalen fünf Wände, mit Ausnahme des Orbitabodens, betroffen sind. Im Gegensatz dazu schließt der totale Maxillektomiedefekt den Orbitaboden mit ein. Der Typ III Defekt lässt sich in einen Typ IIIa mit Erhalt der Orbitaweichteile und einen Typ IIIb, mit Exenteratio orbitae unterteilen. Der Typ IV Defekt entspricht einer Resektion der kranialen fünf Wände unter Erhalt des Gaumendachs.

## Einleitung

---

Bei Beteiligung von Nervenstrukturen kann das funktionelle Ergebnis durch Rekonstruktion maßgeblich beeinflusst werden, so dass der Verlust von Nervenstrukturen bei jeder Klassifikation der Defekte angegeben werden muss.

Bei der Rekonstruktion wird ein eskalierendes Stufenschema beschrieben:

- Heilung per secundam durch Granulationsgewebe
- Heilung per primam intentionem
- Transplantation von Spalthaut oder Vollhaut
- Lokale Hautlappenplastik, je nach Muster der Vaskularisierung als „axial“ oder „random pattern flap“, mit und ohne Muskelgewebe definiert
- Regionale, gestielte Lappenplastik mit Haut-, Muskel- oder Gefäßstiel
- Fernlappenplastik mit Wanderlappen oder Rundstiellappen und mikrovaskuläre Lappentransplantate. (Lineaweaver, 2005)

Seit der Rekonstruktion eines zervikalen Ösophagusabschnitts mit einem mikrovaskulären Jejunumtransplantat und der Beschreibung eines mikrovaskulären Arteria epigastrica inferior superficialis gestielten kutanen Transplantates mit mikrochirurgischer Reanastomosierung, hat sich der mikrochirurgische Gewebettransfer stetig weiterentwickelt und kann mit osteomyo-kutanen Transplantaten dem Anspruch gerecht werden, dass Gewebe mit Gleichartigem ersetzt werden soll. (Seidenberg et al, 1959; Daniel & Taylor, 1973; Millard, 1986) Ein wichtiger Entwicklungsschritt war die Beschreibung des Angiosomkonzepts, das Durchblutungsmuster zwischen Knochen und Haut in zirka 40 verschiedenen Territorien differenziert, bei dem jedes Gewebeterritorium durch eine tiefer gelegene proximale Arterie und einem begleitenden venösen System versorgt wird. (Taylor, 2003) Der Gefäßstamm verläuft entlang den anatomischen Bindegewebsstrukturen mit Perforatorgefäßen, die die Faszien-schicht durchbrechen und einen septokutanen, fasziokutanen oder muskulo-kutanen Verlauf zu dem versorgten subkutanen Fettgewebe und dem darüberliegenden Hautareal nehmen können. Der Perforatorlappen ist ein Gewebetransplantat, das basierend auf dem Angiosomenkonzept, den Vorteil bietet, dass die Morbidität der Donorregion minimiert werden kann. (Wei & Celik, 2003) Jedoch muss mit einem kürzeren Gefäßstiel mit geringeren Gefäßkalibern umgegangen werden.

Die Erfolgsquote bei konventionellen freien Transplantaten liegt bei 96-98%, so dass bei den Forderungen nach einer optimalen frühzeitigen, funktionellen und

## Einleitung

---

morphologischen Rehabilitation freie Transplantate die beste Möglichkeit darstellen, um Gewebe, das im Rahmen der Tumorsektion entfernt werden musste, bestmöglich mit gleichem Gewebe zu ersetzen. (Wei et al, 2002) In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass der mikrovaskuläre Gewebettransfer eine sichere und zuverlässige Technik darstellt, die sich insbesondere für die intraorale Rekonstruktion bewährt hat. (Azizzadeh et al, 2001; Chiarini et al, 2002; Disa et al, 2003; Genden et al, 2001; Hayden & Deschler, 1999; Jol et al, 2003; Makitie et al, 2003; Villaret & Futran, 2003) Dabei wurde ein vollständiger Transplantatverlust in weniger als 1% beschrieben. Eine partielle Nekroserate ist in 3% und eine perioperative Mortalität in 1,3% bei 400 konsekutiven Fällen beschrieben worden. (Suh et al, 2004)

Bei rekonstruktiven Maßnahmen ist zunächst der Zeitpunkt entscheidend. Die Indikation für eine sofortige Weichgewebsrekonstruktion ist meist der Notwendigkeit einer sicheren Defektdeckung geschuldet. Anders als bei Resektionsrändern im Weichgewebe konnte bisher der Nachweis tumorfreier knöcherner Resektionsränder und somit ein tumorfreies Transplantatlager für eine primäre Knochenrekonstruktion intraoperativ nicht erbracht werden. Konsequenterweise war, falls nach definitiver histologischer Befundung eine knöchernere R1-Situation vorlag, die Entfernung eines bereits eingebrachten Knochen-  
transplantats und die Nachresektion in einem zweiten Eingriff nötig, um einen R0-Status zu erreichen. Folglich sollte, im Speziellen für primäre Rekonstruktionen mit limitierten osteo-myo-kutanen mikrovaskulären Transplantaten vorausgesetzt werden können, dass an allen Resektionsgrenzen ein R0-Status gesichert ist. Bisher hatte eine intraoperative Sicherung eines R0-Status an den knöchernen Resektionsrändern keinen Einzug in die Routinediagnostik gefunden. Diese Arbeit beschreibt eine Diagnostik zur intraoperativen Sicherung der Tumorfreiheit knöcherner Resektionsränder und deren Etablierung in der klinischen Routinediagnostik.

Das lokoregionäre Karzinomrezidiv ist der häufigste Grund einer erfolglosen primären Therapie und begründet das Versterben bei einem Fünftel der Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom. In kurativer Intention stehen die therapeutischen Optionen einer erneuten Operation (*Salvage-OP*) oder/und die Radio- oder Radiochemotherapie zur Verfügung.

## **Einleitung**

---

Bei einem nicht resektablen Rezidiv, ohne alternative kurativ intendierte Behandlung, kann durch eine erneute Radio- oder Radiochemotherapie eine 5-Jahres Überlebensraten zwischen 9-20% und eine lokale Tumorkontrollrate von 11-48% erreicht werden. (Ang et al, 2001; Barzan & Talamini, 1996; Close et al, 1989; Hinerman et al, 2004)

### **2.1.5.4      *Adjuvante Therapie***

Fortgeschrittene orale Karzinome, die einer operativen Therapie zugeführt werden können, sollten für ein Therapieschema aus einer Kombination aus Operation und Radio-(chemo)therapie vorgesehen werden. (Levendag et al, 1996; Rodgers et al, 1993)

Bei der Bestrahlungstechnik wird eine perkutane, eine endoluminale und eine interstitielle Radiotherapie unterschieden, die in das therapeutische Konzept prä- oder postoperativ, additiv oder adjuvant, in Kombination mit oder ohne Chemotherapie eingebunden wird. Die Anzahl der Bestrahlungen wird in einem Fraktionierungsschema angepasst.

Eine primäre Radiotherapie wird nur in frühen Stadien kurativ angedacht und ist vor dem Hintergrund der Ausdehnung, des histologischen Befundes, der Allgemeinsituation des Patienten und dessen Therapiewunsch zu evaluieren.

Bei einer präoperativen Bestrahlung wird zum einen eine Sterilisation mikroskopischer Tumoranteile jenseits der Resektionsgrenzen beabsichtigt, zum anderen kann eine Remission mit Verbesserung der Resektabilität erzielt werden. Jedoch zeigte sich früh, dass eine präoperative Bestrahlung bezüglich der Lokalrezidivrate und des Überlebens gegenüber postoperativer Radiotherapie unterlegen ist.

Heute stellt das Behandlungskonzept der adjuvanten, postoperativen Strahlentherapie bei fortgeschrittenen Tumorstadien den Standard dar. Die Indikation zu einer postoperativen Radiotherapie ist vom individuellen Rezidivrisiko, von der Lokalisation des Primärtumors, von dessen Größe und dem Resektionsstatus (R0-R2) abhängig. Ein wichtiges Entscheidungskriterium stellt der lokoregionäre Lymphknotenbefall, deren Lokalisation und ein potentiell kapselüberschreitendes Wachstum dar. Strahlenbiologisch wird bei postoperativer Bestrahlung durch eine relative Hypoxie bei verändertem

## Einleitung

---

Gefäßstatus eine höhere Gesamtdosis von 50-60 Gy gefordert und kann in postoperativer Kenntnis des Resektionsstatus risikoadaptiert geplant werden.

Bei fortgeschrittenen Stadien wird die Bestrahlung individuell adaptiert. Die Gesamtdosis der Strahlentherapie wird in der Regel in mehreren Einzeldosen entweder konventionell fraktioniert (1,8-2,0 Gy/d, 5x/Woche), akzeleriert (>10 Gy/Woche) oder hyperfraktioniert (1,1-1,2 Gy, 2x/d) angewandt. Bei einer Rezidivrate von bis zu 75% bei primärer Radiotherapie wird einer Radiochemotherapie der Vorrang gelassen, bei der die Bestrahlung fraktioniert oder hyperfraktioniert und akzeleriert durchgeführt wird. Dabei nehmen die Gesamtdosis, das Fraktionierungsschema und die Gesamtbehandlungszeit größten Einfluss.

Frühe Tumorstadien können mit konventionellen Fraktionierungsschemata gut kontrolliert werden. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren wird jedoch bei einer Dosis von 70 Gy in 7 Wochen nur eine geringe Tumorkontrolle von 25% erreicht. Eine Akzelerierung mit Hyperfraktionierung kann zu besseren Ergebnissen führen, wobei eine Steigerung der Akuttoxizität ohne Zunahme der Spättoxizität zu erwarten ist. Die optimale Tumordosis ist mit 65 Gy beschrieben. (Mazeron et al, 1990) Diese sollte nicht überschritten werden, um Nekrosen des Weichgewebes oder eine Osteoradionekrose zu vermeiden. (Fujita et al, 1996; Pernot et al, 1997; Pernot et al, 1994) Eine histopathologische Beurteilung der Karzinome lässt eine Präzisierung der Indikationsstellung zu einer Radio- und/oder Radiochemotherapie zu. Bei durchschnittlichem Risiko ist eine Dosis von 54-60 Gy in 27-30 Fraktionen über 5 Tage pro Woche als ausreichend beschrieben.

Bei extrakapsulären Lymphknotenmetastasen, knappen oder positiven Resektionsrändern, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, multiplem Lymphknotenbefall, Lymphknotenbefall mit mehr als 3 cm im Durchmesser und bei Gefäß- oder Nervinfiltration liegt ein stark erhöhtes Risiko für ein Tumorrezidiv vor, bei dem eine adjuvante Strahlentherapie mit einer konventionellen Fraktionierung in einer Dosis  $\geq 57,6$  Gy angewandt werden soll. (Peters et al, 1993) So kann bei einer knappen R0- oder einer R1-Resektion mit Dosen von mindestens 60 Gy eine lokale Tumorkontrolle von bis zu 92% erreicht werden. (Zelevsky et al, 1993) Besonders bei extrakapsulärem Lymphknotenwachstum ist eine Dosiserhöhung auf mindestens 63 Gy in Fraktionierungen von 1,8 Gy oder

## Einleitung

---

ein Boost auf 66 Gy in 33 Fraktionen indiziert. (Bernier et al, 2004; Cooper et al, 2004; Peters et al, 1993) Eine postoperative akzelerierte Strahlentherapie bietet im Vergleich zur konventionellen Strahlentherapie keine Vorteile in Bezug auf die Gesamtüberlebensrate. (Ang et al, 2001; Sanguineti et al, 2005) Eine adjuvante Strahlentherapie sollte spätestens sechs Wochen post operationem begonnen werden. Die Zeitspanne zwischen der Operation und dem Abschluss der Strahlentherapie beeinflusst die lokoregionäre Kontrolle und das Gesamtüberleben signifikant und sollte höchstens 11 Wochen betragen. (Ang et al, 2001; Awwad et al, 2002) Bei Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium und N+-Status trägt eine adjuvante Strahlentherapie zu einem 10%igen Anstieg der 5-Jahresüberlebensrate im Vergleich zur alleinigen chirurgischen Therapie bei. (Lavaf et al, 2008)

Die häufigste Behandlung von Kopf-Hals-Karzinomen erfolgt durch perkutane Strahlentherapie. Zur Positionierung werden eine individuelle Maske und eine Fixationschiene des Oberkiefers angefertigt. Eine dreidimensionale Planung des Bestrahlungsfelds kann durch ein konventionelles CT verwirklicht werden.

Eine höhere Abgabe an Energiedichte kann durch Neutronenstrahlung erzielt werden, die vor allem bei Speicheldrüsentumoren, R1-Status und Lokalrezidiven Anwendung findet.

Bei einem cN0-Status muss von einem potentiellen mikroskopischen Tumorbefall des Lymphgewebes ausgegangen werden. Durch die Applikation von 45-50 Gy wurde der Effekt einer Sterilisation potentiell disseminierter Karzinomzellen im Bereich der Lymphabflusswege postuliert, so dass eine bis zu 90%ige Kontrolle bei subklinischem Befall lokoregionaler Lymphknoten erreicht werden kann. (Fletcher, 1984)

Von einer perkutanen Bestrahlung ist die interstitielle und interkavitäre Bestrahlung abzugrenzen, die zur lokalen Dosiserhöhung, zum Abschluss einer perkutanen Radiotherapie, als lokale Therapie bei Tumorresektion oder als primäre Therapie in frühen Tumorstadien dient. Verschiedene Techniken werden für eine interstitielle Applikation verwendet: Bei der interstitiellen Nadelimplantation wird das Radioisotop Iridium sowohl als LDR (*low dose rate*)-Brachytherapie als auch als HDR (*high dose rate*)-Brachytherapie oder als PDR (*pulse dose rate*)-Brachytherapie angewandt. <sup>192</sup>Iridium gibt eine mittlere Energie von 0,35 MeV ab und hat eine Halbwertstiefe von 2 mm. Es wird bei Tumoren der

## Einleitung

---

Lippe, Zunge und des Mundbodens angewandt, wenn ein Abstand zum Knochen besteht und eine Entfernung von 5 mm zum Mukoperiost eingehalten werden kann. Für sehr umgrenzte anatomische Bereiche wird die Seidefadentechnik verwendet, bei der ein dünner Seidenfaden mit <sup>192</sup>Iridium-Stiften in das Gewebe eingebracht wird, so dass eine lokale Applikation in geringen Dosen für Hauttumore ermöglicht wird.

Bei initialem T1- und T2-Stadium wurden für das Zungen- und Mundbodenkarzinom eine lokale Tumorkontrolle nach 5 Jahren von 65-97% und bei fortgeschrittenen Karzinomen von 49-70% beschrieben. (Bachaud et al, 1994; Hareyama et al, 1993; Lefebvre et al, 1994; Leung et al, 2002; Matsumoto et al, 1996; Mazon et al, 1990; Pernot et al, 1995; Podd et al, 1994; Shibuya et al, 1993; Hareyama et al, 1993; Lefebvre et al, 1994; Pernot et al, 1995; Pernot et al, 1994)

Der Erfolg nach einer Strahlentherapie ist abhängig von der relativen Zelldichte des Tumors, dem Anteil an Stromagewebe, als auch der Fähigkeit lokale avitale Tumorzellen abzubauen. Für verbleibende Tumorreste sind somit die Histologie, das Grading und die Lokalisation von entscheidender, prognostischer Bedeutung.

Die Fähigkeit des klonalen Wachstums verbleibender Tumorzellen ist bisher nicht zu beurteilen, so dass erst nach einem Zeitraum von sechs Wochen eine engmaschige Nachkontrolle sinnvoll ist. Bei Persistenz einer Raumforderung des Lymphgewebes über sechs Wochen muss eine *Salvage-ND* erwogen werden.

Als Nebenwirkungen der Strahlentherapie muss eine akute Strahlentoxizität von einer Spättoxizität abgegrenzt werden. Akute Strahlenfolgen treten zirka zwei bis drei Wochen nach der Bestrahlung auf und sind durch eine verminderte zelluläre Proliferationsrate und eine verminderte Zellregeneration begründet. Eine entzündliche Begleitreaktion kann mit einer mangelnden Ausheilung der Akuttoxizität verbunden sein, so dass diese in chronische Strahlenfolgen übergehen. Chronische Strahlenfolgen treten verzögert auf, sind irreversibel und oftmals durch progrediente Obliteration von Kapillaren mit Nekrosenbildung und einer Fibrosierung der Lymphgefäße verbunden. Jedes Gewebe zeichnet sich durch eine individuelle Radiosensitivität aus, so dass sich eine chronische radiogene Schädigung hauptsächlich auf langsam proliferierendes Gewebe wie das Gefäßendothel, das Bindegewebe, das Knochengewebe und das

## Einleitung

---

Nervengewebe auswirkt. Chronische Nebenwirkungen einer Bestrahlung sind eine Fibrosierung mit Teleangiektasien, ein zervikales Lymphödem und eine Osteoradionekrose. Speicheldrüsengewebe wird schon bei einer geringen Strahlendosis von 10 Gy geschädigt, so dass eine Radiotherapie in den meisten Fällen zu einer irreversiblen Xerostomie und einer veränderten Speichelzusammensetzung mit einem hohen Eiweißanteil führt. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung der bakteriziden Anteile des Speichels mit einer konsekutiven Veränderung der Mikroflora. Neben dem direkten kariogenen Effekt der Bestrahlung führen diese Veränderungen zusätzlich zu Zahnschädigungen. Eine Zahnsanierung als Osteonekroseprophylaxe sollte 14 Tage vor einer Bestrahlung durchgeführt und eine Strahlenschutzschiene angepasst werden. (Dörr W, 2000) Zusätzlich zu der Xerostomie wird die Nahrungsaufnahme durch Dysgeusie beeinträchtigt, die in den meisten Fällen jedoch reversibel ist.

Eine alleinige Chemotherapie zeigt keinen kurativen Effekt bei der Behandlung des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich. Für die Kombination der Strahlentherapie mit einer Chemotherapie ist ein Überlebensvorteil jedoch gesichert. (Pignon et al, 2000) Im Vergleich zu einer alleinigen Strahlentherapie liegt beim Mundhöhlenkarzinom der Überlebensvorteil durch Kombination mit einer Chemotherapie bei 17%. Der Vorteil durch eine Strahlentherapie mit begleitender Chemotherapie ist mit 22-24% besonders bei Patienten unter 60 Jahren gegeben. Bei den 60-70-jährigen Patienten liegt der Vorteil noch bei 12%. (Pignon et al, 2000)

Die Chemotherapie in Kombination mit Strahlentherapie führt, im Vergleich zur alleinigen Radiatio, zu einer Verbesserung der 5-Jahres Gesamtüberlebensrate und der lokalen Tumorkontrolle um jeweils 8%. Für die Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms liegen keine klinischen randomisierten Studien vor, die eine Strahlentherapie oder Radiochemotherapie mit einer primären operativen Therapie vergleichen. Fallserien beschreiben für kleine und oberflächliche orale Karzinome, dass ein therapeutischer, kurativer Ansatz sowohl durch eine Operation als auch durch eine Strahlentherapie möglich ist. (Iyer et al, 2004; Lefebvre et al, 1994; Panje et al, 1980; Rodgers et al, 1993; Sessions et al, 2000) Bei einem cN0-Status differieren die Ergebnisse nach 5 Jahren hinsichtlich der lokalen Tumorkontrolle zwischen einer elektiven ND und einer prophylaktischen Strahlentherapie nicht signifikant. (Chow et al, 1989)

## Einleitung

---

In zwei Multicenter Phase III-Studien zur adjuvanten Therapie fortgeschrittener Kopf-Hals-Karzinome wurde empfohlen, dass bei Indikation zur Strahlentherapie und bei extrakapsulärem Karzinomwachstum oder einem Abstand der Resektionsrändern von weniger als 5 mm, eine Radiochemotherapie mit Cisplatin ergänzt werden sollte. (Bernier, 2007)

Patienten mit positiven Resektionsrändern und/oder Befall der Lymphknoten profitieren von einer adjuvanten Radiochemotherapie hinsichtlich der lokalen Tumorfreiheit und des Gesamtüberlebens nach 3 Jahren. (Huang et al, 1992) Bei schlecht differenzierten Karzinomen reduziert sich folglich das Risiko eines Rezidivs im Bereich der Lymphknoten. (Bartelink et al, 1983; Byers, 1985; Jesse & Fletcher, 1977; Lundahl et al, 1998; Vikram et al, 1984)

Ein extrakapsuläres Wachstum von Lymphknotenmetastasen stellt den wichtigsten Risikofaktor für ein Lokalrezidiv nach ND dar. (Barzan & Talamini, 1996; Brasilino de Carvalho, 1998; Goffinet et al, 1984; Hinerman et al, 2004; Peters et al, 1996; Snow et al, 1982; Woolgar et al, 2003)

In Untersuchungen zu einer postoperativen Radiochemotherapie haben zwei randomisierte Studien, RTOG 9501 und EORTC 22931, bei Patienten mit Stadium III/IV eine Überlegenheit der alleinigen postoperativen Radiotherapie hinsichtlich der lokoregionären Kontrolle zeigen können. (Bernier et al, 2004; Cooper et al, 2004) Dabei konnte die lokale Kontrolle nach 5 Jahren durch platinhaltige und konventionelle fraktionierte Radiochemotherapie bis 66 Gy von 69% bzw. 72% auf 82% verbessert werden. Die EORTC-Studie konnte eine signifikante Verbesserung der Überlebenszeit nachweisen. In beiden Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer R1-Resektion und/oder perinodaler Tumorausbreitung von einer postoperativen Radiochemotherapie im Vergleich zu einer alleinigen Radiotherapie profitierten. (Bernier et al, 2005)

### 2.1.5.5 *Neoadjuvante Therapie*

Bei Patienten mit chirurgisch entfernten T2-T4-Karzinomen ohne Lymphknotenbefall zeigt die postoperative, adjuvante Strahlentherapie im Bezug auf die lokale Tumorkontrolle signifikant besser Ergebnisse im Vergleich zu einer neoadjuvanten Behandlung. (Tupchong et al, 1991; Kramer et al, 2004) Ist jedoch eine Resektabilität aufgrund eines fortgeschrittenen Tumorwachstums zu

## Einleitung

---

riskant, kann durch eine präoperative, primär systemische Induktionstherapie ein *Downstaging* und *Downsizing* erzielt werden, um die Resektabilität zu verbessern und das operative Risiko zu reduzieren. Metaanalysen konnten eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate durch eine Induktionstherapie mit Cisplatin und 5-FU (5-Fluorouracil) zeigen. Eine neoadjuvante Chemotherapie mit Cisplatin und 5-FU verbesserte die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit nicht metastasierten Kopf-Hals-Karzinomen statistisch signifikant um 5% im Vergleich zu einer alleinigen Operation. (Pignon et al, 2000) Eine Radiochemotherapie wurde mit einem Überlebensvorteil von 8% assoziiert. (Fazekas et al, 1983)

In einer Phase III-Studie konnte für Patienten mit nicht resektablen, lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs ein signifikanter Überlebensvorteil bei neoadjuvanter Cisplatin/5-FU und Doxetacel Vorbehandlung im Vergleich zu einer Cisplatin/5-FU Kombinationstherapie vor Strahlentherapie gezeigt werden. (Calais et al, 1999)

In den vergangenen Jahren wurde vor diesem Hintergrund in verschiedenen Studien der Stellenwert mehrerer Prüfsubstanzen für eine neoadjuvante Therapie bei lokal fortgeschrittenen, irresektablen und potentiell resektablen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich untersucht. Ähnlich konnte durch Zugabe von Doxetacel zu einer Cisplatin/5-FU Induktionschemotherapie im Vergleich zur alleinigen Induktion mit Cisplatin und 5-FU, gefolgt von einer Radiochemotherapie mit Carboplatin, eine verbesserte Überlebensrate beschrieben werden.

EORTC 24971/TAX 323 Study Group: (Vermorken et al, 2007)

In dieser Studie wurden 358 Patienten mit meist lokal fortgeschrittenen und nicht resektablem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich randomisiert, einem Behandlungsarm mit Cisplatin und 5-Fluorouracil (PF) in vier Zyklen im Abstand von 3 Wochen und einem Arm mit Docetaxel und Cisplatin in Kombination mit 5-Fluorouracil (TPF) in vier Zyklen im Abstand von 3 Wochen zugeführt. Im Anschluss erfolgte eine Strahlentherapie mit Chirurgie vor oder drei Monate nach Bestrahlung. Nach 32 Monaten wurde das progressionsfreie Überleben evaluiert. Es zeigte sich unter TPF mit 11 Monaten ein signifikant besseres Überleben im Vergleich zu PF mit 8,2 Monaten ( $p=0,015$ ). Das Gesamtüberleben war unter TPF im Vergleich zu PF mit 18,6 zu 14,2 Monaten signifikant besser ( $p=0,0052$ ) und mit einer besseren Lebensqualität assoziiert.

## Einleitung

---

Bei der TAX 324 Studie wurden in einer multizentrischen randomisierten Phase III Studie die Patienten in drei Studienarmen eingeteilt, bei der eine Gruppe mit TPF, eine mit 5-FU und eine mit PF behandelt wurde. (Posner et al, 2007) Im Anschluss wurde eine Radiochemotherapie durchgeführt, bei der die Radiotherapie mit Carboplatin kombiniert wurde. Eine chirurgische Intervention wurde bei Resttumoren oder im Bereich mit Bulk-Erkrankungen zu Beginn durchgeführt. Als primärer Endpunkt wurde das Überleben, als sekundärer Endpunkt das progressionsfreie Überleben und die Toxizität definiert. Das mediane Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben war im TPF-Arm signifikant besser. Das Sterberisiko nach 3 Jahren konnte im TPF-Arm um 30% im Vergleich zum PF-Arm gesenkt werden. Jedoch musste eine erhöhte Toxizität im TPF-Arm festgestellt werden.

Weitere Ansätze in Kombination mit Antikörpern wurden geprüft: Eine Phase I-Studie untersuchte die Kombination von TPF mit Cetuximab in der Induktionstherapie. Die Ergebnisse wurden mit einem vertretbaren Toxizitätsprofil beschrieben. Eine zweite Studiengruppe untersuchte die Induktionstherapie mit TPE (Docetaxel/Cisplatin/Cetuximab) bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomen. Im Anschluss erfolgte eine Radiochemotherapie (RCT) mit Cisplatin/Cetuximab, gefolgt von einer Cetuximab Erhaltungstherapie. Mit diesem Schema wurde eine Ansprechrate von 100% nach RCT beschrieben, die mit einer 2-Jahres Überlebensrate von 80% assoziiert war. (Argiris, 2008; Argiris et al, 2010; Tishler RB, 2008) Im Falle von EGFR resistenten Tumoren wurden weiterführende Therapiestrategien beschrieben. (Machiels & Schmitz, 2011)

Zusammenfassend wurde ein neoadjuvantes Therapiespektrum bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomen durch Taxane und Cetuximab als positiv bewertet. Das Schema mit TPF und einer carboplatinhaltigen RCT wurde als akzeptabler Therapiestandard zur Induktionstherapie bei lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region beschrieben, der durch die Ergänzung mit Cetuximab vielversprechende Möglichkeiten eröffnet.

Bei konventioneller, fraktionierter Bestrahlungstherapie beträgt die Prognose von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen im Stadium III-IV bei einer 2-Jahres-Überlebensrate unter 30%. Ursächlich muss die mangelnde Kontrolle von Lokalrezidiven gesehen werden. Eine Intensivierung eines Fraktionsschemas durch akzelerierte oder hyperfraktionierte Bestrahlung und/oder die Kombination

## Einleitung

---

mit Chemotherapie nützt eine potentielle synergistische und additive zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen bei gleichzeitiger Dissoziation der Nebenwirkungen. Ein Effekt wird durch die Inhibition von DNA-Reperaturmechanismen, der durch Strahlentherapie geschädigten Zellen, erzielt. Ein weiterer Effekt ist die selektive Abtötung von Zellen die sich in später S1 und G1 Phase befinden und somit resistent gegen Bestrahlung sind oder gezielt hypoxische und somit strahlenresistente Zellen angreifen. Weiterhin können Zellen durch die Gabe von Chemotherapeutika, z.B. Cisplatin, für eine nachfolgende Bestrahlung sensibilisiert werden. Ein sensibilisierender Effekt schließt jedoch gesunde Zellen nicht aus, so dass ein erhöhtes Auftreten von Grad III-IV Nebenwirkungen (CTC), vor allem Mukositis und Dermatitis, beschrieben wurden.

Eine Chemotherapie kann in zeitlich unterschiedlicher Abfolge zu einer Bestrahlung neoadjuvant, simultan, sequenziell oder adjuvant verabreicht werden. Eine Metaanalyse konnte zeigen, dass mit einem simultanen Vorgehen die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. (Pignon et al, 2000) Dabei wurden in Mono- und Polychemotherapie Schemata für Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil und Mitomycin C in 50% der Fälle eine Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle, in weniger als 30% der Fälle eine signifikante Verbesserung des Überlebens erzielt, so dass eine kombinierte Radiochemotherapie einen Überlebensgewinn von 8-11% nach 5-Jahren bewirkt. Jedoch wird der klinische Vorteil durch eine erhöhte therapiebedingte Mortalität aufgrund von Sekundärmalignomen geschmälert. Bei Taxanen konnte in Kombination mit platinhaltigen Derivaten und/oder 5-FU ein krankheitsfreies Überleben von 51-78% nach 2-3 Jahren erzielt werden. Dieser Vorteil wird durch eine erhöhte Toxizität mit Grad-III-IV Mukositis/Dermatitis erkaufte.

Als neuere, gezielte Therapiestrategien werden monoklonale Antikörper gegen den EGF-Rezeptor verwendet, der auf Plattenepithelkarzinomzellen stark exprimiert ist und dessen Signaltransduktionskaskade auf mehreren Ebenen unterbrochen werden kann. So sind neben der Rezeptorblockade mit Cetuximab oder Panitumumab auch Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie Gefinitib, Erlotinib oder Lapatinib in mehreren Phase II Studien in Verwendung.

### 2.1.5.6 Palliative Therapie

Eine palliative Situation muss angenommen werden, wenn die Resektion eines Karzinoms aus anatomischen Limitationen und/oder funktionellen Gründen nicht mehr möglich ist und eine Strahlentherapie keinen kurativen Ansatz mehr bieten kann. Der Allgemeinzustand des Patienten kann ein limitierender Faktor sein von einer chirurgischen Intervention oder einer Strahlentherapie Abstand nehmen zu müssen. Eine *Salvage*-Operation oder eine erneute Bestrahlung kann aus operationstechnischen oder strahlenbiologischen Gründen eine palliative Situation begründen. Dennoch kann eine palliative chirurgische Intervention mit Intention einer Verringerung der Tumormasse zur Symptomverbesserung, Schmerzreduktion, Prophylaxe von Arrosionsblutungen oder zur Verbesserung der Atmung, gerechtfertigt sein.

Im Rahmen von palliativen Optionen wurde bei Patienten mit einem fortgeschrittenen, rezidivierenden oder metastasierten Karzinom, die einer palliativ intendierten Chemotherapie zugeführt wurden, eine Ansprechrate von 10-35% beschrieben. (Awwad et al, 2002; Bachaud et al, 1996; Bernier et al, 2005) Mit hochdosiertem Cytarabin in Kombination mit Cisplatin/5-FU konnte eine Ansprechrate von 57% erreicht werden, wobei eine erhöhte Fallzahl von Granulozytopenien und Thrombozytopenien beobachtet wurde. (Jelic et al, 2002) Obwohl die Ansprechrate durch eine Kombination verschiedener Zytostatika verbessert werden kann, muss anhand der Datenlage zusammenfassend festgestellt werden, dass keine Verlängerung der Überlebenszeit abzuleiten ist. Jedoch wird eine Kombinationstherapie von einer erhöhten hämatologischen und auch allgemeinen Toxizität begleitet. (Awwad et al, 2002; Bachaud et al, 1996; Bernier et al, 2005)

Es konnte gezeigt werden, dass eine Strahlentherapie in palliativer Intention mit 20 Gy in 5 Fraktionen über 5 Tage bei 55% der Patienten zu einer anhaltenden Symptomverbesserung führt. (Stevens et al, 2011) Für eine aktuelle Übersicht der therapeutischen Optionen siehe (Price & Cohen, 2012).

### 2.1.6 Prognoseparameter

Um die prognostische Relevanz einer Tumorerkrankung im Kopf-Hals-Bereich zu evaluieren ist das Staging entsprechend der TNM-Klassifikation und die Kategorisierung in UICC-Stadien das etablierte System. Dabei kommt der T-Kategorie und der Unterscheidung in N+ oder N0 die größte prognostische Relevanz zu.

Das T-Stadium beschreibt die maximale Ausdehnung des Primärtumors und das Vorhandensein oder Fehlen der Invasion des Tumors in Nachbarstrukturen. Eine höhere TNM-Kategorie korreliert direkt mit einer schlechteren Prognose. (Carinci et al, 1998; Nishimaki et al, 2002; O'Brien et al, 2003c; Yamazaki et al, 1998)

Bei systemischer Metastasierung beträgt die mittlere Überlebensrate unter einem Jahr. Als prognostische Faktoren werden vor allem histopathologische Parameter herangezogen. Nach histologischer Aufbereitung des gesamten Resektionspräparates lassen sich histopathologische Befunde mit prognostischer Relevanz ableiten, die direkt mit der Tumormasse, bzw. mit der Tumorzellzahl assoziiert sind: Der Tumordurchmesser ist als Parameter für die T-Klassifikation ausschlaggebend. Ergänzend sind die Tumordicke und das Tumolvolumen als prognostische Faktoren beschrieben worden. (Plataniotis et al, 2004; Woolgar, 2006) Eine Tumordicke von mehr als 4 mm korreliert mit einer schlechteren Prognose. (Carinci et al, 1998; Nishimaki et al, 2002; O'Brien et al, 2003c; Yamazaki et al, 1998).

In mehreren Studien wurde ein Einfluss des Tumorgradings auf die Prognose beschrieben, wobei ein höheres Grading mit einer schlechteren Prognose assoziiert war. (Carinci et al, 1998; Coatesworth & MacLennan, 2002; Fortin et al, 2001; Hirvikoski et al, 1999) Bei den Karzinomen liegen über 90% als G2 Karzinome vor, so dass die klinische Relevanz des Gradings als differenziertes Beurteilungsmerkmal für prognostische Aussagen hinterfragt werden kann. Deshalb wurden morphologische Kriterien zur Beurteilung der Invasionsfront eingeführt, die jedoch noch keinen Einzug in die klinische Routine gefunden haben. (Bundgaard et al, 2002; Woolgar & Triantafyllou, 2005) Unter histologischen Aspekten werden, im Vergleich zum konventionellen Plattenepithelkarzinom, papilläre und verruköse Karzinome differenziert, die generell eine bessere Prognose aufweisen. Dagegen zeigen basaloide und

## Einleitung

---

spindelzellige Formen ein aggressiveres Wachstumsmuster. (Huber et al, 2011) Von einem kontinuierlichen Wachstum mit einer definierten Wachstumsfront ist ein diskontinuierliches, infiltratives Wachstum abzugrenzen, das insbesondere an der Zunge und am Mundboden zu einer schlechteren Prognose führt. (Ang et al, 2002; Spiro et al, 1999; Wong et al, 2000)

Einer HPV (humanes Papilloma-Virus)-Infektion wird bei Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs eine kausale Rolle zugesprochen. Interessanterweise ist die HPV-Infektion bei oropharyngealen Tumoren jüngerer Patienten, mit dem Fehlen von Risikofaktoren, höheren Proliferationsindizes, einem höheren Grading, einem basaloiden Subtyp, als auch mit einem besseren Ansprechen auf Strahlentherapie und einer besseren Prognose assoziiert. (Buchwald et al, 2001; Dahlstrom et al, 2003; Friesland et al, 2001; Lindel et al, 2001; Gillison et al, 2000)

Ein wichtiger prognostischer histologischer Parameter ist die Invasion von Karzinomzellen in Lymph- und Blutgefäße, der einer vermehrten lymphogenen und hämatogenen Metastasierung zugrunde liegt. Daneben ist die perineurale Invasion mit einer erhöhten Rate an Lokalrezidiven, Fernmetastasen und einer schlechteren Prognose assoziiert. (McMahon et al, 2003; Woolgar & Triantafyllou, 2005)

Eine erhöhte lokale Rezidivrate korreliert vor allem mit einem knappen Resektionsstatus, bzw. einer R1-Situation, mit fortgeschrittenem Tumorstadium, mit einem Lymphknotenbefall mit über 3 cm im Durchmesser, mit multiplem Lymphknotenbefall und mit Gefäß- oder Nerveninfiltration. (Ang et al, 2001; Barzan & Talamini, 1996; Close et al, 1989; Foote et al, 1989; Hinerman et al, 2004; McMahon et al, 2003; Peters et al, 1996; Woolgar et al, 2003) Bei Vorliegen von zwei oder mehr der aufgezählten Risikofaktoren verschlechtert sich die lokale Tumorkontrolle. (Parsons et al, 1997; Peters et al, 1996; Snow et al, 1982)

Dabei ist die lokale Metastasierung in Halslymphknoten ein maßgebender Prognoseparameter. Eine steigende Anzahl von Lymphknotenmetastasen, die Beteiligung der kaudalen Level IV und V und ein kapselüberschreitendes Wachstum beeinflusst die Prognose negativ. (Brasilino de Carvalho, 1998; Byers et al, 1998; Coatesworth & MacLennan, 2002; Enepekides et al, 1999; Esposito et al, 2001; Greenberg et al, 2003b; Suoglu et al, 2002; Tankere et al, 2000;

## Einleitung

---

Woolgar et al, 2003) Es konnte gezeigt werden, dass ein extrakapsuläres Wachstum von Lymphknotenmetastasen den wichtigsten Risikofaktor für ein Lokalrezidiv nach einer ND darstellt. (Brasilino de Carvalho, 1998; Goffinet et al, 1984; Peters et al, 1996; Snow et al, 1982; Woolgar et al, 2003; Barzan & Talamini, 1996; Hinerman et al, 2004)

Eine ausschließlich immunhistologische Beurteilung des Tumors ist momentan noch von unsicherer Signifikanz. (Ferlito et al, 2001) Im Rahmen der Beurteilung des Lymphknotenstatus ist die extrakapsuläre Infiltration der Lymphknotenmetastasen (ECI) ein wichtiger Prognosefaktor. (Greenberg et al, 2003a) Die ECI ist mit einer erhöhten Rate an lokoregionären Rezidiven als auch mit Fernmetastasen assoziiert und wird als Entscheidungskriterium für eine adjuvante Strahlentherapie herangezogen. Unter Berücksichtigung des Alters und der Allgemeinanamnese des Patienten stellt eine ECI die Indikation zur Erweiterung eines adjuvanten Therapieschemas durch eine simultane Radiochemotherapie.

Ein interessanter Zusammenhang konnte zwischen der Hypoxie im Tumorgewebe und der Überlebensrate der Patienten beschrieben werden. Eine erhöhte Hypoxie ist Ausdruck eines schnellen Tumorstwachstums, bei dem die Vaskularisierung nicht für eine suffiziente Versorgung der Tumormasse ausreicht. Die Hypoxie führt zur Expression von hypoxieinduzierbaren Genen (HIF1 $\alpha$ ). Daraus resultiert die Induktion von VEGF und ein aggressives Tumorstwachstum mit erhöhter Angiogenese und Invasionsneigung. (Bussink et al, 2003) Durch Messung des Sauerstoffpartialdrucks konnte eine Tumorsthypoxie mit einer signifikant geringeren Überlebensrate assoziiert werden. (Nordsmark et al, 2005) Dieser Erkenntnis wird unter therapeutischen Ansätzen durch die Gabe von Chemotherapeutika, z.B. Nimorazol oder Tirapazamin Rechnung getragen, die selektiv unter hypoxischen Bedingungen wirksam sind. (Overgaard et al, 2005; Rischin et al, 2005) In weiteren Untersuchungen wurden Nicotinamid und Carbogen (ARCON) im Rahmen der Radiotherapie verwendet. (Kaanders et al, 2004) Eine diagnostische Evaluierung gezielter hypoxischer Therapieansätze wurde durch die Anwendung von 18-Fluoromisonidazole (FMISO) PET möglich. (Hicks et al, 2005)

Ein weiterer unabhängiger Prognosefaktor ist die Anämie. (Daly et al, 2003) Jedoch ist durch die Gabe von Erythropoietin die lokoregionale Kontrolle und das

## Einleitung

---

Gesamtüberleben nicht verbessert, sondern signifikant verschlechtert worden. (Henke et al, 2003)

Ein entscheidender Prognosefaktor ist der Resektionsstatus, der nicht nur für die Prognose und die lokoregionäre Kontrolle, sondern auch für die Entscheidung einer adjuvanten Therapie maßgebend ist. Bei einem R0-Status ist eine adjuvante Therapie von dem Risikoprofil des Patienten abhängig, wobei eine R1-Situation grundsätzlich zu einer adjuvanten Therapie prädestiniert. Bei einem R2-Status muss ein adjuvantes Radio(chemo)therapie Schema wie bei einer primären konservativen Therapie angedacht werden. Folglich ist der Resektionsstatus ein elementarer Faktor in den Händen des behandelnden Chirurgen, um direkt Einfluss auf das Rezidivverhalten und die Prognose nehmen zu können. Die vorliegende Arbeit beschreibt eine diagnostische Methode für die klinische Routine, um den Resektionsstatus an den knöchernen Resektionsrändern intraoperativ beurteilen zu können. Somit kann eine R0-Situation nicht nur durch Schnellschnittdiagnostik der weichteiligen Resektionsränder, sondern auch an den knöchernen Resektionsrändern intraoperativ gesichert werden.

Eine weitere Möglichkeit, die jedoch noch keinen Einzug in die klinische Diagnostik und in ein routinemäßiges Stagingverfahren gehalten hat, ist die Möglichkeit Malignome anhand ihrer Proteinexpression bzw. ihres Expressionsprofils zu charakterisieren, um einen Einblick in die Tumorbilogie zu erhalten und somit Schlussfolgerungen für den klinischen Verlauf der Erkrankung ziehen zu können. Studien hinsichtlich ihres prognostischen Wertes wurden für den EGF-Rezeptor (EGFR), Cox-2, VEGF, Cyclin D, p53 und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) unternommen. (Kim & Califano, 2004; Koch & Sidransky, 2004) Ergebnisse für klinische Phase-III-Studien liegen für den EGFR bereits vor. Durch Blockade des EGFR in Kombination mit Radiotherapie konnte eine Verbesserung der Überlebensrate erzielt werden. Die Aussagekraft von Proliferationsindizes und molekularen Markern wird für die Vorhersage des individuellen Krankheitsverlaufs noch als unbeständig angesehen. Eine hohe Expression von Ki-67 konnte allerdings mit dem Risiko einer schnellen Tumorprogression korreliert werden. (Helliwell, 2001; Ribeiro et al, 2003; Takes et al, 2002)

Im Rahmen des Stagings werden vor allem im Stadium IV prognostische Parameter als wegweisend für den Krankheitsverlauf deutlich. Diese umfassen zum einen das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen mit einem Durchmesser von mehr als 3 cm, zum anderen das infiltrative Tumorwachstum in benachbarte Strukturen, das im Bereich der Mundhöhle definiert ist, wenn ein infiltratives Wachstum durch kortikalen Knochen, Nervenstrukturen, Muskulatur oder Haut vorliegt. Diese Parameter führen zu einer Reduktion der 5-Jahres-Überlebensrate von Stadium III mit 40-70% zu 16-25% in Stadium IV. Somit ist es von entscheidender Bedeutung eine Infiltration in benachbarte Strukturen so genau und so früh wie möglich zu diagnostizieren, um das therapeutische Vorgehen den jeweiligen Anforderungen für einen kurativen Therapieansatz mit gesicherter R0-Resektion gerecht werden zu können. Im Bezug auf eine Infiltration von Karzinomzellen durch kortikalen Knochen bedeutet das eine intraoperative diagnostische Aussage über die Tumorfreiheit der knöchernen Resektionsränder. Diese Lücke in der klinischen Routinediagnostik soll durch die vorliegende Arbeit geschlossen werden können.

Im Folgenden soll zum einen der wichtige prognostische Faktor der Metastasierung weiter erläutert werden, zum anderen auf den Stellenwert einer intraoperativen Karzinomdiagnostik des Knochens Bezug genommen werden.

## 2.2 Metastasierung

Eine Metastasierung der Halslymphknoten geht in den meisten Fällen von epithelialen Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs aus. Das Metastasierungsmuster entlang der Lymphknotenlevel wird durch die anatomischen Lymphabflusswege bestimmt und ist folglich von der Lokalisation des Primärtumors abhängig.

Die Inzidenz von Fernmetastasen liegt bei Karzinomen der Mundhöhle in Abhängigkeit von der Größe des Primärtumors, zwischen 4% und 33%, wobei Patienten im Stadium T3/T4 und Patienten mit Lymphknotenbefall in Level IV besonders häufig betroffen sind. (de Bree et al, 2000; Haughey et al, 1992; Warner & Cox, 2003)

Level Ia ist Metastasierungsbereich von Karzinomen des anterioren Mundbodens, des anterioren Bereichs der Zunge, der Mandibula, des Alveolarfortsatzes und der Unterlippe. Das Level Ib ist bei Primärtumoren der

## Einleitung

---

vorderen zwei Drittel der Zunge, des Mundwinkels, des anterioren und lateralen Mundbodens, der Mandibula, der Gl. submandibularis und der anterioren Nasenhöhle, sowie des Weichgewebes des Mittelgesichts betroffen.

Levels II ist involviert bei Lokalisation des Tumors in der Mundhöhle, der Nasenhöhle, des Nasopharynx, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx, sowie der Gl. parotis. Bei einem cN0-Status ist bei oralen Karzinomen, meist Zungenkarzinomen, das Level IIb nur in bis zu 5% betroffen. (Corlette et al, 2005; Elsheikh et al, 2005; Lim et al, 2004) Bei cN+-Status ist in über 5% mit einem Befall des Levels IIb zu rechnen, so dass die Empfehlung zur Ausräumung von Level IIb besteht. (Lim et al, 2004; Santoro et al, 2008)

Für das Level III gelten, als konsekutiver Ausbreitungsbereich, die selben Lokalisationen wie für Level II. Das Metastasierungsmuster bei oralen Karzinomen betrifft hauptsächlich die Level I-III. Bei Befall der Level I-III liegt die Wahrscheinlichkeit für eine Beteiligung des Levels IV bei 7-17%. Bei Befall des Hypopharynx und der Schilddrüse, des zervikalen Oesophagus und des Larynx muss das Level IV berücksichtigt werden. Auch bei Zungenkarzinomen wurde eine Metastasierung in Level IV beschrieben. (Byers et al, 1997)

Die Wahrscheinlichkeit der Beteiligung des Levels V beträgt 0-6%. (Cole & Hughes, 1997; Shah et al, 1990) Als "*skip Metastasen*" wird ein Befall von Level V beschrieben, obwohl keine Metastasierung der Level II -IV vorliegt. (De Zinis et al, 2006) Eine Metastasierung in Level V wird nur in ca. 1% beobachtet. (Byers et al, 1988; Jin et al, 2008; Shah et al, 1990) Level V ist bei Nasopharynx- und Oropharynxkarzinomen, sowie bei Befall der occipitalen Haut betroffen.

Neben der Schilddrüse drainiert der glottische und subglottische Bereich des Larynx, des Sinus piriformis und der zervikale Oesophagus in das Ausbreitungsgebiet des Levels VI.

Bei Karzinomen des Mundbodens und bei Karzinomen nahe der Mittellinie erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung nach kontra- oder bilateral. (De Zinis et al, 2006; Kowalski et al, 1999) Unabhängig der Lokalisation steigt mit höherem T-Stadium, einem höheren Grading und dem Befall mehrerer ipsilateraler Lymphknoten das Risiko einer kontralateralen Metastasierung. (Koo et al, 2006; Ritoe et al, 2002)

Die molekularen Mechanismen der Metastasierung und Invasion sind noch nicht vollständig geklärt.

### 2.3 Molekulare Tumorbologie

Die Karzinogenese basiert auf einer Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen von Genen, die karzinom-assoziierte Signaltransduktionskaskaden regulieren und die Phänotypen der Karzinomzellen begründen. Die Charakteristika von Krebszellen wurden von Hanahan und Weinberg zusammengefasst. (Hanahan & Weinberg, 2000) Diese umfassen, dass Krebszellen sich grenzenlos replizieren, sich selbst mit Wachstumsfaktoren versorgen, unempfindlich gegenüber wachstumshemmenden Signalen sind, die Fähigkeit haben sich den Mechanismen der Apoptose zu entziehen, invasiv zu wachsen und zu metastasieren und die Angiogenese induzieren können. Im Jahre 2010 wurden diese bekannten „*hallmarks of cancer*“ um den Faktor der genetischen Instabilität erweitert. (Negrini et al, 2010)

In der bisher dargestellten Einleitung spiegelt sich in der breiten Streuung einiger statistischer Daten die klinische Heterogenität der Krankheitsverläufe wider. Das ist der Tatsache geschuldet, dass die molekularbiologischen Eigenschaften des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich durch ein heterogenes Expressionsprofil gekennzeichnet sind. Folglich muss jede Erkrankung vor dem Hintergrund der individuellen Veränderungen karzinomassoziiertes Proteine und Signalwege gesehen werden.

Karzinome entwickeln sich oft auf dem Boden präneoplastisch veränderten Gewebes mit genetisch veränderten Zellen. Das Verständnis veränderter Expressionsprofile dieser Zellen und dass nach therapeutischen Maßnahmen präneoplastische Zellen persistieren können stellt eine Herausforderung dar, weil diese Zellen die Grundlage für Rezidive und Sekundärkarzinome bilden, die für einen großen Teil der Todesfälle verantwortlich sind. Das Verständnis der tumorbologischen Charakteristika und deren Analyse kann dazu beitragen die klinische Heterogenität der Erkrankung besser zu verstehen und die beteiligten Faktoren für diagnostische und therapeutische Zwecke nutzbar zu machen.

Mit den Entwicklungen der molekularbiologischen Forschung während der letzten zwei Jahrzehnte konnte der Prozess der Feldkanzerisierung mit molekularen Faktoren beschrieben werden. Basierend auf der genetischen Charakterisierung morphologischer Veränderungen des Plattenepithels wurde 1996 das erste genetische Model der schrittweisen Entwicklung von Kopf-Hals-Karzinomen

## Einleitung

---

beschrieben. (Califano et al, 1996)

Jeder histopathologische Schritt von einer gutartigen Hyperplasie, zu einer Dysplasie, hin zu einem Carcinoma in situ und einem invasiven Karzinom, korrelier mit der Zunahme chromosomaler Aberrationen. Der Verlust der Heterozygotie, „*loss of heterocycosity* (LOH)“ genannt, führt meist zur verminderten oder fehlenden Expression von Tumorsuppressorgenen. In hyperplastischem Gewebe konnte ein LOH am Genlocus 9p21 gezeigt werden. Dieser Genlocus kodiert für p16/INK4a/CDK4I, ein Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor der Zellzyklusregulation. (Boyle et al, 1993; Kamb et al, 1994; Nobori et al, 1994)

Ein weiterer Genlocus mit häufigem LOH ist 3p21 (RASSF1A), ein Bereich nahe des Retinoblastoma Genlocus, der als Tumorsuppressor identifiziert wurde, sowie der p53 Genlocus bei 17p13, der regelmäßig bei Karzinomen der Kopf-Hals-Region mutiert ist. (Hogg et al, 2002; Boyle et al, 1993; Yoo et al, 1994) In dysplastischem Gewebe konnte zusätzlich ein LOH bei 11q13, 13q21, 14q31 und eine Zunahme der genetischen Aberration bei 9p21 (CDKN2A) und 3p21 (RASSF1A), sowie typische Veränderungen bei Chromosom 11q, 4q und Chromosom 8 beobachtet werden, die in späteren Phasen der Karzinogenese betroffen sind. (Califano et al, 1996)

Bei der Fragestellung nach der Beurteilung histologisch prämaligener Läsionen wurden molekularbiologische Ansätze gefunden, um das Malignitätsrisiko einzuschätzen. Dazu zählt die Beurteilung von Mikrosatelliten, die Expression von Cornulin, Keratin 4 und Keratin 13, LOH bei 3p und/oder 9p und allelischer Verlust bei 4q, 8p, 11q oder 17p, LOH bei 9p21 und 3p14 und Aneuploidie in zytometrischen Untersuchungen. (Partridge et al, 2000; Schaaaj-Visser et al, 2010; Rosin et al, 2000; Mao et al, 1996; Torres-Rendon et al, 2009)

Eine zusammenfassende Übersicht der molekularbiologischen Faktoren bei Kopf-Hals-Karzinomen unter Berücksichtigung der Rolle humaner Papilloma Viren (HPV) wurde bereits vorgestellt. (Leemans et al, 2011) Die kausale Rolle der Hochrisikoviren, wie HPV-16 bei Zervixkarzinomen, konnte gesichert werden. (Walboomers et al, 1999; zur Hausen, 2002) Das Virus enthält zwei Onkogene, i.e. E6 und E7, deren Expression p53 und das Retinoblastoma Tumorsuppressorgen (RB) inaktivieren, was in infizierten Zellen zu einer veränderten Zellzyklusregulation führt und als ursächlich für die Induktion der Karzinogenese

## Einleitung

---

gesehen wird. (zur Hausen, 2002) Die Onkogene E6 und E7 werden auch bei der Entstehung HPV-assoziiertes Karzinome des aerodigestiven Trakts als ursächlich angesehen. (Snijders et al, 1992; Syrjanen, 2005) Die Inaktivierung von p53 ist bei 60-80% aller Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs zu finden, bei den anderen 40-20% konnte die Inaktivierung mit der Expression von E6 und E7 korreliert werden. (van Houten et al, 2001; Wiest et al, 2002)

In Anlehnung an das Modell von Hanahan und Weinberg werden im Folgenden die relevanten Faktoren zusammengefasst. (Hanahan & Weinberg, 2000; Negrini et al) Das unbegrenzte Potential zur Selbstreplikation bei Krebszellen ist maßgeblich durch die Inaktivierung, z.B. durch HPV Onkogene, der Mutation von Genen des p53 und RB Signalwegs begründet. Somatische Mutationen des p53 Gens konnten in 60-80% der Kopf-Hals-Karzinome nachgewiesen werden. (Balz et al, 2003; Poeta et al, 2007; van Houten et al, 2002) Die Überexpression von Cyclin D1 oder einer Cyclin abhängigen Kinase (CDK4) Variante, die nicht durch p16/INK4a/CDK4I inhibiert werden kann, führt zu einer Immortalisierung bei oralen Plattenepithelzelllinien *in vitro*. (Opitz et al, 2001; Rheinwald et al, 2002) Ein weiterer Signalweg ist definiert durch die Transduktion durch p16/INK4A - cyclin D1 - CDK4-RB oder p16/INK4A - cyclin D1 - CDK6 - RB. p16/INK4A ist durch das Gen *CDKN2A* kodiert, das auf Chromosom 9p21 lokalisiert ist und durch Mutation, Methylierung, durch Verlust von Chromosomen oder durch homozygote Deletion inaktiviert ist. (Reed et al, 1996) Cyclin D1 ist durch das Gen *CCND1* kodiert, das auf Chromosom 11q13 lokalisiert ist und in über 80% der HPV-negativen Karzinome überexprimiert ist. (Smeets et al, 2006) In 20% der Fälle konnte keine Mutation des p53 Gens nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass noch weitere Faktoren des p53 Signalwegs die Karzinogenese kausal beeinflussen können. (Berns et al, 2004) Eine weitere Voraussetzung einer unbegrenzten Replikation, ist die Fähigkeit die Verkürzung der Telomere bei jeder Zellteilung umgehen zu können. Telomerasen sind Enzyme mit einer katalytischen Untereinheit, i.e. Telomerase Reverse Transkriptase (TERT), die verkürzte Telomere wieder herstellen. Die Aktivität von Telomerasen ist bei 80% der Karzinome nachgewiesen worden. (Califano et al, 1996)

Bei den Signaltransduktionswegen, die durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden, spielt der EGF-Rezeptor (EGFR) Weg via Ras - MAPK, PI3K - PTEN -

## Einleitung

---

AKT und der Phospholipase C Signalweg eine wichtige Rolle. (Hynes & Lane, 2005) Der EGF-Rezeptor kann jedoch auch in den Nucleus translozieren und direkt Einfluss auf die Genexpression ausüben. Ein Gen das durch den intranukleären EGF-Rezeptor aktiviert wird, ist CCND1, das für Cyclin D1 kodiert, so dass eine direkte Verbindung und Integration der Zellzykluskaskade und der mitogenen Signaltransduktion besteht. (Lin et al, 2001) Die Option der Amplifikation des EGFR als onkogenes Ereignis wurde 1986 zuerst beschrieben. Die Häufigkeit ist variabel, wurde zwischen 10-30% angegeben und konnte auf den EGFR Genlocus bei 7p11.2 eingeschränkt werden. (Sheu et al, 2009; Temam et al, 2007) Im selben Jahr wurde die Überexpression von EGFR bei Karzinom der Kopf-Hals-Region beschrieben und von weiteren Studien bestätigt die zu einer klinischen Studie führten, welche eine verbesserte Wirksamkeit der Radiotherapie in Kombination mit der Gabe von Antikörpern gegen EGFR beschrieb. (Bonner et al, 2006; Grandis & Tweardy, 1993; Hama et al, 2009; Ozanne et al, 1986)

Mittlerweile wurde gezeigt, dass eine Überexpression von EGFR nur in einem geringen Teil auch mit einer autokatalytischen Aktivierung durch Phosphorylierung einhergeht und Mutationen bei Kopf-Hals-Karzinomen in nur 1-7% gefunden wurden, von denen nur ein geringer Anteil aktivierend mit onkogenem Potential waren. (Hama et al, 2009; Lee et al, 2005; Loeffler-Ragg et al, 2006) Folglich ist die Rolle einer Mutation des EGFR (EGFRvIII) für Kopf-Hals-Karzinome noch nicht geklärt.

Ein weiterer Wachstumsfaktor Rezeptor ist MET (Chromosome 7q31), der Rezeptor des Hepatozyten Wachstumsfaktors (HGF), auch als „scatter factor“ beschrieben, dem eine wichtige Rolle bei Kopf-Hals-Karzinomen zugeschrieben wird. (Knudsen & Vande Woude, 2008) MET ist eine Tyrosinkinase die auch den AKT - Ras Signalweg aktiviert und somit die Transduktion des EGFR-Signals integriert. Für MET sind sowohl Amplifikationen als auch Mutationen bekannt und es wird mittlerweile als wichtiges Onkogen bei Kopf-Hals-Karzinomen beschrieben, das Einfluss auf Zellwachstum, Motilität und Angiogenese nimmt. (Knowles et al, 2009; Seiwert et al, 2009)

Ein weiterer wichtiger Signaltransduktionsweg wird durch das inhibitorische Signal TGF- $\beta$  und seinen Rezeptor TGF- $\beta$ 1 vermittelt, der durch Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 zusammen mit SMAD4 Gene für Apoptose,

## Einleitung

---

Zellproliferation und Überleben reguliert. Eine verminderte Expression des TGF Rezeptors wurde bei vielen Tumoren beschrieben. (Huntley et al, 2004; Wang et al, 1997) Die Verbindung zwischen TGF- $\beta$  Signal und dem nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), der einen wichtigen Faktor für das Zellüberleben darstellt, wurde in Assoziation mit der Karzinogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms beschrieben. (Mishra et al, 2006)

Damit Karzinomzellen der Apoptose entgehen können wird der PI3K - PTEN - AKT Signalweg aktiviert. PI3K ist an Tyrosin Rezeptor Kinasen, wie z.B. EGFR, gekoppelt, die durch Phosphorylierung aktiviert werden. Eine katalytische Untereinheit von PI3K wird durch das Gen PIK3CA auf 3q26 kodiert. Dieser Genort ist bei Kopf-Hals-Karzinomen häufig aktiviert und in 10-20% der Fälle mutiert. (Kozaki et al, 2006; Murugan et al, 2008; Qiu et al, 2006) Die Mutationen führen zu einer erhöhten Migration und Invasion von Krebszellen. (Murugan et al, 2008) Die Induktion der Angiogenese wird aktiviert, sobald ein Tumor ein paar Millimeter im Durchmesser erreicht hat, um die Versorgung mit Nährstoffen, Sauerstoff und den Abtransport von Kataboliten zu ermöglichen. (Folkman, 2002) Alle soliden Tumoren induzieren die Angiogenese durch die Produktion angiogener Faktoren. Der stärkste Induktor ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF). (Kerbel, 2008)

Die Invasion und Metastasierung setzt sich aus mehreren Schritten zusammen. Der erste Schritt ist die Degradierung der extrazellulären Matrix. Ein Zusammenhang mit Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) wurde beschrieben, wobei therapeutische Ansätze gegen MMPs keinen durchschlagenden Erfolg verzeichnen konnten. (Rosenthal & Matrisian, 2006) Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein bestimmtes Expressionsprofil des Primärtumors mit einer Lymphknotenmetastasierung korreliert. (Roepman et al, 2005) Das impliziert, dass bestimmte Genen einer Metastasierung Vorschub leisten können. Diese Expressionsprofile beinhalten viele Gene, die auch bei der epithelialen-mesenchymalen Transition exprimiert werden. (Chung et al, 2006; Thiery, 2002) Weitere Arbeiten beschreiben die Expression von Biomarkern im Speichel, die mit einem Malignitätsrisiko positiv korrelieren. (Bremmer et al, 2005; Shpitzer et al, 2009)

### 2.3.1 Epitheliale-mesenchymale Transition

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist ein biologischer Prozess bei dem polarisierte epitheliale Zellen, die unter physiologischen Bedingungen durch die Basalmembran begrenzt werden, mehrere biochemische Veränderungen durchlaufen, so dass epitheliale Zellen einen mesenchymalen Phänotyp annehmen können. Ein mesenchymaler Phänotyp impliziert unter anderem eine gesteigerte Migrationsfähigkeit, Invasivität und erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose. Eine komplette EMT ist durch Degradierung der Basalmembran und der Formation von mesenchymalen Zellen gekennzeichnet, die sich aus dem epithelialen Zellverband lösen und in die Peripherie migrieren können. Folglich wurde der Verlust von epithelialen und der Zugewinn von mesenchymalen Zelleigenschaften mit einer erhöhten Migrationsfähigkeit der Zellen als EMT definiert. (Kang & Massague, 2004; Voulgari & Pintzas, 2009). Nach Robert A. Weinberg lässt sich die EMT in drei Subtypen klassifizieren. (Kalluri & Weinberg, 2009):

- **Typ1** ist assoziiert mit der **Embryonalentwicklung und Organogenese** bei der unterschiedliche Zellarten entstehen, die Gemeinsamkeiten eines mesenchymalen Phänotyps teilen.
- **Typ2** ist assoziiert mit den Prozessen der **Wundheilung, der Geweberegeneration und Fibrose**. Die Prozesse der Typ2 EMT werden als Teil eines Programms induziert, das Fibroblasten aktiviert um nach Gewebetrauma und Entzündungsprozessen geschädigtes Gewebe zu ersetzen. Im Gegensatz zur Typ1 EMT ist der Typ2 mit Entzündungsprozessen assoziiert, die bei der Wundheilung und Geweberegeneration auftreten und räumlich und zeitlich auf diese Vorgänge beschränkt sind.
- **Typ3** tritt in **neoplastischen Zellen** auf, deren Onkogene und Tumorsuppressorgene genetische und epigenetische Veränderungen durchlaufen haben, die einem klonalen Wachstum und der Karzinogenese Vorschub leisten. Karzinomzellen, die eine Typ3 EMT durchlaufen, wachsen invasiv, metastasieren und stellen die Grundlage eines progressiven Karzinomwachstums dar.

## Einleitung

---

Nicht alle Karzinomzellen durchlaufen den Prozess der EMT, so dass maligne Zellen in unterschiedlichem Ausmaß ihren epithelialen Charakter beibehalten, während andere Zellen einen vollständigen mesenchymalen Charakter annehmen. Eine epitheliale Zellproliferation und Angiogenese sind Schlüsselmechanismen der frühen Karzinogenese. (Hanahan & Weinberg, 2000) Das konsequente invasive Wachstum ist ein weiterer Schritt, der zu einem metastasierenden Wachstum führen kann. Studien beschreiben, dass die Aktivierung des EMT Programms einen wichtigen Mechanismus bei der Akquirierung des malignen Phänotyps der Karzinomzellen darstellt. (Thiery, 2002)

Die Beschreibung der Mechanismen der Metastasierung und des invasiven Wachstums von Karzinomzellen unter molekularbiologischen Gesichtspunkten setzt theoretische Grundlagen der Embryonalentwicklung und Tumorbilogie voraus. Während der Embryonalentwicklung verlieren ektodermale Zellen ihren epithelialen Charakter und reduzieren die Expression epithelialer Adhäsionsmoleküle, wie E-Cadherin. Die Reduktion dieser interzellulären Kontaktmoleküle ermöglicht den Zellen zu migrieren, die Basalmembran zu überschreiten und in angrenzendes, mesenchymales Gewebe zu migrieren. In der Tumorbilogie werden diese Eigenschaften bei der Metastasierung von Karzinomzellen beschrieben. Das gesamte Spektrum der Signalmoleküle, die zur EMT beitragen ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird diskutiert, dass genetische und epigenetische Veränderungen während der initialen Phase der Karzinogenese die Karzinomzellen für EMT-induzierende Signale des Tumorstromas sensibilisieren. (Kalluri & Weinberg, 2009) EMT induzierende Signale, wie HGF, EGF, PDGF, und TGF- $\beta$  aktivieren die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, Sip1/ZEB1 (*zinc-finger E-box binding homeobox 1 gene*), Twist, Goosecoid, und FOXC2, die eine EMT induzieren können. (Hartwell et al, 2006; Kokudo et al, 2008; Mani et al, 2007; Medici et al, 2008; Shi & Massague, 2003; Thiery, 2002) Jeder dieser Transkriptionsfaktoren kann das EMT Programm aktivieren. Wie die Aktivierung der EMT in jeder Zelle umgesetzt wird, ist abhängig von einem intrazellulären Netzwerk von Signalmolekülen, z.B. ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinases*), MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*), Akt, Smads, RhoB,  $\beta$ -catenin, LEF (*Lymphoid Enhancer binding Factor*), Ras und c-Fos, als auch Zellmembranmoleküle wie  $\beta$ 4 Integrine,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1

## Einleitung

---

Integrin und  $\alpha v \beta 6$  Integrin. (Tse & Kalluri, 2007) Dabei kommt auch der Auflösung von Zell-Zell Kontakten und der Interaktion von Integrinen mit der extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle bei der Induktion des EMT Programms zu. (Gupta et al, 2005; Hartwell et al, 2006; Mani et al, 2008; Mani et al, 2007; Taki et al, 2006; Weinberg, 2008; Yang et al, 2006; Yang & Weinberg, 2008) Abhängig vom jeweiligen Kontext kann das TGF- $\beta$  Signal der Karzinomprogression und Metastasierung Vorschub leisten und eine EMT induzieren. (Bierie & Moses, 2006; Hata et al, 1998; Oft et al, 1998; Song, 2007) Zwei unterschiedliche Signalwege sind beschrieben worden, wie durch das TGF- $\beta$  Signal eine EMT induziert werden kann. Der erste Signalweg wird durch die Bindung von TGF- $\beta$  an den TGF- $\beta$  Rezeptor (ALK5) mit konsekutiver Aktivierung von Smad Proteinen vermittelt und führt zur Induktion der EMT. (Derynck et al, 2001; Heldin et al, 1997; Miyazono et al, 2000; Piek et al, 1999; Roberts et al, 2006; Zeisberg et al, 2003)

Ein zweiter Signalweg führt zur Aktivierung von p38 MAPK und RhoA mit autokriner Aktivierung von TGF- $\beta$ . (Bhowmick et al, 2001a) Dieser Signalweg ist abhängig von einem  $\beta 1$  Integrin vermittelten Signal und benötigt die Aktivierung von latent TGF- $\beta$  durch  $\alpha v \beta 6$  Integrin. (Bhowmick et al, 2001b)

Die Rolle einer verminderten Expression von E-Cadherin bei der Induktion der EMT wurde in mehreren Studien beschrieben. (Edelman et al, 1983; Eger et al, 2000; Tepass et al, 2000) An den zytoplasmatischen Anteil von E-Cadherin bindet  $\beta$ -Catenin als Teil des Zelladhäsionskomplexes. Als Signalmolekül wird  $\beta$ -Catenin von einem Proteinkomplex aus GSK3, AXIN und APC phosphoryliert, ubiquitinyliert dem Proteasom zugeführt und proteolytisch abgebaut. Das hat zur Folge, dass Karzinomzellen epitheliale Eigenschaften beibehalten. Bei Verlust der E-Cadherin Expression wird  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma nicht abgebaut und akkumuliert, so dass es in den Nucleus translozieren und als Teil der Tcf/LEF Transkriptionsfaktoren funktionieren kann, was mit der Akquirierung eines mesenchymalen Phänotyps korreliert. (Gottardi et al, 2001; Stockinger et al, 2001) Bei Verlust der E-Cadherin Expression akkumuliert  $\beta$ -Catenin im Nucleus, so dass epitheliale Zellen leichter in die EMT eintreten und ein invasives Wachstumsmuster annehmen. Der Verlust von E-Cadherin führt weiterhin zu einer erhöhten Sensibilität für die Induktion der EMT. (Kim et al, 2002; Thiery, 2002) Auch die epigenetische Regulierung der E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin und

## Einleitung

---

Tcf/LEF Aktivität spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des metastatischen Potentials von Karzinomzellen. (Birchmeier & Behrens, 1994; Hirohashi, 1998; Muta et al, 1996; Saito et al, 1999) Obwohl die Expressionslevel von E-Cadherin bei unterschiedlichen Tumorentitäten starken Schwankungen unterliegen, konnte eine indirekte Korrelation mit dem Expressionslevel von E-Cadherin und der Überlebensrate von Karzinompatienten beschrieben werden. (Hirohashi, 1998) Die zentrale Rolle einer verminderten E-Cadherin Expression bei der EMT wird deutlich, wenn man die Funktion von EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren in Betracht zieht, deren Expression zur Akquirierung eines mesenchymalen Phänotyps führt. Diese Transkriptionsfaktoren, i.e. Snail und Slug als auch SIP1 sowie E12, die durch das TGF- $\beta$  Signal induziert werden, führen zu einer Repression der E-Cadherin Expression. (Medici et al, 2008) In Verbindung mit klinischen Daten konnte gezeigt werden, dass die Expression von Snail und E-Cadherin invers mit der Prognose von Patienten mit Brustkrebs und mit oralen Plattenepithelkarzinomen korreliert. (Blanco et al, 2002; Yokoyama et al, 2001)

Diese Arbeiten zeigen, dass die EMT mit der Expression spezifischer Markergene assoziiert ist. Dabei kommt  $\alpha v \beta 6$  Integrin für die Interaktion zwischen invasiv wachsenden Zellen und dem angrenzenden Gewebe (Stroma), sowie für die Vermittlung von Zellsignalen, wie TGF- $\beta$ , eine entscheidende Rolle zu.

Für die Charakterisierung eines potentiellen Biomarkers für invasive Karzinomzellen wird dieser Arbeit die Arbeitshypothese zugrunde gelegt, dass bei der Invasion von epithelialen Karzinomzellen in mesenchymales Knochengewebe  $\alpha v \beta 6$  Integrin von Karzinomzellen an der Invasionsfront exprimiert wird. Gegenstand dieser Arbeit war es, die Hypothese zu testen, ob Karzinomzellen, die invasiv in Knochengewebe einwachsen, migrieren, proliferieren und eine Resistenz gegen Apoptose bei unphysiologischen Zellkontakt (=Anoikis) entwickeln,  $\alpha v \beta 6$  Integrin exprimieren. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, könnte  $\alpha v \beta 6$  Integrin als Biomarker dienen, um Karzinomzellen im Knochengewebe nachzuweisen.

### 2.3.1.1 Funktion von $\alpha\beta6$ Integrin bei der Invasion von Karzinomzellen

Als heterodimeres transmembranes Glykoprotein (135kD) besteht  $\alpha\beta6$  Integrin aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit. Integrine gehören zu einer großen Familie von Oberflächenproteinen, die mit Komponenten der ECM, wie Fibronectin, Kollagene und Laminin interagieren und sowohl für die Zell-Zell Interaktion als auch für den Kontakt zwischen Karzinomzellen und dem Stroma nötig sind.

Durch diese Interaktionen vermitteln Integrine eine extra-/intrazelluläre Signaltransduktion, die Einfluss auf praktisch alle höheren Zellfunktionen, wie Zellüberleben, Zelldifferenzierung und Proliferation ausübt. (Lock et al, 2008) Zellen wachsen und teilen sich nur, wenn sie in physiologischen Kontakt zur ECM stehen. Bei einer Störung der Interaktion zwischen Epithelzellen und der ECM wird ein programmierter Zelltod, i.e. Anoikis, induziert. (Frisch & Francis, 1994) Durch Veränderung der Expression von Oberflächenproteinen, wie Integrine, können Zellen den Kontakt zur ECM wieder herstellen und somit eine Resistenz gegen Anoikis aufbauen. Bei Plattenepithelkarzinomzellen ist ein dynamischer Wechsel der Integrin-Konfiguration, ein sogenannter Integrin-Switch, mit einem Überlebensvorteil verbunden. (Abbildung 1)

Diese Kommunikation via Integrine ermöglicht das Überleben von Karzinomzellen, so dass  $\alpha\beta6$  Integrin nicht nur verhindert, dass die Zellen in Ihrer unphysiologischen Umgebung apoptotisch werden (Anoikis), sondern vermittelt wichtige Informationen der Signaltransduktion, i.e. TGF- $\beta$ , für die EMT.

Die Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin ist auf epitheliale Zellen beschränkt. In differenzierten epithelialen Geweben ist  $\alpha\beta6$  Integrin kaum zu detektieren, wird jedoch im Rahmen der Wundheilung, bei Entzündungsprozessen und bei der Karzinogenese stark induziert. (Breuss et al, 1995) Basierend auf *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass  $\alpha\beta6$  Integrin die Migration, Ausbreitung und Proliferation epithelialer Zellen, als auch das Wachstum bei der Reorganisation des Epithels während der Entwicklung, der Wundheilung und bei Neoplasien induziert, so dass es als potentieller Regulator des Karzinomwachstums diskutiert wurde. (Breuss et al, 1995; Agrez et al, 1994; Jones et al, 1997; Koivisto et al, 2000) Das am häufigsten hoch regulierte Integrin bei epithelialen Tumoren ist  $\alpha\beta6$  Integrin und wird bei Mammakarzinomen, Lungenkarzinomen,

## Einleitung

---

Kolonkarzinomen und bei oralen Plattenepithelkarzinomen überexprimiert. (Arihiro et al, 2000; Smythe et al, 1995; Agrez, 1996; Breuss et al, 1995; Jones et al, 1997)

Basierend auf Studien mit  $\beta 6$  defizienten Keratozyten wurde vorgeschlagen, dass  $\alpha v\beta 6$  Integrin eine Rolle im Rahmen der Zellmigration spielt. (Huang et al, 1998)

Bekannte Liganden von  $\alpha v\beta 6$  Integrin inkludieren latent TGF- $\beta 1$ , Fibronectin, Tenascin-c und Vitronectin. (Munger et al, 1999; Busk et al, 1992; Prieto et al, 1993; Huang et al, 1998) Interaktionen zwischen Zellen und der ECM sind von entscheidender Bedeutung bei der Invasion von Karzinomzellen in benachbarte Gewebestrukturen.

Folglich wird Integrinen eine zentrale Rolle bei der Karzinogenese zugesprochen, indem sie Einfluss auf die Signaltransduktion, Genexpression, Zellproliferation, Invasion, Regulierung der Apoptose/Anoikis, Metastasierung und Angiogenese nehmen. (Varner & Cheresch, 1996)

Folgende Funktionen wurden mit der Expression von  $\alpha v\beta 6$  Integrin assoziiert:

1) Aktivierung des TGF- $\beta 1$  Signalwegs, führt zur EMT und resultiert in der Expression von  $\alpha v\beta 6$ . Die Expression von  $\alpha v\beta 6$  führt zur erneuten Aktivierung von TGF- $\beta 1$ . (= *self sufficiency in growth signals*)

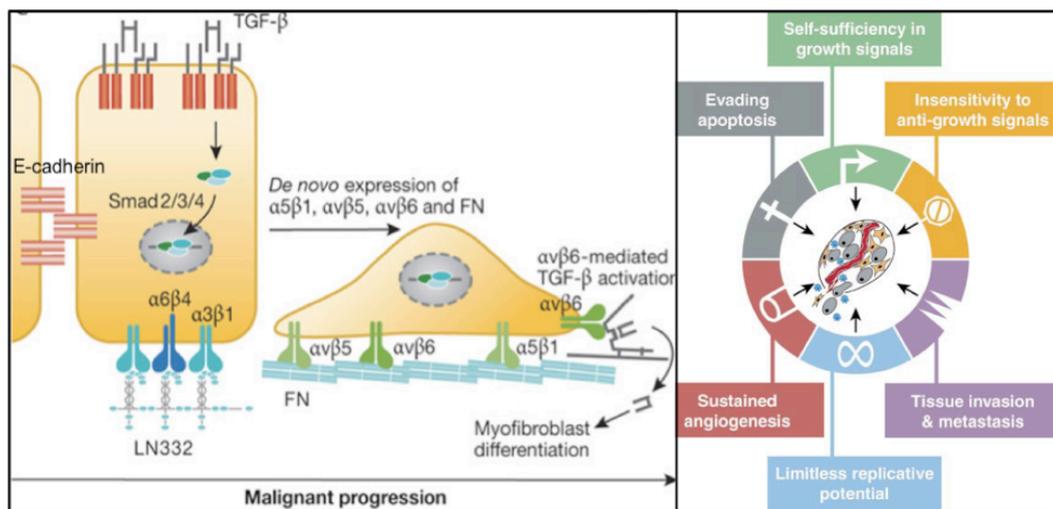
2)  $\alpha v\beta 6$  vermittelt die Signaltransduktion zwischen extrazellulärer Matrix (Vitronectin, Tenascin, Fibronectin, Osteopontin) und dem Zytosol. Dadurch wird die Signaltransduktion zwischen Zellen epithelialen Ursprungs im mesenchymalen Stroma ermöglicht und die Apoptose/Anoikis gehemmt. (= *insensitivity to anti-growth signals and evading apoptosis*)

3) Im Rahmen der malignen Transformation und der EMT kommt es zu einer verminderten Expression von E-Cadherin.

4)  $\alpha v\beta 6$  fördert Zellmigration und Invasion durch Induktion von MMP3/9 und uPA (3.+4. = *tissue invasion and metastasis*)

5) Induktion der Zellproliferation (= *limitless replicative potential*)

Diese Funktionen finden ihre Entsprechung in den bekannten "Six Hallmarks of Cancer" (in Klammern). (Hanahan & Weinberg, 2000) Dementsprechend ist die *de novo* Expression von  $\alpha v\beta 6$  Integrin ein elementarer Faktor der Karzinogenese, Invasion und Metastasierung. Abbildung 1 illustriert die Veränderungen im Rahmen der malignen Progression.



**Abbildung 1: Funktion von  $\alpha v \beta 6$  Integrin bei der malignen Progression und Invasion epithelialer Zellen**

Bei der malignen Entartung epithelialer Zellen induziert das TGF- $\beta$  Signal die Expression von Fibronectin,  $\alpha 5 \beta 1$  und  $\alpha v \beta 6$  Integrin.

Die Expression von  $\alpha v \beta 6$  führt zur Zellmigration und Invasion. Die *de novo* Expression von  $\alpha v \beta 6$  generiert neues, aktives TGF- $\beta$ , das zur Stimulation weiterer Karzinomzellen führt. FN, Fibronectin; LN332, Laminin 332.

Die einzelnen Funktionen, die mit der *de novo* Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin assoziiert sind, finden ihre Entsprechung in den bekannten "Six Hallmarks of Cancer". Angepasst von (Margadant & Sonnenberg, 2010) und (Hanahan & Weinberg, 2000).

## **2.4 Stellenwert einer intraoperativen Karzinomdiagnostik und Darstellung der klinischen Situation**

### **2.4.1 Stellenwert einer intraoperativen Karzinomdiagnostik**

Im Rahmen der Tumorresektion ist die Schnellschnittdiagnostik eine etablierte und sichere Methode, um Tumorresiduen an den Resektionsrändern des Weichgewebes zu sichern. Die intraoperative Beurteilung knöcherner Tumorresektionsränder stellt eine bislang ungelöste klinische Problematik dar. Kalzifiziertes Knochengewebe ist ein mechanisches Hindernis bei der Verarbeitung mit Standardmethoden der Schnellschnittdiagnostik. Eine mehrtägige Dekalzifizierung ermöglicht es, Knochengewebe zu schneiden und mit den Techniken der histologischen Weichgewebeverarbeitung zu analysieren. Aufgrund der langen Verarbeitungszeit der Knochenproben ist diese Technik für eine intraoperative Diagnostik nicht in Betracht zu ziehen. Die technische Limitation der Knochendiagnostik führt zu Einschränkungen in der rekonstruktiven Tumorchirurgie. Bei Patienten mit umfangreicher Tumorresektion und Tumorinfiltration des Knochens ist die primäre Rekonstruktion der knöchernen Strukturen und des Weichgewebes mit mikrovaskulären Transplantaten das beste operative Vorgehen, um eine zeitnahe, funktionelle und morphologische Rehabilitation zu ermöglichen. Eine primäre Rekonstruktion ist mit einer höheren Lebensqualität für Tumorpatienten verbunden. (Holzle et al, 2007; Maciejewski & Szymczyk, 2007; Markowitz & Calcaterra, 1994) Mehrere Studien konnten belegen, dass der Resektionsstatus, das Ausmaß der knöchernen Beteiligung und der Umfang der knöchernen Resektion die Prognose der Patienten beeinflusst. (Munoz Guerra et al, 2003b; O'Brien et al, 2003b; Schliephake et al, 1996; Wong et al, 2000)

Für eine primäre Rekonstruktion nach der Tumorresektion ist die intraoperative Kontrolle aller Tumorresektionsränder unabdingbar. Eine Revision und Nachresektion des Knochens in einer zweiten Operation im voroperierten und eventuell vorbestrahlten Gewebe ist, neben der Belastung des Patienten, durch Fibrosierung und Narbenbildung mit einem stark erhöhten Operationsrisiko für die mikrovaskuläre Versorgung des Transplantats verbunden. Dieses Risiko ist bei einem limitierten Angebot autologer osteo-(myo-)kutaner Transplantate nicht

vertretbar, so dass für eine primäre Rekonstruktion eine intraoperative Sicherung der Tumorfreiheit des Knochens gefordert werden muss. Bis zum aktuellen Zeitpunkt lässt sich allein durch klinische und radiologische Parameter das Ausmaß der Tumorinfiltration des Knochens und somit die Resektionsgrenzen nicht genau festlegen. (Bremerich et al, 1992; Forrest et al, 1997; Hong et al, 2001; Wolff et al, 2004b) Im Bereich des Unterkieferknochens ist somit die Frage nach einer Teil- oder Segmentresektion Gegenstand mehrerer Diskussionen. (Krause et al, 1992; Munoz Guerra et al, 2003b; Politi et al, 2000; Wolff et al, 2004b)

Verschiedene methodische Ansätze wurden beschrieben, um sich dieser Problematik mit einer intraoperativen Schnelldiagnostik für Knochengewebe zu nähern. Die aktuelle Datenlage lässt bisher keine einheitliche Schlussfolgerung mit klaren Richtlinien zu.

### **2.4.2 Vorarbeiten auf dem Gebiet der intraoperativen Beurteilung knöcherner Resektionsränder**

Forrest et al. postulierte eine Ausbreitung der Tumorinfiltration entlang des Knochenmarks und beschrieb eine Gefrierschnittdiagnostik des spongiösen Knochens als methodischen Ansatz für eine intraoperative Diagnostik. Im Vergleich zur konventionellen Diagnostik mit dekalzifizierten Knochenproben wurde mit diesem Ansatz eine Sensitivität von 98% beschrieben. (Forrest et al, 1997) Brown et al. hingegen revidierte die Aussage der Ausbreitung von Tumorzellen entlang des Knochenmarks. (Brown, 2003) Oxford et al. beschrieb eine intraoperative Gefrierschnittdiagnostik des kortikalen Knochens mit einer Sensitivität von 88,9% und einer Spezifität von 100%. (Oxford & Ducic, 2006)

Ein weiterer Lösungsansatz wurde von Wysluch et al. dargestellt. Durch Trepanbohrungen wurden Knochenproben gewonnen, die im histologischen Schnellschnittverfahren in 94% der Fälle eine diagnostische Übereinstimmung mit der konventionellen Knochenhistopathologie zeigten. (Wysluch et al, 2010)

Ein ähnlicher Ansatz wurde kürzlich dargestellt, um Knochenmarkbiopsien durch Gefrierschnitttechnik im Vergleich zu Schnellschnittuntersuchungen des Nervus alveolaris inferior zu evaluieren. In diesen Untersuchungen wurde eine Sensitivität von 50% erreicht. (Bilodeau & Chiosea, 2011)

Im Rahmen einer Pilotstudie mit sieben Patienten beschrieb Mahmood et al. die Praktikabilität einer zytologischen Beurteilung des spongiösen Knochens mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 100%. (Mahmood et al, 2001)

Bisher konnte jedoch keine der genannten Ansätze für die intraoperative Beurteilung der knöchernen Resektionsränder bei Kopf-Hals-Karzinomen in der klinischen Routinediagnostik etabliert und ihre diagnostische Wertigkeit getestet werden. In dieser Arbeit wird ein zytologischer Ansatz zur intraoperativen Beurteilung knöcherner Resektionsränder vorgestellt und beschreibt die Etablierung und Evaluierung der diagnostischen Wertigkeit im Rahmen der klinischen Routinediagnostik. Das Ziel, auch einzelne Karzinomzellen in einem zytologischen Ausstrichpräparat zu detektieren legt nahe, dass, neben einer zytomorphologischen Beurteilung, die Markierung invasiver Karzinomzellen im Sinne einer immun(fluoreszenz)zytologischen Färbung eine ergänzende Option darstellt. Für die Markierung invasiver Karzinomzellen können Proteine dienen, die im Rahmen der malignen Progression und Invasion exprimiert werden. Im Folgenden wird  $\alpha\beta6$  Integrin als potentieller Biomarker invasiver Karzinomzellen des Knochenmarks beschrieben.

### **2.4.3 $\alpha\beta6$ Integrin als potentieller Biomarker invasiver Karzinomzellen des Knochenmarks**

Für die Charakterisierung eines Biomarkers invasiver Karzinomzellen ging die Überlegung voraus, dass Zellen epithelialen Ursprungs, die ihre physiologische Umgebung verlassen und invasiv in angrenzendes, mesenchymales Gewebe infiltrieren und proliferieren, die Basalmembran und somit Keimblattgrenzen überschreiten. Der Prozess der Migration epithelialer Zellen über Keimblattgrenzen hinweg, zusammen mit dem Zugewinn mesenchymaler Zellcharakteristika, wird in der Entwicklungsbiologie als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) beschrieben. In Analogie zur EMT werden ähnliche physiologische und molekulare Mechanismen bei invasivem Karzinomwachstum und bei der Metastasierung beobachtet, so dass der tumorbiologischen Charakterisierung der molekularbiologischen Prozesse bei der Invasion und Metastasierung die EMT zugrunde gelegt wird. (Theveneau & Mayor, 2012)

## Einleitung

---

In der Tumorbiologie können mehrere Parallelen zwischen der EMT und der Metastasierung von Karzinomzellen gezogen werden. Bei beiden Prozessen kann der Verlust von epithelialen und der Zugewinn von mesenchymalen Zelleigenschaften beobachtet werden, der mit einer Veränderung spezifischer Markergene assoziiert ist. Interessant ist, dass  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin in invasiven Plattenepithelkarzinomzellen der oralen Mukosa *de novo* exprimiert wird. (Breuss et al, 1995)

Für die Charakterisierung eines Biomarkers invasiver Karzinomzellen des Knochenmarks legten wir die Arbeitshypothese zugrunde, dass bei der Invasion epithelialer Tumore in mesenchymales Knochengewebe  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin von Karzinomzellen der Invasionsfront exprimiert wird. Wir postulierten, dass Karzinomzellen, die invasiv in Knochengewebe einwachsen, durch eine hohe  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin Expression charakterisiert werden könnten. Folglich wurde in der vorliegenden Arbeit dieses Protein als potentieller Biomarker für migrierende, invasive Karzinomzellen des Knochenwebes untersucht. Ziel war es, invasive Karzinomzellen des Knochengewebes anhand ihrer Proteinexpression spezifisch zu markieren. Ein spezifischer Biomarker invasiver Karzinomzellen kann Anwendung finden, um im Rahmen einer intraoperativen zytologischen Beurteilung knöcherner Resektionsränder potentielle Karzinomzellen immun(fluoreszenz)zytologisch zu markieren und somit leichter und sensitiver detektieren zu können.

### 3 Ziel und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, eine sichere und sensitive diagnostische Methode zu entwickeln, mit der knöchernen Resektionsränder intraoperativ hinsichtlich einer Karzinominfiltration beurteilt werden können. Die Methode soll für die klinische Routinediagnostik ausgelegt sein. Die Praktikabilität der Methode soll im Rahmen der klinischen Routine evaluiert und ihre diagnostische Validität, Reliabilität sowie ihre Sensitivität und Spezifität im Vergleich zur konventionellen Knochendiagnostik analysiert werden. Bei positiver Evaluierung soll die Methode für die intraoperative Beurteilung der knöchernen Resektionsgrenzen klinisch etabliert werden.

Zur Detektion invasiver Karzinomzellen im Knochengewebe soll ein spezifischer Biomarker charakterisiert werden. Es soll beantwortet werden, ob Karzinomzellen, die invasiv in Knochengewebe einwachsen,  $\alpha v \beta 6$  Integrin exprimieren. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob  $\alpha v \beta 6$  Integrin als diagnostischer Biomarker dienen könnte um invasiv wachsende und migrierende Karzinomzellen im Knochengewebe nachzuweisen. Ziel der Charakterisierung eines Biomarkers ist es eine ergänzende, spezifische immun(fluoreszenz)zytologische Markierung potentieller Karzinomzellen im Knochengewebe zu erarbeiten.

Diese Studie soll prüfen, ob eine immun(fluoreszenz)zytologische Schnellfärbung mit  $\alpha v \beta 6$  Integrin und E-Cadherin die Detektion von Karzinomzellen im Knochengewebe erleichtern kann.

# 4 Material und Methoden

## 4.1 Patienten und Untersuchungsmaterial

Im Vorfeld wurden unterschiedliche Optionen der Verarbeitung von Knochengewebe methodisch erörtert. Im Rahmen von operativen Kursen an humanen Präparaten in den Anatomischen Anstalten der Charité Berlin und der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden spongiöse und kortikale Knochenproben aus dem Os ilium (n=45) und der Fibula (n=40) entnommen. Es wurden Proben, sowohl von lyophilisierten als auch von Formalin-fixierten humanen Präparaten gewonnen. Die Proben wurden luftdicht gelagert und verschiedenen Methoden der Gewebeaufbereitung zugeführt.

Verschiedene Ansätze der Gewebeaufbereitung für eine intraoperative Diagnostik wurden getestet: Die Verkürzung des chemischen Entkalkungsprozesses mit 20% EDTA oder 10% Zitronensäure wurde durch Applikation von Wärme beschleunigt. Ein zweiter Ansatz wurde mit der Kryoschnitttechnik des Schnellschnittverfahrens am spongiösen Knochengewebe unternommen. Eine zytologische Beurteilung der knöchernen Gewebeproben erfolgte wie beschrieben unter 4.4.1.

Für die Charakterisierung eines Biomarkers für invasive Karzinomzellen des Knochens wurden von Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten histologischen Präparaten von 50 Karzinompatienten, bei denen eine Infiltration eines Plattenepithelkarzinoms in den kortikalen und spongiösen Anteil der Mandibula diagnostiziert wurde, Leerschnitte für immunhistologische Untersuchungen und Proteinisolierungen für Western blot Analysen angefertigt.

Im klinischen Teil der Studie wurden Patienten eingeschlossen, die sich im Zeitraum von 2010 bis 2012 in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar mit der histologisch gesicherten Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich vorstellten. Bei 28 Patienten, mit klinischem und CT-morphologischem Hinweis einer Karzinom-infiltration der Mandibula, wurde eine Segment- oder Teilresektion des Unterkiefers durchgeführt. Aus dem Bereich der knöchernen Resektionsränder und dem zentralen Invasionsbereich wurden Gewebeproben entnommen und einer intraoperativen zytologischen Untersuchung zugeführt. Die zytologischen

Befunde wurden mit den Ergebnissen der konventionellen, histologischen Untersuchung nach Entkalkung des Knochengewebes verglichen. Alle Patienten gaben nach Information und Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Durchführung der Studie. Die Studie wurde von Seiten der Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar bewilligt (Ethikvotum: 2435/09).

### **4.2 Laborausstattung und Geräte**

#### **4.2.1 Für Histologie und zytologische Untersuchungen**

AxioCam HRC®, Zeiss, Jena, Germany

Superfrost Plus® Gläser (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)

Wärmeschrank (Thermo Scientific Function Line®, Firma Heraeus, Hanau)

Wasserbad (Typ 1003, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel)

#### **4.2.2 Für Immunfluoreszenzzytologie**

Olympus System Mikroskop BX 53 (Olympus, 31 Gilby Road, Mount Waverely, VIC., 3149, Australien)

Olympus Digitalkamera DP 72 in Kombination mit Olympus System Mikroskop BX 53 (Olympus, 31 Gilby Road, Mount Waverely, VIC., 3149, Australien)

Lichtquelle: X-CITE® 120PC Q (Lumen Dynamics Group Inc. 2260 Argentia Road Mississauga, Ontario L5N 6H7, Canada)

Software: Cellsens Digital Imaging Software For Research Applications (Olympus, 31 Gilby Road, Mount Waverely, VIC., 3149, Australien)

Superfrost Plus® Gläser (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)

### **4.3 Histologische und immunhistologische Methoden**

#### **4.3.1 Histologie**

Für histologische Färbungen wurden von entkalkten, Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Proben knocheninfiltrierender Karzinomresektate von 50 Patienten 4µm Schnitte erstellt. Die Schnitte wurden für die Entfernung des

## Material und Methoden

---

Paraffins 2 mal für je 10 Minuten in Xylol inkubiert, gefolgt von einem 10-minütigen Inkubationsschritt mit Xylol/Ethanol. Die Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit destilliertem Wasser gereinigt. Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung erfolgte nach Standardverfahren. Die Schnitte wurden mit Eosin und Hämalaun (*Mayer's hematoxylin, Firma Bio Optica, Mailand, Italien*) gefärbt und für 10 Minuten gebläut. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe mit einer abschließenden Ethanol/Xylol Lösung, gefolgt von 2-maliger Xylol Inkubation wurden die Schnitte mit DPX und Deckgläsern (*Thermo Scientific, Firma Menzel Gläser GmbH, Braunschweig*) versiegelt.

### 4.3.2 Immunhistologie

Für immunhistologische Färbungen wurden von entkalkten, Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Proben knocheninfiltrierender Karzinomresektate 4µm Schnitte erstellt. Die Schnitte wurden für die Entfernung des Paraffins und Dehydrierung, wie in 4.3.1 beschrieben, behandelt. Für die Demaskierung immunreaktiver Antigene wurden die Schnitte für 10 Minuten bei 37°C (*Thermo Scientific Function Line, Firma Heraeus, Hanau*) mit Proteinase K (*Proteinase K ready-to-use, Firma Dako, Glostrup, Dänemark*) verdaut und nach dem Abkühlen mit PBS gespült. Für die Inhibition der endogenen Peroxidase wurde 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Firma Merck KGaA, Darmstadt*) für 10 Minuten appliziert. Nach kurzen Spülen wurden die Schnitte mit Blocking Reagenz aus 30µl Serum (*normal goat serum S-1000, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) in 1ml PBS-Puffer mit 0,1% BSA (*albumin from bovine serum, Firma Sigma-Aldrich, St.Louis, USA*) für 30 Minuten geblockt. Die Blocking Reagenz wurde mit einem Filterpapier abgenommen, der erste Antikörper (*anti-αvβ6 Integrin monoklonaler Antikörper, BiogenIdec*) appliziert und die histologischen Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach 3-maligem Spülen mit PBS für 5 Minuten wurde der 2. Antikörper (*biotinylierter anti-mouse IgG Antikörper, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) appliziert und die Schnitte für 1h inkubiert. Nach 3-maligem Spülen mit PBS für 5 Minuten wurde die Streptavidin Lösung (*Vectastain ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) für 45 Minuten appliziert. Nach 3-maligem Spülen mit PBS für 5 Minuten wurde DAB für 5-10 Minuten aufgetragen (1µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 500ml DAB). DAB

## **Material und Methoden**

---

wurde bei suffizienter Färbung abgewaschen und in destilliertem Wasser für 2 Minuten gespült. Abschließend wurden die Schnitte mit Hämalaun (*Mayer's hematoxylin, Firma Bio Optica, Mailand, Italien*) gefärbt und für 10 Minuten gebläut. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe, mit einer abschließenden Ethanol/Xylol Lösung, gefolgt von 2-maliger Xylol Inkubation, wurden die Schnitte mit DPX und Deckgläsern (*Thermo Scientific, Firma Menzel Gläser GmbH, Braunschweig*) versiegelt.

### **4.3.2.1 Antikörper für Immunhistologie**

#### Primärantikörper:

Anti- $\alpha$ v $\beta$ 6 Integrin monoklonaler Antikörper Klon # 6,2A

Konzentration: 1,67mg/ml, Verdünnung 1:1000

Hersteller: *BiogenIdec, Paul Weinreb* (Weinreb et al, 2004)

#### Sekundärantikörper:

biotinylierter anti-mouse IgG Antikörper, Verdünnung 1:200

Hersteller: *Vector Laboratories, Burlingame USA*

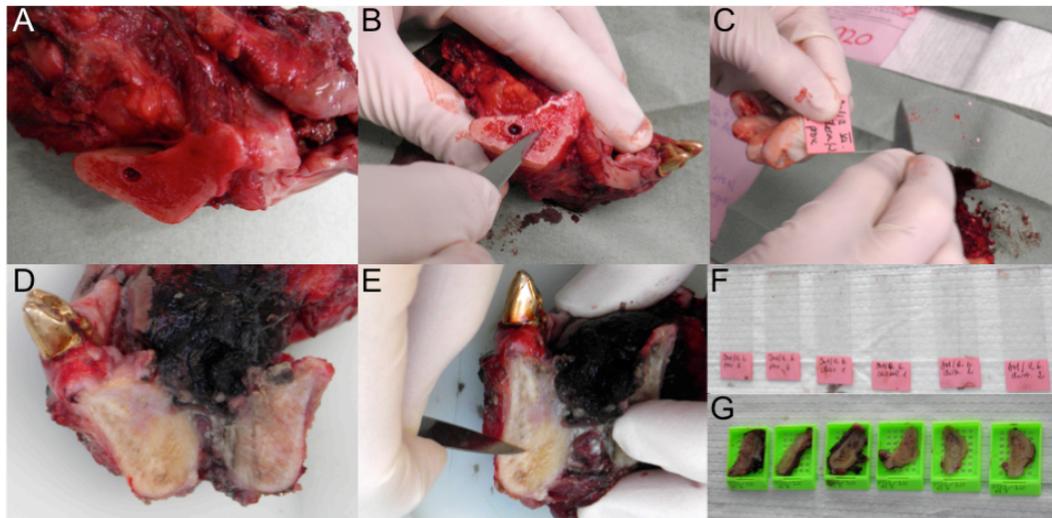
## **4.4 Zytologische und Immunzytologische Methoden**

### **4.4.1 Erstellung der zytologischen Präparate**

Bei Patienten mit Karzinominfiltration der Mandibula, bei denen eine Segment- oder Teilresektion durchgeführt wurde, sind Gewebeproben der knöchernen Resektionsränder entnommen und zytologische Präparate erstellt worden. Als positive Kontrollen dienten Proben aus dem zentralen Invasionsbereich des Karzinoms, der klinisch und CT-morphologisch eine Infiltration des spongiösen Knochens zeigte und histologisch bestätigt wurde. Zytologische Präparate von gesundem, spongiösem Knochengewebe dienten als negative Kontrolle. Die Präparate wurden durch dreimaliges Abstreichen der Resektionsstelle auf den Objektträger erstellt. Zusätzlich erfolgte die Probenentnahme mit einem sterilen Skalpell. Die zytologischen Ausstriche wurden luftgetrocknet und mit der Hemacolor® Färbelösung (*Merck, Darmstadt, Germany*) sowie mit HE gefärbt.

## Material und Methoden

Im Rahmen der klinischen Routinediagnostik wurden bei 28 Patienten mit Resektion knöcherner Anteile der Mandibula, 174 Ausstrichpräparate der knöchernen Resektionsränder der zytologischen Schnelldiagnostik unterzogen und evaluiert. Siehe Abbildung 2.



**Abbildung 2: Probengewinnung und Erstellung zytologischer Präparate**

- A) Resektat eines Plattenepithelkarzinoms mit Knocheninfiltration
- B) Probenentnahme aus dem Bereich der Resektionsränder
- C) Erstellung zytologischer Abstrichpräparate auf Objektträger
- D) Darstellung des zentralen Invasionsbereichs des Karzinoms in den Knochen
- E) Gewinnung von Proben aus dem zentralen Invasionsbereich für positive Kontrollen
- F) Darstellung der zytologischen Abstrichpräparate
- G) Korrelation der zytologischen Abstrichpräparate mit den histologischen Präparaten der korrespondierenden Knochenproben

### 4.4.2 Auswertung der zytologischen Präparate

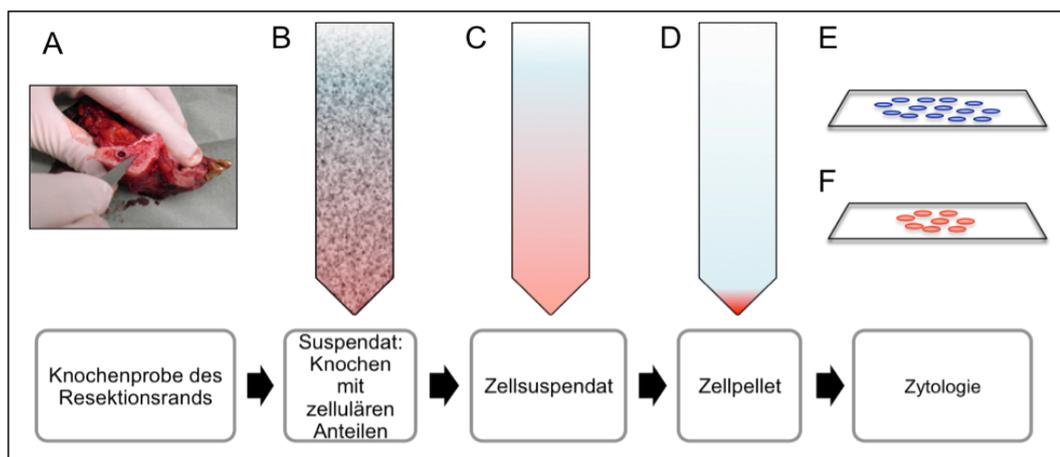
Die zytologischen Ausstrichpräparate wurden von zwei unabhängigen Zytopathologen untersucht, die bezüglich der Entnahmestelle verblindet waren. Die zytologischen Präparate wurden entweder als negativ/gutartig, verdächtig oder positiv/maligne deklariert. Verdächtige Zytologien wurden unter den positiven Befunden subsumiert, da die Konsequenz beider Befunde eine Erweiterung des Resektionsrandes zur Folge hatte. Die zytologischen **Kriterien** für Malignität umfassen **heterochromatische Nuclei**, **eine Veränderung des**

### Kern/Plasma Verhältnisses zu Gunsten des Nucleus, Anisokariose, Kernpolymorphismen und multiple Nucleoli.

Von den korrespondierenden Entnahmestellen der zytologischen Präparate, wurden histologische Schnitte erstellt und nach Standardprotokoll mit Formalin fixiert, mit Ameisensäure entkalkt und in Paraffin eingebettet. Die histologischen Schnitte wurden entweder als negativ/gutartig oder positiv/maligne eingestuft. Die Ergebnisse der zytologischen und der histologischen Untersuchung wurden verglichen und die Sensitivität und Spezifität, sowie der negative und positive prädikative Wert in Bezug auf die Ergebnisse der standardisierten histologischen Diagnostik bewertet.

#### 4.4.3 Zellaufreinigung von Knochenmarkproben

Von Knochenproben wurde ein Teil des Gewebes mit einem Skalpell zerkleinert und in PBS (1g Knochengewebe/ml PBS) gelöst. Das Suspendat wurde vier mal gevortext. Das gesamte Volumen wurde durch einen Zellfilter (*BD Falcon, Cell Strainer, 100 $\mu$ m*) gegeben, um die knöchernen Bestandteile von den zellulären zu trennen. Das Eluat wurde mit 1800rpm in einem Falcontube für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 100 $\mu$ l PBS resuspendiert. Das aufgereinigte Zellsuspendat wurde auf Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas ausgestrichen. Das zytologische Präparat wurde den beschriebenen zytologischen und immunzytologischen Färbungen unterzogen. Der Überstand wurde abgenommen und zytologisch auf verbleibende zelluläre Bestandteile untersucht. Siehe Abbildung 3. Vergleiche Abbildung 11A-D.



### Abbildung 3: Schematische Illustration der Isolierung und Aufreinigung von zellulären Bestandteilen aus Knochenproben

- A) Entnahme einer Knochenprobe und Zerkleinerung der spongiosen und kortikalen Anteile
- B) Suspendierung der Gewebeprobe in PBS (1g/1ml PBS) und Lösen der zellulären Anteile durch mehrfaches vortexen. Die zellulären Bestandteile des Gewebesuspendats wurden mit einem Zellfilter isoliert.
- C) Das resultierende Eluat enthält isolierte zelluläre Bestandteile ohne Spongiosabälkchen oder kortikaler Anteile.
- D) Zentrifugation des Eluats mit 1800rpm in einem Falcontube für 2 Minuten.
- E) Nach Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und kann der zytologischen Beurteilung zugeführt werden.
- F) Das konzentrierte Zellpellet wird in 100µl PBS resuspendiert und kann der zytologischen Beurteilung zugeführt werden. Die schematische Illustration ist nicht maßstabsgetreu.

#### 4.4.4 Erstellung immunzytologischer Präparate

Bei den immunzytologischen Färbungen wurden die zytologischen Abstrichpräparate luftgetrocknet und mit Aceton für 10 Minuten bei RT fixiert. Im Anschluss wurden die Präparate luftgetrocknet und für 20 Minuten bei RT mit PBS mit 1% BSA (*albumin from bovine serum, Firma Sigma-Aldrich, St.Louis, USA*) inkubiert. Das Serum wurde von den Objektträgern abgenommen und die zytologischen Präparate mit dem Primärantikörper anti- $\alpha\beta6$  Integrin (*Biogen/dec*) (1:1000) für 1h bei RT inkubiert. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die zytologischen Präparate 3 mal mit PBS gewaschen, der Sekundärantikörper (*biotinylierter anti-mouse IgG Antikörper, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) aufgetragen und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die zytologischen Präparate 3 mal für 2 Minuten in PBS gewaschen und Streptavidin (*Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) für 30 Minuten bei RT appliziert. Nach 3-maligem Spülen mit PBS für 5 Minuten wurde DAB für 5-10 Minuten aufgetragen (1µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 500ml DAB). DAB wurde bei suffizienter Färbung abgewaschen und in destilliertem Wasser für 2

## **Material und Methoden**

---

Minuten gespült. Die Schnitte wurden mit DPX und Deckgläsern (*Thermo Scientific*, *Firma Menzel Gläser GmbH, Braunschweig*) versiegelt.

### **4.4.4.1 Antikörper für Immunzytologie**

#### Primärantikörper:

Anti- $\alpha$ v $\beta$ 6 Integrin monoklonaler Antikörper Klon # 6,2A

Konzentration: 1,67mg/ml

Verdünnung: 1:1000

Hersteller: *Biogen/dec, Paul Weinreb* (Weinreb et al, 2004)

#### Sekundärantikörper:

biotinylierter anti-mouse IgG Antikörper

Hersteller: *Vector Laboratories, Burlingame USA*

### **4.4.5 Immunfluoreszenzzytologie**

Für die immunfluoreszenzzytologischen Färbungen wurden die zytologischen Abstrichpräparate luftgetrocknet und mit Aceton für 10 Minuten bei RT fixiert. Im Anschluss wurden die Präparate luftgetrocknet und für 20 Minuten bei RT mit PBS mit 1% BSA (*albumin from bovine serum, Firma Sigma-Aldrich, St.Louis, USA*) inkubiert. Das Serum wurde von den Objektträgern abgenommen und die zytologischen Präparate mit dem Primärantikörpern anti- $\alpha$ v $\beta$ 6 Integrin (*Biogen/dec*) (1:1000) und E-Cadherin Alexa 555 (BD Pharmingen) (1:100) für 1h bei RT inkubiert. Nach Inkubation mit dem Primärantikörpern wurden die zytologischen Präparate 3 mal mit PBS gewaschen, der Sekundärantikörper anti-mouse, Streptavidin Alexa 488 (*Invitrogen*) (1:200) aufgetragen und wurde für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die zytologischen Präparate 3 mal für 2 Minuten in PBS gewaschen und Streptavidin (*Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) für 30 Minuten bei RT appliziert. Bei der direkten Immunfluoreszenz (DIF) wurde ein Primärantikörper verwendet, der direkt mit Alexa 555 gekoppelt war (E-Cadherin Alexa 555).

## Material und Methoden

---

### 4.4.5.1 Antikörper für Immunfluoreszenzzytologie

#### Primärantikörper:

Anti- $\alpha$ v $\beta$ 6 Integrin monoklonaler Antikörper

Klon: # 6,2A

Konzentration: 1,67mg/ml

Verdünnung: 1:1000

Hersteller: *BiogenIdec, Paul Weinreb* (Weinreb et al, 2004)

E-Cadherin Alexa Fluor® 555, monoklonaler Antikörper, mouse anti-human

Katalog: # 560064

Klon: # 36/E-Cadherin

Isotyp: IgG<sub>2a</sub>,K

Epitop: Humanes E-Cadherin C-terminal rekombinantes Protein, bindet die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin unabhängig des Phosphorylierungsstatus.

Verdünnung: 1:100

Hersteller: *BD Pharmingen*

#### Sekundärantikörper:

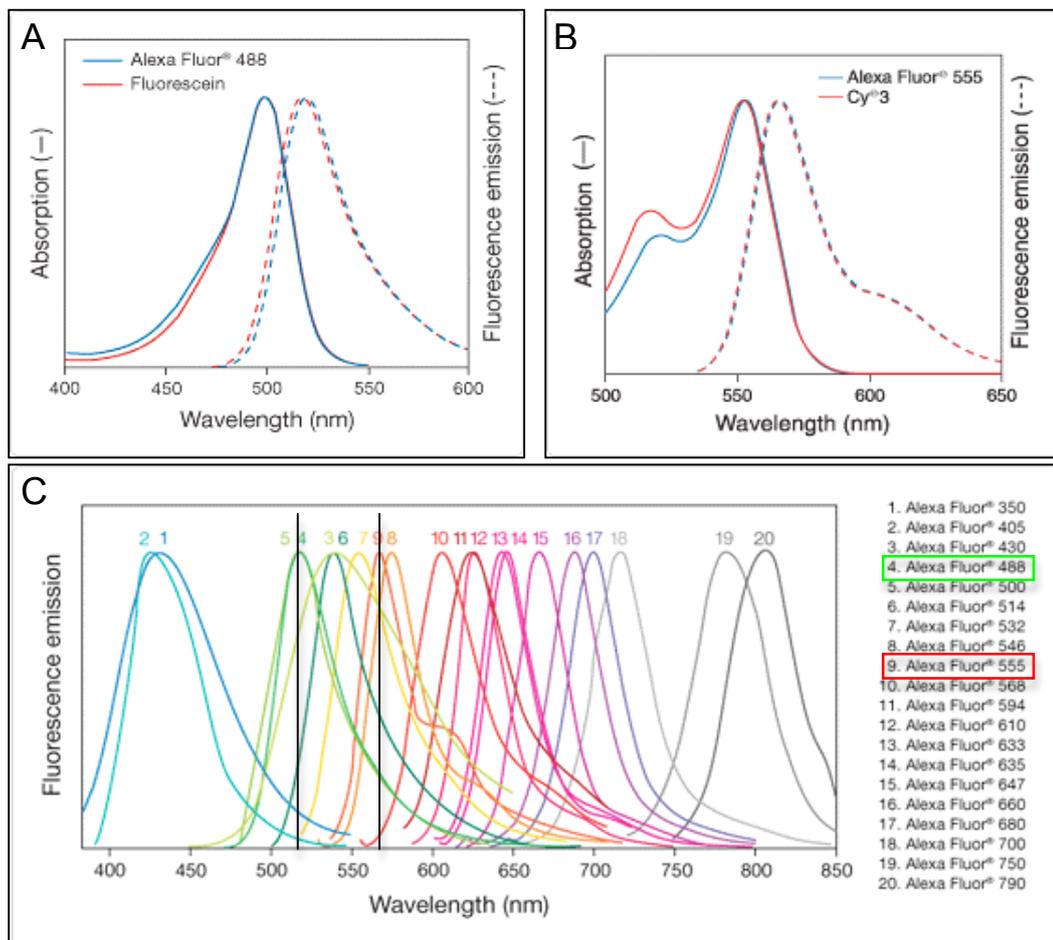
Anti-mouse, Alexa Fluor® 488, # A 11017

Verdünnung: 1:200

Hersteller: *Invitrogen*

## Material und Methoden

Die entsprechenden Fluorochrome wurden mit einer Lichtquelle, X-CITE® 120PC Q (Lumen Dynamics Group Inc. 2260 Argentia Road Mississauga, Ontario L5N 6H7, Canada) angeregt und mit einem Mikroskop, Olympus System Mikroskop BX 53 (Olympus, 31 Gilby Road, Mount Waverely, VIC., 3149, Australien) dargestellt. Das Signal wurde mit einer Olympus Digitalkamera DP 72 detektiert und mit CellSens Digital Imaging Software (Olympus, 31 Gilby Road, Mount Waverely, VIC., 3149, Australien) aufgenommen. Das Fluoreszenzsignal wurde mit den entsprechenden Filtern für Fluorescein/Alexa 488, DAPI und TXRed, bzw. Cy3/Alexa 555 spezifiziert. Abbildung 4 illustriert die verwendeten Fluoreszenzsignale mit entsprechenden Absorptions- und Emissionsmaxima.



Alexa Fluor; Farbstoff	Absorption Max (nm)	Emission Max (nm)	Emission; Farbe
Alexa Fluor 488	495	519	grün
Alexa Fluor 555	555	565	orange/rot

### Abbildung 4: Absorptions- und Emissionsmaxima von Alexa Fluor 488 und 555

A) Alexa Fluor 488: Absorptionsmaximum bei 495nm und Emissionsmaximum bei 519 nm. Die Absorptions- und Emissionsfrequenzen sind nahezu identisch mit dem Fluoresceinsignal.

B) Alexa Fluor 555: Absorptionsmaximum bei 555nm und Emissionsmaximum bei 565 nm. Die Absorptions- und Emissionsfrequenzen sind nahezu identisch mit dem Cy3-Signal. Folglich können die Fluoreszenzsignale für Alexa 488 und 555 mit den entsprechenden Filtern für Fluorescein und Cy3 detektiert werden.

C) Darstellung der Emissionsfrequenzen verschiedener Alexa Fluor Farbstoffe und Illustration überlappender Fluoreszenzsignale. Für Alexa 488 und Alexa 555 ergibt sich ein geringer Bereich eines überlappenden Fluoreszenzsignals. Mit der entsprechenden Wahl der Fluoreszenzfilter konnte eine falsch positive Co-Lokalisation beider Signale ausgeschlossen werden. Als Kontrolle wurde ein Filter für Alexa 594/TXRed verwendet, der keine Überlappung mit dem Alexa 488 Signal aufweist. Sowohl Filter für Alexa 555/Cy3 als auch für Alexa 594/TXRed zeigten kein Signal für Alexa 488. Folglich kann eine falsch positive Co-Lokalisation für von Alexa 488 und Alexa 555 ausgeschlossen werden.

Angepasst von: <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Fluorophores-and-Their-Amine-Reactive-Derivatives/Alexa-Fluor-Dyes-Spanning-the-Visible-and-Infrared-Spectrum>

#### 4.4.5.2 *Darstellung und Auswertung der $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ Integrin und E-Cadherin Expression*

Die  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin und E-Cadherin Expression wurde mit Hilfe von ImageJ 1.45 und dem Plugin „Colocalization finder“ (Author: Christophe Laummonerie, Jerome Mutterer, Institut de Biologie Moleculaire des Plantes, Strasbourg, Frankreich) dargestellt und hinsichtlich der Co-Lokalisation analysiert. Die Bilder wurden als tiff.-Format gespeichert. Die Bildbearbeitung erfolgte nach folgenden Schritten: <file> - <open>; <Image> – <Color> – <Split channels>; <Plugins> - <Analyze> – <Colocalization finder>; <Image> – <Color> – <Merge channels>. Die Co-Lokalisation wurde durch *Scatter blots* graphisch illustriert und statistisch korreliert.

### 4.4.5.3 Statistische Auswertung

Die Co-Expression der  $\alpha v\beta 6$  Integrin und E-Cadherin Expression wurde als Pearson's Korrelationskoeffizienten ( $r_p$ ) berechnet und als *Scatter blot* graphisch verdeutlicht. Eine vollständige Korrelation der  $\alpha v\beta 6$  Integrin und E-Cadherin Expression würde dem Wert  $r_p=1$  entsprechen. In einem 2-dimensionalen Koordinatensystem würden sich alle Werte auf einer Geraden mit positiver Steigung darstellen lassen. Je kleiner  $r_p$  wird, desto geringer ist der Zusammenhang beider Merkmale. Für  $r_p=0$  gilt kein Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen. Für die Darstellung der  $\alpha v\beta 6$  Integrin und E-Cadherin Expression gilt: Je kleiner  $r_p$ , desto geringer die E-Cadherin Expression.

Die statistische Signifikanz des Wertes der Korrelationskoeffizienten  $r_p$  von 0 wurde mit *R Project-Programm for statistical computing and graphics (Universal R 2.14.2; Quelle <http://mirrors.softliste.de/cran/>)* berechnet. Das 5% Signifikanzniveaus des Wertes des Korrelationskoeffizienten  $r_p$  im Bezug auf die Nullhypothese 0 beträgt für  $n=20$   $p \leq 0,44$ . Die Programmierung zur Berechnung des p-Wertes entsprach für  $n=20$  den Befehlen:

```
r <- -0.33
n <- 20
r <- abs(r)
z <- 0.5 * log((1+r) / (1-r))
v <- 1/(n-3)
p <- (1 - pnorm((z - 0) / sqrt(v))) * 2 = p
```

## 4.5 Molekularbiologische Methoden

### 4.5.1 Proteinisolierung aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebeproben

Von 50 Patienten bei denen im Rahmen der klinischen Routine eine Teil-, oder Segmentosteotomie des karzinombefallen Unterkieferknochens durchgeführt wurde, wurden histologische Schnitte von den entkalkten, Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Proben erstellt. Die histologischen Schnitte wurden von zwei Fachärzten für Pathologie beurteilt und anhand der histologischen Schnitte

## Material und Methoden

---

die Diagnose der Karzinominfiltration des Unterkieferknochens gestellt. Das Areal der Karzinominfiltration wurde in HE-Schnitten markiert. Ungefärbte Schnitte wurden vom selben Block erstellt und über die markierten HE-Schnitte gelegt, so dass die Bereiche der Karzinominvasion detektiert und durch Mikrodisektion entnommen werden konnten. Durch das Labor von Prof. Dr. Becker des Pathologischen Instituts der Technischen Universität München wurde ein Verfahren entwickelt, das es ermöglicht aus Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeproben immunreaktive Proteine zu isolieren. (Becker et al, 2007) Diese Methode ist als Qproteome FFPE Tissue Kit durch Qiagen, Hilden, Germany kommerziell erhältlich.

Nachdem die ungefärbten Gewebeschnitte deparaffinisiert wurden und die Gewebebereiche der invasiven Knocheninfiltration durch Mikrodisektion abgenommen wurden, ist es in Qproteome FFPE Tissue Kit Puffer transferiert worden. Die Proteine wurden gemäß dem Standardprotokoll extrahiert und bei -20°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit microBCA protein assay, gemäß den Herstellerinformationen (*Katalog Nummer 23235, Pierce, Rockford, IL, USA*) quantifiziert. Als Kontrolle der Proteinextraktion wurden mit den Proteinlysaten Western blot Analysen mit  $\beta$ -actin erstellt.

### 4.5.2 Western blot Analyse

Die gesamten Proteinextrakte der Gewebeanteile aus dem histologisch gesicherten Bereich der Invasionsfront des Karzinoms wurden mit einer Natrium-Dodecylsulphat-polyacrylamid Gel Elektrophorese (7,5%) separiert und auf Nitrozellulose geblotted (*Whatman/Schleicher and Schuell, Dassel, Germany*). Immunoblots wurden mit ECLplus (*Amersham/GE Healthcare Europe GmbH, München, Germany*) visualisiert.

Für die Analyse der Blots wurde ECLPlus und ECLadvance Western blot Detection Systems (*Amersham/GE Healthcare Europe GmbH, München, Germany*) verwendet.

## **Material und Methoden**

---

### *4.5.2.1 Antikörper für Western blot Analyse*

Integrin  $\alpha_v$ , monoklonaler Antikörper #4711S

Verdünnung: 1:200

Hersteller: *Cell signaling, Danvers, USA*

$\beta$ -actin, monoklonaler Antikörper, A1978

Verdünnung: 1:200

Hersteller: *Sigma, Hamburg, Germany*

# 5 Ergebnisse

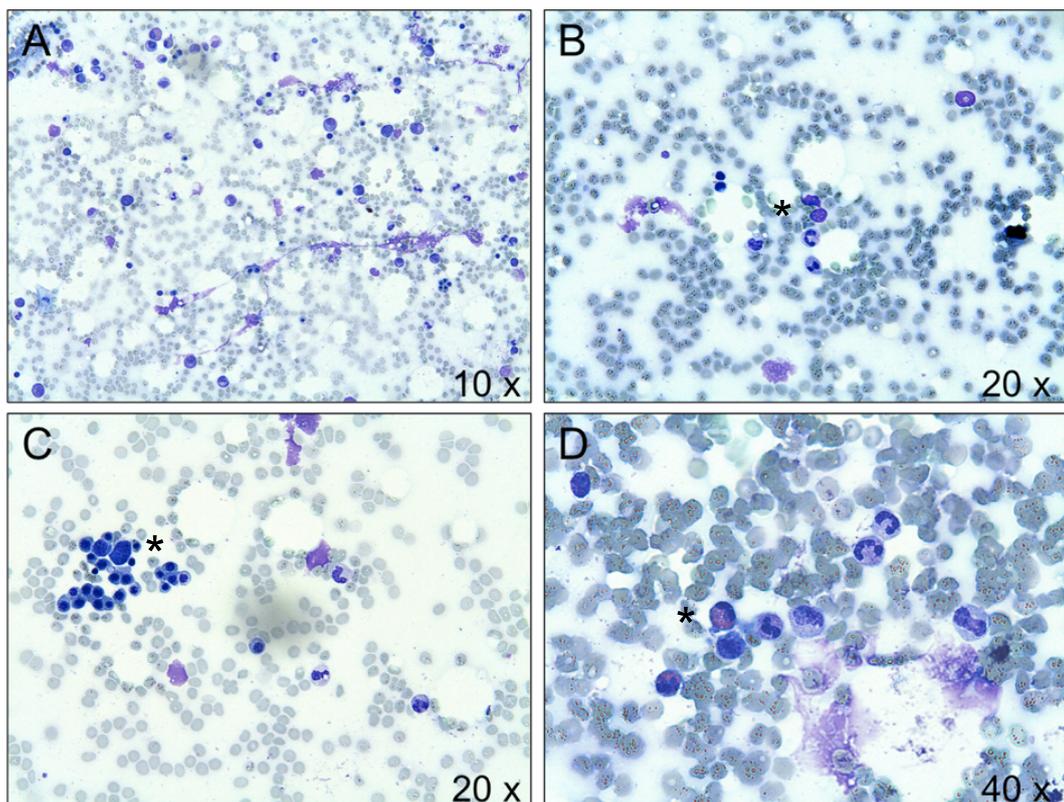
## 5.1 Evaluierung zytologischer Ausstrichpräparate des spongiösen Knochens

Zu Beginn der Studie stand die Fragestellung im Raum, welche Methode geeignet ist, um infiltrative Karzinomzellen im Knochengewebe zu detektieren. Die Fragestellung musste vor dem Hintergrund der Forderung nach einer hohen diagnostischen Qualität, nach einer zeit- und kosteneffizienten Umsetzbarkeit, die auch den Anforderungen der klinischen Routinediagnostik gerecht wird, beantwortet werden. Es wurden mehrere Ansätze getestet, um ein Verfahren zu entwickeln das intraoperativ eine diagnostische Beurteilung von Knochengewebe ermöglicht. Um unterschiedliche Optionen der Verarbeitung von Knochengewebe methodisch zu erörtern wurden, gemäß dem Ethikvotum 2435/09, im Rahmen von operativen Kursen an humanen Präparaten in den Anatomischen Anstalten der Charité Berlin und der Ludwig-Maximilians-Universität München aus dem Os ilium und der Fibula spongiöse und kortikale Knochenproben entnommen und verschiedene Ansätze der Gewebeaufbereitung in Bezug auf Praktikabilität für eine intraoperative Diagnostik getestet. Ein Ansatzpunkt war, eine Verkürzung des Entkalkungsprozesses zu erreichen, indem der chemische Entkalkungsprozess durch Applikation von Wärme beschleunigt wurde. Auf diese Weise konnte die Zeit des Entkalkungsprozesses bis das Knochengewebe schneidbar wurde, im Vergleich zur konventionellen Entkalkungsmethode mit EDTA oder Zitronensäure, verkürzt werden. Es war jedoch nicht möglich, dieses Verfahren in einem Zeitrahmen umzusetzen, der eine intraoperative Diagnostik erlauben würde.

Ein zweiter Ansatz wurde mit der Kryoschnitttechnik des Schnellschnittverfahrens von spongiösem Knochengewebe unternommen. Prinzipiell war die Schneidbarkeit von spongiösem Knochengewebe im Schnellschnittverfahren möglich, jedoch waren die Resultate mit qualitativen Einschränkungen verbunden, so dass sich dieser methodische Ansatz nicht mit der klinischen Routinediagnostik und einem hohen Anspruch an diagnostischer und methodischer Sicherheit und Qualität vereinbaren ließ.

### 5.1.1 Zytologie spongiöser Knochenproben des Os ilium

Als dritter Ansatz wurde ein zytologisches Verfahren erprobt, bei dem spongiöses Knochengewebe in Ausstrichpräparaten auf ihre Qualität und diagnostische Wertigkeit evaluiert wurde. Zunächst wurden zytologische Ausstrichpräparate von spongiösen Knochenproben aus dem Bereich der Crista ilica des Os ilium untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine sehr gute Auflösung auf zellulärer Ebene, die eine zytomorphologische Differenzierung unterschiedlicher Zellpopulationen zuließ. (Abbildung 5)



**Abbildung 5: Zytologie spongiöser Knochenproben der Crista iliaca**

A) Die Übersichtsdarstellung eines zytologischen Präparates aus spongiösen Proben der Crista iliaca zeigt eine gute zytomorphologische Darstellung, die eine Differenzierung und Beurteilung einzelner Zellen zulässt. (10-fache Vergrößerung)

B) Differenzierung verschiedener Zelltypen: Granulopoese, Granulozyten, Erythroblasten \* (20-fache Vergrößerung)

C) Darstellung der Erythropoese \* (20-fache Vergrößerung)

D) Darstellung eosinophiler Granulozyten und Leukozyten \* (40-fache Vergrößerung),  
Färbungen nach Papanheim

### 5.1.2 Zytologie spongiöser Knochenbiopsien der Mandibula

Nachdem mit einer zytologischen Untersuchung spongiösen Knochengewebes gute Ergebnisse erreicht werden konnten, wurde dieser methodische Ansatz auf den Unterkieferknochen übertragen. Dabei konnten in zytologischen Präparaten, die aus Biopsien gesunden spongiösen Knochens der Mandibula erstellt wurden, physiologische Zellpopulationen des Knochenmarks detektiert werden. Die Ergebnisse ließen eine differenzierte Beurteilung einzelner Zellen und deren zytomorphologische Charakteristika in diagnostischer Qualität zu. (Abbildung 7A) Für positive Kontrollen wurden Biopsien aus dem zentralen knöchernen Invasionsbereich von Plattenepithelkarzinomen gewonnen. In diesen zytologischen Präparaten konnten Epithelzellen dargestellt werden, die nach zytomorphologischen Malignitätskriterien als Plattenepithelkarzinomzellen diagnostiziert werden konnten. (Abbildung 6B/C und 7B/D)

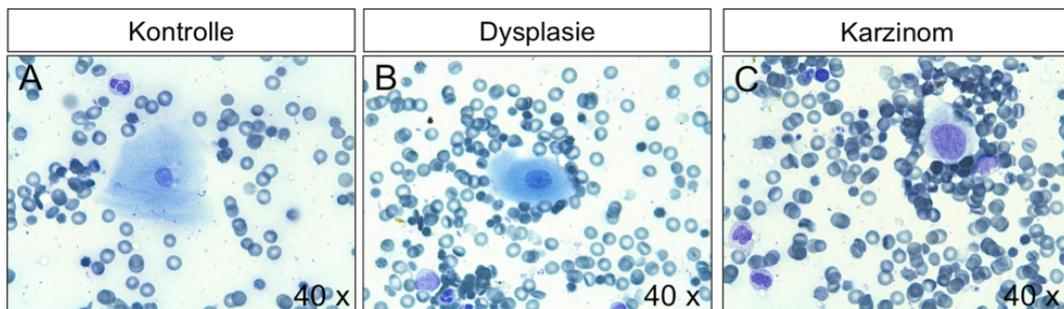
Auf diese Weise wurde eine Methode erarbeitet, mit der es möglich ist zelluläre Bestandteile des Knochengewebes in diagnostischer Qualität zu differenzieren. Für die Zielsetzung einer intraoperativen Karzinomdiagnostik für Knochengewebe war eine weiterführende Differenzierung zwischen der physiologischen, mesenchymalen Zellpopulation des Knochenmarks und infiltrativen Karzinomzellnestern im Knochengewebe nötig. Die Zellen und deren zelluläre Bestandteile wurden nach den folgenden Kriterien der Malignität evaluiert. Siehe Tabelle 4 und Abbildung 6

**Tabelle 4: Zytologische Kriterien der Malignität**

<b><i>Malignitätskriterium</i></b>	<b><i>Erläuterung</i></b>
Nucleusform	Unterschiedliche Zellkerngrößen und -strukturen
Nucleus/Plasma-Relation	Verschiebung der Relation zwischen der Kerngröße und des Zytoplasmasaums zu Gunsten der Kerngröße
Hetero-/Polychromasie	Unterschiede in der Struktur und dem Färbeverhalten des Chromatins
Nucleuspolymorphien	Unterschiedliche Kernformen
Nucleoli	Mehrere Nucleoli in einem Zellkern
Zellaggregation	Unphysiologische Ausbildung von Karzinomzellnestern

## Ergebnisse

---

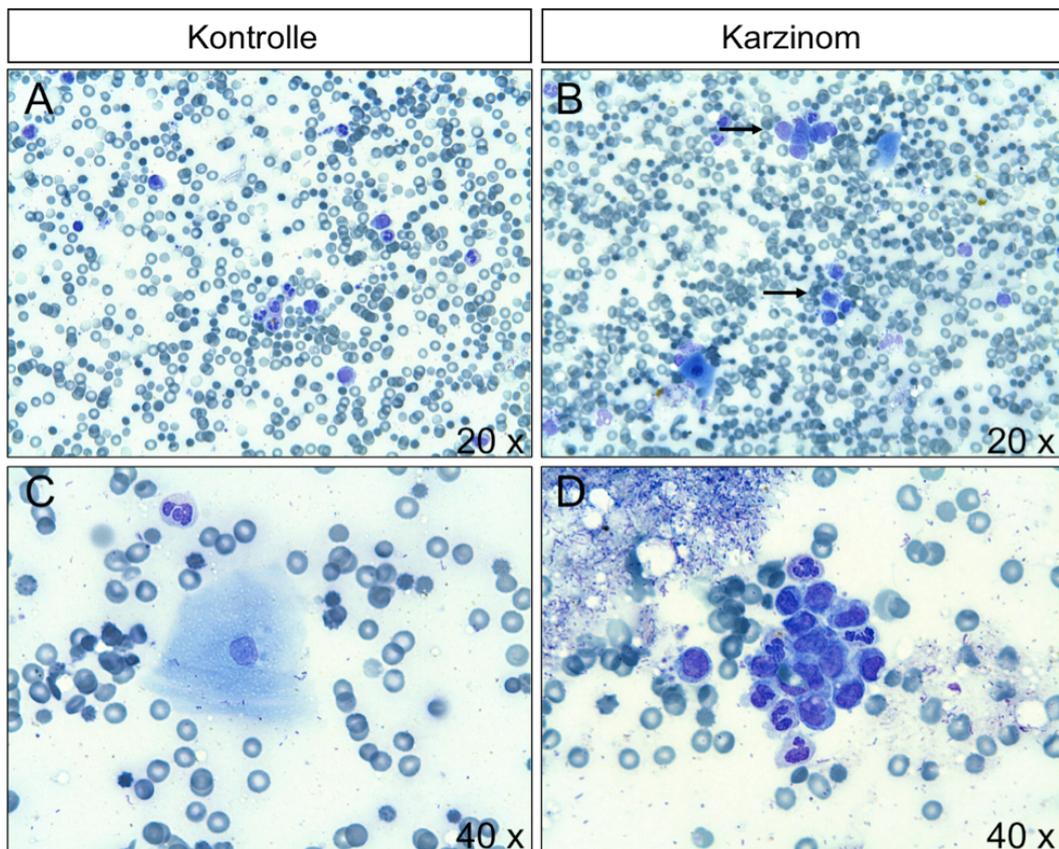


**Abbildung 6: Illustration zytomorphologischer Malignitätskriterien bei Epithelzellen**

Von A nach C sind Plattenepithelzellen dargestellt, die zytomorphologische Veränderungen von einer physiologischen Plattenepithelzelle (Kontrolle, A) über eine dysplastisch veränderte Epithelzelle (B) hin zu einer Karzinomzelle (C) verdeutlichen. Es zeigt sich eine Verschiebung der Nucleus/Plasma-Relation zu Gunsten des Nucleus mit zunehmender Nucleusgröße, Hetero-/Polychromasie, betonte Nucleoli und polymorpher Nucleusstruktur. (40-fache Vergrößerung)

Anhand dieser Beurteilungskriterien konnten Karzinomzellnester und einzelne Karzinomzellen in den Ausstrichpräparaten detektiert werden. Für eine zeit-effektive Umsetzung und für die Optimierung der Färbemethoden wurde sowohl die Färbung nach Papanheim, als auch die zeiteffiziente Hemacolor®-Färbung (Abbildung 8) und eine konventionelle HE Färbung verwendet.

## Ergebnisse



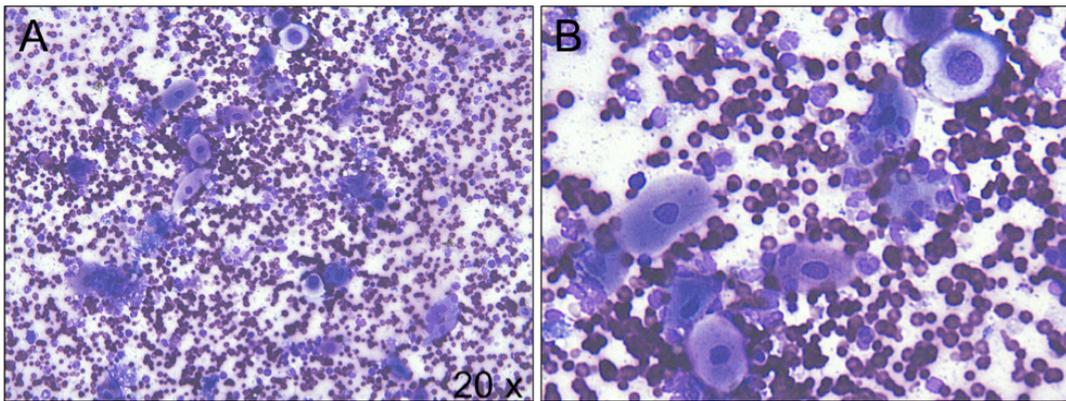
**Abbildung 7: Zytologien gesunder und karzinominfiltrierter Knochenproben der Mandibula**

A) Übersicht einer zytologischen Darstellung eines Ausstrichpräparates physiologischer Mandibulaspongiosa. (20-fache Vergrößerung)

B) Zytologische Darstellung eines Ausstrichpräparats karzinominfiltrierter Mandibulaspongiosa. Karzinomzellen zeigen alle Malignitätskriterien und sind in Aggregaten angeordnet. (siehe Pfeile) (20-fache Vergrößerung)

C) Darstellung eines zytologischen Ausstrichpräparats gesunder Mandibulaspongiosa, mit einer physiologischen Plattenepithelzelle ohne Anzeichen zytomorphologischer Malignitätskriterien. (40-fache Vergrößerung)

D) Zytologische Darstellung aggregierter Plattenepithelkarzinomzellen mit entsprechenden Malignitätskriterien einer veränderten Nucleus/Plasma-Relation, Nucleuspolymorphien, Hetero-/Polychromasie und mehreren Nucleoli. Vergleiche Abbildung 6C. (40-fache Vergrößerung)



**Abbildung 8: Plattenepithelkarzinomzellen mit Hemcolor®-Färbung**

A) Darstellung von Plattenepithelkarzinomzellen in einem zytologischen Ausstrichpräparat einer Knochenprobe aus dem Bereich der knöchernen Infiltration eines Plattenepithelkarzinoms der Mandibula. (20-fache Vergrößerung)

B) Ergänzende Illustration der zytomorphologischen Malignitätskriterien der Karzinomzellen im Vergleich zur umgebenden Knochenmarkzellpopulation (Vergrößerung aus Abbildung 8A)

### **5.1.3 Evaluierung der zytologischen Knochendiagnostik im Rahmen der klinischen Routinediagnostik**

Ziel dieser Vorarbeiten war es, einen methodischen Ansatz für eine intraoperative Beurteilung der knöchernen Resektionsränder zu etablieren, der im Rahmen der klinischen Routinediagnostik umsetzbar ist. Um diese Methode unter klinischen Bedingungen zu evaluieren, wurden in einem prospektiven Studienarm bei 28 Patienten mit einem histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom, die sich zwischen den Jahren 2010 und 2012 in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar vorstellten, eine intraoperative zytologische Beurteilung der knöchernen Resektionsränder durchgeführt. Die Patienten wurden vor dem Eingriff über die Studie ausführlich informiert und stimmten einer Teilnahme schriftlich zu. Im Rahmen der präoperativen Diagnostik lag bei allen Patienten der klinische und/oder CT-morphologische Verdacht einer Karzinominfiltration der Mandibula vor. Nachdem im Sinne des operativen Therapiekonzepts eine Segment- oder Kontinuitätsresektion der Mandibula durchgeführt wurde, wurden intraoperativ von den knöchernen Resektionsrändern Abstriche entnommen und zytologische Präparate erstellt. Siehe Abbildung 2.

## Ergebnisse

Die Präparate wurden luftgetrocknet, fixiert und der Hemacolor® Schnellfärbung, sowie einer HE Färbung unterzogen. Die zytologischen Präparate wurden intraoperativ einer zytologischen Beurteilung durch zwei Kollegen des Pathologischen Instituts der Technischen Universität München zugeführt. Der zentrale Bereich des Karzinoms, mit klinischer und CT-morphologischer Karzinominfiltration des spongiösen Knochens, wurde geschnitten, so dass Abstriche aus dem Bereich der Karzinominfiltration des Knochens gewonnen werden konnten, die als Positiv-Kontrollen dienten. Abstriche von gesundem Knochengewebe wurden als Negativ-Kontrollen verwendet. Insgesamt wurden bei 28 Fällen 174 zytologische Präparate von den knöchernen Resektionsrändern intraoperativ angefertigt und evaluiert.

**Tabelle 5: Zusammenfassung der klinischen Daten der Studienpatienten n=28**

<b>Kriterium</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>klinische Daten in %</b>
Tumorgröße	Tis	0
	T0	0
	pT1	10,7
	pT2	3,5
	pT3	17,8
	pT4a	57,1
	pT4b	10,7
	Tx	0
Lymphknotenstatus	pN0	57,1
	pN1	14,2
	pN2a	0
	pN2b	10,7
	pN2c	10,7
	pN3	0
Fernmetastasen	cNx	7,14
	cM0	7,14
	M1	0
Graduierung	cMx	92,8
	G1	0
	G2	78,5
Resektionsstatus	G3	21,4
	R0	78,5
	R1 knöchern	10,7
Invasionsstatus	R1 weichtelig	10,7
	L0	96,5
	L1	3,5
	Pn1	3,5
Geschlecht	Pn0	96,5
	m	75
	w	25

## Ergebnisse

---

Für die diagnostische Beurteilung ist die Repräsentativität der zytologischen Präparate des Knochens durch die Darstellung spongiöser Knochenanteile, Osteoid, Osteoblasten, Osteoklasten, Lipide und Riesenzellen gegeben. (Abbildung 9)

Die Ergebnisse der zytologischen Untersuchungen wurden mit den Befunden der konventionellen histologischen Diagnostik der korrespondierenden Entnahmestellen verglichen. Siehe Abbildung 10 und Tabelle 6.

Die zytologischen Präparate wurden in vier Kategorien eingeteilt und als negativ/benigne, verdächtig oder positiv/maligne klassifiziert. Positive und verdächtige Befunde wurden zusammengefasst, da in beiden Fällen die operative Konsequenz einer Erweiterung des Resektionsstaus entspricht. Die zytologischen Präparate, die aufgrund von zu wenig Zellmaterial, schlechter Ausgangssituation für die Abstrichnahme durch Austrocknung des Gewebes oder durch Kontamination von Blut von zu geringer Qualität für eine diagnostische Aussage waren, wurden als technisch defizitär deklariert und als mangelhaft klassifiziert.

**Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der zytologischen Diagnostik**

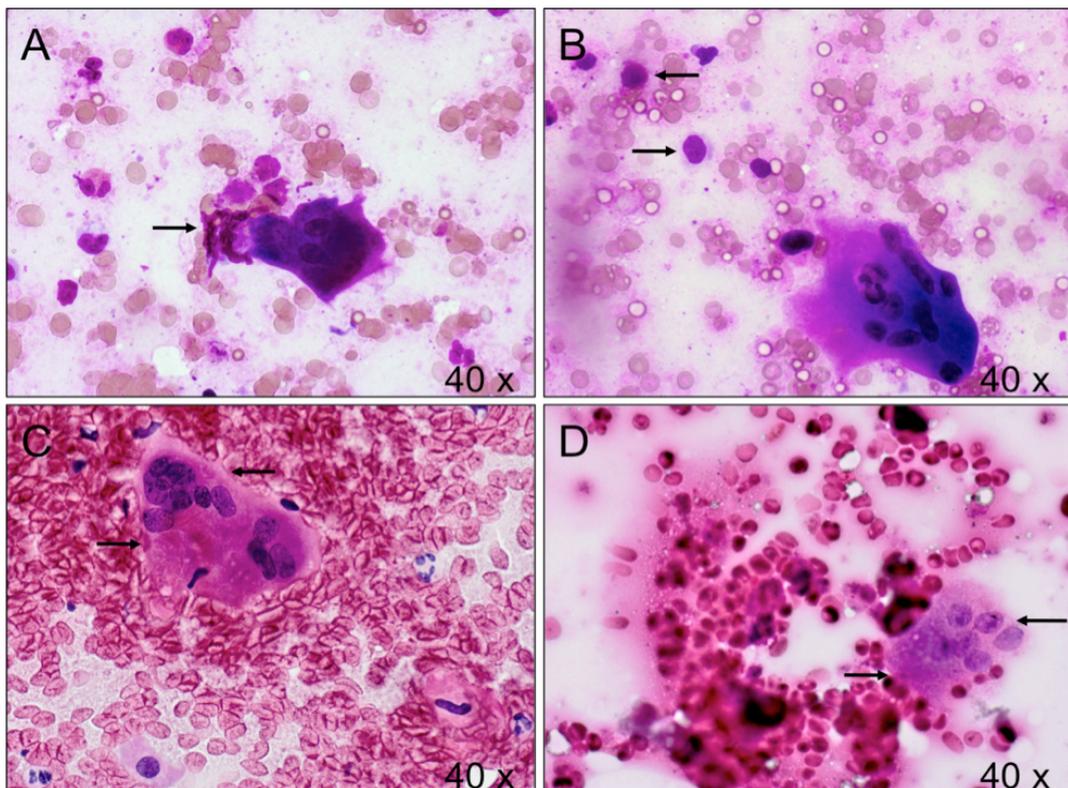
<i>Kriterium</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Sensitivität</i>	<i>Spezifität</i>	<i>ppW</i>	<i>npW</i>	<i>Kkr</i>	<i>Fkr</i>
Patienten	28	95,3%	96%	93,8%	96,9%	96,3%	3,7%
Präparate	174						
richtig positiv	61						
richtig negativ	96						
falsch positiv	4						
falsch negativ	3						
mangelhaft	10						

Die zytologische Beurteilung erlaubte intraoperativ eine Differenzierung zwischen mesenchymalen Zellen des Knochenmarks und epithelialen Zellen. Entsprechend der oben genannten Malignitätskriterien konnte eine maligne Zellmorphologie gut detektiert werden. (Abbildung 10) Die zytologischen Befunde (n=174) wurden mit den histologischen Befunden, die als diagnostischer Standard dienten, verglichen. Mit der zytologischen Beurteilung der knöchernen Resektionsränder konnte, im Vergleich zur konventionellen histologischen Diagnostik, eine Sensitivität von 95,3% und eine Spezifität von 96% erreicht werden. Daraus kann, in Bezug auf

## Ergebnisse

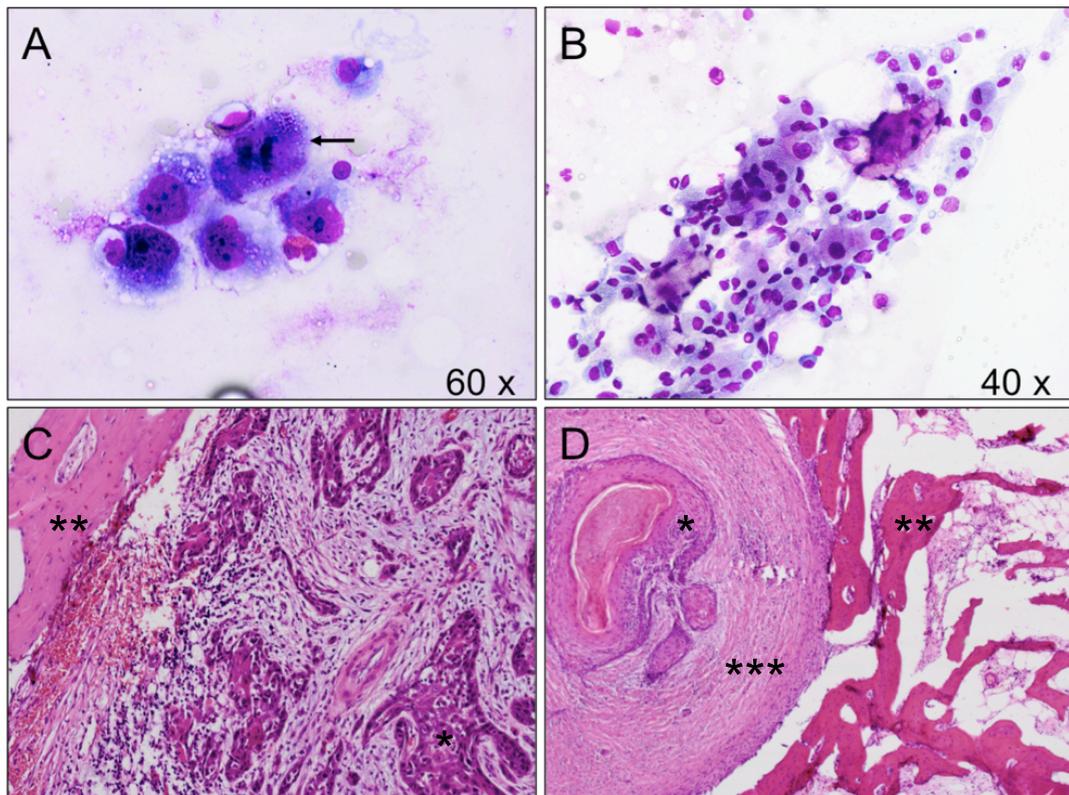
---

den Resektionsstatus, ein konsekutiver positiver prädikativer Wert (ppW) von 93,8% mit einem negativen prädikativen Wert (npW) von 96,9% abgeleitet werden. Die Korrektklassifikationsrate (Kkr), entsprechend der geschätzten Wahrscheinlichkeit mit einer zytologischen Beurteilung das richtige Ergebnis in Bezug auf die histologische Diagnose zu erreichen, beträgt 96,3%, mit einem Klassifikationsfehler bzw. einer Falschklassifikationsrate (Fkr) von 3,7%.



**Abbildung 9: Repräsentativität der zytologischen Präparate der Mandibula**

- A) Osteoidbildung (Pfeil) durch Osteoblasten
- B) Osteoblasten (Pfeile) neben mehrkernigem Osteoklast und Lipidtröpfchen
- C) mehrkernige Riesenzelle (Pfeile)
- D) mehrkerniger Osteoklast (Pfeile). Alle Abbildungen in 40-facher Vergrößerung.



**Abbildung 10: Zytologische Befunde mit korrespondierender Histologie**

A) Exemplarische Darstellung eines zytologischen Befundes, der im Rahmen der klinischen Routinediagnostik erstellt wurde. Dargestellt ist eine Aggregation von Plattenepithelkarzinomzellen mit Mitosefigur (Pfeil). Der korrespondierende histologische Befund ist in C dargestellt. (60-fache Vergrößerung)

B) Exemplarische Darstellung eines zytologischen Befundes, der im Rahmen der klinischen Routinediagnostik erstellt wurde. Dargestellt ist die Aggregation von Plattenepithelkarzinomzellen. Der korrespondierende histologische Befund ist in D dargestellt. (40-fache Vergrößerung)

C) Histologischer Befund eines Plattenepithelkarzinoms \* in spongiösem Knochengewebe \*\* eines knöchernen Resektionsrandes der Mandibula.

D) Histologischer Befund eines Plattenepithelkarzinoms \* in spongiösem Knochengewebe \*\* eines knöchernen Resektionsrandes der Mandibula. Die Karzinomzellen sind von fibrosierender, entzündlicher Begleitreaktion \*\*\* umgeben.

Die zytologische Beurteilung führte mit hoher Sensitivität und Spezifität zu gleichen diagnostischen Befunden, wie die histologische Beurteilung der knöchernen Resektionsränder, mit dem Unterschied, dass der zytologische Befund intraoperativ erhoben werden konnte. Folglich ermöglicht dieser Ansatz eine intraoperative Beurteilung des Resektionsstatus der knöchernen Resektionsränder. Die Methode erwies sich im Rahmen der klinischen Routinediagnostik als praktikabel und kosteneffizient. Zehn der zytologischen Präparate waren aufgrund von zu wenig oder zu viel Zellmaterial als technisch defizitär, so dass die Beurteilung als mangelhaft deklariert und nicht in die Beurteilung mit einbezogen wurde. Dieser technische Fehler trat in der initialen Phase der Studie auf und konnte im Laufe der Optimierung der klinischen Routineverarbeitung verhindert werden. Für eine Gesamtbeurteilung der Etablierung der Methode in der klinischen Routinediagnostik wurde die potentielle Fehlerquelle berücksichtigt.

Bei drei Patienten lag, entsprechend dem histologischen Befund, eine postoperative R1-Situation des knöchernen Resektionsrandes vor. In diesen drei Fällen konnte der R1-Status intraoperativ zytologisch diagnostiziert werden. Eine erneute zytologische Beurteilung des knöchernen Resektionsrandes nach Nachresektion wurde unter Studienbedingungen nicht durchgeführt. Das histologische Ergebnis zeigte jedoch Karzinomresiduen nach Nachresektion. Als Konsequenz dieser Ergebnisse kann eine zytologische Beurteilung nach jeder knöchernen Resektion, als auch nach jeder Nachresektion zur Beurteilung des knöchernen Resektionsstatus gefordert werden.

### **5.1.1 Evaluierung der Zellisolierung und Aufreinigung aus Knochenproben für eine zytologische Knochendiagnostik**

In drei Fällen ergab die zytologische Beurteilung einen falsch negativen Befund. In diesen Fällen waren in der konventionellen Histologie Karzinomzellnester in einem Abstand von 0,2-0,3 cm vom knöchernen Absetzungsrand diagnostiziert worden. Folglich sollte ein größeres Gewebevolumen für die zytologische Beurteilung entnommen werden, um auch potentielle, einzelne Karzinomzellnester bis zu 0,5 cm jenseits des Absetzungsrandes in der zytologischen Untersuchung berücksichtigen zu können. Für eine zytologische Beurteilung wurde ein Protokoll

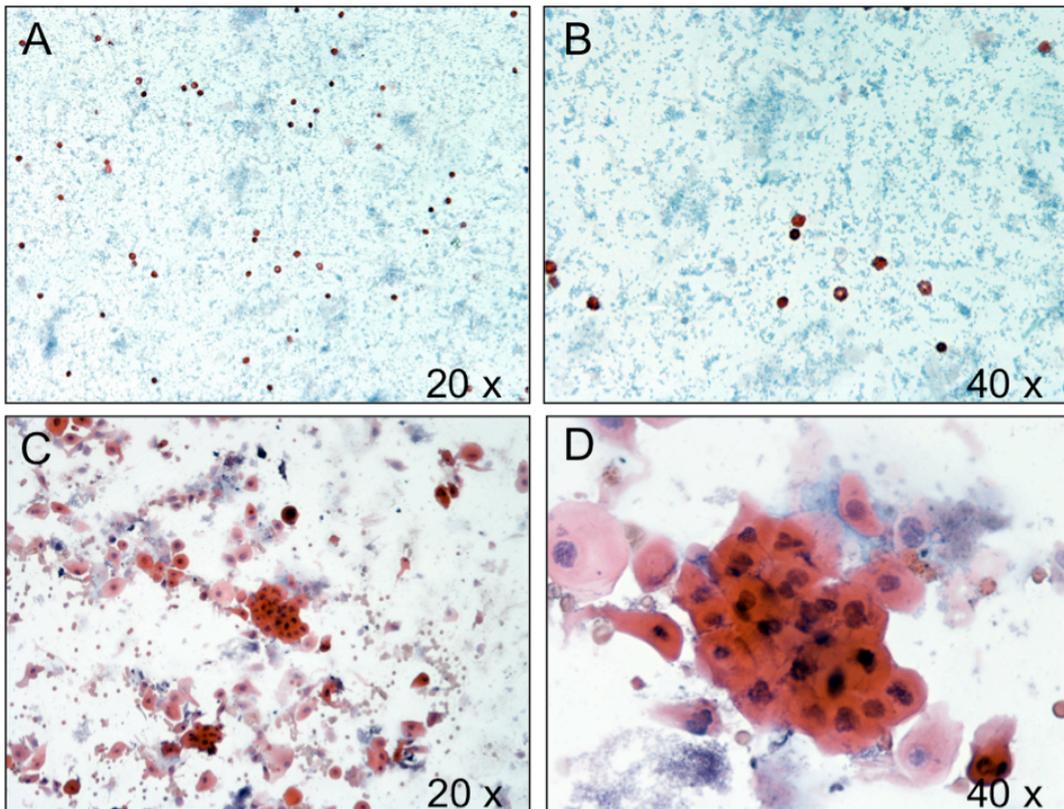
## Ergebnisse

---

zur Zellisolierung und Aufreinigung erarbeitet, so dass die zellulären Bestandteile eines größeren knöchernen Gewebavolumens einer zytologischen Beurteilung zugänglich gemacht werden können. Vergleiche Abbildung 3.

Abbildung 11 zeigt eine zytologische Darstellung isolierter und aufgereinigter Zellen einer Knochenprobe. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen. Abbildung 11A und B zeigt die zytologische Beurteilung des Überstandes nach Zentrifugation des Zellsuspendats, wie in Abbildung 3E beschrieben. Es sind einzelne Erythrozyten und Thrombozyten dargestellt. Es konnten keine Karzinomzellen im Überstand nachgewiesen werden. Das Zellpellet der isolierten und aufgereinigten Zellen wurde in 100µl PBS resuspendiert und der zytologischen Beurteilung zugeführt, wie in Abbildung 3E beschrieben. Abbildung 11C und D zeigt den zytologischen Befund isolierter und aufgereinigter Zellen aus einer Knochenprobe.

In Abbildung 11D ist die vergrößerte Darstellung eines Karzinomzellnestes aus Abbildung 11C abgebildet. Der Prozess der Zellisolierung und Aufreinigung mit anschließender, zytologischer Beurteilung war im Rahmen des operativen Eingriffs problemlos umzusetzen. Folglich ist auch die zytologische Beurteilung eines größeren knöchernen Gewebavolumens zur intraoperativen Beurteilung der knöchernen Resektionsränder möglich.



**Abbildung 11: Zytologie isolierter und aufgereinigter Zellen aus Knochenproben**

A) Zytologie des Überstandes nach Zentrifugation der suspendierten zellulären Bestandteile, entsprechend Abbildung 3E.

B) Vergrößerte Darstellung aus A. Es sind einzelne Erythrozyten und Thrombozyten dargestellt. Es sind keine Karzinomzellen nachweisbar.

C) Zytologie der isolierten und aufgereinigten Zellen nach Zentrifugation und Resuspendierung in PBS, entsprechend Abbildung 3F. Es sind unterschiedliche Zellmorphologien des Knochenmarks und einzelne Karzinomzellnester dargestellt.

D) Vergrößerung aus C. Darstellung eines Karzinomzellnestes aus isolierten und aufgereinigten Zellen einer Knochenprobe. A-D: HE Färbungen

Zusammenfassend ist die intraoperative zytologische Beurteilung des Knochens ein sensitiver und spezifischer diagnostischer Ansatz, um eine intraoperative Kontrolle der knöchernen Resektionsränder zu ermöglichen. Somit kann eine primäre Rekonstruktion mit mikrovaskulären osteo-(myo-)kutanen Transplantaten in einem karzinomfreien Empfängergebiet gewährleistet werden.

Trotz der hohen Sensitivität kann die Detektion kleiner Karzinomzellnester oder einzelner Karzinomzellen in einem zytologischen Präparat schwierig sein. Eine

immunzytologische Markierung invasiver Karzinomzellen kann eine Ergänzung der Methode darstellen, um die Detektion von Karzinomzellen zu erleichtern. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Charakterisierung eines potentiellen Biomarkers invasiver Karzinomzellen dargestellt.

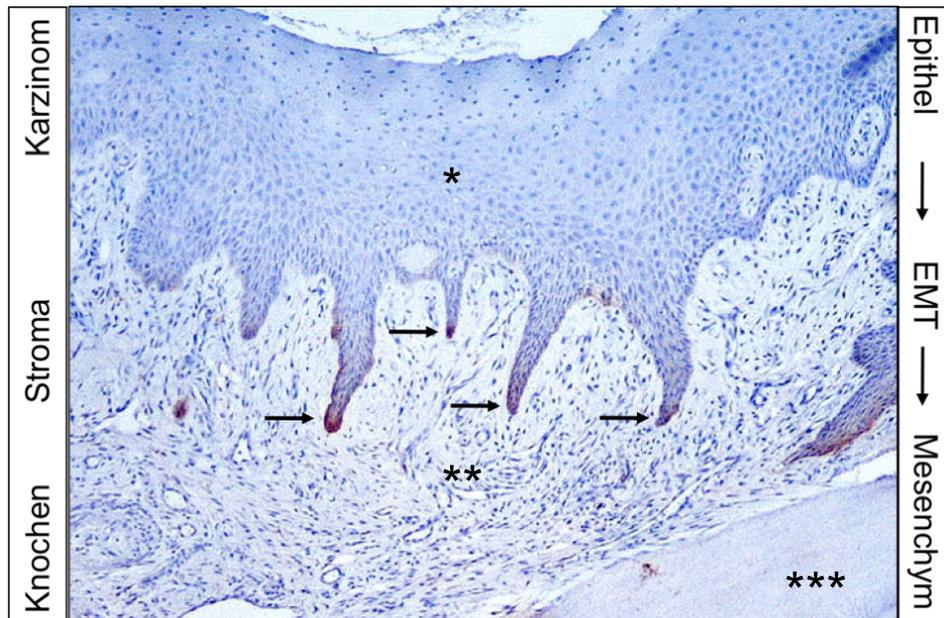
### **5.2 Biomarker für invasive Karzinomzellen**

Der Maßstab der an eine intraoperative diagnostische Methode zur Beurteilung der knöchernen Resektionsränder gestellt wird ist, auch vereinzelte, invasive Karzinomzellen zu detektieren. (Wysluch et al, 2010) Um diesem Anspruch gerecht zu werden, wurde ein immunzytologischer Ansatz erarbeitet, der es ermöglicht, Karzinomzellen anhand der  $\alpha v \beta 6$  Integrin Expression im Knochengewebe zu markieren. Die Markierung durch  $\alpha v \beta 6$  Integrin als Biomarker kann als Hilfestellung dienen, um einzelne, invasive Karzinomzellen leichter detektieren zu können.

Die folgenden Ergebnisse charakterisieren  $\alpha v \beta 6$  Integrin als potentiellen Biomarker für invasive Karzinomzellen im Knochengewebe und illustrieren die potentielle Applikation für eine ergänzende, immun-(fluoreszenz-)zytologisch gestützte intraoperative Diagnostik.

#### **5.2.1 $\alpha v \beta 6$ Integrin als immunologischer Biomarker invasiver Karzinomzellen**

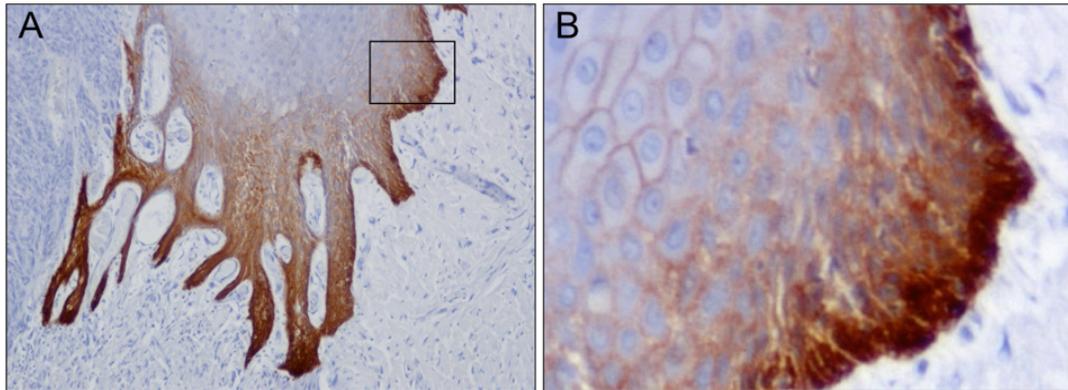
In immunhistologischen Untersuchungen konnte die Expression von  $\alpha v \beta 6$  im Bereich der Invasionsfront invasiver Plattenepithelkarzinome nachgewiesen werden. Dabei wird  $\alpha v \beta 6$  im Besonderen im Bereich der invasiv in das Stroma einwachsenden Karzinomzellen exprimiert. (Abbildung 12 und 13)



**Abbildung 12: Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin bei invasiven Plattenepithelkarzinomen**

Immunhistologische Darstellung der  $\alpha\beta6$  Integrin Expression im Bereich eines invasiv wachsenden Plattenepithelkarzinoms. Das Karzinomgewebe \* ist gekennzeichnet durch Persistenz der Nuclei in den obersten Zellschichten, Verbreiterung der Epithelschicht, Durchbrechen der Basalmembran und infiltratives Wachstum in das angrenzende mesenchymale Stroma \*\* mit Anteilen des kortikalen Knochens der Mandibula \*\*\*.

Die Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin ist auf den Bereich der Interaktion zwischen den invasiven, migrierenden Karzinomzellen der Invasionsfront und dem Tumorstroma beschränkt. Karzinomzellen, die in direkten Kontakt mit dem mesenchymalen Stroma stehen, zeigen die höchste  $\alpha\beta6$  Integrin Expression. Im zentralen Bereich des Karzinomgewebes ist  $\alpha\beta6$  Integrin nicht exprimiert. Die Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin im Invasionsbereich der Karzinome ist spezifisch membran-ständig lokalisiert. (Abbildung 13A und B)



**Abbildung 13: Spezifische, membranständige Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin**

A) Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin im Bereich der Karzinominvasion in angrenzendes mesenchymales Stroma

B) Der vergrößerte Ausschnitt aus Abbildung 13A zeigt die spezifische, membranständige Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin. Karzinomzellen der Invasionsfront in Kontakt zum mesenchymalen Stroma und der extrazellulären Matrix, zeigen die höchste  $\alpha\beta6$  Integrin Expression.

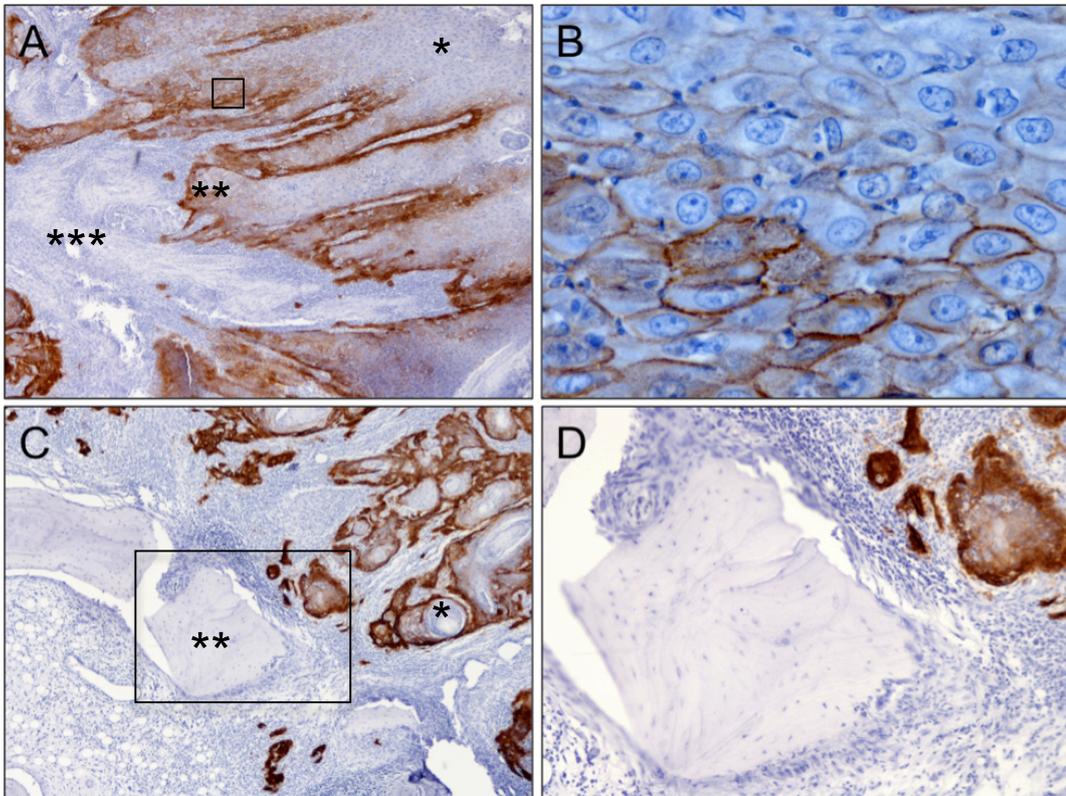
Basierend auf dieser Beobachtung haben wir untersucht, ob  $\alpha\beta6$  Integrin im Bereich der Invasionsfront der Karzinome mit knöcherner Infiltration exprimiert ist. Dabei sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob Karzinomzellen, die infiltrativ in spongiöses Knochengewebe einwachsen  $\alpha\beta6$  Integrin exprimieren.

Bei 50 Patienten mit Infiltration eines Karzinoms in den kortikalen und spongiösen Anteil der Mandibula wurde der Bereich der Karzinominfiltration immunhistologisch auf Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin untersucht. In Abbildung 14 ist die immunhistologische Färbung eines entkalkten histologischen Präparates dargestellt. Wie bei nicht entkalkten histologischen Schnitten war die Expression von  $\alpha\beta6$  auf den Bereich der Invasionsfront beschränkt. (Abbildung 14A) Auch nach dem Entkalkungsprozess zeigen die Karzinomzellen eine spezifische, membranständige Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin. (Abbildung 14B)

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Entkalkungsprozess keinen Einfluss auf die Epitopenkonfiguration von  $\alpha\beta6$  Integrin hat. Somit konnten invasive Karzinomzellen durch die Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin immunhistologisch dargestellt werden. Abbildung 14C stellt einen Ausschnitt desselben

## Ergebnisse

histologischen Präparats dar und zeigt Karzinomzellnester im Bereich der Karzinominfiltration im spongiösen Knochengewebe. Die Abbildung zeigt eine starke Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin durch infiltrierende Karzinomzellen im spongiösen Knochengewebe. Abbildung 14D verdeutlicht in einer Vergrößerung aus Abbildung 14C die  $\alpha v \beta 6$  Integrin Expression bei Karzinomzellnestern im Knochenmark.



**Abbildung 14: Immunhistologische Darstellung der  $\alpha v \beta 6$  Integrin Expression bei infiltrativen Karzinomzellen im spongiösen Knochengewebe**

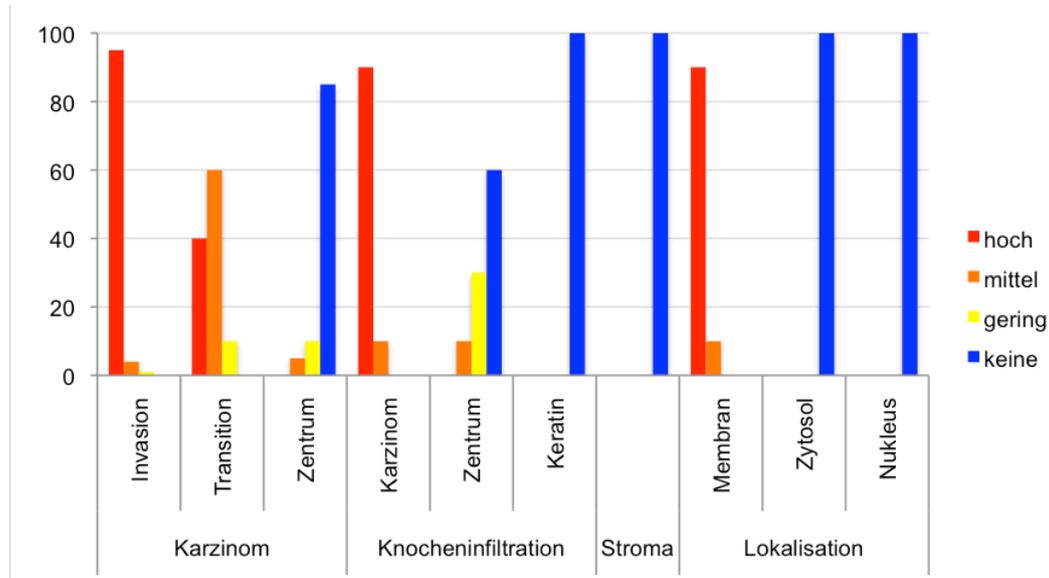
A) Darstellung der Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin im Bereich der Karzinominvasionsfront \*\*. Im zentralen Bereich des Karzinoms ist  $\alpha v \beta 6$  Integrin nicht exprimiert \*. Das Stroma \*\*\* zeigt entzündliche Begleitreaktion ohne unspezifische  $\alpha v \beta 6$  Integrin Expression.

B) Darstellung der spezifischen, membranständigen Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin durch Karzinomzellen. Vergrößerung aus Abbildung 14A.

C)  $\alpha v \beta 6$  Integrin Expression der infiltrativen Karzinomzellen im spongiösen Knochengewebe \*\*. In epithelialen Hornperlen ist  $\alpha v \beta 6$  Integrin nicht exprimiert \*.

D) Die vergrößerte Darstellung aus Abbildung 14C illustriert die spezifische Markierung von infiltrierenden Karzinomzellnestern im spongiösen Knochengewebe durch  $\alpha v \beta 6$  Integrin Expression.

## Ergebnisse



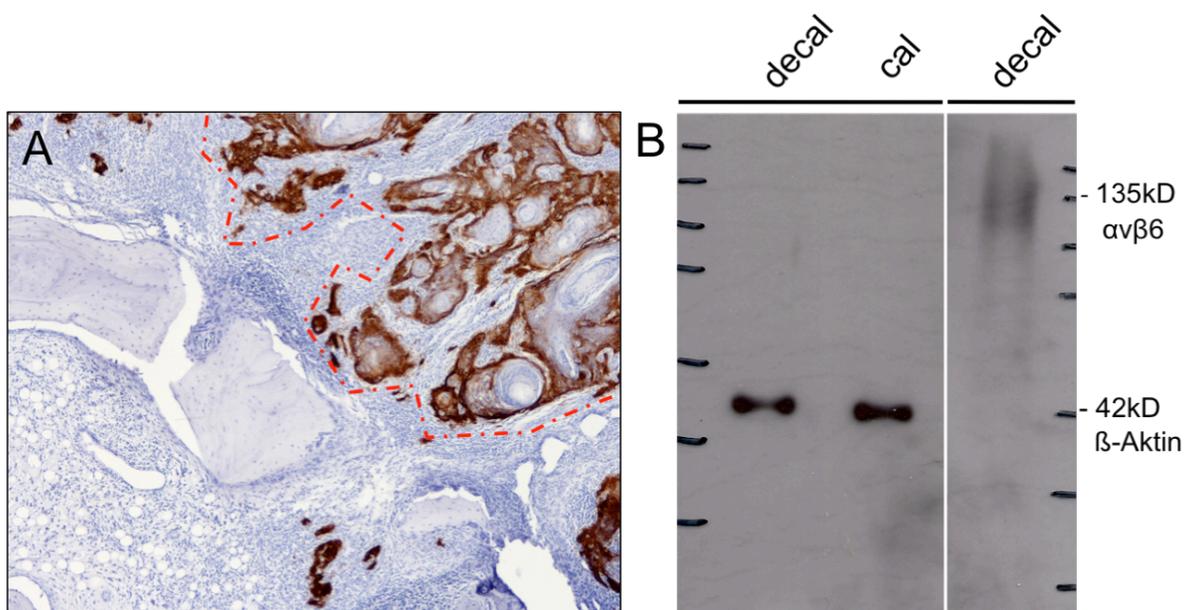
**Abbildung 15: Graphische Darstellung der  $\alpha v\beta 6$  Integrin Expressionsanalyse**

Die  $\alpha v\beta 6$  Integrin Expression im Karzinomgewebe wurde in vier Intensitätsgrade eingeteilt (hoch/mittel/gering/keine). Die Lokalisation der  $\alpha v\beta 6$  Integrin Expression im Karzinomgewebe ohne knöchernen Invasion wurde in den Bereich der Invasion, der Transition und in den zentralen Karzinombereich eingeteilt. Bei Karzinomen mit Knocheninfiltration wurde zwischen dem Karzinomgewebe, dem zentralen Bereich von Karzinomzellnestern und Keratinablagerungen im Karzinomgewebe unterschieden. Die Expression im Bereich des Karzinomstromas, sowie die zelluläre Lokalisation der beobachteten  $\alpha v\beta 6$  Integrin Expression wurde berücksichtigt. Die Graphik stellt den prozentualen Anteil der beobachteten Karzinomproben von n=50 Patienten dar und illustriert den jeweiligen Intensitätsgrad der Expression im Bezug auf die Lokalisation. Abbildung 13 und 14 stellen repräsentative histologische Ergebnisse der Auswertung dar. Zusammenfassend ist die Expression im Bereich der Karzinominvasion am höchsten. Karzinomzellen, die infiltrativ in Knochengewebe einwachsen sind durch eine hohe  $\alpha v\beta 6$  Integrin Expression gekennzeichnet. Keratinhaltige Ablagerungen im Bereich der Karzinomzellnester im Knochenmark zeigen keine  $\alpha v\beta 6$  Integrin Expression. (Abbildung 14C\*) Das Stroma, das das Karzinomgewebe umgibt, zeigt keine  $\alpha v\beta 6$  Integrin Expression. In Vergrößerungen kann eine spezifische, membranständig Expression detektiert werden. Im Zytosol und im Nucleus wurde keine  $\alpha v\beta 6$  Integrin Expression beobachtet. (Abbildung 14B)

## Ergebnisse

### 5.2.1.1 Darstellung der $\alpha\beta6$ Integrin Expression invasiver Karzinomzellen im Western Blot Verfahren

Die Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin wurde semi-quantitativ in Western Blot Analysen bestätigt. Aus ungefärbten histologischen Schnitten, bei denen in histologischen und immunhistologischen Analysen eine Karzinominfiltration in den Knochen diagnostiziert wurde, wurden durch Mikrodisektion die Bereiche der Karzinominvasion separiert. (Abbildung 16A) Aus den separierten Gewebeanteilen der FFPE Schnitte wurden die Proteine isoliert und gereinigt. Die Proteinisolate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und  $\alpha\beta6$  Integrin im Western Blot Verfahren dargestellt. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Isolierung immunreaktiver Proteine diente  $\beta$ -Aktin, das sowohl aus dekalzifizierten (decal) als auch aus kalzifizierten (cal) Schnitten im Vergleich untersucht wurde. (Abbildung 16B)



#### Abbildung 16: Semi-quantitative Darstellung der $\alpha\beta6$ Integrin Proteinexpression

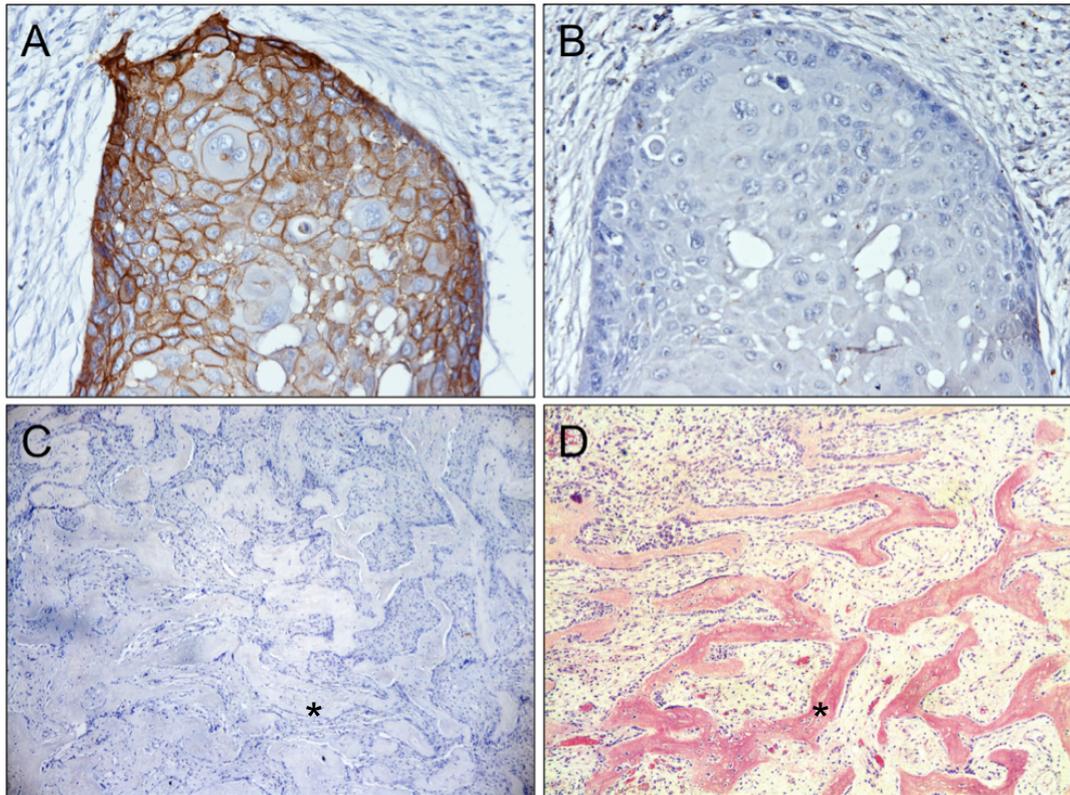
A) Exemplarische Darstellung der Karzinombereiche (rote Linie), die durch Mikrodisektion aus den histologischen Schnitten isoliert wurden.

B) Nach Mikrodisektion des Invasionsbereichs der Karzinome wurden die Proteine der desektierten Gewebeareale isoliert, aufgereinigt und im Western Blot Verfahren analysiert. Die Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin konnte als spezifische Bande bei 135kD im Western Blot Verfahren dargestellt werden. Gleichmäßige Darstellung der  $\beta$ -Aktin Expression aus entkalkten (decal) und nicht entkalkten (cal) histologischen Schnitten. Die Dekalzifikation zeigte keinen Einfluss auf die Immunreaktivität isolierter Proteine.

### 5.2.1.2 Kontrolle der $\alpha v \beta 6$ Integrin Expression

In Kontrollexperimenten wurde die Spezifität der Bindung der anti- $\alpha v \beta 6$  Integrin Antikörper in entkalkten histologischen Präparaten getestet. Neben der konventionellen immunhistologischen Färbung wurden Immunhistologien, ohne Verwendung des ersten Antikörpers gegen  $\alpha v \beta 6$  Integrin erstellt, um zu testen, ob der zweite Antikörper unspezifische Epitopenbindungen aufweist. Eine unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers würde zu falsch positiven Ergebnissen bei immunhistologischen Färbungen führen.

Abbildung 17A stellt die immunhistologische Färbung eines Plattenepithelkarzinoms mit spezifischer, membranständiger Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin dar. Abbildung 17B zeigt, dass ohne Applikation des Erstantikörpers keine unspezifische Bindung des Zweitantikörpers aufgetreten ist, die zu einer unspezifischen Färbung führen würde. Eine weiterführende Kontrolluntersuchung ist in Abbildung 17C und D dargestellt. Die Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin wurde nicht nur im Rahmen der Karzinogenese, sondern auch im Rahmen von Wundheilungsprozessen diskutiert. (Thomas et al, 2006) Um ausschließen zu können, dass die Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin auf entzündliche Begleitreaktionen und Remodellierungsprozesse bei der Infiltration der Karzinomzellen in Knochengewebe zurückzuführen ist, wurde knöchernes Kallusgewebe auf die Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin untersucht. Abbildung 17D zeigt eine HE Färbung knöchernen Kallusgewebes. Abbildung 17C illustriert die immunhistologische Färbung mit  $\alpha v \beta 6$  Integrin eines histologischen Schnittes desselben Präparats. Die Ergebnisse zeigen, dass im Rahmen der knöchernen Wundheilung keine  $\alpha v \beta 6$  Integrin Expression detektiert werden konnte. Folglich kann ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin im Bereich der Karzinominfiltration im Knochengewebe durch entzündliche Begleitreaktionen verursacht wird. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass  $\alpha v \beta 6$  Integrin spezifisch von infiltrierenden Karzinomzellen der Invasionsfront und von infiltrierenden Karzinomzellen im spongiösen Knochengewebe exprimiert wird. Somit könnte  $\alpha v \beta 6$  Integrin als immunologischer Biomarker des invasiven Plattenepithelkarzinoms im Knochengewebe für eine immunzytologische Diagnostik angewandt werden, um Karzinomzellen in zytologischen Präparaten zu markieren.



**Abbildung 17: Zweitantikörperkontrolle und Kontrolle der  $\alpha\beta 6$  Integrin Expression im spongiösen Kallusgewebe**

A) Immunhistologische Darstellung der spezifischen, membranständigen Expression der  $\alpha\beta 6$  Integrin Expression von Plattenepithelkarzinomzellen

B) Die Zweitantikörperkontrolle zeigt keine Zeichen einer unspezifischen Färbung durch unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers.

C) Die Immunhistologische Färbung der  $\alpha\beta 6$  Integrin Expression im spongiösen Kallusgewebe mit Anteilen von spongiösen Knochen\* und entzündlicher Begleitreaktion zeigt keine Expression von  $\alpha\beta 6$  Integrin im Rahmen von Remodellierungsprozessen der Knochenwundheilung.

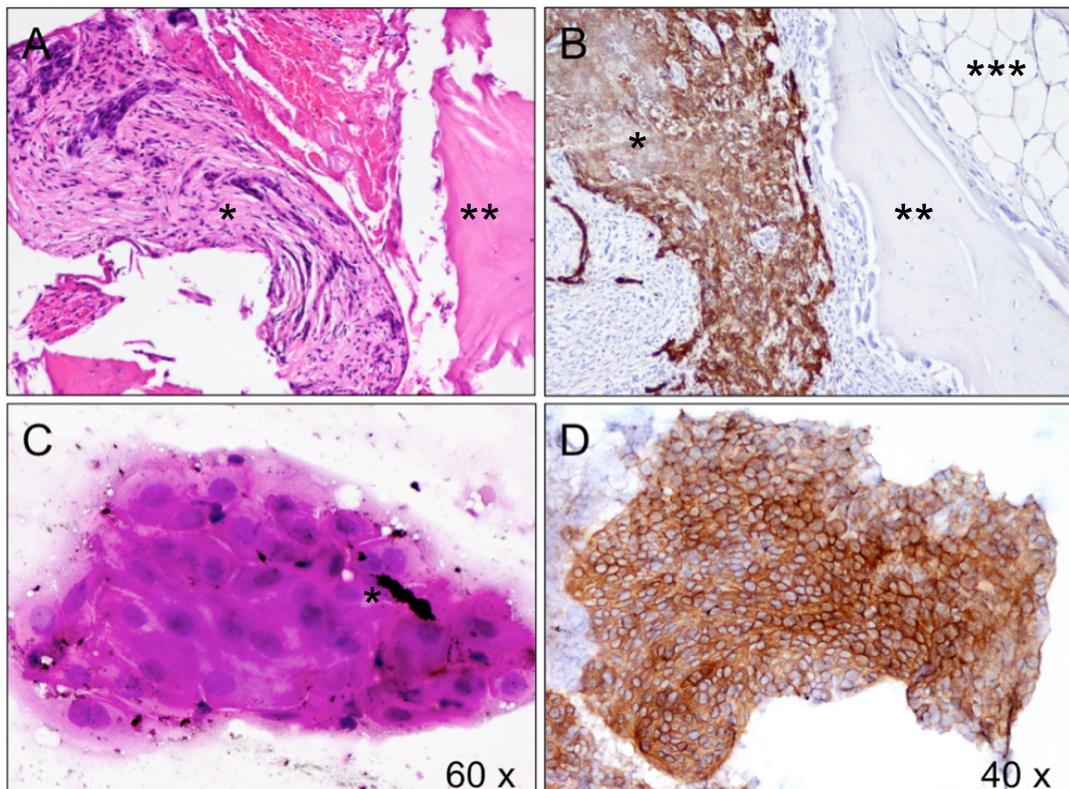
D) HE Färbung von knöchernen Kallusgewebe mit Anteilen spongiösen Knochens\*.

### 5.2.2 $\alpha v\beta 6$ Integrin als immunzytologischer Biomarker invasiver Karzinomzellen

Nachdem in histologischen Präparaten und im Western Blot Verfahren die spezifische Expression von  $\alpha v\beta 6$  Integrin bei invasiven Karzinomzellen im mesenchymalen Knochengewebe nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob Karzinomzellen auch in zytologischen Präparaten durch die Darstellung der  $\alpha v\beta 6$  Integrin Expression spezifisch markiert werden können. Es wurden Zellproben aus dem zentralen, histologisch gesicherten Invasionsbereich von knocheninfiltrierenden Plattenepithelkarzinomen gewonnen. Von diesen Zellproben wurden zytologische Präparate erstellt und immunzytologisch auf die Expression von  $\alpha v\beta 6$  Integrin untersucht. Durch Desintegration der knöchernen Gewebeproben, Suspendierung des Gewebes, Filterung, Zentrifugation und Resuspendierung des gewonnenen Zellpellets, konnten die zellulären Anteile der Knochenmarkproben aufgereinigt werden und somit ein größeres Gewebevolumen einer zytologischen Beurteilung zugeführt und die Qualität der zytologischen Präparate verbessert werden.

In Abbildung 18A ist in konventioneller HE Färbung ein Plattenepithelkarzinom mit Infiltration des Knochengewebes dargestellt. Die immunhistologische Färbung in Abbildung 18B mit  $\alpha v\beta 6$  Integrin illustriert die spezifische Abgrenzung des Karzinomgewebes vom umliegenden Stroma mit entzündlicher Begleitreaktion.

Abbildung 18C stellt in einem zytologischen Präparat aggregierte Karzinomzellen mit Anteilen spongiösen Knochengewebes dar. Der Befund zeigt das Ergebnis einer zytologischen Untersuchung eines knöchernen Resektionsrands mit Karzinominfiltration. Die aggregierten Zellen wurden anhand zytomorphologischer Malignitätskriterien als Karzinomzellen diagnostiziert. In Abbildung 18D ist das Ergebnis einer immunzytologischen Untersuchung aggregierter Karzinomzellen im zytologischen Ausstrichpräparat exemplarisch dargestellt. Die Karzinomzellen sind durch eine spezifische, membranständige Expression von  $\alpha v\beta 6$  Integrin gekennzeichnet. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Karzinomzellen, die invasiv in Knochengewebe einwachsen und das Knochenmark infiltrieren, mit Hilfe der immunzytologischen Darstellung der  $\alpha v\beta 6$  Integrin Expression spezifisch markiert und vom umliegenden Gewebe differenziert dargestellt werden können.



**Abbildung 18: Immunzytologische Markierung invasiver Karzinomzellen des Knochenmarks mit korrespondierendem histologischen Befund**

A) Darstellung eines Plattenepithelkarzinoms \* mit Infiltration des Knochengewebes \*\* in konventioneller HE Färbung.

B) Darstellung der  $\alpha v \beta 6$  Integrin Expression des Karzinomgewebes \* mit Infiltration des spongiösen Knochengewebes \*\*. Das umgebende Stroma mit entzündlicher Begleitreaktion, sowie das Knochenmarkfettgewebe \*\*\* zeigt keine  $\alpha v \beta 6$  Integrin Expression.

C) Zytologische Darstellung aggregierter Karzinomzellen mit Anteilen spongiösen Knochengewebes \*. Der Befund zeigt exemplarisch das Ergebnis einer zytologischen Untersuchung eines knöchernen Resektionsrands mit Karzinominfiltration. (60-fache Vergrößerung)

D) Illustration einer immunzytologischen Untersuchung aggregierter Karzinomzellen im zytologischen Ausstrichpräparat. Die Karzinomzellen sind durch eine spezifische, membranständige Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin gekennzeichnet. (40-fache Vergrößerung)

Eine weiterführende Charakterisierung der Karzinomzellen epithelialen Ursprungs im mesenchymalen Knochengewebe, kann durch die Darstellung der Expression epithelialer Markerproteinen erfolgen. Für diesen Ansatz kann die Analyse von Markerproteinen dienen, die im Rahmen der EMT in ihrer Expression verändert exprimiert werden. Ein Protein, das für die Integrität der epithelialen Zellstruktur verantwortlich ist, ist das Strukturprotein E-Cadherin. Im Rahmen der EMT, bei der Metastasierung und bei infiltrativem Wachstum von Karzinomzellen, wird die Expression von E-Cadherin herunterreguliert, damit sich epitheliale Zellen aus dem Zellverband lösen und in benachbarte Strukturen einwandern können. Folglich kann zum einen die *de novo* Expression von  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin als auch eine verminderte Expression von E-Cadherin genutzt werden, um infiltrative Karzinomzellen epithelialen Ursprungs im mesenchymalen Knochenmark zu markieren und von mesenchymalen Zellen zu differenzieren.

Im Folgenden wurden isolierte Karzinomzellen hinsichtlich der Expression EMT assoziierter Proteine, i.e.  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin und E-Cadherin, immunfluoreszenzzytologisch untersucht.

### 5.2.2.1 *$\alpha\text{v}\beta\text{6}$ Integrin und E-Cadherin als Markerproteine für eine Immunfluoreszenz gestützte Diagnostik invasiver Karzinomzellen*

Für die diagnostische Anwendung könnte eine Markierung von Karzinomzellen in zytologischen Ausstrichpräparaten hilfreich sein, um diese leichter, schneller und sensitiver zu detektieren. Zusätzlich könnten EMT Markerproteine dazu dienen, den Grad der Dedifferenzierung der Karzinomzellen vom Ursprungsgewebe zu evaluieren. Für diesen Ansatz kann die Expression epithelialer EMT Markerproteine, wie E-cadherin, nützlich sein.

Um diese Idee für eine intraoperative zytologische Beurteilung des Knochengewebes umzusetzen, wurde eine immunfluoreszenzzytologische Färbung für zytologische Präparate spongiöser Knochenproben erarbeitet, mit der die Expression von  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin und E-Cadherin zeitgleich detektiert werden kann. Für die Evaluierung der zytomorphologischen Malignitätskriterien wurden die immunfluoreszenzzytologische Färbung mit einer DAPI Färbung für DNA ergänzt. Abbildung 19 zeigt die immunfluoreszenzzytologische Darstellung der  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin und E-Cadherin Proteinexpression aggregierter Plattenepithel-

## Ergebnisse

---

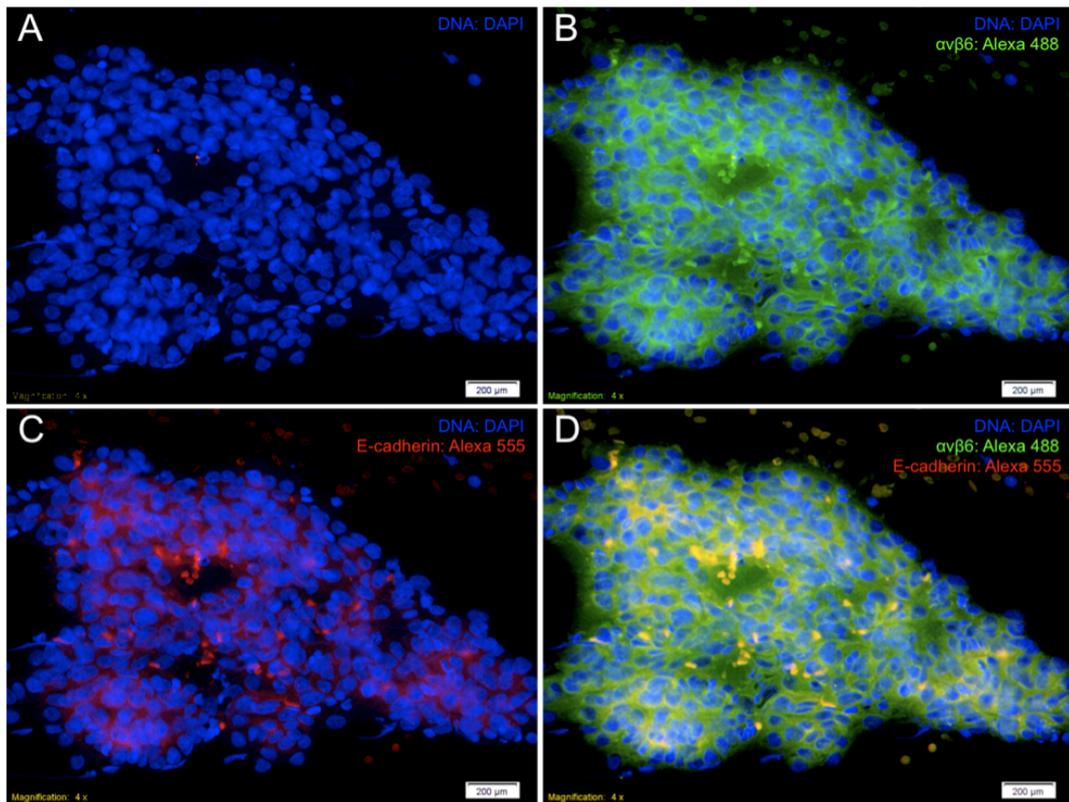
karzinomzellen im zytologischen Präparat. Die Nuclei der Karzinomzellen sind durch das blaue DAPI Signal dargestellt und lassen eine morphologische Beurteilung einer Anisokariose, einer gestörten Nucleus/Plasma Relation zu Gunsten des Nucleus, einer Nucleuspolymorphie und Veränderungen der Chromatinstruktur mit mehreren Nukleoli zu. (Abbildung 19A und 20A)

Die Karzinomzellen lassen sich durch Markierung der  $\alpha v \beta 6$  Integrin Proteinexpression mit grünem Fluoreszenzsignal darstellen. (Abbildung 19B und 20B)

Die interzelluläre Bindung und der zelluläre Zusammenhalt sind Voraussetzungen für eine geordnete Gewebearchitektur und zählen zu den wichtigsten Differenzierungsmerkmalen epithelialen Gewebes. Eine verminderte Expression epithelialer Adhäsionsmoleküle führt zu einem Kohäsivitätsverlust und ist ein wichtiges Kriterium der Malignität. Zusätzlich differenziert die Expression von E-Cadherin Zellen ektodermalen Ursprungs vom mesenchymalen Knochengewebe. Eine verminderte Expression epithelialer Proteine ist Hinweis auf eine fortgeschrittene Dedifferenzierung der Karzinomzellen vom epithelialen Ursprungsgewebe. Abbildung 19C und 20C zeigt die Expression des epithelialen Adhäsionsproteins E-Cadherin als rotes Fluoreszenzsignal.

Im zentralen Bereiches der aggregierten Karzinomzellen ist die Co-Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin und E-Cadherin, durch die Überlagerung des grünen und des roten Fluoreszenzsignals, in gelb zu detektieren. (Abbildung 19D und 20D)

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Karzinomzellen in einem zytologischen Ausstrichpräparat mit dieser Immunfluoreszenzmarkierung spezifisch markiert und detektiert werden können.



### Abbildung 19: $\alpha v \beta 6$ Integrin und E-Cadherin Immunfluoreszenzzytologie

A) Die Nuclei der Karzinomzellen sind durch das blaue DAPI Signal dargestellt und lassen eine morphologische Beurteilung einer Anisokariose, einer gestörten Nucleus/Plasma Relation zu Gunsten des Nucleus, einer Nucleuspolymorphie und Veränderungen der Chromatinstruktur mit mehreren Nukleoli zu. (Siehe auch Abbildung 20A)

B) Immunfluoreszenzzytologische Darstellung der  $\alpha v \beta 6$  Integrin Expression mit grünem Fluoreszenzsignal Alexa 488

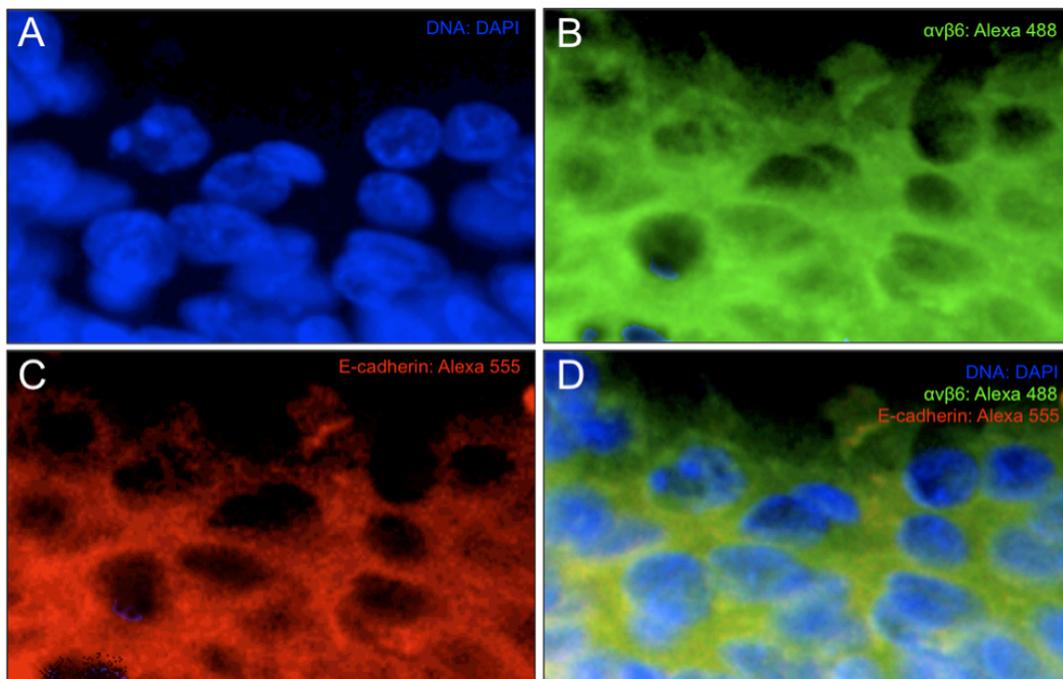
C) Direkte immunfluoreszenzzytologische Darstellung der E-Cadherin Expression mit rotem Fluoreszenzsignal Alexa 555

D) Immunfluoreszenzzytologische Darstellung der  $\alpha v \beta 6$  Integrin und E-Cadherin Co-Expression. Die Regionen der Protein Co-Expression erscheinen durch die Überlagerung des grünen und des roten Fluoreszenzsignals gelb.

## Ergebnisse

---

In einer vergrößerten immunfluoreszenzzytologischen Darstellung sind mit der DAPI Färbung die zytomorphologischen Malignitätskriterien einer Anisokariose, einer gestörten Nucleus/Plasma Relation zu Gunsten des Nucleus, einer Nucleuspolymorphie und Veränderungen der Chromatinstruktur zu differenzieren. Die Aussparungen der DAPI Fluoreszenz weisen auf mehrere Nucleoli in einem Nucleus hin. Überlagerungen mit konsekutiver Tiefenunschärfe sind einer pathologische Zellaggregation der Karzinomzellen im Ausstrichpräparat geschuldet. Abbildung 20A-D verdeutlicht die spezifische Markierung der Karzinomzellen durch die membranständige Expression von  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin und E-Cadherin.



**Abbildung 20:  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin und E-Cadherin Immunfluoreszenzzytologie**

A) In der DAPI Färbung sind die zytomorphologischen Malignitätskriterien einer Nucleuspolymorphie und Veränderungen der Chromatinstruktur zu differenzieren. Die Aussparungen des DAPI Signals weisen auf mehrere Nucleoli in einem Nucleus hin.

B) Immunfluoreszenzzytologische Darstellung der  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin Expression.

C) Immunfluoreszenzzytologische Darstellung der E-Cadherin Expression.

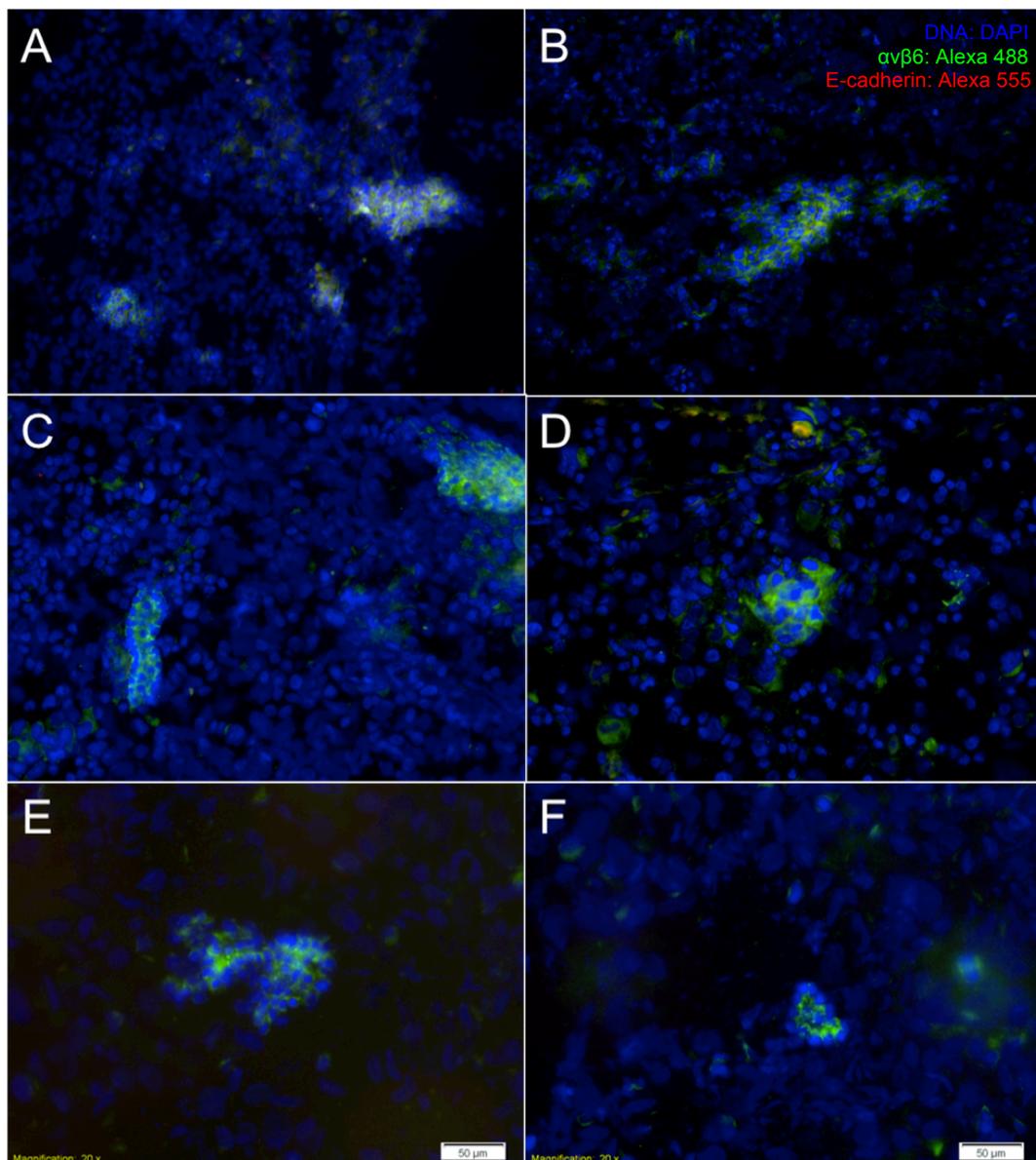
D) Immunfluoreszenzzytologische Darstellung der  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin und E-Cadherin Co-Expression. Regionen der Co-Expression erscheinen in der Zusammenführung der Farbkanäle gelb. Partielle unscharfe Bereiche sind der Tiefenunschärfe durch pathologische Aggregation der Karzinomzellen geschuldet.

### 5.2.2.2 *Immunfluoreszenz gestützte Diagnostik invasiver Karzinomzellen mit $\alpha\beta6$ Integrin und E-Cadherin*

In einer weiterführenden Untersuchung wurde eine immunfluoreszenzgestützte zytologische Beurteilung invasiver Plattenepithelkarzinomzellen für die klinische Routinediagnostik evaluiert. Von 17 Patienten mit Karzinominfiltration der Mandibula wurden intraoperativ zytologische Präparate erstellt und die Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin und E-Cadherin immunfluoreszenzzytologisch untersucht. In Abbildung 21A-F sind die Ergebnisse exemplarisch dargestellt. Alle Karzinomzellen zeigten eine konstante, membranständige  $\alpha\beta6$  Integrin Expression. Wie in histologischen und immunzytologischen Vorversuchen beschrieben, war die Expression von  $\alpha\beta6$  Integrin auf Karzinomzellen beschränkt. Bei mesenchymalen Knochenmarkzellen konnte keine  $\alpha\beta6$  Integrin Expression nachgewiesen werden. Die Expression von E-Cadherin war auf Karzinomzellen im zentralen Bereich aggregierter Karzinomzellen beschränkt. In allen Fällen konnten aggregierte Karzinomzellen in den zytologischen Ausstrichpräparaten karzinominfiltrierter Spongiosaprobe durch eine immunfluoreszenzzytologische Markierung der  $\alpha\beta6$  Integrin und E-Cadherin Expression deutlich von umgebenden mesenchymalen Zellen differenziert werden.

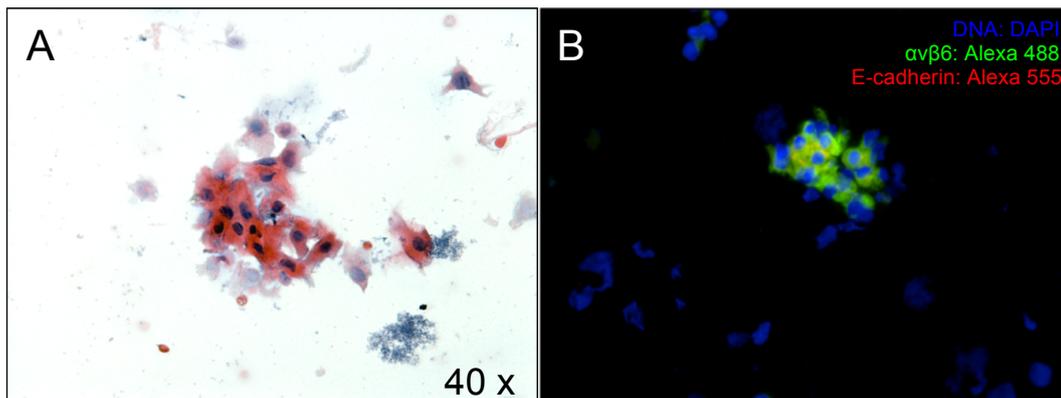
Damit auch potentielle, einzelne Karzinomzellnester innerhalb eines Sicherheitsabstands von 5 mm durch eine zytologische Beurteilung berücksichtigt werden können, wurde ein Protokoll zur Isolierung und Aufreinigung zelluläre Bestandteile des Knochens erarbeitet, so dass ein größeres knöchernes Gewebenvolumen einer zytologischen Beurteilung zugänglich gemacht werden kann. Vergleiche Abbildung 3 und Abbildung 11.

Abbildung 22A zeigt eine zytologische Darstellung isolierter und aufgereinigter Karzinomzellen einer Knochenprobe. In Abbildung 22B ist der immunfluoreszenzzytologische Befund eines Karzinomzellnests isolierter und aufgereinigter Karzinomzellen der selben Knochenprobe dargestellt. Der Prozess der Zellisolierung und Aufreinigung mit anschließender, immunfluoreszenzzytologischer Beurteilung war im Rahmen des operativen Eingriffs umzusetzen.



**Abbildung 21:  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin und E-Cadherin Immunfluoreszenzzytologie**

A-F) In den exemplarischen Darstellungen sind durch die Proteinexpression von  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin und E-Cadherin aggregierte Karzinomzellnester spezifisch vom umgebenden mesenchymalen Zellen abgrenzbar. Ein grünes Fluoreszenzsignal ist hinweisend auf eine  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin Proteinexpression. Ein gelbes Fluoreszenzsignal markiert eine Co-Expression von  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  und E-Cadherin. Eine Co-Expression wurde hauptsächlich im zentralen Bereichen der Karzinomzellnester beobachtet und ist hinweisend auf eine persistierende Expression des epithelialen Adhäsionsproteins E-Cadherin. Die Expression epithelialer Adhäsionsproteine markiert Zellen epithelialen Ursprungs im mesenchymalen, spongiosen Knochengewebe und erklärt die Aggregation der Karzinomzellen in Zellnester.



**Abbildung 22: Zytologie aufgereinigter und isolierter Karzinomzellen und immunfluoreszenzzytologische Markierung mit  $\alpha v \beta 6$  Integrin und E-Cadherin**

A) Zytologische Darstellung intraoperativ isolierter und aufgereinigter Karzinomzellen einer Knochenprobe, entsprechend Abbildung 3 und Abbildung 11. HE Färbung

B) Immunfluoreszenzzytologische Darstellung der  $\alpha v \beta 6$  Integrin und E-Cadherin Expression intraoperativ isolierter und aufgereinigter Karzinomzellen aus Abbildung 22A.

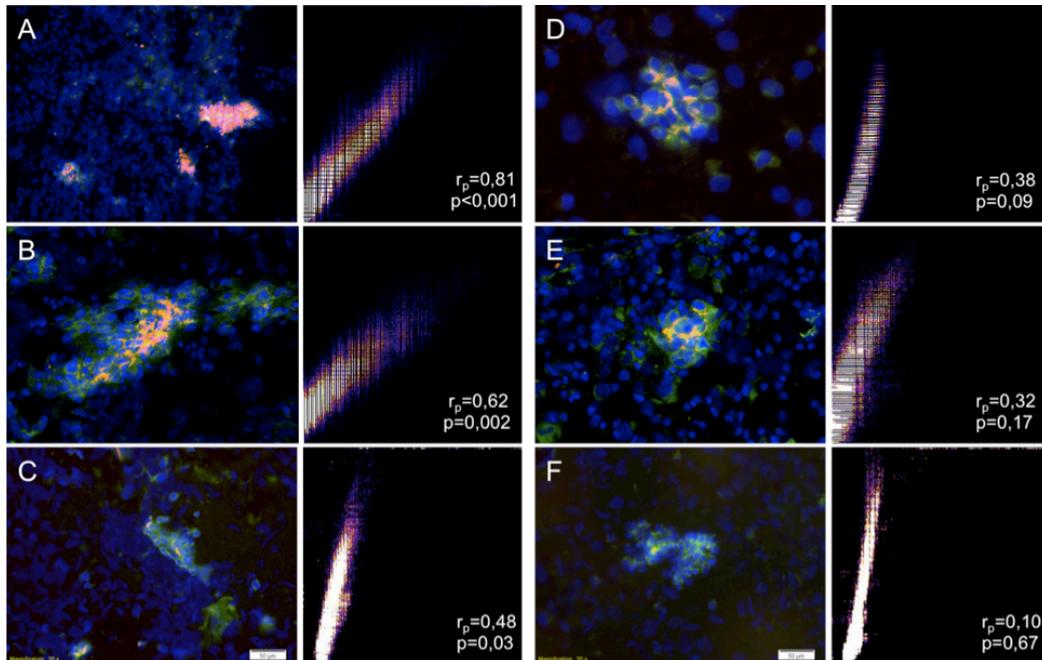
Die Isolierung und Aufreinigung der zellulären Bestandteile ermöglicht die zytologische Beurteilung eines größeren knöchernen Gewebavolumens zur intraoperativen Beurteilung der knöchernen Resektionsränder. Eine immunfluoreszenzzytologische Markierung durch  $\alpha v \beta 6$  Integrin und E-Cadherin kann die Detektion potentieller Karzinomzellen erleichtern.

Eine verminderte oder fehlende E-Cadherin Expression ist vereinbar mit der verminderten Expression epithelialer Adhäsionsproteine im Rahmen der EMT. Die verminderte Expression von Adhäsionsproteinen mit konsekutiver Reduktion der Kohäsivität der Karzinomzellen ist Zeichen einer fortgeschrittenen Dedifferenzierung vom epithelialen Ursprungsgewebe und Voraussetzung für ein migratives, infiltratives Wachstum. Folglich kann eine verminderte E-Cadherin Expression mit einem aggressiven Karzinomwachstum assoziiert sein und die Analyse der  $\alpha v \beta 6$  Integrin und E-Cadherin Co-Expression der Charakterisierung invasiver Karzinome dienen. In Abbildung 23A-F sind die Ergebnisse einer Co-Expressionsanalyse illustriert.

Um den Grad der Dedifferenzierung der Karzinomzellen vom epithelialen Ursprungsgewebe zu quantifizieren, wurde die Expression von E-Cadherin in Relation zur Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin analysiert. Dafür wurde die Co-Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin und E-Cadherin korreliert und farblich illustriert. Die

## Ergebnisse

Co-Expression wurde mit ImageJ anhand des Pearson's Korrelationskoeffizienten quantifiziert und als *Scatter blot* illustriert. (Abbildung 23A-F)



**Abbildung 23: Korrelierte Expression von  $\alpha v\beta 6$  Integrin und E-Cadherin**

A-F) Die Co-Expression der  $\alpha v\beta 6$  Integrin und E-cadherin Expression wurde als Pearson's Korrelationskoeffizienten ( $r_p$ ) berechnet und als *Scatter blot* graphisch verdeutlicht. Eine vollständige Korrelation der  $\alpha v\beta 6$  Integrin und E-Cadherin Expression würde dem Wert  $r_p=1$  entsprechen und sich als Geraden mit positiver Steigung darstellen lassen. Je kleiner  $r_p$  wird, desto geringer ist der Zusammenhang beider Merkmale. Für  $r_p=0$  gilt kein Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen. Für die Darstellung der  $\alpha v\beta 6$  Integrin und E-Cadherin Expression gilt: Je kleiner  $r_p$ , desto geringer die E-Cadherin Expression. Das 5% Signifikanzniveau des Wertes des Korrelationskoeffizienten  $r_p$  in Bezug auf die Nullhypothese beträgt für  $n=20$   $p\leq 0,44$ . Bei nahezu fehlender E-Cadherin Expression geht  $r_p$  gegen 0 und das Signifikanzniveau wird nicht erreicht.

## **Ergebnisse**

---

Zusammenfassend beschreibt die Arbeit die Etablierung einer diagnostischen Methode für die klinische Routinediagnostik. Durch die Charakterisierung der EMT Markerproteine als Biomarker invasiver Karzinomzellen im Knochengewebe können die morphologischen Malignitätskriterien der zytologischen Diagnostik um eine Immunfluoreszenz gestützte Beurteilung zur Detektion invasiver Karzinomzellen erweitert werden. Die DAPI Färbung lässt eine zytomorphologische und zytometrische Beurteilung des DNA Gehalts zu, um Karzinomzellen von physiologischen Knochenmarkzellen zu differenzieren.

# 6 Diskussion

Das Thema einer intraoperativen Beurteilung der knöchernen Resektionsränder bei Karzinompatienten war bisher ein ungelöstes Problem und stellte eine Lücke in der klinischen Diagnostik dar. Ansätze zur Lösung dieser Problematik wurden im Vorfeld von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgestellt. Jede Arbeitsgruppe verfolgte unterschiedliche Methoden mit dem Ziel, intraoperativ eine valide diagnostische Aussage des knöchernen Resektionsstatus treffen zu können. Als erstes wurde eine Analyse von Kryoschnitten spongiösen Knochengewebes bei 29 Patienten als eine schnelle Methode präsentiert, um karzinomfreie Resektionsränder der Mandibula zu garantieren. Mit diesem Ansatz konnte eine Tumorfreiheit bei 97% der 33 Resektionsränder korrekt bestimmt werden. (Forrest et al, 1995) Nach zwei Jahren wurde eine Aktualisierung der Studie mit einer größeren Probenanzahl und zusätzlichen Tumorentitäten vorgestellt. Die Sensitivität der Kryoschnellschnittdiagnostik wurde mit 88,9% und die Spezifität mit 100% beschrieben. (Forrest et al, 1997)

In einer weiteren Studie wurde die Praktikabilität von Kryoschnitten kortikaler Knochenränder mit einer Sensitivität von 89% und einer Spezifität von 100% bei 25 Patienten evaluiert. (Oxford & Ducic, 2006) Eine Pilotstudie präsentierte eine Modifikation des methodischen Ansatzes der Kryoschnellschnittdiagnostik, bei der Knochenproben durch Trepanbohrungen gewonnen und der Schnellschnitttechnik unterzogen wurden. Bei dieser Variante konnte eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 95% beschrieben werden. (Wysluch et al, 2010)

Kürzlich wurde bewertet, ob Proben, die intraoperativ durch Kürettage des Knochenmarks der Mandibula gewonnen wurden und Biopsien des Nervus alveolaris inferior als repräsentativ im Vergleich zu entkalkten, histologischen Schnittpräparaten betrachtet werden können. Die Auswertungen der Studie ergaben eine Sensitivität von 50% (3 von 6 Proben zeigten ein falsch positives Ergebnis) und eine Spezifität von 100%. (Bilodeau & Chiosea, 2011) Die aufgeführten Arbeiten beschreiben, dass spongiöses Knochengewebe und kortikaler Knochen einer Kryoschnellschnittuntersuchung unterzogen werden kann. Obwohl die Autoren diese Methode als praktikablen diagnostischen Ansatz beschreiben, werden technische Schwierigkeiten bei der Gewebeerarbeitung

## Diskussion

---

eingerräumt, die auf die Härte und Dichte des Knochengewebes zurückzuführen sind. Zusätzlich würde für die diagnostische Beurteilung der Gewebepreparate eine besondere Übung in der morphologischen Beurteilung benötigt.

Nach unseren eigenen Erfahrungen führen die technischen Limitationen der bisher beschriebenen methodischen Ansätze zu Artefakten, die eine verminderte Qualität der Präparate zur Folge haben und die diagnostische Wertigkeit und Verlässlichkeit einschränken. Um eine Methode für die intraoperative Beurteilung knöcherner Resektionsränder als klinische Routinediagnostik etablieren zu können, müssen technische Limitationen der Gewebeerarbeitung gelöst sein, wenn diese als diagnostische Methode angewandt werden soll, die Konsequenzen für das chirurgische Vorgehen hat.

Als Lösung der technischen Problematik wurde vorgeschlagen, die knöchernen Resektionspräparate in kleinere Gewebeproben vorzuschneiden, um in Kombination mit Mikrowellenstrahlung eine Beschleunigung des Fixierungs- und Entkalkungsprozesses der Knochenproben zu erzielen. So sollte das Knochengewebe leichter den Methoden der Weichteilgewebeerarbeitung zugänglich gemacht werden. Obwohl Ergebnisse mit einer Sensitivität von 100% in Korrelation mit der konventionellen Technik der Dekalzifizierung beschrieben wurden, sind für eine intraoperative Beschleunigung des Entkalkungsprozesses mehrerer Arbeitsschritte nötig, die einen hohen personellen Aufwand innerhalb eines zeitaufwendigen Protokolls von 3 Stunden fordern. (Weisberger et al, 2001) Die Zeit- und Arbeitsintensität schließt diese Methode für einen intraoperativen diagnostischen Ansatz aus.

Ein methodischer Ansatz, der einen Hinweis erbringen konnte das Potential zu haben eine schnelle, kosteneffektive und zuverlässige Diagnostik zu ermöglichen, mit der intraoperativ die knöchernen Resektionsränder hinsichtlich einer Karzinominfiltration beurteilt werden können, wurde in einer Pilotstudie von Mahmood und Kollegen vorgestellt. (Mahmood et al, 2001) In dieser Studie wurde eine zytologische Untersuchung von spongiösen Ausstrichpräparaten präsentiert mit der eine Sensitivität von 100% erzielt werden konnte. Trotz der limitierten Anzahl von sieben Patienten, bietet diese Pilotstudie einen Einblick in die Praktikabilität einer zytologischen Untersuchung knöcherner Resektionsränder.

Auch vor dem Hintergrund vielversprechender Ergebnisse konnten die

beschriebenen diagnostischen Ansätze bisher nicht für die intraoperative Beurteilung des knöchernen Resektionsstatus in der klinischen Routinediagnostik etabliert werden.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde ein zytologischer Ansatz erarbeitet, mit dem knöcherne Resektionsränder intraoperativ beurteilt werden können. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien zeichnet sich der hier beschriebene methodische Ansatz durch sehr gute Praktikabilität aus, so dass die diagnostische Wertigkeit im Rahmen der klinischen Routinediagnostik evaluiert werden konnte. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse, führte diese Studie zur Etablierung der intraoperativen zytologischen Beurteilung des knöchernen Resektionsstatus in der klinischen Diagnostik und schliesst eine bis dato offene diagnostische Lücke. Im Folgenden werden einzelne Aspekte dieser intraoperativen zytologischen Karzinomdiagnostik des Knochens dargestellt und unter verschiedenen Gesichtspunkten kritisch beurteilt.

### **6.1 Intraoperative zytologische Karzinomdiagnostik**

#### **6.1.1 Stellenwert der Methode im klinischen Kontext**

Der Stellenwert einer diagnostischen Methode zur intraoperativen Sicherung der Karzinomfreiheit knöcherner Resektionsränder wird im Kontext des diagnostischen Stagingverfahrens deutlich. In der Einleitung wurde das präoperative Stagingverfahren beschrieben, das nach bioptischer Sicherung der Diagnose, durch die Möglichkeiten der bildgebenden Verfahren und durch die intraoperative und postoperative histologische Aufarbeitung der Resektionspräparate des Primärtumors und der Lymphknoten eine Einteilung nach Tumorgröße, Lymphknoten- und Resektionsstatus, nach dem Grading und nach Vorhandensein von Metastasen ermöglicht. Unter diesen Beurteilungskriterien kann eine Stadieneinteilung der Erkrankung erfolgen. Dem Erkrankungsstadium entsprechend kann interdisziplinär eine Optimierung des therapeutischen Procederes, im Sinne einer adjuvanten Therapie, für jeden Patienten individuell erörtert und festgelegt werden.

Das operative Vorgehen hat zum einen zum Ziel, das gesamte Karzinomgewebe mit dem assoziierten lymphatischen Gewebe unter maximaler Schonung der

funktionellen Strukturen zu entfernen, und zum anderen die resezierten Gewebeanteile bestmöglich morphologisch und funktionell zu rekonstruieren.

Um der Forderung gerecht zu werden gleiches Gewebe mit Gleichem zu ersetzen, sind für komplexe Defektsituationen mit Verlust von Hart- und Weichgewebe im Kopf-Hals-Bereich osteo-myo-kutane mikrovaskuläre Transplantate nötig. Sowohl für die Sicherung der vollständigen Resektion des Karzinomgewebes an den Resektionsrändern, als auch zur Sicherung eines karzinomfreien Transplantatlagers ist die intraoperative histologische Schnellschnittuntersuchung der Goldstandard für ein optimiertes chirurgisches Vorgehen mit kurativer Zielsetzung. Speziell vor dem Hintergrund der operativen Möglichkeiten der primären Rekonstruktion nach vollständiger Entfernung eines Tumors wird deutlich, dass bis dato die intraoperative Sicherung der Tumorfreiheit der knöchernen Resektionsränder eine diagnostische Lücke darstellte. Die klinische Etablierung und Evaluation der zytologischen Beurteilung knöcherner Resektionsränder im klinischen Kontext stellt somit einen Beitrag zur Optimierung der interdisziplinären Versorgung von Karzinompatienten dar.

### 6.1.1.1 *Bedeutung der intraoperativen Knochenzytologie für den Patienten*

Für jeden Patienten mit einer Tumorerkrankung, dem nach interdisziplinärem Konsens ein chirurgisches Therapiekonzept empfohlen wird, für das auf die Kapazitäten eines klinischen Umfeld der Maximalversorgung zurückgegriffen werden kann, sollten alle diagnostischen und therapeutischen Optionen zur Optimierung des therapeutischen Konzeptes fallbezogen ermöglicht werden.

Ein maßgebender Anspruch jeder chirurgischen Intervention mit kurativer Zielsetzung bei Tumorerkrankungen ist ein postoperativer R0-Status. Auch durch (neo-)adjuvante radio- und/oder chemotherapeutische Therapieoptionen ist ein R1-Status mit einer niedrigeren 5-Jahres Überlebensrate und einer höheren Rezidivrate assoziiert. Bei adjuvanter Therapie von Karzinomen mit Knocheninvasion könne durch chirurgische Therapie im Vergleich zur Radiotherapie keine bessere Kontrolle des lokalen Befundes erzielt werden. Jedoch sei das Risiko einer Osteoradionekrose mit konsekutivem Verlust des Kieferknochens nach Radiotherapie deutlich erhöht. (Glanzmann & Gratz, 1995; Turner et al, 1996) Speziell bei fortgeschrittenen Karzinomen der Mundhöhle (T3,

## Diskussion

---

T4) ist, im Vergleich zu anderen Kopf-Hals-Karzinomen, eine primäre Radiotherapie mit einer höheren Rezidivrate assoziiert. (Levendag et al, 1996) Folglich steht für eine erfolgreiche therapeutische Strategie bei fortgeschrittenen Karzinomen die chirurgische Therapie mit vollständiger Entfernung des Karzinomgewebes im Vordergrund. Für Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen der Mundhöhle (T3, T4) sollte die chirurgische Therapie durch eine adjuvante Radiotherapie ergänzt werden. (Rodgers et al, 1993) Um dem kurativen Anspruch einer R0-Situation an allen Resektionsrändern gerecht werden zu können und jedem Patienten einen bestmöglichen therapeutischen Erfolg zu ermöglichen, wird mit der vorliegenden Arbeit eine Methode angeboten, mit der im diagnostisch schwierig zugänglichen Bereich des Knochengewebes der Resektionsstatus intraoperativ untersucht und gegebenenfalls durch Nachresektion ein R0-Status gesichert werden kann. Eine Sicherung des R0-Status an den knöchernen Resektionsgrenzen kann die Prognose eines jeden Patienten mit Karzinominfiltration des Knochens verbessern. Bei gesichertem knöchernen R0-Status kann ein adjuvantes, radiotherapeutisches Konzept dem geringeren Rezidivrisiko im Vergleich zu einem R1-Status durch eine geringere Strahlendosis adaptiert werden und somit das Risiko einer Osteoradionekrose mit konsekutivem Verlust des Kieferknochens verringert werden.

Abgesehen von den Vorteilen der zytologischen Beurteilung als einfache, schnelle und kosteneffektive Methode, sollte der Weg der Karzinominvasion und die Ausbreitung im spongiösen Knochengewebe in die Beurteilung mit einbezogen werden. Der vorgestellte methodische Ansatz ermöglicht es, dass das Ausbreitungsmuster der Karzinome berücksichtigt werden kann. Die Biologie der Karzinomausbreitung wurde von verschiedenen Fachrichtungen durch klinische, radiologische, histologische oder immunhistologische Methoden beschrieben. CT-morphologische und histologische Daten beschreiben die Haupteintrittsstelle des oralen Plattenepithelkarzinoms im Bereich des Alveolarfortsatzes. (Huntley et al, 1996) Andere Studien beschreiben zwei grundlegende Ausbreitungsmuster bei Karzinomen im Bereich der Mandibula: Bei einem infiltrativen oder invasiven Ausbreitungsmuster breitet sich das Karzinom entlang des spongiösen Knochengewebes aus und ist durch eine geringe osteoklastische Aktivität charakterisiert. Bei dem erosiven oder expansiven Wachstumsmuster arrodirt das Karzinomgewebe den Knochen mit

## Diskussion

---

einer Bindegewebeschicht und aktiven Osteoklasten, die zwischen dem Karzinomgewebe und dem Knochengewebe lokalisiert sind. (Brown, 2003; Slootweg & Muller, 1989; Totsuka et al, 1991)

Diese Unterscheidung wird auch als Osteoklasten unabhängige, oder infiltrative und Osteoklasten abhängige, oder erosive Phase der Knocheninvasion beschrieben. (Carter et al, 1983) Andere Autoren beschreiben die Invasion als dynamischen Prozess, der, abhängig von der Tiefe der Karzinominvasion, sowohl durch ein erosives als auch durch ein infiltratives Karzinomwachstumsmuster gekennzeichnet ist. (Brown & Browne, 1995)

Sobald ein Karzinom in die Mandibula eingewachsen ist, breitet es sich entlang des geringsten Widerstands aus. Die klinische Relevanz des Wachstumsmusters ist Gegenstand mehrerer Diskussionen. Einige Autoren beschreiben, dass sich das Karzinomwachstum bevorzugt entlang des Knochenmarks und des Nervus alveolaris inferior ausdehnt. (Carter et al, 1980; Lukinmaa et al, 1992; Southam, 1970; Totsuka et al, 1991) Verschiedene Arbeiten beschäftigten sich mit dem Thema der Karzinomausbreitung entlang des spongiösen Knochenmarks und des Nervus alveolaris inferior mit der Folge, dass das chirurgische Vorgehen dem erwarteten Wachstumsmuster angepasst wurde. Folglich wurde bei marginaler Resektion eine horizontale Kastenresektion der Mandibula mit Einschluss des Nervus alveolaris inferior bis in den Bereich der Schädelbasis erweitert. (McGregor & MacDonald, 1988a; McGregor & MacDonald, 1988b; McGregor & MacDonald, 1989; McGregor & MacDonald, 1993; McGregor & MacDonald, 1987)

Die klinischen Charakteristika, die mit einem infiltrativen Wachstumsmuster assoziiert sind, zeichnen sich durch ein höheres Grading, durch die Invasion in den Knochenmarkraum, durch positive Resektionsränder des Weich- und Hartgewebes, eine fehlgeschlagenen Vorbehandlung in der Anamnese und durch postoperative Rezidive aus. Ein infiltratives Wachstumsmuster in die Mandibula zeigte in 47,6% der Fälle postoperativ positive knöcherne Resektionsränder und eine Rezidivrate im Bereich des Primärtumors von 52.6% mit einem 4-fach erhöhten Risiko an der Erkrankung zu versterben. In diesen Fällen reduzierte sich eine krankheitsfreie 3-Jahres Überlebensrate auf 30%. (Wong et al, 2000)

Andere Autoren sind der Auffassung, dass die klinische Relevanz des Ausbreitungsmusters der Karzinome im Knochen überbewertet wird und dass die Tendenz der Ausbreitung entlang des spongiösen Knochengewebes nicht als generelles Wachstumsmuster beobachtet werden kann. Eine Analyse von Gewebeproben, die bei Kasten- und Segmentresektionen gewonnen wurden zeigte, dass die Rate der positiven Resektionsränder im Weichgewebe vergleichbar war mit den positiven knöchernen Resektionsrändern, jedoch in keinem Fall der knöcherne Resektionsrand Karzinomresiduen enthielt, wenn an den Resektionsrändern des Weichgewebes ein R0-Status vorlag. (Brown, 2003) Eine ähnliche Beobachtung wurde in 182 Fällen beschrieben, bei denen in 45% der Fälle ein Karzinombefall der Mandibula vorlag, aber nur in 2% der Fälle post operationem Karzinomresiduen im Resektionsrand bestätigt werden konnten. (Schusterman et al, 1993)

Wenn jedoch Karzinome, wie bei primären intraossären Karzinomen, im Bereich der Mandibula entstehen oder die Mandibula vom Karzinombefall stark betroffen ist, steigt das Risiko einer präferenziellen Karzinomausbreitung im Knochenmark. Zusätzlich lässt sich durch Bezug auf statistische Daten die Karzinomfreiheit knöcherner Resektionsränder für den individuellen Patienten nicht garantieren. Speziell vor dem Hintergrund primärer Rekonstruktionen muss ein R0-Status für jeden individuellen Patienten gesichert werden.

Zusammenfassend empfehlen wir die intraoperative zytologische Beurteilung der knöchernen Resektionsränder als diagnostischen Standard. Im Speziellen muss bei primären Rekonstruktionen mit osteo-myo-kutanen Transplantaten ein R0-Status im knöchernen Bereich des Transplantatlagers für jeden Patienten gesichert werden.

### *6.1.1.2 Die intraoperative Knochenzytologie als diagnostisches Mittel für den Chirurgen und den Pathologen*

Die Sicherung des R0-Status ist ein wichtiger prognostischer Faktor. Die multifaktoriellen Ursachen, die auf molekularbiologischer Ebene die Aggressivität und das Rezidivpotential einer Tumorerkrankung mit konsekutiv schlechter Prognose begründen, können nicht alleine durch die chirurgische oder radiotherapeutische Intervention kontrolliert werden. Folglich bleiben

Unsicherheitsfaktoren bei jedem interdisziplinären therapeutischen Vorgehen bestehen.

Was jedoch als direktes Mittel zu einer Verbesserung der Prognose dem Chirurgen und dem Pathologen in die Hände gegeben wird, sind diagnostische Methoden zur Sicherung der vollständigen Karzinomresektion. Der Chirurg kann im interdisziplinären Vorgehen mit dem Pathologen durch die Schnellschnitt-diagnostik direkt Einfluss auf das therapeutische Ergebnis nehmen, indem die vollständige Entfernung des Karzinomgewebes intraoperativ kontrolliert und der Resektionsumfang gegebenenfalls adaptiert wird.

Durch die hier beschriebene Methode der intraoperativen Knochenzytologie und deren klinische Etablierung steht dem Chirurgen und dem Pathologen ein diagnostisches Mittel zu Verfügung, um auch an den knöchernen Resektionsrändern den Resektionsstatus kontrollieren und direkt Einfluss auf den Behandlungserfolg nehmen zu können.

### 6.1.1.3 *Bedeutung der intraoperativen Knochenzytologie für die Klinik*

Eine Kontrollmöglichkeit des Resektionsstatus, die mit einer Verbesserung des Behandlungserfolgs für den Patienten, mit einer Verminderung der Rezidivgefahr und einer Minimierung der operativen Eingriffe verbunden ist, ist in erster Linie dadurch motiviert, jedem Patienten ein optimales Behandlungskonzept bieten zu können. Darüber hinaus beinhaltet eine Optimierung des Behandlungskonzepts mit einer Reduktion operativer Zweiteingriffe eine effizienzorientierte Nutzung beschränkter Ressourcen eines klinischen Betriebs.

Im Falle einer knöchernen R1-Situation wird der definitive pathologische Befund nach vollständiger Entkalkung und histologischer Aufarbeitung des Knochengewebes bekannt. Dieser Vorgang kann mehrere Tage in Anspruch nehmen. Im Falle einer Nachresektion muss folglich ein neuer operativer Eingriff unter Inanspruchnahme aller nötigen klinischen Ressourcen erfolgen. Neben der Belastung für den Patienten einer erneuten Narkose und eines operativen Zweiteingriffs ausgesetzt zu sein, müssen für eine Nachresektion personelle, zeitliche und materielle Ressourcen in Anspruch genommen werden, die für andere Patienten nicht zur Verfügung stehen können. Der zytologische Ansatz für die intraoperative Sicherung des knöchernen Resektionsstatus soll dazu

dienen potentielle Karzinomresiduen im Knochen intraoperativ zu detektieren, so dass eine Nachresektion in derselben operativen Sitzung stattfinden kann. Folglich könnten Zweiteingriff vermindert und Kapazitäten in einer Klinik geschaffen werden.

## 6.2 Methode und Technik

Einen zytologischen Ansatz für die Beurteilung von Zellen im Knochengewebe zu wählen ist eine bewährte Methode in der Hämatologie und Onkologie. Diese Methode, mit modifizierter Probengewinnung auf den Unterkieferknochen anzuwenden, wurde vor mehr als zehn Jahren angetestet und als hoch sensitiv, kostengünstig, zeiteffizient und praktikabel evaluiert. (Mahmood et al, 2001) Jedoch lässt die geringe Patientenzahl und die Studienbedingungen einer Pilotstudie keine Aussage zu, wie sich dieser Ansatz bei einem größeren Patientenkollektiv unter den Bedingungen der klinischen Routinediagnostik bewähren kann. Unter diesen Kriterien müssen verschiedene Aspekte der Methode kritisch beurteilt werden. In dieser Arbeit wurde die zytologische Diagnostik für den Unterkieferknochen klinisch etabliert und erweitert. Durch die Aufreinigung der zellulären Bestandteile von Knochenproben konnte ein größeres Gewebevolumen der zytologischen Beurteilung zugänglich gemacht werden. Durch die Charakterisierung von  $\alpha v \beta 6$  Integrin als Biomarker invasiver Karzinomzellen im Knochengewebe und der erarbeiteten immunfluoreszenz-zytologischen Färbung kann die zytomorphologische Beurteilung an Hand der Malignitätskriterien durch die Proteinexpression ergänzend spezifiziert werden.

### 6.2.1 Kritische Aspekte bei der Erstellung der zytologischen Präparate

Bei einer diagnostischen Methode, die unter den Kriterien der klinischen Routinediagnostik evaluiert wird, müssen verschiedene Aspekte der Methode in Bezug auf Erstellung der zytologischen Präparate kritisch beurteilt werden, um Fehlerquellen bei der Probeentnahme, der Färbung und der zytologischen Beurteilung zu erkennen. Im Folgenden soll dargelegt werden, wie methodische Fehler vermieden werden sollen.

### 6.2.1.1 *Kritische Aspekte bei der Probenentnahme*

Bei der Probenentnahme waren im Rahmen der Studie zwei Vorgehensweisen zu unterscheiden. Erstens, die Probe kann intraoperativ durch den Chirurgen genommen und direkt auf einem Objektträger ausgestrichen werden. Das luftgetrocknete Präparat wird zur weiteren Fixierung, Färbung und Beurteilung in das pathologische Institut übersandt.

Bei der zweiten Vorgehensweise werden die Gewebeproben im pathologischen Institut direkt von den knöchernen Resektionsrändern des Hauptresektats gewonnen, so dass die zytologischen Präparate umgehend nach der Probengewinnung im Schnellschnittlabor erstellt und beurteilt werden können.

Bei der ersten Möglichkeit wird die topologische Zuordnung der entnommenen Proben durch den Chirurgen vorgenommen. Die Erstellung der zytologischen Präparate kann im Anschluss direkt im Operationssaal durchgeführt und die Objektträger in das pathologische Institut überführt werden. Der Nachteil bei diesem Vorgehen ist, dass eine zusätzliche qualifizierte Person für die Probenannahme aus dem sterilen Operationsfeld bereitgestellt werden muss, um die zytologischen Präparate zu erstellen.

Werden die zytologischen Proben im pathologischen Institut direkt vom Hauptresektat entnommen und die zytologischen Präparate im Rahmen der Routine der Schnellschnittdiagnostik erstellt und verarbeitet, sind keine zusätzlichen personellen Kapazitäten gefordert und der operative Ablauf wird nicht unterbrochen. Ein zusätzlicher personeller Aufwand für den Transport der Objektträger in das pathologische Institut entfällt. Bei diesem Verfahren obliegt dem Pathologen die Probeentnahme von den Resektionsrändern des Hauptpräparats. Für die Gewinnung des Zellmaterials vom Resektionsrand hat sich auch die Bürstenbiopsie als praktikabel erwiesen. Die topologische Zuordnung kann problemlos vorgenommen und die zytologischen Untersuchungsergebnisse dem Chirurgen, analog dem Schnellschnittverfahren, mitgeteilt werden. Im Rahmen der Studie hat sich das zweite Verfahren als praktikabel erwiesen und wird für die klinische Routinediagnostik empfohlen.

### 6.2.1.2 *Optimierung der Verarbeitung der Knochenproben*

Für die Evaluierung der zytologischen Diagnostik in der klinischen Routinediagnostik wurden die Knochenproben wie unter 4.4.1 und in Abbildung 2 beschrieben entnommen und verarbeitet. Um ein größeres Gewebavolumen aus dem Bereich des knöchernen Resektionsrandes der zytologischen Beurteilung zuführen zu können und weiterführende Untersuchungen mit immunfluoreszenzzytologischer Darstellung der Karzinomzellen zu ermöglichen, wurde ein Protokoll für die Isolierung und Aufreinigung der zellulären Bestandteile der Knochenproben erarbeitet. (Vergleiche 4.4.3 und Abbildung 3) Dabei wurden Knochenproben des kompakten und spongiösen Knochens, inklusive des Nervus alveolaris inferior, mechanisch zerkleinert und in 1ml PBS suspendiert. Das Suspendat enthielt gelöste zelluläre Anteile, zerkleinertes knöchernes Gewebe und spongiöse Knochenbälkchen. Durch einen Zellfilter wurden die gelösten zellulären Anteile isoliert und das Suspendat durch Zellzentrifugation pelletiert. Der flüssige Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in einem geringen Flüssigkeitsvolumen resuspendiert. Aus dem konzentrierten Zellsuspendat wurden zytologische Ausstrichpräparate erstellt und der zytologischen, immunzytologischen und immunfluoreszenzzytologischen Färbung zugeführt. Durch die Aufreinigung konnten homogene zytologische Ausstriche ohne Überlagerungen von Zellen und Artefakte durch große Spongiosabälkchen erzielt werden.

### 6.2.1.3 *Kritische Aspekte bei der Färbung*

Bei der Färbung der zytologischen Ausstrichpräparate sind nach Evaluierung verschiedener Färbemethoden Unterschiede zu differenzieren. Die Hemacolorfärbung ermöglicht, ähnlich der Pappenheimfärbung, das Zytoplasma gut von den Nuclei zu unterscheiden und lässt eine gute diagnostische Aussage zu. Die Nuclei stellen sich in der Hemacolorfärbung überwiegend rot bis violett dar. Die Färbung beruht auf der molekularen Wechselwirkung zwischen Eosin G und einem Azur B-DNA Komplex, der zur Bildung des Farbstoffs führt. Die zellulären Bestandteile des Knochenmarks lassen sich durch unterschiedliche Intensitäten in der Färbung differenzieren. Das Zytoplasma der Lymphozyten stellt sich

## Diskussion

---

hellgrau, das der Monozyten überwiegend taubenblau dar. Granulozyten differenzieren sich in neutrophile mit hellvioletten Granula, eosinophile mit roten bis braunroten Granula und basophile mit dunkelvioletten bis schwarzen Granula. Thrombozyten stellen sich violett und Erythrozyten rötlich dar. Die Intensität der Färbung ist abhängig vom Verhältnis der Konzentration des Azur B zu Eosin G. Dabei müssen verschiedene Faktoren, die das Färbeverhalten beeinflussen können, berücksichtigt werden. Beeinflussende Faktoren sind zum einen der pH-Wert der Färbelösungen und der Pufferlösung, die Färbezeit und die Fixierung. Um eine standardisierte Beurteilung der zytologischen Präparate umsetzen zu können, müssen eine standardisierte Verarbeitung und Färbungen in diagnostischer Qualität zugrunde gelegt werden.

Neben der Hemacolorfärbung hat sich für die klinische Routinediagnostik die Hämatoxylin-Eosin Färbung bewährt. Hämalaun färbt die sauren, basophilen Nuclei mit DNA und Ribosomen im rauen endoplasmatischen Retikulum blau. Davon lassen sich die azidophilen Zellplasmaproteine durch eine rötliche Färbung abgrenzen.

### 6.2.1.4 *Kritische Aspekte bei der zytologischen Beurteilung*

Bei der zytologischen Beurteilung muss der interdisziplinäre Charakter der Methode betont werden. Die Etablierung eines neuen diagnostischen Ansatzes zur Beantwortung der Frage nach residualem Karzinomgewebe im Knochen setzt die enge Zusammenarbeit zwischen Chirurgen und Pathologen/Zytologen voraus. Die zytologische Beurteilung sollte von einem erfahrenen Zytologen durchgeführt werden. Bei einem positiven Befund müssen die Malignitätskriterien eindeutig erkennbar und epitheliale Zellen von mesenchymalen gut zu differenzieren sein. Störfaktoren bei der Beurteilung sind zum einen eine zu dicke Zellschicht, die eine fokussierte Beurteilung der Kernmorphologie behindern kann. Zum anderen könne Erythrozyten im Ausstrich störend bei der Detektion kleiner Karzinomzellnester oder einzelner Karzinomzellen sein und die Beurteilung erschweren oder unmöglich machen. In dieser Studie waren 10 von 174 zytologischen Präparaten von einer Qualität, die eine diagnostische Aussage einschränkten und nicht verwendet wurden. Die Verbesserung der Qualität der zytologischen Präparate kann durch Optimierung des Zellmaterials, wie unter

## Diskussion

---

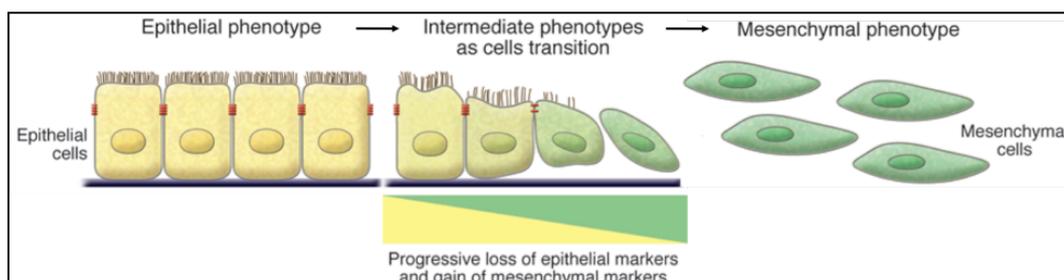
4.4.3 und 6.2.1.2 beschrieben, erreicht werden. Zusätzlich kann neben den zellmorphologischen Beurteilungskriterien eine Markierung von Zellen epithelialen Ursprungs die Detektion von Plattenepithelzellen im Ausstrichpräparat erleichtern. Ein Biomarker, der epitheliale Zellen markiert, die sich durch ein spezifisches Proteinexpressionsprofil auszeichnen, kann ergänzende Hilfestellung bei der zytologischen Beurteilung leisten.

Die zugrundeliegenden Überlegungen und die molekularbiologischen Grundlagen zur Identifikation eines geeigneten Biomarkers für knocheninfiltrierende Karzinomzellen sollen im Folgenden erörtert werden.

### 6.2.2 EMT-Markerproteine: Biomarker für invasive Karzinomzellen?

Ein Biomarker soll dazu dienen eine physiologische oder pathologische Situation spezifisch durch eine detektierbare Charakteristik, z.B. Expression von Proteinen oder Nukleinsäuren, darzustellen.

Der erste und bedeutendste Schritt des infiltrativen Karzinomwachstums ist die lokale Invasion durch die Basalmembran, der Veränderungen der Zell-Zell und der Zell-Stroma Interaktion voraussetzt. In diesem Zusammenhang kommt es zu einer Remodellierung der extrazellulären Matrix, einer Veränderung des Zytoskeletts und einer Zunahme der Zellmotilität. Nicht alle Zellen eines Karzinoms sind durch diese Kriterien gekennzeichnet. Jedoch wird bei Karzinomzellen der Invasionsfront der Verlust des epithelialen und der Zugewinn eines dedifferenzierten, mesenchymalen Phänotyps postuliert, der starke Parallelen mit der ektodermalen-mesenchymalen Transition (EMT) der Embryonalentwicklung aufweist.



### **Abbildung 24: Funktionelle und morphologische Veränderungen epithelialer Zellen bei der EMT**

Bei der EMT durchlaufen epitheliale Zellen funktionelle und morphologische Veränderungen und transformieren zu mobilen mesenchymalen Zellen. Dabei werden epitheliale Markerproteine reduziert und mesenchymale Markerproteine exprimiert. Die Co-Expression epithelialer und mesenchymaler Markerproteine impliziert, dass diese Zellen teilweise eine EMT durchlaufen haben. Angepasst von (Kalluri & Weinberg, 2009).

Interessanterweise sind die molekularen Mechanismus der EMT im Rahmen der Embryonalentwicklung konserviert und bei der Wundheilung, sowie bei der Karzinogenese mit der Expression derselben Faktoren, i.e. Morphogene, Adhäsionsproteine, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Strukturproteine und Zellzyklusproteine, assoziiert. Die molekularbiologischen Parallelen implizieren, dass, ähnlich der embryonalen mesenchymalen Zellen, die Karzinomzellen mobil und an der Tumorinvasionsfront lokalisiert sind. (Arima et al, 2008)

Das EMT-Programm setzt sich aus mehreren koordinierten Prozessen zusammen. Diese beinhalten den Verlust der interzellulären Kohäsion, das Auflösen und Verändern der extrazellulären Matrix, die Modifikation des Zytoskeletts mit gesteigerter zellulärer Motilität und Invasionsfähigkeit der Zellen.

#### *6.2.2.1 Aspekte der Tumorbilogie: Induktion und Mechanismen der EMT*

Die EMT ist ein biologischer Prozess bei dem polarisierte, epitheliale Zellen biochemische Veränderungen durchlaufen und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Nach Robert A. Weinberg lässt sich die EMT in drei Subtypen klassifizieren. (Kalluri & Weinberg, 2009)

Typ3 wird bei der Karzinogenese beschrieben und ist durch eine gesteigerte Migrationsfähigkeit, Invasivität und erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber Apoptose/Anoikis gekennzeichnet. Bei der EMT wird die Basalmembran degradiert, Zellen nehmen einen mesenchymalen Phänotyp an und lösen sich aus dem epithelialen Zellverband, so dass sie in die Peripherie migrieren können. Vergleiche Abbildung 24.

Den ersten Schritt zu einem invasiven Wachstum setzt die Auflockerung der interzellulären Zell-Zellkontakte voraus. Bei epithelialen Zellen ist das

## Diskussion

---

transmembrane Glykoprotein der Typ I Cadherin Superfamilie (E-Cadherin) das wichtigste Adhäsionsmolekül. Siehe rote Markierung in Abbildung 24. Der extrazelluläre Anteil des Proteins interagiert mit den Cadherin Dimeren anderer Zellen. Der intrazelluläre Teil von E-Cadherin ist mit einem Proteinkomplex verbunden, der aus beta-, alpha- und p120-Catenine besteht und mit den intrazellulären Aktinfilamenten interagiert. Dies führt zu einem Signaltransduktionsweg, der zwischen Zellkontakt, Regulation des Zytoskeletts und der Zellform vermittelt und so für den Zusammenhalt und für die Immobilität epithelialer Zellen grundlegend ist. (Birchmeier & Behrens, 1994; Conacci-Sorrell et al, 2002; Miyoshi & Takai, 2008; Niessen & Gottardi, 2008)

Darüber hinaus ist E-Cadherin durch die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin ein wichtiges Signalprotein der EMT. Sowohl bei der EMT, als auch bei der Karzinogenese wird einer veränderten Expression des Cadherin/Catenin Proteinkomplexes eine maßgebliche Rolle bei der gestörten Zelladhäsion zugeschrieben. Vereinbar mit dem Auflösen der zellulären Adhäsion, als Voraussetzung einer Zellmigration, ist sowohl bei Zellen der EMT als auch bei Krebszellen eine Reduktion der E-Cadherin und Catenin Expression beschrieben worden. (Hajra & Fearon, 2002) Folglich wurde E-Cadherin im Kontext der Karzinogenese eine Schlüsselrolle bei der Induktion der EMT zugewiesen. (Hajra & Fearon, 2002)

Obwohl gezeigt werden konnte, dass eine Störung der Zell-Zell Kontakte alleine keine ausreichende Kondition darstellt, um eine Metastasierung zu induzieren, ist gesichert, dass der Verlust von E-Cadherin die EMT induziert und der Invasivität und Resistenz gegenüber Anoikis der Karzinomzellen Vorschub leistet. (Auersperg et al, 1999; Burdsal et al, 1993; Onder et al, 2008) Eine Resistenz gegen Anoikis hat eine vermehrte Metastasierung zur Folge, da die Karzinomzellen leichter in benachbartes Gewebe einwandern und sich über Lymph-, oder Blutgefäße ausbreiten können. Vereinbar mit einem höheren metastatischen Potential zeigen auch Zellen, die unter physiologischen Bedingungen während der Embryonalentwicklung die EMT durchlaufen, eine Resistenz gegen Anoikis.

Vor dem Hintergrund einer verminderten Expression von E-Cadherin als Schlüsselmechanismus für die Ausbreitung von Karzinomzellen, konnte der Verlust der E-Cadherin Expression mit einer schlechten Prognose, mit Progression der Erkrankung und Metastasierung bei verschiedenen

## Diskussion

---

Tumorentitäten assoziiert werden. (Birchmeier & Behrens, 1994; Dorudi et al, 1993; Kowalski et al, 2003; Sanders et al, 1999) Wichtige Faktoren, welche die Expression von E-Cadherin regulieren, sind transkriptionelle Repressorproteine, die mit der Karzinomprogression, der Invasion und der EMT assoziiert sind. (Cano et al, 2000; Franz et al, 2009; Onder et al, 2008; Peinado et al, 2007; Peinado et al, 2004b; Yokoyama et al, 2003)

Zu den ersten Repressoren, die identifiziert wurden, zählen die Zink-Finger Proteine SNAI1 (SNAIL), SNAI2 (SLUG) und die Smad-interagierenden Proteine ZEB1 (deltaEF1/ZFHX1A) und ZEB2 (SIP1/ZFHX1B). (Comijn et al, 2001; Batlle et al, 2000; Cano et al, 2000; Guaita et al, 2002; Yokoyama et al, 2001; Bolos et al, 2003; Comijn et al, 2001; Grootelclaes & Frisch, 2000) Diese Repressorproteine können das E-pal Element des E-Cadherin Promotors binden. Weitere wichtige Repressoren sind der „*basic helix-loop-helix*“ Transkriptionsfaktor E12/E47 (TCF3) und Twist. (Gasparotto et al, 2011; Onder et al, 2008; Perez-Moreno et al, 2001; Yang et al, 2004) Diese Proteine reprimieren die Transkription indem sie Co-Repressoren, wie CtBP (*c-terminal binding protein*), Repressorkomplexe, wie PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) oder Histone-Deacetylase Komplexe, wie Sin3A/HDAC1/HDAC2 rekrutieren. (Postigo & Dean, 1999; Postigo et al, 2003; Herranz et al, 2008; Aghdassi et al, 2011; Peinado et al, 2004a)

Die Aktivität der E-Cadherin Repressoren wird durch zentrale Signaltransduktionskaskaden und Signaltransduktionswege, die mit der EMT assoziiert sind, vermittelt. Dazu zählen der TGF- $\beta$  Signalweg,  $\beta$ -Catenin und der Wnt Signalweg. (Auersperg et al, 1999; Comijn et al, 2001; Hills et al, 2012; Conacci-Sorrell et al, 2003; Iwai et al, 2010; Peinado et al, 2007; Yook et al, 2005)

Die Signaltransduktion von E-Cadherin wird vor allem durch die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin vermittelt, das sowohl als Cadherin gebundene Form, als auch in freier Form vorliegt. (Hajra & Fearon, 2002) Im Zytosol wird  $\beta$ -Catenin in einem Proteinkomplex aus APC, Axin und GSK3-beta Kinase phosphoryliert und im Ubiquitin-Proteasom System degradiert. (Peifer & Polakis, 2000) Das Wnt Signal verhindert diese Kaskade durch Phosphorylierung von GSK3-beta, so dass  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma akkumuliert und in den Nucleus transloziert wird. (Papkoff et al, 1996) Im Nucleus funktioniert  $\beta$ -Catenin als Co-Faktor für die Transkriptionsfaktoren Tcf/Lef (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*). (Behrens

## Diskussion

---

et al, 1996; Bienz & Clevers, 2000; Huber et al, 1996; Polakis, 2000) Bei Plattenepithelkarzinomzellen führt die zytoplasmatische Akkumulation von  $\beta$ -Catenin zur Steigerung der transkriptionellen Aktivität via Tcf/Lef, gefolgt von einer Überexpression von MMP-7 und der Induktion der EMT. Dies führt zur einer gesteigerten Invasion und Migration der oralen Plattenepithelkarzinomzellen. (Iwai et al, 2010)

Neben der verminderten Expression von E-Cadherin wird auch die Aktivität anderer Adhäsionsproteine während der EMT stark modifiziert. Im Gegensatz zur interzellulären Interaktion epithelialer Zellen, basieren Adhäsionsproteine für die Interaktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) hauptsächlich auf heterodimeren transmembranen Proteinen der Integrin Familie. Die Proteinfamilie der Integrine besteht aus 24 Mitgliedern, die in Abhängigkeit des jeweiligen zellulären Kontexts, unterschiedliche Funktionen ausüben. Infolgedessen ist die Expression der Integrine Zelltyp spezifisch und vom extrazellulären Kontext abhängig. (Hynes, 2002) Integrine vermitteln eine transmembrane Signaltransduktion und stellen so eine Kommunikation zwischen der ECM und dem Aktingerüst des Zytoskeletts her. Die Expression einiger Integrine ist spezifisch mit der EMT assoziiert. (Bates et al, 2005; Maschler et al, 2005) Durch die Bindung an die ECM kommt es zu einer Aggregation der Integrinmoleküle an der Zellmembran und so zu einer Verstärkung der Interaktion des zytoplasmatischen Anteils der Integrine und der zellulären Faktoren. Dadurch entstehen Multiproteinkomplexe mit fokalen Adhäsionen, durch die die ECM mit dem Zytoskelett verbunden ist. Diese fokalen Adhäsionskomplexe sind mit dem Aktinnetzwerk der Lamellipodien, sowie der Filopodien verbunden und vermitteln wichtige Signale für die Zellmigration. Neben einer mechanischen interzellulären Verbindung vermitteln die Adhäsionskomplexe somit die Regulation der Bindung an die ECM, die intrazelluläre Signaltransduktion und bilden die Kommunikationspunkte zwischen der ECM und dem Aktinzytoskelett. (Huveneers et al, 2007)

Neben ihrer Funktion bei der Zellmigration üben Zell-Matrix Adhäsionskomplexe der Integrine durch ihre extra-/intrazelluläre Signaltransduktion Einfluss auf praktisch alle höheren Zellfunktionen, wie Zellüberleben, Zelldifferenzierung und Proliferation aus. (Lock et al, 2008) Zellen wachsen und teilen sich nur, wenn sie in Kontakt zu einer physiologischen Verbindung stehen. Bei einer Störung der

Interaktion zwischen Epithelzellen und der ECM wird ein programmierter Zelltod, i.e. Anoikis, induziert. (Frisch & Francis, 1994) Durch Veränderung der Expression von Oberflächenproteinen, wie Integrine, können Zellen den Kontakt zur ECM wieder herstellen und somit eine Resistenz gegen Anoikis aufbauen. Bei Plattenepithelkarzinomzellen ist ein dynamischer Wechsel der Integrin-Konfiguration, ein sogenannter *Integrin-Switch*, mit einem Überlebensvorteil verbunden. (Abbildung 1)

So können sich Karzinomzellen durch eine verminderte Expression des  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$  Integrins und einer konsekutiven Überexpression von  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrin vor einer Anoikis schützen, indem dieser *Integrin-Switch* zu einer Aktivierung des Akt Signalweges führt. (Janes & Watt, 2004)

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Expression von E-Cadherin verwendet um Zellen epithelialer Herkunft von mesenchymalen Zellen zu differenzieren. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Plattenepithelkarzinomzellen, die in Knochengewebe infiltrieren, durch eine hohe Expression des  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  Integrins gekennzeichnet sind. Diese Beobachtung ist mit der dargestellten tumorbiologischen Funktion eines *Integrin-Switches* vereinbar, der den infiltrierenden Karzinomzellen einen Überlebensvorteil im umgebenden mesenchymalen Knochengewebe bietet. Vergleiche Abbildung 1 und 12-23.

### 6.2.2.2 *EMT-Markerproteine: Biomarker für klinische Applikationen?*

Trotz starker Argumente für den Prozess der EMT bei maligner Entartung von Zellen, gibt es kritische Stimmen, welche die Theorie vertreten, dass das biologische Repertoire normaler und maligner Zellen für den Prozess der Karzinogenese ausreicht und Zellen nicht einer EMT bedürfen. (Garber, 2008; Tarin et al, 2005) Die Gründe dafür, ob dies einem überproportionalen Einsatz an spezifischen, mesenchymalen Markern oder zu geringen klinischen Beweisen, aufgrund mangelnder Methodik oder eines mangelndem Bewusstsein geschuldet ist, sind noch nicht geklärt. Tatsache ist, dass eine EMT nicht bei allen Malignomen beobachtet worden ist und scheint auch nicht bedingend für eine Metastasierung zu sein. Folglich ist eine Metastasierung mit schlechter Prognose nicht immer mit der Expression gängiger EMT-Markerproteine assoziiert.

## Diskussion

---

Als Konsequenz einer Metastasierung aufgrund einer vollständigen EMT, die nicht nur auf ein verändertes Proteinexpressionsprofil beschränkt ist, müsste eine histologische Heterogenität der Metastasen mit mesenchymalem Phänotyp im Vergleich zum Primärtumor zu erwarten sein. Diesen Beweis sind Befürworter der EMT-Hypothese bisher schuldig geblieben. Weitere Hindernisse in der Beurteilung der EMT ist der Mangel an geeigneten Markern und die zeitliche und räumliche Heterogenität der EMT, so dass zu einem Zeitpunkt der Beurteilung meist die Expression einzelner, aber nicht aller EMT-Marker beobachtet werden kann.

Obwohl die histopathologische Beurteilung eine bewährte Methode in der klinische Routinediagnostik darstellt, ist es schwierig das metastatische Potential eines Karzinoms zu beurteilen, da Zellen mit invasivem und metastatischem Potential nur eine Subpopulation des Primärtumors repräsentieren. (Scheel et al, 2007) Die invasive Front eines soliden Tumors ist durch individuelle Zellen charakterisiert, die von der primären Tumormasse gelöst, weniger kohäsiv und geringer differenziert sind und in dichter Beziehung mit dem umgebenden Stroma stehen. (Guarino et al, 2007) Vergleiche Abbildungen 12-18.

Vereinbar mit der Beschreibung der  $\alpha v \beta 6$  Integrin Expression in der vorliegenden Arbeit wurde die lokalisierte Expression von EMT-Markerproteinen im Bereich der invasiven Front bei Tumoren beschrieben. Diese Beobachtungen argumentieren für die Hypothese, dass die EMT ein Mechanismus ist, der für die Ausbreitung von Karzinomzellen wichtig ist. (Franci et al, 2006; Huang & Du, 2008; Thiery, 2002)

Darüber hinaus konnten einzelne Karzinomzellnester, die im Bereich der Invasionsfront beobachtet wurden, positiv mit einer Metastasierung und einer EMT korreliert werden und sind bei mehreren Tumorentitäten von prognostischer Signifikanz. (Nakamura et al, 2005; Takasaki et al, 1998; Ueno et al, 2002; Wang et al, 2011; Zlobec & Lugli, 2010) Das Auftreten von Tumorzellnestern, auch als Tumorknospung oder „*tumor budding*“ beschrieben, ist durch eine verminderte Expression von E-Cadherin, einer nukleären Lokalisation und Aktivierung von  $\beta$ -Catenin und durch Charakteristika von Tumorstammzellen gekennzeichnet. (Brabletz et al, 2005; Masaki et al, 2001)

Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass epitheliale Zellen auch ohne einen mesenchymalen Charakter anzunehmen, migrieren können. Die Beobachtung ist

## Diskussion

---

durch eine kollektive Zellmigration zu erklären, die auf starke Zell-Zell Interaktionen beruht, so dass Zelleinheiten entlang einer veränderten ECM migrieren können. (Friedl et al, 2004; Friedl & Wolf, 2003) Eine kollektive Migration impliziert eine organisierte interzelluläre Architektur und funktionelle Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen einer migrierenden Zelleinheit. Um unterschiedlichen Ansprüchen in einem funktionellen Zellverband gerecht werden zu können, müssen diese Zellen einen höheren Differenzierungsgrad aufweisen. Zusätzlich könnten sich verschiedene Arten der Zellmigration abwechseln, die in Abhängigkeit der ECM und abhängig von genetischen Unterschieden vorkommen können. (Friedl, 2004; Hegerfeldt et al, 2002)

Unterschiedliche Mechanismen der Zellinvasion und Migration wurden bei mehreren Karzinomen mit metastatischem Potential beschrieben, die aber nicht immer mit einer verminderten E-Cadherin Expression assoziiert sind. Beispielsweise ist beim infiltrativen lobulären Mamakarzinom die verminderte E-Cadherin Expression unabhängig vom klinischen Verlauf. Im Gegensatz dazu ist beim invasiven, nicht lobulären Mamakarzinom mit N0-Status eine verminderte E-Cadherin Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert. (Heimann et al, 2000) Als Erklärung dieser heterogenen Daten kann dienen, dass einige Karzinomzellen beim metastatischen Prozess eher einen epithelialen als einen mesenchymalen Charakter aufweisen.

Zusammenfassend kann man folgern, dass es wahrscheinlich ist, dass bei invasiven und metastasierenden Malignomen nicht alle Karzinomzellen eine vollständige EMT durchlaufen müssen. Dies impliziert, dass sowohl eine modulierte Verminderung der E-Cadherin Expression, als auch eine veränderte Expression im Primärtumor von klinischer Signifikanz sein kann. (Huber et al, 2011; Nijkamp et al, 2011) Als zusätzliches Beurteilungskriterium kann eine Veränderung der Moleküle, z.B. Integrine, für die Interaktion zwischen den Karzinomzellen und der ECM grundlegend sein, um den Mechanismus der EMT zu identifizieren und sich die Expression EMT-assoziiierter Markerproteine diagnostisch nutzbar zu machen. (Kimura et al, 2011; Nemeth et al, 2003)

Studien, die den Prozess der EMT und EMT-spezifische Faktoren untersuchen, können dazu beitragen, den Mechanismus der Metastasierung besser zu verstehen. Die Identifizierung von EMT-Markerproteinen in Karzinomproben kann eine Hilfestellung für eine bessere Diagnostik, für Prognoseabschätzungen und

## Diskussion

Therapiestrategien bieten. Einschränkend muss erwähnt werden, dass, basierend auf solchen Entscheidungskriterien, eine objektive Beurteilung schwierig für eine klinische Routinediagnostik ist. Je mehr Karzinomzellen einen mesenchymalen Phänotyp annehmen, desto schwieriger sind sie mit konventionellen histologischen Methoden von Zellen des Tumorstromas, i.e. Fibroblasten oder Myofibroblasten, zu differenzieren. Eine weitere Einschränkung ist, dass Zellen die eine EMT durchlaufen nur einen kleinen repräsentativen Teil des Primärtumors darstellen, der räumlich auf den Bereich der Karzinominvasion und auf invasive, infiltrierende Karzinomzellen beschränkt sein kann. Diese Einschränkungen vorausgesetzt, konnten mehrere Proteine, die eine EMT implizieren, identifiziert werden und mit deren Hilfe Karzinomzellen im Bereich der invasiven Front speziell markiert werden. Deren Expression konnte mit Karzinominvasion und Metastasierung positiv korreliert werden. Diese Proteine können für klinische Proben als EMT-Marker in Betracht gezogen werden, um einer Prognoseabschätzung hinsichtlich Progression und Metastasierung zu dienen. Die folgende Tabelle 7 stellt exemplarisch eine Zusammenfassung der klinisch relevanten EMT-Marker dar.

**Tabelle 7: EMT-Markerproteine für klinische Applikationen**

<b>MESENCHYMALE MARKER</b>					
	<b>Expression während der EMT</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Einschränkungen</b>	<b>Literatur</b>
Vimentin	↑	hauptsächlich zytoplasmatisch	mesenchymales Intermediärfilament	auch exprimiert in aktivierten Fibroblasten, Endothelzellen, gl. Muskelzellen, Leukozyten	(Ngan et al, 2007)
FSP1/S100A4	↑	Nucleus und/oder Zytoplasma	Fibroblasten Ca <sup>2+</sup> bindendes Protein	teilweise Markierung der ECM	(Strutz et al, 1995), (Iwano et al, 2002)
MMPs	↑	Zytoplasma und/oder ECM	Matrixmetalloproteinasen, Zink-abhängige Endopeptidase		(Masaki et al, 2001), (Impola et al, 2004)
SNAIL (SNAI1)	↑	Nucleus	Snail homolog 1 (Drosophila); Zink Finger Transkription Repressor		(Franci et al, 2006; Usami et al, 2008), (Roy et al, 2005)
SLUG (SNAI2)	↑	Nucleus	Snail homolog 2 (Drosophila); Zink Finger Transkription Repressor		(Hotz et al, 2007; Uchikado et al, 2005), (Shiomi et al, 2006)
EF1/ZEB1	↑	Nucleus	Zink Finger E-box		(Rosivatz

## Diskussion

			bindend Homeobox 1	et al, 2002)
Twist	↑	Nucleus	hochreguliert in mesenchymalen Zellen	(Hotz et al, 2007; Mironchik et al, 2005)
N-Cadherin	↑	Zellmembran, Zytoplasma und/oder ECM	Type-1 transmembranes Protein	(Hotz et al, 2007)
Fibronectin	↑	ECM	hochmolekulares extrazelluläres Matrix Glykoprotein	(Gonzalez et al, 1999)
Integrine: $\alpha v\beta 6$ ; $\alpha 5\beta 1$	↑	Zellmembran	Membranrezeptor	(Sawada et al, 2008), (Yang et al, 2008)
<b>EPITHELIALE MARKER</b>				
E-Cadherin	↓	Zellmembran	Typ-1 transmembranes Glycoprotein	Proteinexpression während der EMT reduziert, mesenchymale Tumorzellen werden nicht markiert (El-Bahrawy et al, 2002)
Desmoplakin	↓	Zellmembran	Protein mit Desmosomen assoziiert	(Shinohara et al, 1998)
Zytokeratin	↓	Zytoplasma	Intermediärfilament des intrazytoplasmatischen Zytoskeletts	(Putz et al, 1999), (Franzen et al, 1996)
cdx-2	↓	Nucleus	Homeobox Transkriptionsfaktor 2	(Brabletz et al, 2004; Resnick et al, 2005)
ZO-1	↓	Zellmembran und Zytoplasma, diffus zytoplasmatisch und/oder nukleär in migrierenden Zellen	Zona occludens 1 in interzellulären „tight junctions“	(Resnick et al, 2005)
Claudin 1	↓	Zellmembran	Mitglied der Claudin Proteinfamilie in „tight junctions“	(Resnick et al, 2005)
<b>ANDERE</b>				
Beta-Catenin	⇔	Fibroblasten: Zytoplasma u/o Zellmembran; Epithelzellen: Zellmembran; mesenchymale Zellen nach EMT: meist nucleär	Untereinheit des Cadherin Protein Komplexes, Mitglied der Armadillo Proteinfamilie	diffuse Markierung, keine eindeutige Lokalisation in verschiedenen Zellkompartimenten (Brabletz et al, 2001)
Laminin-5 (alpha 3, beta 3, gamma 2)	⇔	Basalmembran und/oder Zytoplasma Akkumulation	Basalmembran Glykoprotein. Modifikationen in der Expression unterschiedlicher Isoformen in invasiven Krebszellen; gamma 2 meist überexprimiert	Modifikationen der Expression; die Lokalisation kann gewebespezifisch sein (Yamamoto et al, 2001), (Sordat et al, 2000), (Sordat et al, 1998)
Ki-67	⇔	Nucleus	Zellproliferationsmarker: Epitheliale Zellen zeichnen sich im Gegensatz zu mesenchymalen Zellen durch eine hohe Proliferationsrate aus	gering proliferierende Tumorzellen sind ggf. schwierig von physiologischen Zellen abzugrenzen (Rubio, 2008), (Ceccarelli et al, 2005), (Brabletz et al, 2001)

## Diskussion

---

Um die morphologische Beurteilung der Knochenzytologien durch eine immunzytologische Markierung der Karzinomzellen zu ergänzen haben wir EMT-Markerproteine untersucht, die es ermöglichen epitheliale Zellen von mesenchymalen Zellen zu differenzieren. E-cadherin ist unter physiologischen Bedingungen nicht im Knochengewebe exprimiert, so dass der immunologische Nachweis des Proteins Hinweis auf Zellen epithelialen Ursprungs liefert.

Als zweiter immunologischer EMT-Marker bietet  $\alpha v \beta 6$  Integrin die Möglichkeit Zellen epithelialen Ursprungs zu markieren, die infiltrativ im Gewebe migrieren. Die Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin ist für die Zell-Matrix Kommunikation, einer konsekutiven Inhibition der Anoikis und der autokatalytischen Aktivierung des TGF- $\beta$  Signals voraussetzend. (Munger et al, 1999; Niu et al, 2001; Thomas et al, 2001a; Thomas et al, 2001b) Dieser Arbeit wurde die Arbeitshypothese zugrunde gelegt, dass nicht nur Karzinomzellen der Invasionsfront, sondern auch Karzinomzellen, die invasiv in mesenchymales Knochengewebe einwachsen und infiltrativ im Knochenmark proliferieren und migrieren, durch die Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin zu charakterisieren sind. Konsekutiv könnten Karzinomzellen im Knochenmark mit Hilfe der  $\alpha v \beta 6$  Proteinexpression markiert und dadurch von mesenchymalen Knochenmarkzellen differenziert werden. Die Bestätigung dieser Hypothese ist Gegenstand der Arbeit. Siehe Abbildungen 12-23.

Im Folgenden soll die klinische Applikation dieser Biomarker für eine immunzytologische Diagnostik diskutiert werden.

### 6.2.2.3 *EMT-Marker als Biomarker für eine immunzytologische Diagnostik*

Die zytomorphologische Beurteilung kann, basierend auf den Malignitätskriterien, gesunde von malignen Zellen differenzieren. Eine zusätzliche immunzytologische Färbung ist keine zwingende Notwendigkeit um Karzinomzellen von Knochenmarkzellen zu unterscheiden. Es kann jedoch schwierig sein bei zellreichen Präparaten kleine Karzinomzellnester oder vereinzelt Karzinomzellen auf dem Objektträger zu detektieren. Ein Lösungsansatz kann die Integration verschiedener Informationsquellen bieten. Als wichtigstes Beurteilungskriterium gelten die zytomorphologischen Malignitätskriterien. In einer Fluoreszenzzytologie können durch eine DAPI Färbung die DNA Moleküle im Zellkern markieren und der Nucleus in seiner Größe, seiner Färbeintensität

und die Anzahl der Nukleoli dargestellt werden. Zusätzliche Informationen kann die Proteinexpression liefern, um eine Differenzierung zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen vorzunehmen, so dass Zellen epithelialen Ursprungs von mesenchymalen abgegrenzt werden können. Diese Abgrenzung kann dazu dienen, Blasten im Knochenmark von Karzinomzellen leichter zu unterscheiden. Zellen, die durch die Expression von E-Cadherin markiert werden, können einem epithelialen Ursprungsgewebe zugeordnet werden. In dieser Arbeit konnte die spezifische und membranständige Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin bei Karzinomzellen im Knochenmark gezeigt werden. Epitheliale Zellen, die im Rahmen der EMT E-Cadherin herunterregulieren und sich durch eine Dedifferenzierung genotypisch vom Ursprungsgewebe entfernen, können durch die Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin im Knochenmark dargestellt werden. Eine verminderte Expression von E-Cadherin als Indikator des Dedifferenzierungsgrades kann, z.B. durch eine Korrelationsanalyse der Expression von  $\alpha v \beta 6$  Integrin und E-Cadherin, wie unter 5.2.2.2 und Abbildung 21 beschrieben, für ein Grading invasiver Karzinomzellen herangezogen werden.

Durch die Expression der membranständigen Integrin Expression lässt sich die Zellmembran darstellen, so dass in Kombination mit der DAPI Färbung des Nucleus das Malignitätskriterium einer veränderten Relation zwischen der Größe des Nucleus und des Zytoplasmasaums beurteilt werden kann.

### **6.3 Ausblick**

#### **6.3.1 Evaluierung der intraoperativen zytologischen Diagnostik der knöchernen Resektionsränder**

Im Rahmend der klinischen Routinediagnostik ist die Methode als fester Bestandteil des chirurgischen Verfahrens eingeführt und wurde basierend auf dieser Arbeit in einer Validierungscohorte als Standarddiagnostik reevaluiert. (Nieberler et al, 2014) In definierten Zeitabschnitten soll zukünftig evaluiert werden, welche Konsequenzen sich durch die Etablierung dieses zusätzlichen diagnostischen Verfahrens hinsichtlich folgender Fragestellung ergeben haben.

### 6.3.1.1 *Bedeutung der intraoperativen Knochenzytologie für den Patienten*

1. Konnte die Anzahl der knöchernen R1-Resektionen mit konsekutiven Zweiteingriffen für Patienten reduziert oder verhindert werden?
2. Konnte die Rezidivrate bei Patienten mit knöcherner Infiltration reduziert und das rezidivfreie Überleben, sowie das Gesamtüberleben gesteigert werden?
3. Konnte bei Patienten, die nach intraoperativer Sicherung der knöchernen Resektionsränder einer primären Rekonstruktion zugeführt wurden, eine Senkung der Morbidität, der Erhalt der Kau-, Schluck-, und Sprechfunktion und eine soziale Rehabilitation erzielt werden?

### 6.3.1.2 *Bedeutung der intraoperativen Knochenzytologie für die Klinik*

1. Konnte die Anzahl der Zweiteingriffe aufgrund einer knöchernen R1-Resektion insgesamt reduziert werden?
2. Konnte dadurch eine effizienzorientierte Behandlung mit Einsparung beschränkter Ressourcen, i.e. Operationssäle, Operationszeit, Kosten für Materiellen und Liegezeit, erzielt werden.

### 6.3.1.3 *Evaluierung der immunfluoreszenzzytologischen Markierung invasiver Karzinomzellen*

1. Konnte die Sensitivität und Spezifität der zytologischen Beurteilung in der klinischen Routinediagnostik durch Applikation der immunfluoreszenzzytologischen Markierung der Karzinomzellen gesteigert werden?
2. Ergeben sich durch eine potentielle Verbesserung der Diagnostik durch eine ergänzende, immunfluoreszenzzytologische Markierung der Karzinomzellen neue Erkenntnisse in Bezug auf die oben genannten Fragestellungen?

## 7 Literaturverzeichnis

Bourhis J, Amand C, Pignon JP. Update of MACH-NC (Meta-Analysis of Chemotherapy in Head and Neck Cancer) database focused on concomitant chemoradiotherapy: 5505. *J Clin Oncol* 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition) 2004;22(14S (July 15 Supplement)).

(1998) Results of a prospective trial on elective modified radical classical versus supraomohyoid neck dissection in the management of oral squamous carcinoma. Brazilian Head and Neck Cancer Study Group. *Am J Surg* **176**(5): 422-427

(London: Royal College of Surgeons of England. 1994) Department of Dental Services. Screening for oral cancer.

(Saarbrücken 2006) Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut: 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe.

Abler A, Roser M, Weingart D (2005) [On the indications for and morbidity of segmental resection of the mandible for squamous cell carcinoma in the lower oral cavity]. *Mund Kiefer Gesichtschir* **9**(3): 137-142

Aghdassi A, Sendler M, Guenther A, Mayerle J, Behn CO, Heidecke CD, Friess H, Buchler M, Evert M, Lerch MM, Weiss FU (2011) Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. *Gut*

Agrez M, Chen A, Cone RI, Pytela R, Sheppard D (1994) The alpha v beta 6 integrin promotes proliferation of colon carcinoma cells through a unique region of the beta 6 cytoplasmic domain. *J Cell Biol* **127**(2): 547-556

Agrez MV (1996) Cell adhesion molecules and colon cancer. *Aust N Z J Surg* **66**(12): 791-798

Akhtar S, Ikram M, Ghaffar S (2007) Neck involvement in early carcinoma of tongue. Is elective neck dissection warranted? *JPMA J Pak Med Assoc* **57**(6): 305-307

Andrle J, Schartinger VH, Schwentner I, Deibl M, Sprinzl GM (2009) Initial staging examinations for head and neck squamous cell carcinoma: are they appropriate? *J Laryngol Otol* **123**(8): 885-888

Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang H-Z, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L (2002) Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* **62**(12499279): 7350-7356

Ang KK, Trotti A, Brown BW, Garden AS, Foote RL, Morrison WH, Geara FB, Klotch DW, Goepfert H, Peters LJ (2001) Randomized trial addressing risk features and time factors of surgery plus radiotherapy in advanced head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **51**(3): 571-578

Anzai Y (2004) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: nodal metastases and beyond. *Top Magn Reson Imaging* **15**(2): 103-111

## Literaturverzeichnis

---

Anzai Y, Carroll WR, Quint DJ, Bradford CR, Minoshima S, Wolf GT, Wahl RL (1996) Recurrence of head and neck cancer after surgery or irradiation: prospective comparison of 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose PET and MR imaging diagnoses. *Radiology* **200**(1): 135-141

Argiris A, Gibson MK, Heron DE, Smith RP, Ferris RL, Lai SY, Kim SW, Brandsteter BF, Johnson JT, Grandis JR (2008) Phase II trial of neoadjuvant docetaxel (T), cisplatin (P), and cetuximab (E) followed by concurrent radiation (X), P, and E in locally advanced head and neck cancer (HNC). In *ASCO Annual Meeting Proceedings*.

Argiris A, Heron DE, Smith RP, Kim S, Gibson MK, Lai SY, Brandstetter BF, Posluszny DM, Wang L, Seethala RR, Dacic S, Gooding W, Grandis JR, Johnson JT, Ferris RL (2010) Induction docetaxel, cisplatin, and cetuximab followed by concurrent radiotherapy, cisplatin, and cetuximab and maintenance cetuximab in patients with locally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* **28**(36): 5294-5300

Arihiro K, Kaneko M, Fujii S, Inai K, Yokosaki Y (2000) Significance of alpha 9 beta 1 and alpha v beta 6 integrin expression in breast carcinoma. *Breast Cancer* **7**(1): 19-26

Arima Y, Inoue Y, Shibata T, Hayashi H, Nagano O, Saya H, Taya Y (2008) Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristic of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res* **68**(13): 5104-5112

Arunachalam PS, Putnam G, Jennings P, Messersmith R, Robson AK (2002) Role of computerized tomography (CT) scan of the chest in patients with newly diagnosed head and neck cancers. *Clin Otolaryngol Allied Sci* **27**(12383307): 409-411

Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, Maines-Bandiera S, Somasiri A, Roskelley CD (1999) E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11): 6249-6254

Awwad HK, Lotayef M, Shouman T, Begg AC, Wilson G, Bentzen SM, Abd El-Moneim H, Eissa S (2002) Accelerated hyperfractionation (AHF) compared to conventional fractionation (CF) in the postoperative radiotherapy of locally advanced head and neck cancer: influence of proliferation. *Br J Cancer* **86**(4): 517-523

Azizzadeh B, Yafai S, Rawnsley JD, Abemayor E, Sercarz JA, Calcaterra TC, Berke GS, Blackwell KE (2001) Radial forearm free flap pharyngoesophageal reconstruction. *Laryngoscope* **111**(5): 807-810

Babin E, Desmots C, Hamon M, Benateau H, Hitier M (2008) PET/CT for assessing mandibular invasion by intraoral squamous cell carcinomas. *Clin Otolaryngol* **33**(1): 47-51

Bachaud JM, Cohen-Jonathan E, Alzieu C, David JM, Serrano E, Daly-Schweitzer N (1996) Combined postoperative radiotherapy and weekly cisplatin infusion for locally advanced head and neck carcinoma: final report of a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **36**(5): 999-1004

Bachaud JM, Delannes M, Allouache N, Benchalal M, Alzieu C, David JM, Serrano E, Daly-Schweitzer NJ (1994) Radiotherapy of stage I and II carcinomas of the mobile tongue and/or floor of the mouth. *Radiother Oncol* **31**(3): 199-206

Baek C-H, Chung MK, Son Y-I, Choi JY, Kim H-J, Yim YJ, Ko YH, Choi J, Cho JK, Jeong H-S (2008) Tumor volume assessment by 18F-FDG PET/CT in patients with oral cavity cancer with dental artifacts on CT or MR images. *J Nucl Med* **49**(9): 1422-1428

## Literaturverzeichnis

---

Bahadur S, Thakar A, Mohanti BK, Lal P (2002) Results of radiotherapy with, or without, salvage surgery versus combined surgery and radiotherapy in advanced carcinoma of the hypopharynx. *J Laryngol Otol* **116**(1): 29-32

Bailet JW, Abemayor E, Jabour BA, Hawkins RA, Ho C, Ward PH (1992) Positron emission tomography: a new, precise imaging modality for detection of primary head and neck tumors and assessment of cervical adenopathy. *Laryngoscope* **102**(3): 281-288

Bailey JS, Blanchaert RH, Ord RA (2001) Management of oral squamous cell carcinoma treated with inadequate excisional biopsy. *J Oral Maxillofac Surg* **59**(11526566): 1007-1010

Balz V, Scheckenbach K, Gotte K, Bockmuhl U, Petersen I, Bier H (2003) Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res* **63**(6): 1188-1191

Bartelink H, Breur K, Hart G, Annyas B, van Slooten E, Snow G (1983) The value of postoperative radiotherapy as an adjuvant to radical neck dissection. *Cancer* **52**(6): 1008-1013

Barzan L, Talamini R (1996) Analysis of prognostic factors for recurrence after neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **122**(12): 1299-1302

Barzan L, Talamini R, Politi D, Minatel E, Gobitti C, Franchin G (2002) Squamous cell carcinoma of the hypopharynx treated with surgery and radiotherapy. *J Laryngol Otol* **116**(1): 24-28

Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, Sheppard D, Oettgen P, Mercurio AM (2005) Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest* **115**(2): 339-347

Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2**(2): 84-89

Becker KF, Schott C, Hipp S, Metzger V, Porschewski P, Beck R, Nahrig J, Becker I, Hofler H (2007) Quantitative protein analysis from formalin-fixed tissues: implications for translational clinical research and nanoscale molecular diagnosis. *J Pathol* **211**(3): 370-378

Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**(6592): 638-642

Bergqvist M, Brodin O, Pouzon A, Linder A, Hesselius P, Blomquist E (2002) Radiation treatment of T1-T4 squamous cell carcinoma of the larynx: a retrospective analysis and long-term follow-up of 135 patients. *Anticancer Res* **22**(2B): 1239-1242

Bernier J (2007) [Adjuvant treatment of head and neck cancers: advances and challenges]. *Bull Cancer* **94**(9): 823-827

Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, Ozsahin EM, Jacobs JR, Jassem J, Ang KK, Lefebvre JL (2005) Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative

## Literaturverzeichnis

---

radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck* **27**(10): 843-850

Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A, van Glabbeke M (2004) Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* **350**(19): 1945-1952

Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, Kerkhoven RM, Madiredjo M, Nijkamp W, Weigelt B, Agami R, Ge W, Cavet G, Linsley PS, Beijersbergen RL, Bernards R (2004) A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* **428**(6981): 431-437

Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL (2001a) Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* **12**(1): 27-36

Bhowmick NA, Zent R, Ghiassi M, McDonnell M, Moses HL (2001b) Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J Biol Chem* **276**(50): 46707-46713

Bienz M, Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**(2): 311-320

Bier J (1994) Radical neck dissection versus conservative neck dissection for squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Recent Results Cancer Res* **134**(57-62)

Bierie B, Moses HL (2006) Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* **6**(7): 506-520

Bilodeau EA, Chiosea S (2011) Oral Squamous Cell Carcinoma with Mandibular Bone Invasion: Intraoperative Evaluation of Bone Margins by Routine Frozen Section. *Head Neck Pathol*

Birchmeier W, Behrens J (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* **1198**(1): 11-26

Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA (2002) Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* **21**(20): 3241-3246

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr. (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* **48**(11): 3282-3287

Bocca E, Pignataro O, Oldini C, Cappa C (1984) Functional neck dissection: an evaluation and review of 843 cases. *Laryngoscope* **94**(7): 942-945

Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* **116**(Pt 3): 499-511

Bolzoni A, Cappiello J, Piazza C, Peretti G, Maroldi R, Farina D, Nicolai P (2004a) Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging in the assessment of mandibular involvement in oral-oropharyngeal squamous cell carcinoma: a prospective study. *Archives of Otolaryngology -- Head & Neck Surgery* **130**(7): 837-843

## Literaturverzeichnis

---

- Bolzoni A, Cappiello J, Piazza C, Peretti G, Maroldi R, Farina D, Nicolai P (2004b) Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging in the assessment of mandibular involvement in oral-oropharyngeal squamous cell carcinoma: a prospective study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **130**(7): 837-843
- Bongers V, Hobbelink MG, van Rijk PP, Hordijk G-J (2002) Cost-effectiveness of dual-head 18F-fluorodeoxyglucose PET for the detection of recurrent laryngeal cancer. *Cancer Biother Radiopharm* **17**(12136522): 303-306
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **354**(6): 567-578
- Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, Correo R, Eby YJ, Ruppert JM, Sidransky D (1993) The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* **53**(19): 4477-4480
- Braams JW, Pruijm J, Freling NJ, Nikkels PG, Roodenburg JL, Boering G, Vaalburg W, Vermey A (1995) Detection of lymph node metastases of squamous-cell cancer of the head and neck with FDG-PET and MRI. *J Nucl Med* **36**(2): 211-216
- Braams JW, Pruijm J, Kole AC, Nikkels PG, Vaalburg W, Vermey A, Roodenburg JL (1997) Detection of unknown primary head and neck tumors by positron emission tomography. *Int J Oral Maxillofac Surg* **26**(2): 112-115
- Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T (2001) Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10356-10361
- Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005) Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* **5**(9): 744-749
- Brabletz T, Spaderna S, Kolb J, Hlubek F, Faller G, Bruns CJ, Jung A, Nentwich J, Duluc I, Domon-Dell C, Kirchner T, Freund JN (2004) Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. *Cancer Res* **64**(19): 6973-6977
- Brasilino de Carvalho M (1998) Quantitative analysis of the extent of extracapsular invasion and its prognostic significance: a prospective study of 170 cases of carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Head Neck* **20**(1): 16-21
- Bremerich A, Akuamo-Boateng E, Machtens E (1992) [Indications for partial mandibular resection in tumors of the mouth floor]. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* **37**(98-100)
- Bremmer JF, Braakhuis BJ, Ruijter-Schippers HJ, Brink A, Duarte HM, Kuik DJ, Bloemena E, Leemans CR, van der Waal I, Brakenhoff RH (2005) A noninvasive genetic screening test to detect oral preneoplastic lesions. *Lab Invest* **85**(12): 1481-1488
- Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, Klimanskaya IV, Folkesson HG, Pittet JF, Nishimura SL, Aldape K, Landers DV, Carpenter W, et al. (1995) Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci* **108 ( Pt 6)**(2241-2251)

## Literaturverzeichnis

---

Brown J (2003) Mechanisms of cancer invasion of the mandible. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **11**(2): 96-102

Brown JS, Browne RM (1995) Factors influencing the patterns of invasion of the mandible by oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* **24**(6): 417-426

Brown JS, Kalavrezos N, D'Souza J, Lowe D, Magennis P, Woolgar JA (2002) Factors that influence the method of mandibular resection in the management of oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* **40**(4): 275-284

Brunnemann KD, Djordjevic MV, Feng R, Hoffmann D (1991) Analysis and pyrolysis of some N-nitrosamino acids in tobacco and tobacco smoke. *IARC Sci Publ*105): 477-481

Buchwald C, Lindeberg H, Pedersen BL, Franzmann MB (2001) Human papilloma virus and p53 expression in carcinomas associated with sinonasal papillomas: a Danish Epidemiological study 1980-1998. *Laryngoscope* **111**(6): 1104-1110

Bundgaard T, Rossen K, Henriksen SD, Charabi S, Sogaard H, Grau C (2002) Histopathologic parameters in the evaluation of T1 squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Head Neck* **24**(7): 656-660

Burdsal CA, Damsky CH, Pedersen RA (1993) The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development* **118**(3): 829-844

Busk M, Pytela R, Sheppard D (1992) Characterization of the integrin alpha v beta 6 as a fibronectin-binding protein. *J Biol Chem* **267**(9): 5790-5796

Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ (2003) Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol* **67**(1): 3-15

Byers RM (1985) Modified neck dissection. A study of 967 cases from 1970 to 1980. *Am J Surg* **150**(4): 414-421

Byers RM, El-Naggar AK, Lee YY, Rao B, Fornage B, Terry NH, Sample D, Hankins P, Smith TL, Wolf PJ (1998) Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue? *Head Neck* **20**(2): 138-144

Byers RM, Weber RS, Andrews T, McGill D, Kare R, Wolf P (1997) Frequency and therapeutic implications of "skip metastases" in the neck from squamous carcinoma of the oral tongue. *Head Neck* **19**(1): 14-19

Byers RM, Wolf PF, Ballantyne AJ (1988) Rationale for elective modified neck dissection. *Head Neck Surg* **10**(3): 160-167

Calais G, Alfonsi M, Bardet E, Sire C, Germain T, Bergerot P, Rhein B, Tortochaux J, Oudinot P, Bertrand P (1999) Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **91**(24): 2081-2086

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D (1996) Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* **56**(11): 2488-2492

## Literaturverzeichnis

---

Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2**(2): 76-83

Carinci F, Pelucchi S, Farina A, De Franciscis G, Calearo C (1998) Extension as a prognostic factor in oropharyngeal cancer: largest mucosal dimension compared with number of (sub)sites involved. *Br J Oral Maxillofac Surg* **36**(6): 440-445

Carter RL, Tanner NS, Clifford P, Shaw HJ (1980) Direct bone invasion in squamous carcinomas of the head and neck: pathological and clinical implications. *Clin Otolaryngol Allied Sci* **5**(2): 107-116

Carter RL, Tsao SW, Burman JF, Pittam MR, Clifford P, Shaw HJ (1983) Patterns and mechanisms of bone invasion by squamous carcinomas of the head and neck. *Am J Surg* **146**(4): 451-455

Ceccarelli C, Piazzini G, Paterini P, Pantaleo MA, Taffurelli M, Santini D, Martinelli GN, Biasco G (2005) Concurrent EGFR and Cox-2 expression in colorectal cancer: proliferation impact and tumour spreading. *Ann Oncol* **16** Suppl 4(iv74-79)

Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML (2008) Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* **26**(4): 612-619

Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Spitz MR, Wei Q (2002) Expression of nucleotide excision repair genes and the risk for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **94**(2): 393-397

Chiarini L, De Santis G, Bedogni A, Nocini PF (2002) Lining the mouth floor with prelaminate fascio-mucosal free flaps: clinical experience. *Microsurgery* **22**(5): 177-186

Chow JM, Levin BC, Krivit JS, Applebaum EL (1989) Radiotherapy or surgery for subclinical cervical node metastases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **115**(8): 981-984

Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, Ang KK, El-Naggar AK, Zanation AM, Cmelak AJ, Levy S, Slebos RJ, Yarbrough WG (2006) Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **66**(16): 8210-8218

Close LG, Brown PM, Vuitch MF, Reisch J, Schaefer SD (1989) Microvascular invasion and survival in cancer of the oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **115**(11): 1304-1309

Coatesworth AP, MacLennan K (2002) Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: the prevalence of microscopic extracapsular spread and soft tissue deposits in the clinically N0 neck. *Head Neck* **24**(11891957): 258-261

Cole I, Hughes L (1997) The relationship of cervical lymph node metastases to primary sites of carcinoma of the upper aerodigestive tract: a pathological study. *Aust N Z J Surg* **67**(12): 860-865

Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F (2001) The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* **7**(6): 1267-1278

## Literaturverzeichnis

---

Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A (2003) Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* **163**(4): 847-857

Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A (2002) The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* **109**(8): 987-991

Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya KA, Ogden G, Macpherson LM (2006) Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) -- recent trends and regional variation. *Oral Oncol* **42**(6): 586-592

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, Machtay M, Ensley JF, Chao KS, Schultz CJ, Lee N, Fu KK (2004) Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **350**(19): 1937-1944

Cordeiro PG, Santamaria E (2000) A classification system and algorithm for reconstruction of maxillectomy and midfacial defects. *Plast Reconstr Surg* **105**(7): 2331-2346; discussion 2347-2338

Corlette TH, Cole IE, Albsoul N, Ayyash M (2005) Neck dissection of level IIb: is it really necessary? *Laryngoscope* **115**(9): 1624-1626

Crampette L, Garrel R, Gardiner Q, Maurice N, Mondain M, Makeieff M, Guerrier B (1999) Modified subtotal laryngectomy with cricohyoidoepiglottopexy--long term results in 81 patients. *Head Neck* **21**(2): 95-103

Crean S-J, Hoffman A, Potts J, Fardy MJ (2003) Reduction of occult metastatic disease by extension of the supraomohyoid neck dissection to include level IV. *Head Neck* **25**(12): 758-762

Crile G (1906) Excision of cancer of the head and neck, with special reference to the plan of dissection based on 132 patients. *JAMA* **47**: 1780-1784

Curtin HD (2004) Detection of perineural spread: fat suppression versus no fat suppression. *AJNR Am J Neuroradiol* **25**(1): 1-3

D'Cruz AK, Siddachari RC, Walvekar RR, Pantvaidya GH, Chaukar DA, Deshpande MS, Pai PS, Chaturvedi P (2009) Elective neck dissection for the management of the N0 neck in early cancer of the oral tongue: need for a randomized controlled trial. *Head & Neck* **31**(5): 618-624

D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML (2009) Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* **199**(9): 1263-1269

Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, Spitz MR, Schiller JT, Wei Q, Sturgis EM (2003) Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**(7): 2620-2626

Daly T, Poulsen MG, Denham JW, Peters LJ, Lamb DS, Krawitz H, Hamilton C, Keller J, Tripcony L, Walker Q (2003) The effect of anaemia on efficacy and normal tissue toxicity following radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* **68**(2): 113-122

## Literaturverzeichnis

---

Dammann F, Horger M, Mueller-Berg M, Schlemmer H, Claussen CD, Hoffman J, Eschmann S, Bares R (2005) Rational diagnosis of squamous cell carcinoma of the head and neck region: comparative evaluation of CT, MRI, and 18FDG PET.[Erratum appears in AJR Am J Roentgenol. 2005 Jun;184(6):1968]. *AJR Am J Roentgenol* **184**(4): 1326-1331

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M (2005) Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* **366**(9499): 1784-1793

Daniel RK, Taylor GI (1973) Distant transfer of an island flap by microvascular anastomoses. A clinical technique. *Plast Reconstr Surg* **52**(2): 111-117

Day GL, Blot WJ (1992) Second primary tumors in patients with oral cancer. *Cancer* **70**(1): 14-19

Day TA, Davis BK, Gillespie MB, Joe JK, Kibbey M, Martin-Harris B, Neville B, Richardson MS, Rosenzweig S, Sharma AK, Smith MM, Stewart S, Stuart RK (2003) Oral cancer treatment. *Current treatment options in oncology* **4**(1): 27-41

de Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR (2000) Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* **110**(3 Pt 1): 397-401

de Vries N, Van der Waal I, Snow GB (1986) Multiple primary tumours in oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* **15**(1): 85-87

De Zinis LOR, Bolzoni A, Piazza C, Nicolai P (2006) Prevalence and localization of nodal metastases in squamous cell carcinoma of the oral cavity: role and extension of neck dissection. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* **263**(12): 1131-1135

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* **29**(2): 117-129

Dias FL, Kligerman J, Matos de Sa G, Arcuri RA, Freitas EQ, Farias T, Matos F, Lima RA (2001) Elective neck dissection versus observation in stage I squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. *Otolaryngol Head Neck Surg* **125**(1): 23-29

Dillon WP, Harnsberger HR (1991) The impact of radiologic imaging on staging of cancer of the head and neck. *Semin Oncol* **18**(2): 64-79

Disa JJ, Pusic AL, Hidalgo DA, Cordeiro PG (2003) Microvascular reconstruction of the hypopharynx: defect classification, treatment algorithm, and functional outcome based on 165 consecutive cases. *Plastic and reconstructive surgery* **111**(2): 652-660; discussion 661-653

Dörr W RD (2000) *Nebenwirkungen in der Radioonkologie*, München: Urban und Vogel.

Dorudi S, Sheffield JP, Poulosom R, Northover JM, Hart IR (1993) E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* **142**(4): 981-986

Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R (2006) Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. *Contrib Microbiol* **13**(16-44)

Edelman GM, Gallin WJ, Delouee A, Cunningham BA, Thiery JP (1983) Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(14): 4384-4388

## Literaturverzeichnis

---

- Edwards DM, Johnson NW (1999) Treatment of upper aerodigestive tract cancers in England and its effect on survival. *Br J Cancer* **81**(2): 323-329
- Eger A, Stockinger A, Schaffhauser B, Beug H, Foisner R (2000) Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J Cell Biol* **148**(1): 173-188
- El-Bahrawy MA, Talbot IC, Poulsom R, Jeffery R, Alison MR (2002) The expression of E-cadherin and catenins in colorectal tumours from familial adenomatous polyposis patients. *J Pathol* **198**(1): 69-76
- Elahi A, Bendaly J, Zheng Z, Muscat JE, Richie JP, Jr., Schantz SP, Lazarus P (2003) Detection of UGT1A10 polymorphisms and their association with orolaryngeal carcinoma risk. *Cancer* **98**(4): 872-880
- Elahi A, Zheng Z, Park J, Eyring K, McCaffrey T, Lazarus P (2002) The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. *Carcinogenesis* **23**(7): 1229-1234
- Elsheikh MN, Mahfouz ME, Elsheikh E (2005) Level IIb lymph nodes metastasis in elective supraomohyoid neck dissection for oral cavity squamous cell carcinoma: a molecular-based study. *Laryngoscope* **115**(9): 1636-1640
- Enepekides DJ, Sultanem K, Nguyen C, Shenouda G, Black MJ, Rochon L (1999) Occult cervical metastases: immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* **120**(5): 713-717
- Engel H, Steinert H, Buck A, Berthold T, Huch Boni RA, von Schulthess GK (1996) Whole-body PET: physiological and artifactual fluorodeoxyglucose accumulations. *J Nucl Med* **37**(3): 441-446
- Esposito ED, Motta S, Cassiano B, Motta G (2001) Occult lymph node metastases in supraglottic cancers of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* **124**(3): 253-257
- Fakih AR, Rao RS, Borges AM, Patel AR (1989) Elective versus therapeutic neck dissection in early carcinoma of the oral tongue. *Am J Surg* **158**(4): 309-313
- Fazekas JT, Sommer C, Kramer S (1983) Tumor regression and other prognosticators in advanced head and neck cancers: a sequel to the RTOG methotrexate study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **9**(7): 957-964
- Ferlay J SH, Bray F, Forman D, Mathers CD, Parkin D (2010) *GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. CancerBase 10*(Lyon, France: International Agency for Research on Cancer;)
- Ferlito A, Partridge M, Brennan J, Hamakawa H (2001) Lymph node micrometastases in head and neck cancer: a review. *Acta Otolaryngol* **121**(6): 660-665
- Fletcher GH (1984) Irradiation of subclinical disease in the draining lymphatics. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **10**(6): 939-942
- Folkman J (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* **29**(6 Suppl 16): 15-18

## Literaturverzeichnis

---

Foote RL, Buskirk SJ, Stanley RJ, Grambsch PM, Olsen KD, DeSanto LW, Earle JD, Weiland LH (1989) Patterns of failure after total laryngectomy for glottic carcinoma. *Cancer* **64**(1): 143-149

Forrest LA, Schuller DE, Karanfilov B, Lucas JG (1997) Update on intraoperative analysis of mandibular margins. *Am J Otolaryngol* **18**(6): 396-399

Forrest LA, Schuller DE, Lucas JG, Sullivan MJ (1995) Rapid analysis of mandibular margins. *Laryngoscope* **105**(5 Pt 1): 475-477

Fortin A, Couture C, Doucet R, Albert M, Allard J, Tetu B (2001) Does histologic grade have a role in the management of head and neck cancers? *J Clin Oncol* **19**(11689578): 4107-4116

Franci C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gomez S, Rodriguez R, Escriva M, Montserrat-Sentis B, Baro T, Garrido M, Bonilla F, Virtanen I, Garcia de Herreros A (2006) Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* **25**(37): 5134-5144

Franz M, Spiegel K, Umbreit C, Richter P, Codina-Canet C, Berndt A, Altendorf-Hofmann A, Koscielny S, Hyckel P, Kosmehl H, Virtanen I (2009) Expression of Snail is associated with myofibroblast phenotype development in oral squamous cell carcinoma. *Histochem Cell Biol* **131**(5): 651-660

Franzen B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E, Uruy K, Hirano T, Okuzawa K, Auer G (1996) Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: down-regulation of cytokeratins. *Br J Cancer* **74**(10): 1632-1638

Friedl P (2004) Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **16**(1): 14-23

Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M (2004) Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* **48**(5-6): 441-449

Friedl P, Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**(5): 362-374

Friesland S, Mellin H, Munck-Wikland E, Nilsson A, Lindholm J, Dalianis T, Lewensohn R (2001) Human papilloma virus (HPV) and p53 immunostaining in advanced tonsillar carcinoma--relation to radiotherapy response and survival. *Anticancer Res* **21**(1B): 529-534

Frisch SM, Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **124**(4): 619-626

Fujita M, Hirokawa Y, Kashiwado K, Akagi Y, Kashimoto K, Kiriu H, Ohtani K, Wada T (1996) An analysis of mandibular bone complications in radiotherapy for T1 and T2 carcinoma of the oral tongue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **34**(2): 333-339

Garavello W, Bertuccio P, Levi F, Lucchini F, Bosetti C, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C (2010) The oral cancer epidemic in central and eastern Europe. *Int J Cancer* **127**(1): 160-171

Garber K (2008) Epithelial-to-mesenchymal transition is important to metastasis, but questions remain. *J Natl Cancer Inst* **100**(4): 232-233, 239

## Literaturverzeichnis

---

Gasparotto D, Polesel J, Marzotto A, Colladel R, Piccinin S, Modena P, Grizzo A, Sulfaro S, Serraino D, Barzan L, Doglioni C, Maestro R (2011) Overexpression of TWIST2 correlates with poor prognosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Oncotarget*

Genden EM, Kaufman MR, Katz B, Vine A, Urken ML (2001) Tubed gastro-omental free flap for pharyngoesophageal reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **127**(7): 847-853

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* **92**(9): 709-720

Giovanni A, Guelfucci B, Gras R, Yu P, Zanaret M (2001) Partial frontolateral laryngectomy with epiglottic reconstruction for management of early-stage glottic carcinoma. *Laryngoscope* **111**(4 Pt 1): 663-668

Glanzmann C, Gratz KW (1995) Radionecrosis of the mandibula: a retrospective analysis of the incidence and risk factors. *Radiother Oncol* **36**(2): 94-9100

Goerres GW, Schmid DT, Schuknecht B, Eyrich GK (2005) Bone invasion in patients with oral cavity cancer: comparison of conventional CT with PET/CT and SPECT/CT.[Erratum appears in Radiology. 2006 Apr;239(1):303]. *Radiology* **237**(1): 281-287

Goffinet DR, Fee WE, Jr., Goode RL (1984) Combined surgery and postoperative irradiation in the treatment of cervical lymph nodes. *Arch Otolaryngol* **110**(11): 736-738

Gonzalez MA, Pinder SE, Wencyk PM, Bell JA, Elston CW, Nicholson RI, Robertson JF, Blamey RW, Ellis IO (1999) An immunohistochemical examination of the expression of E-cadherin, alpha- and beta/gamma-catenins, and alpha2- and beta1-integrins in invasive breast cancer. *J Pathol* **187**(5): 523-529

Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM (2001) E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* **153**(5): 1049-1060

Graham S, Dayal H, Rohrer T, Swanson M, Sultz H, Shedd D, Fischman S (1977) Dentition, diet, tobacco, and alcohol in the epidemiology of oral cancer. *J Natl Cancer Inst* **59**(6): 1611-1618

Grandi C, Mingardo M, Guzzo M, Licitra L, Podrecca S, Molinari R (1993) Salvage surgery of cervical recurrences after neck dissection or radiotherapy. *Head Neck* **15**(4): 292-295

Grandis JR, Tweardy DJ (1993) Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* **53**(15): 3579-3584

Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK, Myers JN (2003a) Extent of extracapsular spread: a critical prognosticator in oral tongue cancer. *Cancer* **97**(6): 1464-1470

Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK, Myers JN (2003b) Extent of extracapsular spread: a critical prognosticator in oral tongue cancer. *Cancer* **97**(12627511): 1464-1470

## Literaturverzeichnis

---

Grooteclaes ML, Frisch SM (2000) Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* **19**(33): 3823-3828

Gu DH, Yoon DY, Park CH, Chang SK, Lim KJ, Seo YL, Yun EJ, Choi CS, Bae SH (2010) CT, MR, (18)F-FDG PET/CT, and their combined use for the assessment of mandibular invasion by squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Acta Radiol* **51**(10): 1111-1119

Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG, Baulida J (2002) Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* **277**(42): 39209-39216

Guarino M, Rubino B, Ballabio G (2007) The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* **39**(3): 305-318

Gupta PB, Mani S, Yang J, Hartwell K, Weinberg RA (2005) The evolving portrait of cancer metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**(291-297)

Haberkorn U, Strauss LG, Reisser C, Haag D, Dimitrakopoulou A, Ziegler S, Oberdorfer F, Rudat V, van Kaick G (1991) Glucose uptake, perfusion, and cell proliferation in head and neck tumors: relation of positron emission tomography to flow cytometry. *J Nucl Med* **32**(8): 1548-1555

Hajra KM, Fearon ER (2002) Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **34**(3): 255-268

Hama T, Yuza Y, Saito Y, J Ou, Kondo S, Okabe M, Yamada H, Kato T, Moriyama H, Kurihara S, Urashima M (2009) Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncologist* **14**(9): 900-908

Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Dahlgren LO, Joneberg J, Creson N, Lindholm J, Ye W, Dalianis T, Munck-Wikland E (2006) Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer* **119**(11): 2620-2623

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70

Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, Andersson G (2005) Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* **125**(12): 1337-1344

Hao S-P, Tsang NM (2002) The role of supraomohyoid neck dissection in patients of oral cavity carcinoma (small star, filled). *Oral Oncol* **38**(11978555): 309-312

Hareyama M, Nishio M, Saito A, Kagami Y, Asano K, Oouchi A, Narimatsu N, Somekawa Y, Sanbe S, Morita K (1993) Results of cesium needle interstitial implantation for carcinoma of the oral tongue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **25**(1): 29-34

Harish K (2005) Neck dissections: radical to conservative. *World J Surg Oncol* **3**(1): 21

Hartwell KA, Muir B, Reinhardt F, Carpenter AE, Sgroi DC, Weinberg RA (2006) The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(50): 18969-18974

## Literaturverzeichnis

---

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lence JJ, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean MD, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Purdue M, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Shangina O, Pilarska A, Zhang ZF, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P (2009) Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**(2): 541-550

Hata A, Shi Y, Massague J (1998) TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* **4**(6): 257-262

Haughey BH, Gates GA, Arfken CL, Harvey J (1992) Meta-analysis of second malignant tumors in head and neck cancer: the case for an endoscopic screening protocol. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **101**(2 Pt 1): 105-112

Hayden RE, Deschler DG (1999) Lateral thigh free flap for head and neck reconstruction. *Laryngoscope* **109**(9): 1490-1494

Hegerfeldt Y, Tusch M, Brocker EB, Friedl P (2002) Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res* **62**(7): 2125-2130

Heimann R, Lan F, McBride R, Hellman S (2000) Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res* **60**(2): 298-304

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**(6659): 465-471

Helliwell TR (2001) Molecular markers of metastasis in squamous carcinomas. *The Journal of pathology* **194**(3): 289-293

Henick DH, Silver CE, Heller KS, Shaha AR, El GH, Wolk DP (1995) Supraomohyoid neck dissection as a staging procedure for squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Head Neck* **17**(2): 119-123

Henke M, Laszig R, Rube C, Schafer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H (2003) Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **362**(9392): 1255-1260

Herranz N, Pasini D, Diaz VM, Franci C, Gutierrez A, Dave N, Escriva M, Hernandez-Munoz I, Di Croce L, Helin K, Garcia de Herreros A, Peiro S (2008) Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol Cell Biol* **28**(15): 4772-4781

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S (2003) Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* **95**(23): 1772-1783

Hicks RJ, Rischin D, Fisher R, Binns D, Scott AM, Peters LJ (2005) Utility of FMISO PET in advanced head and neck cancer treated with chemoradiation incorporating a hypoxia-targeting chemotherapy agent. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **32**(12): 1384-1391

## Literaturverzeichnis

---

Hicks WL, Jr., North JH, Jr., Loree TR, Maamoun S, Mullins A, Orner JB, Bakamjian VY, Shedd DP (1998) Surgery as a single modality therapy for squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Am J Otolaryngol* **19**(1): 24-28

Hicks WL, Loree TR, Garcia RI, Maamoun S, Marshall D, Orner JB, Bakamjian VY, Shedd DP (1997) Squamous cell carcinoma of the floor of mouth: a 20-year review. *Head Neck* **19**(5): 400-405

Hills CE, Siamantouras E, Smith SW, Cockwell P, Liu KK, Squires PE (2012) TGFbeta modulates cell-to-cell communication in early epithelial-to-mesenchymal transition. *Diabetologia*

Hinerman RW, Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, Werning JW, Villaret DB (2004) Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity: 35-year experience. *Head Neck* **26**(11): 984-994

Hirohashi S (1998) Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* **153**(2): 333-339

Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Pirinen R, Salmi L, Halonen P, Johansson R, Kosma VM (1999) Enhanced apoptosis correlates with poor survival in patients with laryngeal cancer but not with cell proliferation, bcl-2 or p53 expression. *Eur J Cancer* **35**(10448265): 231-237

Ho CM, Lam KH, Wei WI, Lau WF (1992) Treatment of neck nodes in oral cancer. *Surg Oncol* **1**(1341238): 73-78

Ho PS, Ko YC, Yang YH, Shieh TY, Tsai CC (2002) The incidence of oropharyngeal cancer in Taiwan: an endemic betel quid chewing area. *J Oral Pathol Med* **31**(4): 213-219

Hogg RP, Honorio S, Martinez A, Agathangelou A, Dallol A, Fullwood P, Weichselbaum R, Kuo MJ, Maher ER, Latif F (2002) Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene from region 3p21.3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* **38**(12): 1585-1592

Hohlweg-Majert B, Metzger MC, Voss PJ, Holzle F, Wolff K-D, Schulze D (2009) Preoperative cervical lymph node size evaluation in patients with malignant head/neck tumors: comparison between ultrasound and computer tomography. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology* **135**(6): 753-759

Holzle F, Kesting MR, Holzle G, Watola A, Loeffelbein DJ, Ervens J, Wolff KD (2007) Clinical outcome and patient satisfaction after mandibular reconstruction with free fibula flaps. *Int J Oral Maxillofac Surg* **36**(9): 802-806

Hong SX, Cha IH, Lee EW, Kim J (2001) Mandibular invasion of lower gingival carcinoma in the molar region: its clinical implications on the surgical management. *Int J Oral Maxillofac Surg* **30**(2): 130-138

Hosal AS, Carrau RL, Johnson JT, Myers EN (2000) Selective neck dissection in the management of the clinically node-negative neck. *Laryngoscope* **110**(12): 2037-2040

Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, Hotz HG (2007) Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **13**(16): 4769-4776

Howaldt HP, Vorast H, Blecher JC, Reicherts M, Kainz M (2000) Ergebnisse aus dem DÖSAK Tumorregister. *Mund Kiefer Gesichtschir* **4 Suppl 1**(S216-225)

## Literaturverzeichnis

---

Huang D, Du X (2008) Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. *World J Gastroenterol* **14**(12): 1823-1827

Huang DT, Johnson CR, Schmidt-Ullrich R, Grimes M (1992) Postoperative radiotherapy in head and neck carcinoma with extracapsular lymph node extension and/or positive resection margins: a comparative study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **23**(4): 737-742

Huang S-F, Kang C-J, Lin C-Y, Fan K-H, Yen T-C, Wang H-M, Chen IH, Liao C-T, Cheng A-J, Chang JT-C (2008) Neck treatment of patients with early stage oral tongue cancer: comparison between observation, supraomohyoid dissection, and extended dissection. *Cancer* **112**(5): 1066-1075

Huang X, Wu J, Spong S, Sheppard D (1998) The integrin alphavbeta6 is critical for keratinocyte migration on both its known ligand, fibronectin, and on vitronectin. *J Cell Sci* **111** ( Pt 15)(2189-2195

Huber GF, Zullig L, Soltermann A, Roessle M, Graf N, Haerle SK, Studer G, Jochum W, Moch H, Stoeckli SJ (2011) Down regulation of E-Cadherin (ECAD) - a predictor for occult metastatic disease in sentinel node biopsy of early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *BMC Cancer* **11**(217:211-218

Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R (1996) Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* **59**(1): 3-10

Huntley SP, Davies M, Matthews JB, Thomas G, Marshall J, Robinson CM, Eveson JW, Paterson IC, Prime SS (2004) Attenuated type II TGF-beta receptor signalling in human malignant oral keratinocytes induces a less differentiated and more aggressive phenotype that is associated with metastatic dissemination. *Int J Cancer* **110**(2): 170-176

Huntley TA, Busmanis I, Desmond P, Wiesenfeld D (1996) Mandibular invasion by squamous cell carcinoma: a computed tomographic and histological study. *Br J Oral Maxillofac Surg* **34**(1): 69-74

Huveneers S, Truong H, Danen HJ (2007) Integrins: signaling, disease, and therapy. *Int J Radiat Biol* **83**(11-12): 743-751

Hynes NE, Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* **5**(5): 341-354

Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**(6): 673-687

IARC (2005) Betel Quid and Areca Nut Chewing and Some Areca Nut Derived Nitrosamines. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* **85**(

IARC (2007) Smokeless Tobacco and Some Tobacco-Specific N-Nitrosamines. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* **89**(

Imaizumi A, Yoshino N, Yamada I, Nagumo K, Amagasa T, Omura K, Okada N, Kurabayashi T (2006a) A potential pitfall of MR imaging for assessing mandibular invasion of squamous cell carcinoma in the oral cavity. *AJNR Am J Neuroradiol* **27**(1): 114-122

Imaizumi A, Yoshino N, Yamada I, Nagumo K, Amagasa T, Omura K, Okada N, Kurabayashi T (2006b) A potential pitfall of MR imaging for assessing mandibular

## Literaturverzeichnis

---

invasion of squamous cell carcinoma in the oral cavity. *AJNR Am J Neuroradiol* **27**(1): 114-122

Impola U, Uitto VJ, Hietanen J, Hakkinen L, Zhang L, Larjava H, Isaka K, Saarialho-Kere U (2004) Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol* **202**(1): 14-22

Iwai S, Yonekawa A, Harada C, Hamada M, Katagiri W, Nakazawa M, Yura Y (2010) Involvement of the Wnt-beta-catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* **37**(5): 1095-1103

Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* **110**(3): 341-350

Iyer SG, Pradhan SA, Pai PS, Patil S (2004) Surgical treatment outcomes of localized squamous carcinoma of buccal mucosa. *Head Neck* **26**(10): 897-902

Iype EM, Sebastian P, Mathew A, Balagopal PG, Varghese BT, Thomas S (2008) The role of selective neck dissection (I-III) in the treatment of node negative (N0) neck in oral cancer. *Oral Oncology* **44**(12): 1134-1138

Jabour BA, Choi Y, Hoh CK, Rege SD, Soong JC, Lufkin RB, Hanafee WN, Maddahi J, Chaiken L, Bailet J, et al. (1993) Extracranial head and neck: PET imaging with 2-[F-18]fluoro-2-deoxy-D-glucose and MR imaging correlation. *Radiology* **186**(1): 27-35

Janes SM, Watt FM (2004) Switch from alphavbeta5 to alphavbeta6 integrin expression protects squamous cell carcinomas from anoikis. *J Cell Biol* **166**(3): 419-431

Jawdynski F (1888) Przypadek raka pierwotnego szyi. T.z. raka skrzelowego volkmann'a. Wyciecie nowotworu wraz z rezekcja telnicy szjowej wspolnej i zyly szyjowej wewnetrznej. *Wydrowienieie Gaz Lek* **28**(530-535)

Jayalekshmi PA, Gangadharan P, Akiba S, Nair RR, Tsuji M, Rajan B (2009) Tobacco chewing and female oral cavity cancer risk in Karunagappally cohort, India. *Br J Cancer* **100**(5): 848-852

Jelic S, Stamatovic L, Vucicevic S, Petrovic Z, Kreacic M, Babovic N, Jovanovic N, Mikic A, Gavrilovic D (2002) Use of high-dose cytarabine to enhance cisplatin cytotoxicity-effects on the response and overall survival rates of advanced head and neck cancer patients. *Eur J Cancer* **38**(11): 1478-1489

Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, Ward E, Wu XC, Ehemann C, Anderson R, Ajani UA, Kohler B, Edwards BK (2008) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst* **100**(23): 1672-1694

Jesse RH, Fletcher GH (1977) Treatment of the neck in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **39**(Suppl 2): 868-872

Jewer DD, Boyd JB, Manktelow RT, Zuker RM, Rosen IB, Gullane PJ, Rotstein LE, Freeman JE (1989) Orofacial and mandibular reconstruction with the iliac crest free flap: a review of 60 cases and a new method of classification. *Plast Reconstr Surg* **84**(3): 391-403; discussion 404-395

## Literaturverzeichnis

---

Jin WL, Ye WM, Zheng JW, Zhou L, Zhu HG, Zhang ZY, Tian J (2008) Occult cervical lymph node metastases in 100 consecutive patients with cN0 tongue cancer. *Chinese Medical Journal* **121** (19):1871-1874

Johansen J, Eigtved A, Buchwald C, Theilgaard SA, Hansen HS (2002) Implication of 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography on management of carcinoma of unknown primary in the head and neck: a Danish cohort study. *Laryngoscope* **112**(12439171): 2009-2014

Johnson JT (1994) Carcinoma of the larynx: selective approach to the management of cervical lymphatics. *Ear Nose Throat J* **73**(5): 303-305

Jol JK, Quak JJ, de Bree R, Leemans CR (2003) Larynx preservation surgery for advanced posterior pharyngeal wall carcinoma with free flap reconstruction: a critical appraisal. *Oral Oncol* **39**(6): 552-558

Jones J, Watt FM, Speight PM (1997) Changes in the expression of alpha v integrins in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* **26**(2): 63-68

Jungehulsing M, Scheidhauer K, Damm M, Pietrzyk U, Eckel H, Schicha H, Stennert E (2000) 2[F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography is a sensitive tool for the detection of occult primary cancer (carcinoma of unknown primary syndrome) with head and neck lymph node manifestation. *Otolaryngol Head Neck Surg* **123**(3): 294-301

Kaanders JH, Bussink J, van der Kogel AJ (2004) Clinical studies of hypoxia modification in radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* **14**(3): 233-240

Kaanders JH, Hordijk GJ (2002) Carcinoma of the larynx: the Dutch national guideline for diagnostics, treatment, supportive care and rehabilitation. *Radiother Oncol* **63**(3): 299-307

Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**(6): 1420-1428

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E, Day RS, 3rd, Johnson BE, Skolnick MH (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* **264**(5157): 436-440

Kang Y, Massague J (2004) Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* **118**(3): 277-279

Kerbel RS (2008) Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* **358**(19): 2039-2049

Kerber CW, Wong WH, Howell SB, Hanchett K, Robbins KT (1998) An organ-preserving selective arterial chemotherapy strategy for head and neck cancer. *AJNR Am J Neuroradiol* **19**(5): 935-941

Kesting MR, Schurr C, Robitzky L, Steintraesser L, Nieberler M, Baurecht H, Wolff KD, Loeffelbein DJ, Mucke T (2009) Results of esophagogastroduodenoscopy in patients with oral squamous cell carcinoma--value of endoscopic screening: 10-year experience. *J Oral Maxillofac Surg* **67**(8): 1649-1655

Kim K, Lu Z, Hay ED (2002) Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int* **26**(5): 463-476

Kim MM, Califano JA (2004) Molecular pathology of head-and-neck cancer. *Int J Cancer* **112**(4): 545-553

## Literaturverzeichnis

---

Kimura RH, Teed R, Hackel BJ, Pysz M, Chuang C, Sathirachinda A, Willmann JK, Gambhir SS (2011) Pharmacokinetically Stabilized Cystine Knot Peptides that Bind Alpha-v-Beta-6 Integrin with Single-Digit Nanomolar Affinities for Detection of Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*

Kligerman J, Lima RA, Soares JR, Prado L, Dias FL, Freitas EQ, Olivatto LO (1994) Supraomohyoid neck dissection in the treatment of T1/T2 squamous cell carcinoma of oral cavity. *Am J Surg* **168**(7977957): 391-394

Knowles LM, Stabile LP, Egloff AM, Rothstein ME, Thomas SM, Gubish CT, Lerner EC, Seethala RR, Suzuki S, Quesnelle KM, Morgan S, Ferris RL, Grandis JR, Siegfried JM (2009) HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* **15**(11): 3740-3750

Knudsen BS, Vande Woude G (2008) Showering c-MET-dependent cancers with drugs. *Curr Opin Genet Dev* **18**(1): 87-96

Koch W, Sidransky D (2004) Molecular markers of radiation effectiveness in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Radiat Oncol* **14**(2): 130-138

Koivisto L, Grenman R, Heino J, Larjava H (2000) Integrins alpha5beta1, alphavbeta1, and alphavbeta6 collaborate in squamous carcinoma cell spreading and migration on fibronectin. *Exp Cell Res* **255**(1): 10-17

Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K (2008) Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Sci* **121**(Pt 20): 3317-3324

Koo BS, Lim YC, Lee JS, Choi EC (2006) Management of contralateral N0 neck in oral cavity squamous cell carcinoma. *Head & Neck* **28**(10): 896-901

Kovacs AF (2004) Relevance of positive margins in case of adjuvant therapy of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* **33**(5): 447-453

Kowalski LP, Bagietto R, Lara JR, Santos RL, Tagawa EK, Santos IR (1999) Factors influencing contralateral lymph node metastasis from oral carcinoma. *Head Neck* **21**(2): 104-110

Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG (2003) E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res* **5**(6): R217-222

Kozaki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H, Omura K, Inazawa J (2006) PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* **97**(12): 1351-1358

Kramer FJ, Janssen M, Eckardt A (2004) Second primary tumours in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clinical oral investigations* **8**(2): 56-62

Krause HR, Thein T, Kreidler J (1992) [Mandible resection in mouth cancer--rim resection versus continuity resection]. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* **37**(100-102)

Kyzas PA, Evangelou E, Denaxa-Kyza D, Ioannidis JP (2008) 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography to evaluate cervical node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* **100**(10): 712-720

## Literaturverzeichnis

---

Lapela M, Grenman R, Kurki T, Joensuu H, Leskinen S, Lindholm P, Haaparanta M, Ruotsalainen U, Minn H (1995) Head and neck cancer: detection of recurrence with PET and 2-[F-18]fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Radiology* **197**(1): 205-211

Laubenbacher C, Saumweber D, Wagner-Manslau C, Kau RJ, Herz M, Avril N, Ziegler S, Kruschke C, Arnold W, Schwaiger M (1995) Comparison of fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET, MRI and endoscopy for staging head and neck squamous-cell carcinomas. *J Nucl Med* **36**(10): 1747-1757

Lavaf A, Genden EM, Cesaretti JA, Packer S, Kao J (2008) Adjuvant radiotherapy improves overall survival for patients with lymph node-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* **112**(3): 535-543

Lavertu P, Bonafede JP, Adelstein DJ, Saxton JP, Strome M, Wanamaker JR, Eliachar I, Wood BG (1998) Comparison of surgical complications after organ-preservation therapy in patients with stage III or IV squamous cell head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **124**(4): 401-406

Layland MK, Sessions DG, Lenox J (2005) The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+. *Laryngoscope* **115**(4): 629-639

Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam HK, Park WS, Nam SW, Kim MS, Sun DI, Lee YS, Jang JJ, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2005) Somatic mutations of EGFR gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* **11**(8): 2879-2882

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* **11**(1): 9-22

Lefebvre JL, Coche-Dequeant B, Buisset E, Mirabel X, Van JT, Prevost B (1994) Management of early oral cavity cancer. Experience of Centre Oscar Lambret. *Eur J Cancer B Oral Oncol* **30**(3): 216-220

Leon X, Quer M, Orus C, Moran J, Recher K (2002) Results of an organ preservation protocol with induction chemotherapy and radiotherapy in patients with locally advanced pyriform sinus carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **259**(1): 32-36

Leon X, Quer M, Orus C, Sancho FJ, Bague S, Burgues J (2001) Selective dissection of levels II-III with intraoperative control of the upper and middle jugular nodes: a therapeutic option for the N0 neck. *Head Neck* **23**(6): 441-446

Leslie A, Fyfe E, Guest P, Goddard P, Kabala JE (1999) Staging of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a comparison of MRI and CT in T- and N-staging. *J Comput Assist Tomogr* **23**(1): 43-49

Leung TW, Wong VY, Kwan KH, Ng TY, Wong CM, Tung SY, Leung LC, O SK (2002) High dose rate brachytherapy for early stage oral tongue cancer. *Head Neck* **24**(3): 274-281

Levendag PC, Nowak PJ, van der Sangen MJ, Jansen PP, Eijkenboom WM, Planting AS, Meeuwis CA, van Putten WL (1996) Local tumor control in radiation therapy of cancers in the head and neck. *Am J Clin Oncol* **19**(5): 469-477

Liaw G-A, Yen C-Y, Chiang W-F, Lee C-H, Yang C, Chiou C-T, Liu S-Y (2006) Outcome of treatment with total main tumor resection and supraomohyoid neck dissection in oral squamous cell carcinoma. *J Formos Med Assoc* **105**(12): 971-977

## Literaturverzeichnis

---

- Lim YC, Song MH, Kim SC, Kim KM, Choi EC (2004) Preserving level IIb lymph nodes in elective supraomohyoid neck dissection for oral cavity squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology -- Head & Neck Surgery* **130**(9): 1088-1091
- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* **3**(9): 802-808
- Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM (2001) Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* **92**(4): 805-813
- Lineaweaver WC (2005) Microsurgery and the reconstructive ladder. *Microsurgery* **25**(3): 185-186
- Lippman SM, Spitz M, Trizna Z, Benner SE, Hong WK (1994) Epidemiology, biology, and chemoprevention of aerodigestive cancer. *Cancer* **74**(9 Suppl): 2719-2725
- Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RC (2003) Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg* **61**(7): 751-758
- Lock JG, Wehrle-Haller B, Stromblad S (2008) Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin Cancer Biol* **18**(1): 65-76
- Loeffler-Ragg J, Witsch-Baumgartner M, Tzankov A, Hilbe W, Schwentner I, Sprinzl GM, Utermann G, Zwierzina H (2006) Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* **42**(1): 109-111
- Lonneux M, Lawson G, Ide C, Bausart R, Remacle M, Pauwels S (2000) Positron emission tomography with fluorodeoxyglucose for suspected head and neck tumor recurrence in the symptomatic patient. *Laryngoscope* **110**(10983949): 1493-1497
- Loree TR, Strong EW (1990) Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg* **160**(4): 410-414
- Lukinmaa PL, Hietanen J, Soderholm AL, Lindqvist C (1992) The histologic pattern of bone invasion by squamous cell carcinoma of the mandibular region. *Br J Oral Maxillofac Surg* **30**(1): 2-7
- Lundahl RE, Foote RL, Bonner JA, Suman VJ, Lewis JE, Kasperbauer JL, McCaffrey TV, Olsen KD (1998) Combined neck dissection and postoperative radiation therapy in the management of the high-risk neck: a matched-pair analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **40**(9486600): 529-534
- Luukkaa M, Aitasalo K, Pulkkinen J, Lindholm P, Valavaara R, Grenman R (2002) Neodymium YAG contact laser in the treatment of cancer of the mobile tongue. *Acta Otolaryngol* **122**(3): 318-322
- Lydiatt DD, Robbins KT, Byers RM, Wolf PF (1993) Treatment of stage I and II oral tongue cancer. *Head Neck* **15**(4): 308-312
- Macfarlane GJ, Boyle P, Scully C (1992) Oral cancer in Scotland: changing incidence and mortality. *BMJ* **305**(6862): 1121-1123

## Literaturverzeichnis

---

Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, Boffetta P, Niu S, Brasure J, Merletti F, Boyle P (1995) Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur J Cancer B Oral Oncol* **31B**(3): 181-187

Machiels JP, Schmitz S (2011) Molecular-targeted therapy of head and neck squamous cell carcinoma: beyond cetuximab-based therapy. *Curr Opin Oncol* **23**(3): 241-248

Maciejewski A, Szymczyk C (2007) Fibula free flap for mandible reconstruction: analysis of 30 consecutive cases and quality of life evaluation. *J Reconstr Microsurg* **23**(1): 1-10

MacKenzie RG, Franssen E, Balogh JM, Gilbert RW, Birt D, Davidson J (2000) Comparing treatment outcomes of radiotherapy and surgery in locally advanced carcinoma of the larynx: a comparison limited to patients eligible for surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **47**(1): 65-71

Mahmood S, Conway D, Ramesar KC (2001) Use of intraoperative cytologic assessment of mandibular marrow scrapings to predict resection margin status in patients with squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* **59**(10): 1138-1141

Makitie AA, Beasley NJ, Neligan PC, Lipa J, Gullane PJ, Gilbert RW (2003) Head and neck reconstruction with anterolateral thigh flap. *Otolaryngol Head Neck Surg* **129**(5): 547-555

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**(4): 704-715

Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, Kutok JL, Hartwell K, Richardson AL, Weinberg RA (2007) Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10069-10074

Manni JJ, van den Hoogen FJ (1991) Supraomohyoid neck dissection with frozen section biopsy as a staging procedure in the clinically node-negative neck in carcinoma of the oral cavity. *Am J Surg* **162**(4): 373-376

Mao L, Lee JS, Fan YH, Ro JY, Batsakis JG, Lippman S, Hittelman W, Hong WK (1996) Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med* **2**(6): 682-685

Margadant C, Sonnenberg A (2010) Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep* **11**(2): 97-105

Markowitz BL, Calcaterra TC (1994) Preoperative assessment and surgical planning for patients undergoing immediate composite reconstruction of oromandibular defects. *Clin Plast Surg* **21**(1): 9-14

Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA (2010) HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* **11**(8): 781-789

Masaki T, Goto A, Sugiyama M, Matsuoka H, Abe N, Sakamoto A, Atomi Y (2001) Possible contribution of CD44 variant 6 and nuclear beta-catenin expression to the formation of budding tumor cells in patients with T1 colorectal carcinoma. *Cancer* **92**(10): 2539-2546

## Literaturverzeichnis

---

Maschler S, Wirl G, Spring H, Bredow DV, Sordat I, Beug H, Reichmann E (2005) Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene* **24**(12): 2032-2041

Matsumoto S, Takeda M, Shibuya H, Suzuki S (1996) T1 and T2 squamous cell carcinomas of the floor of the mouth: results of brachytherapy mainly using 198Au grains. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **34**(8598360): 833-841

Mazeron JJ, Crook JM, Benck V, Marinello G, Martin M, Raynal M, Haddad E, Peynegre R, Le Bourgeois JP, Walop W (1990) Iridium 192 implantation of T1 and T2 carcinomas of the mobile tongue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **19**(6): 1369-1376

McGregor AD, MacDonald DG (1988a) Reactive changes in the mandible in the presence of squamous cell carcinoma. *Head Neck Surg* **10**(6): 378-386

McGregor AD, MacDonald DG (1988b) Routes of entry of squamous cell carcinoma to the mandible. *Head Neck Surg* **10**(5): 294-301

McGregor AD, MacDonald DG (1989) Patterns of spread of squamous cell carcinoma within the mandible. *Head Neck* **11**(5): 457-461

McGregor AD, MacDonald DG (1993) Patterns of spread of squamous cell carcinoma to the ramus of the mandible. *Head Neck* **15**(5): 440-444

McGregor IA, MacDonald DG (1987) Spread of squamous cell carcinoma to the nonirradiated edentulous mandible--a preliminary report. *Head Neck Surg* **9**(3): 157-161

McGuirt WF, Johnson JT, Myers EN, Rothfield R, Wagner R (1995a) Floor of mouth carcinoma. The management of the clinically negative neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **121**(7873143): 278-282

McGuirt WF, Williams DW, 3rd, Keyes JW, Jr., Greven KM, Watson NE, Jr., Geisinger KR, Cappellari JO (1995b) A comparative diagnostic study of head and neck nodal metastases using positron emission tomography. *Laryngoscope* **105**(4 Pt 1): 373-375

McMahon J, O'Brien CJ, Pathak I, Hamill R, McNeil E, Hammersley N, Gardiner S, Junor E (2003) Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* **41**(4): 224-231

Medici D, Hay ED, Olsen BR (2008) Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol Biol Cell* **19**(11): 4875-4887

Medini E, Medini I, Lee CK, Gapany M, Levitt SH (1998) Curative radiotherapy for stage II-III squamous cell carcinoma of the glottic larynx. *Am J Clin Oncol* **21**(3): 302-305

Mendenhall WM, Amdur RJ, Stringer SP, Villaret DB, Cassisi NJ (2000a) Radiation therapy for squamous cell carcinoma of the tonsillar region: a preferred alternative to surgery? *J Clin Oncol* **18**(11): 2219-2225

Mendenhall WM, Stringer SP, Amdur RJ, Hinerman RW, Moore-Higgs GJ, Cassisi NJ (2000b) Is radiation therapy a preferred alternative to surgery for squamous cell carcinoma of the base of tongue? *J Clin Oncol* **18**(1): 35-42

Millard D (1986) *Principalization of plastic surgery*, 1 edn. Boston: Little, Brown and Co.

## Literaturverzeichnis

---

- Miller AB (1974) The epidemiology of oral cancer. *Dent J* **40**(3): 211-217
- Miller CS, Johnstone BM (2001) Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **91**(6): 622-635
- Minn H, Clavo AC, Grenman R, Wahl RL (1995) In vitro comparison of cell proliferation kinetics and uptake of tritiated fluorodeoxyglucose and L-methionine in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *J Nucl Med* **36**(2): 252-258
- Minn H, Joensuu H, Ahonen A, Klemi P (1988) Fluorodeoxyglucose imaging: a method to assess the proliferative activity of human cancer in vivo. Comparison with DNA flow cytometry in head and neck tumors. *Cancer* **61**(9): 1776-1781
- Mironchik Y, Winnard PT, Jr., Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, Kominsky S, Artemov D, Bhujwala Z, Van Diest P, Burger H, Glackin C, Raman V (2005) Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res* **65**(23): 10801-10809
- Mishra A, Bharti AC, Varghese P, Saluja D, Das BC (2006) Differential expression and activation of NF-kappaB family proteins during oral carcinogenesis: Role of high risk human papillomavirus infection. *Int J Cancer* **119**(12): 2840-2850
- Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH (2000) TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* **75**(115-157)
- Miyoshi J, Takai Y (2008) Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 670-691
- Molinari R, Cantu G, Chiesa F, Grandi C (1980) Retrospective comparison of conservative and radical neck dissection in laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **89**(6 Pt 1): 578-581
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D (1999) The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* **96**(3): 319-328
- Munoz Guerra MF, Naval Gias L, Campo FR, Perez JS (2003a) Marginal and segmental mandibulectomy in patients with oral cancer: a statistical analysis of 106 cases. *J Oral Maxillofac Surg* **61**(11): 1289-1296
- Munoz Guerra MF, Naval Gias L, Campo FR, Perez JS (2003b) Marginal and segmental mandibulectomy in patients with oral cancer: a statistical analysis of 106 cases. *J Oral Maxillofac Surg* **61**(11): 1289-1296
- Murugan AK, Hong NT, Fukui Y, Munirajan AK, Tsuchida N (2008) Oncogenic mutations of the PIK3CA gene in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* **32**(1): 101-111
- Muscatello L, Lenzi R, Pellini R, Giudice M, Spriano G (2010) Marginal mandibulectomy in oral cancer surgery: A 13-year experience. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* **267** (5)(759-764
- Muta H, Noguchi M, Kanai Y, Ochiai A, Nawata H, Hirohashi S (1996) E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Jpn J Cancer Res* **87**(8): 843-848

## Literaturverzeichnis

---

- Nair J, Ohshima H, Nair UJ, Bartsch H (1996) Endogenous formation of nitrosamines and oxidative DNA-damaging agents in tobacco users. *Crit Rev Toxicol* **26**(2): 149-161
- Nakamoto Y, Tamai K, Saga T, Higashi T, Hara T, Suga T, Koyama T, Togashi K (2009) Clinical value of image fusion from MR and PET in patients with head and neck cancer. *Mol Imaging Biol* **11**(1): 46-53
- Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato K (2005) Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* **52**(65): 1432-1435
- Nakasato T, Katoh K, Sone M, Ehara S, Tamakawa Y, Hoshi H, Sekiyama S (2000) Superselective continuous arterial infusion chemotherapy through the superficial temporal artery for oral cavity tumors. *AJNR Am J Neuroradiol* **21**(10): 1917-1922
- Namaki S, Matsumoto M, Ohba H, Tanaka H, Koshikawa N, Shinohara M (2004) Masticatory efficiency before and after surgery in oral cancer patients: comparative study of glossectomy, marginal mandibulectomy and segmental mandibulectomy. *J Oral Sci* **46**(2): 113-117
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(3): 220-228
- Nemeth JA, Cher ML, Zhou Z, Mullins C, Bhagat S, Trikha M (2003) Inhibition of alpha(v)beta3 integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* **20**(5): 413-420
- Ng S-H, Yen T-C, Chang JT-C, Chan S-C, Ko S-F, Wang H-M, Lee L-Y, Kang C-J, Wong AM-C, Liao C-T (2006) Prospective study of [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography and computed tomography and magnetic resonance imaging in oral cavity squamous cell carcinoma with palpably negative neck. *Journal of Clinical Oncology* **24**(27): 4371-4376
- Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, Tsujino T, Man-i M, Ikeda JI, Konishi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M (2007) Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer. *Br J Cancer* **96**(6): 986-992
- Nieberler M, Hausler P, Drecoll E, Stoeckelhuber M, Deppe H, Holzle F, Kolk A, Wolff KD, Kesting MR, Weirich G (2014) Evaluation of intraoperative cytological assessment of bone resection margins in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer cytopathology*
- Niessen CM, Gottardi CJ (2008) Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 562-571
- Nieuwenhuis EJC, Castelijns JA, Pijpers R, van den Brekel MWM, Brakenhoff RH, van der Waal I, Snow GB, Leemans CR (2002) Wait-and-see policy for the N0 neck in early-stage oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma using ultrasonography-guided cytology: is there a role for identification of the sentinel node? *Head Neck* **24**(11891961): 282-289
- Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J (2011) Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol* **99**(3): 344-348

## Literaturverzeichnis

---

Nishimaki T, Kanda T, Nakagawa S, Kosugi S-i, Tanabe T, Hatakeyama K (2002) Outcomes and prognostic factors after surgical resection of hypopharyngeal and cervical esophageal carcinomas. *Int Surg* **87**(1): 38-44

Niu J, Gu X, Ahmed N, Andrews S, Turton J, Bates R, Agrez M (2001) The alphaVbeta6 integrin regulates its own expression with cell crowding: implications for tumour progression. *Int J Cancer* **92**(1): 40-48

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994) Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* **368**(6473): 753-756

Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, Becker A, Adam M, Molls M, Dunst J, Terris DJ, Overgaard J (2005) Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol* **77**(1): 18-24

Nowak B, Di Martino E, Janicke S, Cremerius U, Adam G, Zimny M, Reinartz P, Bull U (1999) Diagnostic evaluation of malignant head and neck cancer by F-18-FDG PET compared to CT/MRI. *Nuklearmedizin* **38**(8): 312-318

O'Brien CJ, Adams JR, McNeil EB, Taylor P, Laniewski P, Clifford A, Parker GD (2003a) Influence of bone invasion and extent of mandibular resection on local control of cancers of the oral cavity and oropharynx. *Int J Oral Maxillofac Surg* **32**(5): 492-497

O'Brien CJ, Adams JR, McNeil EB, Taylor P, Laniewski P, Clifford A, Parker GD (2003b) Influence of bone invasion and extent of mandibular resection on local control of cancers of the oral cavity and oropharynx. *Int J Oral Maxillofac Surg* **32**(5): 492-497

O'Brien CJ, Lauer CS, Fredricks S, Clifford AR, McNeil EB, Bagia JS, Koulmandas C (2003c) Tumor thickness influences prognosis of T1 and T2 oral cavity cancer--but what thickness? *Head Neck* **25**(11): 937-945

O'Brien CJ, Traynor SJ, McNeil E, McMahon JD, Chaplin JM (2000) The use of clinical criteria alone in the management of the clinically negative neck among patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **126**(3): 360-365

Oft M, Heider KH, Beug H (1998) TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* **8**(23): 1243-1252

Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA (2008) Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* **68**(10): 3645-3654

Opitz OG, Suliman Y, Hahn WC, Harada H, Blum HE, Rustgi AK (2001) Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism. *J Clin Invest* **108**(5): 725-732

Orus C, Leon X, Vega M, Quer M (2000) Initial treatment of the early stages (I, II) of supraglottic squamous cell carcinoma: partial laryngectomy versus radiotherapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **257**(9): 512-516

Overgaard J, Eriksen JG, Nordsmark M, Alsner J, Horsman MR (2005) Plasma osteopontin, hypoxia, and response to the hypoxia sensitiser nimorazole in radiotherapy of head and neck cancer: results from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* **6**(10): 757-764

## Literaturverzeichnis

---

- Oxford LE, Ducic Y (2006) Intraoperative evaluation of cortical bony margins with frozen-section analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* **134**(1): 138-141
- Ozanne B, Richards CS, Hendler F, Burns D, Gusterson B (1986) Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas. *J Pathol* **149**(1): 9-14
- Paisley S, Warde PR, O'Sullivan B, Waldron J, Gullane PJ, Payne D, Liu FF, Bayley A, Ringash J, Cummings BJ (2002) Results of radiotherapy for primary subglottic squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **52**(5): 1245-1250
- Panje WR, Smith B, McCabe BF (1980) Epidermoid carcinoma of the floor of the mouth: surgical therapy vs combined therapy vs radiation therapy. *Otolaryngol Head Neck Surg* **88**(6): 714-720
- Papkoff J, Rubinfeld B, Schryver B, Polakis P (1996) Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Mol Cell Biol* **16**(5): 2128-2134
- Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, Cassisi NJ, Million RR (1997) An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **39**(1): 137-148
- Partridge M, Pateromichelakis S, Phillips E, Emilion GG, A'Hern RP, Langdon JD (2000) A case-control study confirms that microsatellite assay can identify patients at risk of developing oral squamous cell carcinoma within a field of cancerization. *Cancer Res* **60**(14): 3893-3898
- Pauleit D, Zimmermann A, Stoffels G, Bauer D, Risse J, Fluss MO, Hamacher K, Coenen HH, Langen K-J (2006) 18F-FET PET compared with 18F-FDG PET and CT in patients with head and neck cancer. *J Nucl Med* **47**(2): 256-261
- Peifer M, Polakis P (2000) Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* **287**(5458): 1606-1609
- Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A (2004a) Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* **24**(1): 306-319
- Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* **7**(6): 415-428
- Peinado H, Portillo F, Cano A (2004b) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* **48**(5-6): 365-375
- Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A (2001) A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **276**(29): 27424-27431
- Pernot M, Hoffstetter S, Peiffert D, Luporsi E, Marchal C, Kozminski P, Dartois D, Bey P (1995) Epidermoid carcinomas of the floor of mouth treated by exclusive irradiation: statistical study of a series of 207 cases. *Radiother Oncol* **35**(7480819): 177-185
- Pernot M, Luporsi E, Hoffstetter S, Peiffert D, Aletti P, Marchal C, Kozminski P, Noel A, Bey P (1997) Complications following definitive irradiation for cancers of the oral cavity and the oropharynx (in a series of 1134 patients). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **37**(3): 577-585

## Literaturverzeichnis

---

Pernot M, Malissard L, Hoffstetter S, Luporsi E, Peiffert D, Aletti P, Kozminski P, Bey P (1994) The study of tumoral, radiobiological, and general health factors that influence results and complications in a series of 448 oral tongue carcinomas treated exclusively by irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **29**(4): 673-679

Peters LJ, Goepfert H, Ang KK, Byers RM, Maor MH, Guillaumondegui O, Morrison WH, Weber RS, Garden AS, Frankenthaler RA, et al. (1993) Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of a prospective randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **26**(1): 3-11

Peters LJ, Weber RS, Morrison WH, Byers RM, Garden AS, Goepfert H (1996) Neck surgery in patients with primary oropharyngeal cancer treated by radiotherapy. *Head Neck* **18**(6): 552-559

Pfreundner L, Hoppe F, Willner J, Preisler V, Bratengeier K, Hagen R, Helms J, Flentje M (2003) Induction chemotherapy with paclitaxel and cisplatin and CT-based 3D radiotherapy in patients with advanced laryngeal and hypopharyngeal carcinomas--a possibility for organ preservation. *Radiother Oncol* **68**(2): 163-170

Piedbois P, Mazon JJ, Haddad E, Coste A, Martin M, Levy C, Raynal M, Pavlovitch JM, Peynegre R, Pierquin B (1991) Stage I-II squamous cell carcinoma of the oral cavity treated by iridium-192: is elective neck dissection indicated? *Radiother Oncol* **21**(2): 100-106

Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P (1999) TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* **112** ( Pt **24**)4557-4568

Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L (2000) Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* **355**(9208): 949-955

Plataniotis GA, Theofanopoulou ME, Kalogera-Fountzila A, Haritanti A, Ciuleanu E, Ghilezan N, Zamboglou N, Dimitriadis A, Sofroniadis I, Fountzilas G (2004) Prognostic impact of tumor volumetry in patients with locally advanced head-and-neck carcinoma (non-nasopharyngeal) treated by radiotherapy alone or combined radiochemotherapy in a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59**(4): 1018-1026

Podd TJ, Carton AT, Barrie R, Dawes PK, Roberts JT, Stassen LF, Henderson R, Macleod RL, Piggot TA (1994) Treatment of oral cancers using iridium-192 interstitial irradiation. *Br J Oral Maxillofac Surg* **32**(7947563): 207-213

Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM (2007) TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **357**(25): 2552-2561

Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**(15): 1837-1851

Politi M, Costa F, Robiony M, Rinaldo A, Ferlito A (2000) Review of segmental and marginal resection of the mandible in patients with oral cancer. *Acta Otolaryngol* **120**(5): 569-579

Porter MJ, Mclvor NP, Morton RP, Hindley AC (1998) Audit in the management of T3 fixed-cord laryngeal cancer. *Am J Otolaryngol* **19**(6): 360-364

## Literaturverzeichnis

---

Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winkquist E, Gorbounova V, Tjulandin S, Shin DM, Cullen K, Ervin TJ, Murphy BA, Racz LE, Cohen RB, Spaulding M, Tishler RB, Roth B, Viroglio Rdel C, Venkatesan V, Romanov I, Agarwala S, Harter KW, Dugan M, Cmhlak A, Markoe AM, Read PW, Steinbrenner L, Colevas AD, Norris CM, Jr., Haddad RI (2007) Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med* **357**(17): 1705-1715

Postigo AA, Dean DC (1999) ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6683-6688

Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL (2003) Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J* **22**(10): 2453-2462

Price KA, Cohen EE (2012) Current Treatment Options for Metastatic Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol*

Prieto AL, Edelman GM, Crossin KL (1993) Multiple integrins mediate cell attachment to cytotactin/tenascin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 10154-10158

Putz E, Witter K, Offner S, Stosiek P, Zippelius A, Johnson J, Zahn R, Riethmuller G, Pantel K (1999) Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* **59**(1): 241-248

Qiu W, Schonleben F, Li X, Ho DJ, Close LG, Manolidis S, Bennett BP, Su GH (2006) PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**(5): 1441-1446

Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D (1996) High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **56**(16): 3630-3633

Regelink G, Brouwer J, de Bree R, Pruijm J, van der Laan BF, Vaalburg W, Hoekstra OS, Comans EF, Vissink A, Leemans CR, Roodenburg JL (2002) Detection of unknown primary tumours and distant metastases in patients with cervical metastases: value of FDG-PET versus conventional modalities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **29**(8): 1024-1030

Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE (2005) Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol* **18**(4): 511-518

Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR, Wu JY, Guo Z, Tsao H, De Luca M, Catricala C, O'Toole KM (2002) A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol* **22**(14): 5157-5172

Ribeiro NFF, Godden DRP, Wilson GE, Butterworth DM, Woodward RTM (2003) Do frozen sections help achieve adequate surgical margins in the resection of oral carcinoma? *Int J Oral Maxillofac Surg* **32**(12729775): 152-158

Rischin D, Peters L, Fisher R, Macann A, Denham J, Poulsen M, Jackson M, Kenny L, Penniment M, Corry J, Lamb D, McClure B (2005) Tirapazamine, Cisplatin, and Radiation versus Fluorouracil, Cisplatin, and Radiation in patients with locally advanced head and neck cancer: a randomized phase II trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group (TROG 98.02). *J Clin Oncol* **23**(1): 79-87

## Literaturverzeichnis

---

Ritoe SC, Krabbe PF, Jansen MM, Festen J, Joosten FB, Kaanders JH, van den Hoogen FJ, Verbeek AL, Marres HA (2002) Screening for second primary lung cancer after treatment of laryngeal cancer. *Laryngoscope* **112**(11): 2002-2008

Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, Som P, Wolf GT (2002a) Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **128**(12117328): 751-758

Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, Som P, Wolf GT (2002b) Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **128**(7): 751-758

Roberts AB, Tian F, Byfield SD, Stuelten C, Ooshima A, Saika S, Flanders KC (2006) Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**(1-2): 19-27

Robinson KL, Macfarlane GJ (2003) Oropharyngeal cancer incidence and mortality in Scotland: are rates still increasing? *Oral Oncol* **39**(1): 31-36

Rodgers LW, Jr., Stringer SP, Mendenhall WM, Parsons JT, Cassisi NJ, Million RR (1993) Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head Neck* **15**(1): 16-19

Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Levi F, Talamini R, La Vecchia C (2004) Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol* **40**(2): 207-213

Roepman P, Wessels LF, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, Tilanus MG, Koole R, Hordijk GJ, van der Vliet PC, Reinders MJ, Slootweg PJ, Holstege FC (2005) An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet* **37**(2): 182-186

Rogers SN, Devine J, Lowe D, Shokar P, Brown JS, Vaugman ED (2004) Longitudinal health-related quality of life after mandibular resection for oral cancer: a comparison between rim and segment. *Head & Neck* **26**(1): 54-62

Roh J-L, Yeo N-K, Kim JS, Lee JH, Cho K-J, Choi S-H, Nam SY, Kim SY (2007) Utility of 2-[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography and positron emission tomography/computed tomography imaging in the preoperative staging of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* **43**(9): 887-893

Rosenthal EL, Matrisian LM (2006) Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* **28**(7): 639-648

Rosin MP, Cheng X, Poh C, Lam WL, Huang Y, Lovas J, Berean K, Epstein JB, Priddy R, Le ND, Zhang L (2000) Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* **6**(2): 357-362

Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubber B, Busch R, Hofler H, Becker KF (2002) Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* **161**(5): 1881-1891

Roy HK, Smyrk TC, Koetsier J, Victor TA, Wali RK (2005) The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer. *Dig Dis Sci* **50**(1): 42-46

## Literaturverzeichnis

---

Rubio CA (2008) Arrest of cell proliferation in budding tumor cells ahead of the invading edge of colonic carcinomas. A preliminary report. *Anticancer Res* **28**(4C): 2417-2420

Saito A, Kanai Y, Maesawa C, Ochiai A, Torii A, Hirohashi S (1999) Disruption of E-cadherin-mediated cell adhesion systems in gastric cancers in young patients. *Jpn J Cancer Res* **90**(9): 993-999

Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, Bruton R, Marsden JR, Jankowski J (1999) Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol* **52**(3): 151-157

Sanguineti G, Richetti A, Bignardi M, Corvo R, Gabriele P, Sormani MP, Antognoni P (2005) Accelerated versus conventional fractionated postoperative radiotherapy for advanced head and neck cancer: results of a multicenter Phase III study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **61**(3): 762-771

Santoro R, Franchi A, Gallo O, Burali G, de' Campora E (2008) Nodal metastases at level IIb during neck dissection for head and neck cancer: clinical and pathologic evaluation. *Head & Neck* **30**(11): 1483-1487

Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, Bhaskar V, Kistner EO, Tretiakova M, Jagadeeswaran S, Montag A, Becker A, Kenny HA, Peter ME, Ramakrishnan V, Yamada SD, Lengyel E (2008) Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res* **68**(7): 2329-2339

Schaaij-Visser TB, Bremmer JF, Braakhuis BJ, Heck AJ, Slijper M, van der Waal I, Brakenhoff RH (2010) Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. *Oral Oncol* **46**(2): 123-127

Scheel C, Onder T, Karnoub A, Weinberg RA (2007) Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior. *Cancer Res* **67**(24): 11476-11479; discussion 11479-11480

Schliephake H, Ruffert K, Schneller T (1996) Prospective study of the quality of life of cancer patients after intraoral tumor surgery. *J Oral Maxillofac Surg* **54**(6): 664-669; discussion 669-670

Schusterman MA, Harris SW, Raymond AK, Goepfert H (1993) Immediate free flap mandibular reconstruction: significance of adequate surgical margins. *Head Neck* **15**(3): 204-207

Seidenberg B, Rosenak SS, Hurwitt ES, Som ML (1959) Immediate reconstruction of the cervical esophagus by a revascularized isolated jejunal segment. *Ann Surg* **149**(2): 162-171

Seitz O, Chambron-Pinho N, Middendorp M, Sader R, Mack M, Vogl TJ, Bisdas S (2009) 18F-Fluorodeoxyglucose-PET/CT to evaluate tumor, nodal disease, and gross tumor volume of oropharyngeal and oral cavity cancer: comparison with MR imaging and validation with surgical specimen. *Neuroradiology* **51**(10): 677-686

Seiwert TY, Jagadeeswaran R, Faoro L, Janamanchi V, Nallasura V, El Dinali M, Yala S, Kanteti R, Cohen EE, Lingen MW, Martin L, Krishnaswamy S, Klein-Szanto A, Christensen JG, Vokes EE, Salgia R (2009) The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **69**(7): 3021-3031

## Literaturverzeichnis

---

Sessions DG, Spector GJ, Lenox J, Parriott S, Haughey B, Chao C, Marks J, Perez C (2000) Analysis of treatment results for floor-of-mouth cancer. *Laryngoscope* **110**(10): 1764-1772

Shah JP, Candela FC, Poddar AK (1990) The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer* **66**(1): 109-113

Shah JP, Strong E, Spiro RH, Vikram B (1981) Surgical grand rounds. Neck dissection: current status and future possibilities. *Clin Bull* **11**(1): 25-33

Sheu JJ, Hua CH, Wan L, Lin YJ, Lai MT, Tseng HC, Jinawath N, Tsai MH, Chang NW, Lin CF, Lin CC, Hsieh LJ, Wang TL, Shih le M, Tsai FJ (2009) Functional genomic analysis identified epidermal growth factor receptor activation as the most common genetic event in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **69**(6): 2568-2576

Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**(6): 685-700

Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC (2005) Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer* **103**(9): 1843-1849

Shibuya H, Hoshina M, Takeda M, Matsumoto S, Suzuki S, Okada N (1993) Brachytherapy for stage I & II oral tongue cancer: an analysis of past cases focusing on control and complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **26**(1): 51-58

Shibuya T, Morimoto K (1993) A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutat Res* **297**(1): 3-38

Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K, Garrod DR (1998) Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J Pathol* **184**(4): 369-381

Shioiri M, Shida T, Koda K, Oda K, Seike K, Nishimura M, Takano S, Miyazaki M (2006) Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* **94**(12): 1816-1822

Shpitzer T, Hamzany Y, Bahar G, Feinmesser R, Savulescu D, Borovoi I, Gavish M, Nagler RM (2009) Salivary analysis of oral cancer biomarkers. *Br J Cancer* **101**(7): 1194-1198

Slootweg PJ, Hordijk GJ, Schade Y, van Es RJJ, Koole R (2002) Treatment failure and margin status in head and neck cancer. A critical view on the potential value of molecular pathology. *Oral Oncol* **38**(12110346): 500-503

Slootweg PJ, Muller H (1989) Mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg* **17**(2): 69-74

Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, Snijders PJ, Ylstra B, van de Wiel MA, Meijer GA, Leemans CR, Brakenhoff RH (2006) Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene* **25**(17): 2558-2564

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, Turek LP (2004a) Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* **96**(6): 449-455

## Literaturverzeichnis

---

- Smith GI, O'Brien CJ, Clark J, Shannon KF, Clifford AR, McNeil EB, Gao K (2004b) Management of the neck in patients with T1 and T2 cancer in the mouth. *Br J Oral Maxillofac Surg* **42**(6): 494-500
- Smythe WR, LeBel E, Bavaria JE, Kaiser LR, Albelda SM (1995) Integrin expression in non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer Metastasis Rev* **14**(3): 229-239
- Snijders PJ, Cromme FV, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow GB, Meijer CJ, Walboomers JM (1992) Prevalence and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas, indicating a possible viral etiology. *Int J Cancer* **51**(6): 845-850
- Snow GB, Annyas AA, van Slooten EA, Bartelink H, Hart AA (1982) Prognostic factors of neck node metastasis. *Clin Otolaryngol Allied Sci* **7**(3): 185-192
- Som PM (1987) Lymph nodes of the neck. *Radiology* **165**(3): 593-600
- Som PM (1996) *Lymph Nodes*, Vol. 2, 3 edn. St. Louis: Mosby-Year Book.
- Song J (2007) EMT or apoptosis: a decision for TGF-beta. *Cell Res* **17**(4): 289-290
- Sordat I, Bosman FT, Dorta G, Rousselle P, Aberdam D, Blum AL, Sordat B (1998) Differential expression of laminin-5 subunits and integrin receptors in human colorectal neoplasia. *J Pathol* **185**(1): 44-52
- Sordat I, Rousselle P, Chaubert P, Petermann O, Aberdam D, Bosman FT, Sordat B (2000) Tumor cell budding and laminin-5 expression in colorectal carcinoma can be modulated by the tissue micro-environment. *Int J Cancer* **88**(5): 708-717
- Southam JC (1970) The extension of squamous carcinoma along the inferior dental neurovascular bundle. *Br J Oral Surg* **7**(3): 137-145
- Spiro JD, Spiro RH, Shah JP, Sessions RB, Strong EW (1988) Critical assessment of supraomohyoid neck dissection. *Am J Surg* **156**(4): 286-289
- Spiro RH, Gallo O, Shah JP (1993) Selective jugular node dissection in patients with squamous carcinoma of the larynx or pharynx. *Am J Surg* **166**(4): 399-402
- Spiro RH, Guillaumondegui O, Paulino AF, Huvos AG (1999) Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck* **21**(5): 408-413
- Spiro RH, Morgan GJ, Strong EW, Shah JP (1996) Supraomohyoid neck dissection. *Am J Surg* **172**(8988669): 650-653
- Spitzer WO, Hill GB, Chambers LW, Helliwell BE, Murphy HB (1975) The occupation of fishing as a risk factor in cancer of the lip. *N Engl J Med* **293**(9): 419-424
- Staton J, Robbins KT, Newman L, Samant S, Sebelik M, Vieira F (2002) Factors predictive of poor functional outcome after chemoradiation for advanced laryngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* **127**(1): 43-47
- Stevens CM, Huang SH, Fung S, Bayley AJ, Cho JB, Cummings BJ, Dawson LA, Hope AJ, Kim JJ, O'Sullivan B, Waldron JN, Ringash J (2011) Retrospective study of palliative radiotherapy in newly diagnosed head and neck carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **81**(4): 958-963

## Literaturverzeichnis

---

Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R (2001) E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* **154**(6): 1185-1196

Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG (1995) Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* **130**(2): 393-405

Suh JD, Sercarz JA, Abemayor E, Calcaterra TC, Rawnsley JD, Alam D, Blackwell KE (2004) Analysis of outcome and complications in 400 cases of microvascular head and neck reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **130**(8): 962-966

Sumi M, Kimura Y, Sumi T, Nakamura T (2007) Diagnostic performance of MRI relative to CT for metastatic nodes of head and neck squamous cell carcinomas. *J Magn Reson Imaging* **26**(6): 1626-1633

Sumi M, Sakihama N, Sumi T, Morikawa M, Uetani M, Kabasawa H, Shigeno K, Hayashi K, Takahashi H, Nakamura T (2003) Discrimination of metastatic cervical lymph nodes with diffusion-weighted MR imaging in patients with head and neck cancer. *AJNR Am J Neuroradiol* **24**(8): 1627-1634

Suoglu Y, Erdamar B, Katircioglu OS, Karatay MC, Sunay T (2002) Extracapsular spread in ipsilateral neck and contralateral neck metastases in laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **111**(5 Pt 1): 447-454

Syrjanen S (2005) Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**(S59-66)

Takasaki T, Akiba S, Sagara Y, Yoshida H (1998) Histological and biological characteristics of microinvasion in mammary carcinomas  $\leq 2$  cm in diameter. *Pathol Int* **48**(10): 800-805

Takes RP, Baatenburg De Jong RJ, Alles MJ, Meeuwis CA, Marres HA, Knegt PP, De La Riviere GB, De Wilde PC, Mooi WJ, Hermans J, Van Krieken JH (2002) Markers for nodal metastasis in head and neck squamous cell cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **128**(5): 512-518

Taki M, Verschueren K, Yokoyama K, Nagayama M, Kamata N (2006) Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* **28**(2): 487-496

Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, Negri E, Pasche C, Vaccarella S, Barzan L, Franceschi S (2002) Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer causes & control : CCC* **13**(10): 957-964

Tankere F, Camproux A, Barry B, Guedon C, Depondt J, Gehanno P (2000) Prognostic value of lymph node involvement in oral cancers: a study of 137 cases. *Laryngoscope* **110**(11129021): 2061-2065

Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF (2005) The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res* **65**(14): 5996-6000; discussion 6000-5991

Taylor GI (2003) The angiosomes of the body and their supply to perforator flaps. *Clin Plast Surg* **30**(3): 331-342, v

## Literaturverzeichnis

---

Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa JP, Lee JJ, Mao L (2007) Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol* **25**(16): 2164-2170

Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M (2000) Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(2): 91-100

Terrell JE, Fisher SG, Wolf GT (1998) Long-term quality of life after treatment of laryngeal cancer. The Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **124**(9): 964-971

Theveneau E, Mayor R (2012) Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev Biol*

Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**(6): 442-454

Thomas GJ, Lewis MP, Hart IR, Marshall JF, Speight PM (2001a) AlphaVbeta6 integrin promotes invasion of squamous carcinoma cells through up-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Int J Cancer* **92**(5): 641-650

Thomas GJ, Lewis MP, Whawell SA, Russell A, Sheppard D, Hart IR, Speight PM, Marshall JF (2001b) Expression of the alphavbeta6 integrin promotes migration and invasion in squamous carcinoma cells. *J Invest Dermatol* **117**(1): 67-73

Thomas GJ, Nystrom ML, Marshall JF (2006) Alphavbeta6 integrin in wound healing and cancer of the oral cavity. *J Oral Pathol Med* **35**(1): 1-10

Thomsen JB, Sorensen JA, Grupe P, Karstoft J, Krogdahl A (2005) Staging N0 oral cancer: lymphoscintigraphy and conventional imaging. *Acta Radiol* **46**(5): 492-496

Tishler RB PM, Wirth LJ, Balboni T, Costello R, Goguen L, Annino D, Livada N, Norris CM, Haddad RI (2008) Cetuximab added to docetaxel, cisplatin, 5-fluorouracil induction chemotherapy (C-TPF) in patients with newly diagnosed locally advanced head and neck cancer: A phase I study. In *ASCO Annual Meeting Proceedings*.

To EWH, Tsang WM, Cheng J, Lai E, Pang P, Ahuja AT, Ying M (2003) Is neck ultrasound necessary for early stage oral tongue carcinoma with clinically N0 neck? *Dentomaxillofac Radiol* **32**(3): 156-159

Torres-Rendon A, Stewart R, Craig GT, Wells M, Speight PM (2009) DNA ploidy analysis by image cytometry helps to identify oral epithelial dysplasias with a high risk of malignant progression. *Oral Oncol* **45**(6): 468-473

Totsuka Y, Usui Y, Tei K, Fukuda H, Shindo M, Iizuka T, Amemiya A (1991) Mandibular involvement by squamous cell carcinoma of the lower alveolus: analysis and comparative study of histologic and radiologic features. *Head Neck* **13**(1): 40-50

Tschudi D, Stoekli S, Schmid S (2003) Quality of life after different treatment modalities for carcinoma of the oropharynx. *Laryngoscope* **113**(11): 1949-1954

Tse JC, Kalluri R (2007) Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem* **101**(4): 816-829

Tupchong L, Scott CB, Blitzer PH, Marcial VA, Lowry LD, Jacobs JR, Stetz J, Davis LW, Snow JB, Chandler R, et al. (1991) Randomized study of preoperative versus

## Literaturverzeichnis

---

postoperative radiation therapy in advanced head and neck carcinoma: long-term follow-up of RTOG study 73-03. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **20**(1): 21-28

Turner SL, Slevin NJ, Gupta NK, Swindell R (1996) Radical external beam radiotherapy for 333 squamous carcinomas of the oral cavity--evaluation of late morbidity and a watch policy for the clinically negative neck. *Radiother Oncol* **41**(1): 21-29

Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, Setoyama T, Matsumoto M, Ishigami S, Aikou T (2005) Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **11**(3): 1174-1180

Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC (2002) Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* **40**(2): 127-132

Urken ML, Moscoso JF, Lawson W, Biller HF (1994) A systematic approach to functional reconstruction of the oral cavity following partial and total glossectomy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **120**(6): 589-601

Urken ML, Weinberg H, Vickery C, Buchbinder D, Lawson W, Biller HF (1991) Oromandibular reconstruction using microvascular composite free flaps. Report of 71 cases and a new classification scheme for bony, soft-tissue, and neurologic defects. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **117**(7): 733-744

Usami Y, Satake S, Nakayama F, Matsumoto M, Ohnuma K, Komori T, Semba S, Ito A, Yokozaki H (2008) Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J Pathol* **215**(3): 330-339

Van Cann EM, Koole R, Oyen WJ, de Rooy JW, de Wilde PC, Slootweg PJ, Schipper M, Merkx MA, Stoeltinga PJ (2008) Assessment of mandibular invasion of squamous cell carcinoma by various modes of imaging: constructing a diagnostic algorithm. *Int J Oral Maxillofac Surg* **37**(6): 535-541

van den Brekel MW, Castelijns JA, Snow GB (1998) Diagnostic evaluation of the neck. *Otolaryngol Clin North Am* **31**(4): 601-620

van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, Kummer JA, Meijer CJ, van Leeuwen B, Denkers F, Smeele LE, Snow GB, Brakenhoff RH (2001) Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* **93**(2): 232-235

van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Kummer JA, Denkers F, Dijkstra J, Leemans R, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH (2002) Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *J Pathol* **198**(4): 476-486

Vandenbrouck C, Sancho-Garnier H, Chassagne D, Saravane D, Cachin Y, Micheau C (1980) Elective versus therapeutic radical neck dissection in epidermoid carcinoma of the oral cavity: results of a randomized clinical trial. *Cancer* **46**(2): 386-390

Varner JA, Cheresh DA (1996) Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* **8**(5): 724-730

Vermorcken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, Stewart JS, Jelic S, Betka J, Preiss JH, van den Weyngaert D, Awada A, Cupissol D, Kienzer HR, Rey A, Desauois I, Bernier J, Lefebvre JL (2007) Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med* **357**(17): 1695-1704

## Literaturverzeichnis

---

Vidiri A, Guerrisi A, Pellini R, Manciocco V, Covello R, Mattioni O, Guerrisi I, Di Giovanni S, Spriano G, Crecco M (2010) Multi-detector row computed tomography (MDCT) and magnetic resonance imaging (MRI) in the evaluation of the mandibular invasion by squamous cell carcinomas (SCC) of the oral cavity. Correlation with pathological data. *J Exp Clin Cancer Res* **29**(73)

Vidiri A, Ruscito P, Pichi B, Pellini R, Covello R, Sperduti I, Di Giovanni S, Spriano G, Crecco M (2007) Oral cavity and base of the tongue tumors. Correlation between clinical, MRI and pathological staging of primary tumor. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **26** (4)(575-582)

Vikram B, Strong EW, Shah JP, Spiro R (1984) Failure in the neck following multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg* **6**(3): 724-729

Villaret DB, Futran NA (2003) The indications and outcomes in the use of osteocutaneous radial forearm free flap. *Head Neck* **25**(6): 475-481

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK (1993) Head and neck cancer. *N Engl J Med* **328**(3): 184-194

Voulgari A, Pintzas A (2009) Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* **1796**(2): 75-90

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**(1): 12-19

Wang C, Huang H, Huang Z, Wang A, Chen X, Huang L, Zhou X, Liu X (2011) Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **40**(7): 545-551

Wang D, Song H, Evans JA, Lang JC, Schuller DE, Weghorst CM (1997) Mutation and downregulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis* **18**(11): 2285-2290

Warner GC, Cox GJ (2003) Evaluation of chest radiography versus chest computed tomography in screening for pulmonary malignancy in advanced head and neck cancer. *J Otolaryngol* **32**(12866595): 107-109

Wei FC, Celik N (2003) Perforator flap entity. *Clin Plast Surg* **30**(3): 325-329

Wei FC, Jain V, Celik N, Chen HC, Chuang DC, Lin CH (2002) Have we found an ideal soft-tissue flap? An experience with 672 anterolateral thigh flaps. *Plast Reconstr Surg* **109**(7): 2219-2226; discussion 2227-2230

Weijers M, Snow GB, Bezemer PD, van der Wal JE, van der Waal I (2002) The clinical relevance of epithelial dysplasia in the surgical margins of tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma: an analysis of 37 patients. *J Oral Pathol Med* **31**(11896817): 11-15

Weinberg RA (2008) Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence. *Nat Cell Biol* **10**(9): 1021-1023

Weinreb PH, Simon KJ, Rayhorn P, Yang WJ, Leone DR, Dolinski BM, Pearse BR, Yokota Y, Kawakatsu H, Atakilil A, Sheppard D, Violette SM (2004) Function-blocking

## Literaturverzeichnis

---

integrin alphavbeta6 monoclonal antibodies: distinct ligand-mimetic and nonligand-mimetic classes. *J Biol Chem* **279**(17): 17875-17887

Weisberger EC, Hilburn M, Johnson B, Nguyen C (2001) Intraoperative microwave processing of bone margins during resection of head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **127**(7): 790-793

Weiss MH, Harrison LB, Isaacs RS (1994) Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N0 neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **120**(7): 699-702

Wen CP, Tsai MK, Chung WS, Hsu HL, Chang YC, Chan HT, Chiang PH, Cheng TY, Tsai SP (2010) Cancer risks from betel quid chewing beyond oral cancer: a multiple-site carcinogen when acting with smoking. *Cancer Causes Control* **21**(9): 1427-1435

Werner J (2002) *Lymphknotenerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich. Onkologie und Differentialdiagnostik*, Heidelberg: Springer.

Wiener E, Pautke C, Link TM, Neff A, Kolk A (2006a) Comparison of 16-slice MSCT and MRI in the assessment of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Eur J Radiol* **58**(1): 113-118

Wiener E, Pautke C, Link TM, Neff A, Kolk A (2006b) Comparison of 16-slice MSCT and MRI in the assessment of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Eur J Radiol* **58**(1): 113-118

Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX (2002) Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* **21**(10): 1510-1517

Wolfensberger M, Zbaeren P, Dulguerov P, Muller W, Arnoux A, Schmid S (2001) Surgical treatment of early oral carcinoma-results of a prospective controlled multicenter study. *Head Neck* **23**(7): 525-530

Wolff D, Hassfeld S, Hofele C (2004a) Influence of marginal and segmental mandibular resection on the survival rate in patients with squamous cell carcinoma of the inferior parts of the oral cavity. *J Craniomaxillofac Surg* **32**(5): 318-323

Wolff D, Hassfeld S, Hofele C (2004b) Influence of marginal and segmental mandibular resection on the survival rate in patients with squamous cell carcinoma of the inferior parts of the oral cavity. *J Craniomaxillofac Surg* **32**(5): 318-323

Wolff KD, Stellmach R (1995) The osteoseptocutaneous or purely septocutaneous peroneal flap with a supramalleolar skin paddle. *Int J Oral Maxillofac Surg* **24**(1 Pt 1): 38-43

Wong RJ, Keel SB, Glynn RJ, Varvares MA (2000) Histological pattern of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* **110**(1): 65-72

Woolgar JA (2006) Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **42**(3): 229-239

Woolgar JA, Rogers SN, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED (2003) Cervical lymph node metastasis in oral cancer: the importance of even microscopic extracapsular spread. *Oral Oncol* **39**(12509965): 130-137

## Literaturverzeichnis

---

Woolgar JA, Triantafyllou A (2005) A histopathological appraisal of surgical margins in oral and oropharyngeal cancer resection specimens. *Oral Oncol* **41**(10): 1034-1043

Wynder EL, Bross IJ, Feldman RM (1957) A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer* **10**(6): 1300-1323

Wysluch A, Stricker I, Holzle F, Wolff KD, Maurer P (2010) Intraoperative evaluation of bony margins with frozen-section analysis and trephine drill extraction technique. A preliminary study. *Head Neck*

Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Hosokawa M, Imai K (2001) Expression of the gamma(2) chain of laminin-5 at the invasive front is associated with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **7**(4): 896-900

Yamazaki H, Inoue T, Teshima T, Tanaka E, Koizumi M, Kagawa K, Imai A, Yoshida K, Shiomi H, Shimizutani K, Furukawa S, Fuchihata H, Nakamura H (1998) Tongue cancer treated with brachytherapy: is thickness of tongue cancer a prognostic factor for regional control? *Anticancer Res* **18**(2B): 1261-1265

Yang GY, Xu KS, Pan ZQ, Zhang ZY, Mi YT, Wang JS, Chen R, Niu J (2008) Integrin alpha v beta 6 mediates the potential for colon cancer cells to colonize in and metastasize to the liver. *Cancer Sci* **99**(5): 879-887

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**(7): 927-939

Yang J, Mani SA, Weinberg RA (2006) Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* **66**(9): 4549-4552

Yang J, Weinberg RA (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* **14**(6): 818-829

Yen T-C, Chang JT-C, Ng S-H, Chang Y-C, Chan S-C, Wang H-M, See L-C, Chen T-M, Kang C-J, Wu Y-F, Lin K-J, Liao C-T (2005) Staging of untreated squamous cell carcinoma of buccal mucosa with 18F-FDG PET: comparison with head and neck CT/MRI and histopathology. *J Nucl Med* **46**(5): 775-781

Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, Tsutsumi S, Tomonari M, Taki M, Hosokawa H, Nagayama M (2003) Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* **22**(4): 891-898

Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hoteiya T, Ueda N, Fujimoto R, Nagayama M (2001) Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol* **37**(1): 65-71

Yoo GH, Xu HJ, Brennan JA, Westra W, Hruban RH, Koch W, Benedict WF, Sidransky D (1994) Infrequent inactivation of the retinoblastoma gene despite frequent loss of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **54**(17): 4603-4606

Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, Weiss SJ (2005) Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem* **280**(12): 11740-11748

## Literaturverzeichnis

---

Yu S, Li J, Li Z, Zhang W, Zhao J (2006) Efficacy of supraomohyoid neck dissection in patients with oral squamous cell carcinoma and negative neck. *American Journal of Surgery* **191**(1): 94-99

Yuen AP, Lam KY, Wei WI, Ho CM, Chow TL, Yuen WF (2000) A comparison of the prognostic significance of tumor diameter, length, width, thickness, area, volume, and clinicopathological features of oral tongue carcinoma. *Am J Surg* **180**(2): 139-143

Yuen AP, Wei WI, Lam LK, Ho WK, Kwong D (1997) Results of surgical salvage of locoregional recurrence of carcinoma of the tongue after radiotherapy failure. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **106**(9): 779-782

Yuen AP, Wei WI, Wong SH, Ng RW (1998) Local recurrence of carcinoma of the tongue after glossectomy: patient prognosis. *Ear Nose Throat J* **77**(3): 181-184

Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R (2003) BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* **9**(7): 964-968

Zeilefsky MJ, Harrison LB, Fass DE, Armstrong JG, Shah JP, Strong EW (1993) Postoperative radiation therapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx: impact of therapy on patients with positive surgical margins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **25**(1): 17-21

Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, Wang LE, Eicher SA, Strom SS, Frazier ML, Spitz MR, Wei Q (2001a) Cyclin D1 polymorphism and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Carcinogenesis* **22**(8): 1195-1199

Zheng Z, Park JY, Guillemette C, Schantz SP, Lazarus P (2001b) Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* **93**(18): 1411-1418

Zlobec I, Lugli A (2010) Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget* **1**(7): 651-661

zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**(5): 342-350

### Danksagung:

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Wolff und bei Herrn Prof. Dr. Dr. Hölzle bedanken, mich mit der Problemstellung betraut zu haben. Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn PD. Dr. Dr. Kesting für die Betreuung der Arbeit. Vielen Dank an alle beteiligten Mitarbeiter des Pathologischen Instituts der Technischen Universität München. Die Arbeit war nur durch eine enge Kooperation und durch interdisziplinären Austausch möglich. Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Schenck, Frau PD. Dr. Specht und Frau Dr. Drecoll. Herrn PD. Dr. Weirich ist insbesondere zu verdanken, dass die Methode als Routinediagnostik klinisch etabliert werden konnte.

Vielen Dank, dass die Arbeit im Rahmen der folgenden Kongresse vorgestellt werden konnte:

62. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie (AGKi) und 33. Jahrestagung des Arbeitskreises für Oralpathologie und Oralmedizin (AKOPOM)

62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (DGMKG)

43. Jahrestagung des Deutsch - Österreichisch - Schweizerischen Arbeitskreises für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK)

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, der diese Arbeit gewidmet ist.