

Aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. J. Schipper

Cyclin B1 Expression und p53 Status in Plattenepithelkarzinomen des
Kopf-Hals-Bereiches

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kornelia-Marina Okulicz

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ.- Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. T. K. Hoffmann
Korreferent: Univ.- Prof. Dr. med. B. Homey

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	4
1.1 Zellzyklusregulation	4
1.2 Kopf-Hals-Karzinome	5
2. Fragestellung und Zielsetzung	12
3. Material und Methoden	14
3.1 Patienten	14
3.2 Immunhistochemie für Cyclin B1 und p53	14
3.3 p53 Mutationsanalyse	15
3.4 Statistische Auswertung	16
4. Ergebnisse	17
4.1 Klinisch-pathologische Charakteristika der Patienten	17
4.2 Cyclin B1 Expression	18
4.3 Zusammenhang zwischen Cyclin B1 und klinisch-pathologischen Parametern	20
4.4 p53 Expression und Mutationsanalyse	22
4.5 Zusammenhang zwischen p53 Status und klinisch-pathologischen Parametern	23
4.6 Zusammenhang zwischen Cyclin B1 Expression und p53 Status	24
5. Diskussion	26
6. Zusammenfassung	29
7. Danksagung	30
8. Literaturverzeichnis	31
9. Lebenslauf	38

1. Einleitung

1.1 Zellzyklusregulation

Für das Jahr 2002 wurden weltweit mehr als 500.000 bösartige Neuerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich registriert (Parkin et al. 2005). Histologisch handelt es sich hierbei in über 90 % um Plattenepithelkarzinome, deren wichtigstes Kennzeichen ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen darstellt. In gesunden Zellen wird der Zellzyklus durch Cycline kontrolliert. Diese Zellproteine gehen mit den dazugehörigen Cyclin-abhängigen Kinasen (cdks) eine Bindung ein und initiieren einen Komplex, der die Abläufe im Zellzyklus genau reguliert. Cyclin A, D und E regulieren den Ablauf von der G1- zur S-Phase, in der die DNS der Zelle repliziert wird, während Cyclin A und B die Passage von der G2- zur M-Phase regulieren. Insbesondere ist der Eintritt der Zelle in die Mitose durch Cyclin B1 reguliert, das mit cdk2 einen Komplex eingeht, der in den Nukleus gelangt (Nurse et al. 1990, Hunt et al. 1991). Während cdk2 während des gesamten Zyklus im Cytoplasma vorhanden ist, wird die Synthese und Deaktivierung von Cyclin B1 als der Hauptmechanismus für die Aktivierung des Cyclin B1 / cdk2-Komplexes angenommen. Demzufolge resultiert eine übermäßige oder fehlerhafte Ausbildung von Cyclin B1 in einem vorzeitigen Mitoseeintritt, unkontrollierter Zellproliferation und einem schlechteren Differenzierungsgrad von Karzinomen (Kushner et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass in Tumorzellen Cyclin B1 bereits in der G1-Phase exprimiert wird (Shen et al. 2004) und eine Überexpression von Cyclin B1 konnte in Mamma-, Kolon-, Prostata-, Bronchial-, Ösophagus- und Mundhöhlenkarzinomen festgestellt werden (Mashal et al. 1996; Kawamoto et al. 1997; Wang et al. 1997; Kushner et al. 1999; Soria et al. 2000) und korrelierte mit dem Tumorstadium (Allan et al. 2000), der Aggressivität der Tumorzellen (Hassan et al. 2002; Dong et al. 2002) und schließlich der Prognose (Murakami et al. 1999). Je fortgeschrittener das Stadium war, desto höher war die Cyclin B1 Expression im Cytoplasma und umso aggressiver das biologische Verhalten der Tumorzellen. Die Überexpression von Cyclin D 1 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ist in der Vergangenheit bereits häufig festgestellt worden (Michalides et al. 1995; Bartkova et al. 1995; Bellacosa et al. 1996; Kotelnikov et al. 1997). Allerdings ist bis heute noch wenig zu der Cyclin B1 Expression und der Ausbildung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und seiner daraus folgenden klinischen Bedeutung bekannt. Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, dass Cyclin B1 häufiger in Plattenepithelkarzinomen überexprimiert wird, als in anderen selteneren Malignomen des Kopf-Hals-Bereiches (Soria et al. 2000).

Ein weiteres Zellprotein, dessen fehlerhafte Ausbildung bzw. Mutation mit dem Entstehen von Plattenepithelkarzinomen in Zusammenhang gebracht werden kann, ist das Tumorsuppressorgen p53 (Reiss et al. 1992; Somers et al. 1992; Koch et al. 1996). Es

kodiert für ein kurzlebiges intranukleäres Protein, das auch als „Genomwächterprotein“ bezeichnet wird (Riede et al. 2004). Kommt es durch den Einfluss externer Noxen wie z.B. Tabak oder Alkohol zu DNA-Schäden, so reichert sich das von p53 kodierte Protein sehr schnell an und aktiviert die Transkription weiterer Gene, deren Produkte im Zusammenwirken mit p53 wiederum folgende Hauptwirkungen aufweisen:

1. Zellzyklus-Arrest: p53 bewirkt die Transkription des cdk-Inhibitors p21, der über eine Hemmung des Cyclin-cdk-Komplexes die inaktivierende Phosphorylierung von pRB110 verhindert. Dadurch macht die Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus eine Pause. Diese nutzt sie, indem sie über eine p53 vermittelte Transkription des in die DNA-Reparatur involvierten „Growth-Arrest-and-DNA-Damage-inducible“-Proteins (GADD45) den DNA-Schaden wieder ausbessert. Danach schaltet p53 das mdm2-Gen ein und inaktiviert sich damit selbst. Gelingt dies der Zelle nicht, wird sie von p53 auf den „Friedhof“ geschickt (Riede et al. 2004).

2. Apoptose: In diesem Fall aktiviert p53 das bax-Protein und das IGF-BP3 (insulin-like growth factor). Dabei antagonisiert das bax-Protein das Apoptose-Hemmprotein bcl-2 und der programmierte Zelltod wird eingeleitet (Riede et al. 2004).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass p53 als so genannter „Wächter des Genoms“ den Zellzyklus bei eingetretenen DNA-Schäden unterbricht bzw. bei nicht erfolgreicher DNA-Reparatur die Apoptose der Zelle einleitet.

p53 ist ein bekannter Marker von Plattenepithelkarzinomen verschiedenen Ursprungs (Taylor et al. 2001; Mashal et al. 1996; Hoffmann et al. 2002). Als wichtiger Wächter am G2/M-Übergang blockiert es den Übertritt der Zelle in die Mitosephase, indem es die cdk2-Kinase inhibiert und damit die Transkription von cdk2 und Cyclin B1 supprimiert (Park et al. 2000; Taylor et al. 2001). Ist das Gen, das für p53 kodiert, mutiert oder fehlerhaft ausgebildet, dann entfällt diese Kontrollfunktion im Zellzyklus, was in einer ungehemmten Proliferation der betroffenen Zelle resultiert. Taylor et al. stellten fest, dass p53 in Zellen die einem erhöhten zellulären Stress ausgesetzt waren, den Eintritt in die Mitose blockierte wenn die DNS bei Eintritt in die G2-Phase defekt oder unvollständig repliziert wurde. Einen wichtigen Schritt in diesem Zyklusarrest am G2-Checkpunkt stellt die Inaktivierung der cdk2-Kinase dar, die zum Teil in der Unterdrückung der Transkription von cdk2 und Cyclin B1 durch p53 resultiert (Park et al. 2000)

1.2 Kopf-Hals-Karzinome

Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches gehen in über 90% der Fälle vom Plattenepithel aus. Klassifiziert werden folgende anatomische Bezirke: Lippe, Mundhöhle, Pharynx (Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx), Larynx (Supraglottis, Glottis, Subglottis), Nasenhaupthöhle, die Nasennebenhöhlen, die großen Speicheldrüsen (Glandula parotis, Glandula submandibularis, Glandula sublingualis), die kleinen Speicheldrüsen, sowie die

Schilddrüse. Der Lymphabfluss der genannten Organe erfolgt über die regionalen Halslymphknoten der Level I bis VI (Robbins et al. 1991). Die regionalen Lymphknoten sind im Falle einer Metastasierung meist zuerst betroffen und fallen infolge der Vergrößerung und Verhärtung den Betroffenen nicht selten als erstes Symptom auf. Meist ist die Vergrößerung einseitig und schmerzlos. Weitere Symptome sind abhängig vom Sitz des Primärtumors und machen sich demzufolge unterschiedlich bemerkbar.

Beim sogenannten CUP-Syndrom (Carcinoma of Unknown Primary) handelt es sich um eine histologisch gesicherte Metastase eines malignen Tumors in einem oder mehreren Lymphknoten einer oder beider Halsseiten, wobei der zugehörige Primärtumor erst einige Zeit nach der Therapie der Metastase(n), post mortem oder gar nicht gefunden wird. Meist handelt es sich auch bei diesen Tumoren um Plattenepithelkarzinome. Nicht selten wird doch ein korrespondierender Primärtumor im Bereich des Waldeyer'schen Rachenrings, des Zungengrundes, Nasopharynx, Hypopharynx oder der Schilddrüse lokalisiert. Männer sind deutlich häufiger von einem CUP-Syndrom betroffen. Der Altersgipfel liegt um das 55.-65. Lebensjahr, jedoch werden auch zunehmend Fälle im jüngeren Lebensalter beobachtet. Die Symptomatik dieser Tumore ist abhängig von der Lokalisation des Primärtumors, meistens kommt es aber zu gar keinen Symptomen und nur selten zu lokalen Schmerzen. Die weiterfolgende Diagnostik mit Ziel der Suche nach dem Primärtumor ist sehr vielseitig (Panendoskopie, Blindproben, Positronen-Emissions-Tomographie) und nicht selten erfolglos. Wenn kein Primärtumor gefunden werden kann, richtet sich die Therapie der Metastase(n) nach strengen Leitlinien (z.B. Neck dissection und Radiotherapie).

Als Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches ist ein meist langjähriger Alkohol- und Tabakmissbrauch zu nennen. Auch Schnupftabak wird als exogene Noxe genannt. Malignome, die im beruflichen Zusammenhang mit Stäuben von Hartholz, Textilien und Stoffen aus der Lederindustrie stehen, werden als Berufskrankheiten anerkannt. Auch Dämpfe und Gase, z.B. bei Schweiß- und Lötarbeiten, Farben, Lacke, Lösungsmittel, organische Dämpfe, Schneideöle, Dieselabgase und Radioisotope können einen gewerblichen Hintergrund haben, der unbedingt zu erfragen und gegebenenfalls als Berufskrankheit zu melden ist. Des Weiteren sind organische und anorganische Reagenzien, wie z.B. Nickel, Chromate, Arsen, Pestizide, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Dioxine und Stoffe aus der Petrochemie als Berufskrankheit anerkannt. Als endogene Faktoren werden genetische und insbesondere ethnische Faktoren diskutiert. So ist in Japan die höchste Inzidenz von bösartigen Tumoren der Nasenhaupt- und der Nasennebenhöhlen zu verzeichnen. Ebenso treten die Karzinome bevorzugt im höheren Lebensalter, vor allem im 6. und 7. Lebensjahrzehnt auf und bevorzugen das männliche Geschlecht (2:1).

Als Risikofaktor des undifferenzierten, lymphoepithelialen Karzinoms (Schmincke-Tumor) spielt eine Epstein-Barr-Virus-Infektion eine wichtige Rolle. Hier sollte bei Verdacht eine

EBV-Antikörper-Titerbestimmung vorgenommen werden. Eine IgA-Erhöhung steht bei lymphoepithelialen Karzinomen im Gegensatz zu einer IgM/IgG-Erhöhung bei infektiöser Mononukleose im Vordergrund.

Erwähnenswert ist ein erhöhtes Auftreten von synchronen oder metachronen Zweitkarzinomen bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, das auf den gleichen Einfluss der o.g. Noxen auf die Schleimhäute zurückzuführen ist.

Eine Infektion mit humanen Papilloma Viren (HPV), insbesondere der high risk-Typen gelten als fakultative Präkanzerose für oropharyngeale Karzinome. Histologisch sind Papillome Neubildungen und entsprechen nicht einer Reaktionsform auf einen chronisch-entzündlichen Reiz. Sie gehen im Sinne eines Multistep-Vorganges aus Vorstufen, wie schweren Dysplasien über in ein Carcinoma in situ, und schließlich folgt der Durchbruch der Basalmembran und der Übergang in ein invasives Karzinom. Durch den rasanten Fortschritt molekularbiologischer Techniken konnten nach und nach unterschiedliche HPV-Typen identifiziert und charakterisiert werden. Typisch für HPV ist ihr ausgeprägter Epitheliotropismus, d.h. der Befall von Epithelgewebe. In einigen seltenen Fällen konnte ihr Genom jedoch auch in mesenchymalen Zellen des Stromas gefunden werden (Unger et al. 1996). Dabei unterteilt man die unterschiedlichen HPV-Typen grob in solche, die bevorzugt die Haut befallen und solche, die eher die Schleimhäute des Anogenitaltraktes sowie des oberen Aerodigestivtraktes infizieren. Üblicher ist dagegen die Einteilung der HPV in sogenannte „low risk-“ und „high risk-“ Typen. Die Bezeichnung high risk rührt daher, dass bestimmte HPV-Typen oft in Karzinomen der Zervix uteri und anderen Neoplasien des weiblichen als auch des männlichen unteren Genitaltraktes gefunden werden. Zu den high risk-Typen zählen vor allem die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68 (Nindl et al. 1999). Obwohl der Begriff genitale HPV eine allgemein gewöhnliche Bezeichnung für die high risk-Typen ist, können sie auch mehrere nicht-genitale Regionen des menschlichen Körpers infizieren. Dazu gehören der obere Aerodigestivtrakt, hier vor allem der Oropharynx bzw. die Tonsillen (Haraf et al. 1996, Paz et al. 1997, Gillison et al. 2000), daneben aber auch z.B. die Konjunktiven. Die sogenannten low risk-HPV-Typen zeigen dagegen eine ausgeprägte Assoziation zu benignen Läsionen. Die typischen benignen Läsionen, die durch low risk-HPV-Typen verursacht werden, sind die Condylomata acuminata („Feigwarzen“), verursacht durch die HPV-Typen 6 und 11 (Daling et al. 1986). Der Nachweis von low risk-HPV-Typen in Karzinomen stellt dagegen eine Rarität dar, dennoch werden sie aber auch alleine wie auch in Gesellschaft mit high risk-HPV-Typen in dysplastischen prämaligen Läsionen wie z.B. der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) angetroffen (Nuovo et al. 1998).

Die Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches werden nach der TNM-Klassifikation (UICC 2002) eingeteilt. Klassifiziert werden die oben genannten anatomischen Bezirke und ihre

Unterbezirke. Des Weiteren wird die klinische TNM-Klassifikation (cTNM) und die pathologische TNM-Klassifikation (pTNM) berücksichtigt. Die klinische TNM-Klassifikation beschreibt eine Stadieneinteilung gemäß der Ausbreitung des Primärtumors (T-Kategorie), der regionalen Lymphknoten (N-Kategorie) und der Fernmetastasen (M-Kategorie).

Das T charakterisiert den Primärtumor wie folgt:

TX: Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0: Kein Anhalt für einen Primärtumor

Tis: Carcinoma in situ

T1, T2, T3, T4 müssen für die jeweilige Region, gemäß ihrer Ausbreitung gesondert klassifiziert werden.

Die regionalen Lymphknoten werden wie folgt beschrieben:

NX: Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0: Keine regionalen Lymphknotenmetastasen vorhanden

N1: Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung

N2: Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, oder in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, oder in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung.

N2a: Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, mehr als 3cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung.

N2b: Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung.

N2c: Metastase(n) in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung

N3: Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung.

Fernmetastasen, die M-Kategorie, sind für alle Kopf-Halsregionen gleich definiert.

MX: Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

M0: Keine Fernmetastasen

M1: Fernmetastasen sind vorhanden

Der histopathologische Differenzierungsgrad, die sogenannte G-Kategorie, ist ebenso für alle Kopf-Halslokalisationen gleich definiert:

GX: Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden.

G1: Gut differenziert

G2: Mäßig differenziert

G3: Schlecht differenziert

G4: Undifferenziert

Die R-Klassifikation beschreibt als letztes Kriterium das Fehlen oder Vorhandensein von Residualtumor nach der Therapie. Die Definitionen gelten für alle Kopf-Halslokalisationen.

RX: Kein Residualtumor

R1: Mikroskopischer Residualtumor

R2: Makroskopischer Residualtumor

Eventuell werden zusätzliche Methoden zur Erhöhung der Genauigkeit benutzt.

Ziel der TNM-Klassifikation ist nicht nur eine standardisierte Methode zur Beschreibung und Dokumentation der Tumore, aber auch eine einheitliche Regelung zum benötigten Staging und zur Therapie der Tumore. Des Weiteren können Aussagen zur Prognose des Patienten in den unterschiedlichen Stadien gemacht werden. Daher ist eine sorgfältige Klassifikation nach TNM bei allen Malignomen des Menschen eine unerlässliche Maßnahme. Das multimodale Therapiekonzept der Kopf-Halstumore basiert auf der beschriebenen TNM-Klassifikation. Zuvor ist jedoch ein Staging des Patienten unerlässlich und beinhaltet eine ausführliche Diagnostik. Dabei ist zuerst eine sorgfältige Anamnese (auch Familien- und Berufsanamnese) und klinische Untersuchung mit Erhebung des HNO-Status durchzuführen. Sie beinhaltet eine Palpation und B-Scan Sonografie der Halsweichteile. Eine Funktionsprüfung der Hirnnerven kann deren Befall ausschließen. Eine Mikrolaryngoskopie (MLS), beziehungsweise eine Panendoskopie dient zum Nachweis von Tumorausdehnung, Infiltrationstiefe und Ausschluss eines synchronen Zweitkarzinoms. Ergänzend erfolgt während der MLS die Entnahme von Biopsien und anschließend eine histologische Aufarbeitung der entnommenen Proben. Weiterhin sind Röntgenuntersuchungen des Thorax zur Erfassung von Fernmetastasen und eine Computertomographie sowie eine Magnetresonanztomographieaufnahme durchzuführen. Letztere stellen sehr zuverlässig die Tumorausdehnung, -durchbruch und eventuelle Metastasen dar und sind für eine anschließende Operationsplanung unbedingt notwendig. In Einzelfällen dient die Knochenszintigraphie einem Ausschluss von ossärer Infiltration. Ein interdisziplinäres Konsil der Inneren Medizin ergänzt das Tumorstaging durch eine Abdomensonographie und ggf. eine CT des Thorax. Die Positronen-Emissions-Tomographie, bzw. die PET-CT, die sich zur Bilderzeugung den vermehrten Uptake von injizierter 18-Fluorodesoxyglucose in stoffwechselaktivem Gewebe (Tumor, Entzündung) zu Nutze machen, sind die jüngsten bildgebenden Verfahren und haben gegenwärtig ihren Schwerpunkt in der Tumordiagnostik. Ist die notwendige Diagnostik veranlasst und der Primärtumor histologisch gesichert und gemäß der TNM-Klassifikation eingeteilt worden, erfolgt im Anschluss die stadiengerechte Therapie. Allgemein gesagt ist der Therapiestandard der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches für operable Tumore die primäre Resektion und je nach Stadium und Histologie die adjuvante Radio-, bzw. Radiochemotherapie. Bei nicht resektablen Tumoren oder Vorliegen von multiplen Fernmetastasen wird standardmäßig eine primäre

Radiochemotherapie durchgeführt mit gegebenenfalls anschließender Salvage-OP. Die zytostatische Therapie allein wird meist bei palliativen Ansätzen gewählt. Das allgemeine Prinzip der Tumorchirurgie und somit auch der operativen Therapie von Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches besteht in der Entfernung des Tumors und seiner Lymphabflusswege im Gesunden. Defektschäden nach ausgedehnten Resektionen bedürfen oftmals einer anschließenden plastischen Rekonstruktion (z.B. Radialislappen, Musculus pectoralis major Lappen). Operative Verfahren werden nicht nur in kurativer sondern auch in palliativer Intention eingesetzt (z.B. zur Verbesserung der Lebensqualität bei nicht komplett resezierbaren Primärtumoren, bei Rezidivtumoren oder als laserchirurgische Verkleinerung der Tumormasse). Bei der operativen Therapie des Primärtumors wird oftmals gleichzeitig eine Entfernung verschiedener Lymphknotengruppen durchgeführt (Neck dissection), deren Ausmaß von vielen Begleitfaktoren abhängig ist (z.B. Metastasierungswege, Lokalisation und Ausdehnung des Primärtumors, Anzahl, Lokalisation und Größe der Lymphknotenmetastasen u.a.). Das Prinzip der Neck dissection ist die vollständige Entfernung aller Lymphknoten und -bahnen zwischen Schlüsselbein und Schädelbasis einschließlich des umgebenden Fett- und Bindegewebes einer oder beider Halsseiten. Als Formen der Neck dissection stehen zur Verfügung:

Radikale Neck dissection

Modifiziert radikale Neck dissection

Selektive Neck dissection

Erweiterte radikale Neck dissection

Die Radikale Neck dissection besteht in der Halsweichteilausräumung aller fünf Lymphknotengruppen (Level I-V) mit Entfernung wichtiger nicht lymphatischer Strukturen. Dazu wird der Musculus sternocleidomastoideus, die Vena jugularis interna und der Nervus accessorius gezählt. Die modifizierte radikale Neck dissection beinhaltet die Resektion aller fünf Lymphknotengruppen mit Erhalt einer oder mehrerer der genannten, nicht lymphatischen Strukturen. Die in den letzten Jahrzehnten in der Mehrzahl der Fälle bewährte selektive Neck dissection beschreibt die Resektion von mindestens zwei, aber weniger als fünf Lymphknotengruppen (z.B. Level II-III) und Erhalt aller bzw. von mindestens einer nicht lymphatischen Struktur. Bei der erweiterten radikalen Neck dissection werden zusätzliche Lymphknotengruppen (z.B. intraparotideale Lymphknoten) oder nicht lymphatische Strukturen, wie z.B. Schilddrüse, Nerven, Arteria carotis externa entfernt.

Eine Strahlen- oder die kombinierte Radiochemotherapie steht Patienten bei Operationsverweigerung, bei allgemeiner oder lokaler Inoperabilität und als Palliativmaßnahme zur Verfügung. Die Radiotherapie wird entweder als alleiniges Verfahren angewandt oder aber im Rahmen adjuvanter oder neoadjuvanter Therapieprotokolle. Zum Einsatz kommt in der Regel ein perkutanes Bestrahlungsverfahren. Bestrahlt wird nicht nur

die Tumorregion, sondern auch der regionale Lymphabflussweg. Dazu sind Dosen von ca. 50-70 Gy üblich. Analog dem operativen Vorgehen kann auch die Radiotherapie als kurative oder palliative Maßnahme eingesetzt werden. Die Indikationen zur Radiotherapie sind vielfältig und von weiteren Faktoren abhängig (z.B. vorausgegangene Bestrahlung bei einem Rezidiv, Infiltration von lebenswichtigen Strukturen u.a.). Hauptindikation für eine kombinierte Radiochemotherapie sind Tumore, die inoperabel sind oder organerhaltend therapiert werden sollen. Da die Langzeitergebnisse solcher Tumore bei alleiniger Bestrahlung unbefriedigend sind, werden simultan zur Radiotherapie neben radiosensibilisierenden Substanzen auch Zytostatika gegeben. Zum Einsatz kommen dabei vor allem 5-Fluorouracil (5-FU) und Cisplatin aber auch Carboplatin, Taxane und Mitomycin. Vorteile der simultanen Therapie liegen in einer höheren lokoregionären Tumorfreiheit und in der Organerhaltung. Nachteilig wirken sich dagegen therapieassoziierte Nebenwirkungen wie z.B. Mukositis und Osteonekrose aus (Olmi et al. 2003). Eine alleinige zytostatische Therapie wird derzeit nur in palliativer Intention durchgeführt und auch nur dann, wenn keine Optionen auf eine chirurgische oder Radiotherapie bestehen (z.B. lokoregionäres Rezidiv mit Fernmetastasen). Wirksamkeit zeigten Cisplatin, Carboplatin, 5-FU, MTX (Methotrexat), Ifosfamid, Cyclophosphamid, Paclitaxel und Vincaalcaloide. Bei einem palliativen Therapiekonzept ist zusätzlich auf eine ausreichend suffiziente Analgesie zu achten. Häufig ist bei tumorbedingter Einschränkung der Nahrungspassage zusätzlich die Indikation zur operativen Anlage einer Perkutanen-endoskopischen Gastrostomie (PEG) zur Sicherstellung der enteralen Ernährung gegeben.

Trotz nicht zu unterschätzender Fortschritte bei Operationen, Radio- und Chemotherapie fortgeschrittener Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches, ist die Prognose dieser Tumore immer noch äußerst unbefriedigend (Argiris et al. 2008, Marur et al. 2008). Verantwortlich hierfür ist die Tatsache, dass die Patienten oftmals erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung den Arzt aufsuchen, der dann die erforderlichen diagnostischen und therapeutischen Schritte in die Wege leitet. Die Prognose der bösartigen Neubildungen des Kopf-Hals-Bereiches ist von vielen Faktoren abhängig. Wichtig ist die Histologie und das histopathologische Grading, der Lymphknotenbefall und die Lokalisation des Tumors. Umso näher dieser an der Schädelbasis gelegen ist, desto ungünstiger ist die Prognose. Aber auch das Alter des Patienten, sein Ernährungszustand und Begleiterkrankungen sind relevant. Die Prognose für Kopf-Hals-Tumore ist vor allem für junge Patienten besonders ungünstig, da im Laufe des Lebens häufig Rezidive oder Zweitkarzinome auftreten. Demzufolge ist es von besonderer Relevanz, die Tumore detailliert zu charakterisieren, um das Outcome für die betroffenen Patienten in Zukunft verbessern zu können (Alfredo et al. 2009).

2. Fragestellung und Zielsetzung

In gesunden Zellen wird der Zellzyklus durch Cycline kontrolliert. Diese Zellproteine verbinden sich mit Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk) und leiten jeweils den nächsten Schritt der Zellteilung ein. Cyclin B1 geht mit cdk2 einen Komplex ein, gelangt in den Nukleus und leitet den Übergang zur Mitosephase ein. Eine Überexpression von Cyclin B1 resultiert daher in einer ungebremsten Mitose, und damit ungebremsten Fortschreiten der Zellteilung. Eine unkontrollierte Proliferation ist ein Kennzeichen maligner Entartung. Je mehr sich die Tumorzelle vom Ausgangsgewebe durch voranschreitende Teilung entdifferenziert hat, desto aggressiver ist das biologische Verhalten des Tumors. So sind G1-Tumore, also gut differenzierte Tumore dem Ausgangsgewebe sehr ähnlich, während undifferenzierte G4-Tumore kaum Ähnlichkeit mehr mit dem Ausgangsgewebe zeigen. Das p53 Onkoprotein ist ein wichtiges Zellprotein, das Zellzyklusabläufe genauestens reguliert. In normalen Zellen reguliert p53 bei DNA-Fehlern am G2/M-Checkpunkt den Eintritt der Zelle in die Mitosephase, indem es cdk2 inhibiert. Da die cdk2-Kinase und Cyclin B1 wie oben beschrieben einen Komplex eingehen, der die Mitose einleitet, kommt es bei Einschreiten von p53 zur Unterdrückung von Cyclin B1 und zum Zellzyklusarrest. Diesen nutzt die Zelle dann zur DNA-Reparatur. Daher ist p53 auch als Genomwächterprotein bekannt. Ein fehlerhaftes p53 infolge Genmutation oder -deletion kommt in Plattenepithelkarzinomen gehäuft vor. Bei Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ist in fast allen Fällen das Tumorsuppressorgen, das für p53 kodiert, mutiert oder fehlerhaft ausgebildet (Reiss et al. 1992; Somers et al. 1992; Koch et al. 1996, Balz et al.). Mutationen können zu einer Anhäufung von fehlerhaftem p53 in den Zellen führen. Folglich kann eine p53 Überexpression ein Indikator für ein fehlerhaftes und funktionsunfähiges p53 sein.

Eine genaue detaillierte Charakterisierung der Tumore ist für die Prognose der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches von großer Relevanz. In der Vergangenheit sind viele mögliche Einflussfaktoren und Kennzeichen der Tumore, die dafür von Bedeutung sein könnten, untersucht worden. Der Einfluss einer unkontrollierten Mitose infolge einer Cyclin B1 Überexpression in Tumorzellen ist bis dato noch nicht abschließend geklärt worden. Eine daraus resultierende übermäßige Zellproliferation und eine zusätzlich fehlende Unterdrückung des Zellzyklusarrestes durch ein fehlerhaftes p53 führt zu einer ungebremsten Zellteilung und einem aggressiveren biologischen Verhalten, welches eine wichtige Aussage zur Prognose dieser Tumore machen kann. Daher ist nicht nur die Höhe der Cyclin B1 Expression, sondern auch der damit in unmittelbarem Zusammenhang stehende Einfluss durch ein mutiertes und damit fehlerhaftes p53, für das biologische Verhalten der Zellen und die daraus resultierende Dignität der Tumore von besonders hohem klinischen Interesse. Relevant ist ob eine Cyclin B1 Überexpression und der p53

Status der Zelle in Zukunft als prognostischer Tumormarker genutzt werden kann. Wir untersuchten einen möglichen Zusammenhang zwischen p53 Akkumulation und Cyclin B1 Überexpression. Weiterhin sollen in der vorliegenden Arbeit mögliche Zusammenhänge zwischen einem vermehrten Auftreten von Cyclin B1 im Cytoplasma von Tumorzellen und anderen klinisch-pathologischen Faktoren der betroffenen Patienten untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausprägung von Cyclin B1 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches untersucht. In Tumorproben von 26 Patienten mit unterschiedlichen Tumorlokalisationen wurden Cyclin B1 und p53 mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Weiterhin wurde der p53 Status durch eine genetische Mutationsanalyse der p53 Exone 5-8 (sog. Hotspots) bestimmt. Schließlich wurden die Ergebnisse untereinander und mit klinisch-pathologischen Faktoren der Patienten in Bezug gebracht.

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

In der vorliegenden Studie wurde Tumorgewebe von 26 Patienten (22 Männer und 4 Frauen) mit histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches untersucht. Alle Patienten wurden im Hillman Cancer Center der Universität Pittsburgh, USA behandelt. Die Tumoren wurden gemäß der TNM-Klassifikation, in Anlehnung an die Klassifikation der UICC von 1997 eingeteilt (TNM classification on malignant tumors, 5th edition 1997, Wittekind, C., Wagner, G. (eds.), Springer Verlag, Berlin) und stadiengerecht mit einer operativen Tumoresektion und eventuell adjuvanter Radiochemotherapie behandelt. Im Hinblick auf Rezidive wurde eine Nachbeobachtungszeit von 4,2 Jahren festgelegt. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose von Fernmetastasen nicht betroffen (M0). Als Kontrollgewebe diente das den Tumor umgebende gesunde Epithel. Die klinisch-pathologischen Charakteristika der untersuchten Patienten können der Tabelle 1 entnommen werden.

3.2 Immunhistochemie für Cyclin B1 und p53

Von allen Patienten standen entsprechende Gewebeproben der Tumore zur Verfügung. Die Präparate wurden als Paraffinblöcke vom Medical Center der Universität Pittsburgh, USA freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Histologie jedes Operationspräparates war zuvor von Pathologen (S. Finkelstein, T.L. Whiteside, Pittsburgh, USA) gesichert worden. Anschließend wurden aus dem Operationspräparat Gewebeabschnitte, die repräsentative Ausschnitte der invasiven Plattenepithelkarzinome enthielten, für die weitergehende Immunhistochemie ausgewählt. Als interne Nicht-Tumorkontrolle diente in dem Operationspräparat das den Tumor umgebende gesunde Gewebe/Epithel.

Für die anschließende immunhistochemische Färbung wurden die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeproben in 3-5 µm dicke Scheiben geschnitten, auf einen Adhäsionsobjektträger (Histo Bond® Superior, Marienfeld) überführt und über Nacht bei einer Temperatur von 37°C im Wärmeschrank luftgetrocknet. Im Anschluss an die Lufttrocknung erfolgten eine Entparaffinisierung und Rehydrierung der Präparate durch eine absteigende Alkoholreihe wie nachfolgend beschrieben. Zunächst wurden die Objektträger für 2 mal 10 Minuten in eine mit Xylol gefüllte Glasküvette eingetaucht, danach für 2 mal 5 Minuten in reinem Alkohol, für 5 Minuten in 96%-igen Alkohol und zuletzt für 5 Minuten in 70%-igen Alkohol. Ebenso wurde mit den Kontrollpräparaten verfahren.

Für die p53 Immunhistochemie wurde ein Antikörper von p53, D0-77 (Dako, Carpinteria, CA) eingesetzt, der ein Epitop am N-Terminus zwischen den Aminosäuren 35-45 erkennt und mit dem p53-Wildtyp und den meisten mutierten Formen des Proteins reagiert. Um p53 sichtbar

zu machen, wurde unter Berücksichtigung der Anwendungshinweise des Herstellers (Dako) die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode durchgeführt. Die gefärbten Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop nach der Intensität ihrer Färbung (p53 Anhäufung) folgenderweise eingeteilt. Der Tumor wurde als p53-positiv bewertet, wenn mehr als 25% der Tumorzellen eine Färbung von 2+ und mehr auf einer festgelegten Skala von 0-4+ zeigten. Als negatives Kontrollpräparat diente ein IgG-Isotyp-Antikörper in derselben Konzentration.

Die immunhistochemische Ermittlung von Cyclin B1 wurde mit dem Anti-Cyclin B1 Antikörper GNS-1 (BD PharMingen) wie bereits beschrieben (Kao et al. 2001) durchgeführt. Auch hier wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode nach Dako angewandt. Die Beurteilung der Färbung aller 26 Präparate wurde von zwei unabhängigen Untersuchern (Oliviera Finn, Pittsburgh, USA und Thomas K. Hoffmann, Düsseldorf) vorgenommen und wie im Folgenden eingeteilt: In gesunden Epithelzellen zeigten sich Zellen mit nukleärer Anfärbung in den basalen und parabasalen Schichten des Zellverbandes. Sie markierten Areale mit einer hohen Mitosesrate. Nur wenige Zellen zeigten eine cytoplasmatische Anfärbung. Im Gegensatz dazu zeigten die Tumorproben weitaus überwiegend eine cytoplasmatische Cyclin B1 Expression. Einzelne Zellen mit Cyclin B1 Expression im Cytoplasma waren in den gesamten Tumorealen verteilt.

Gruppe 1 enthielt Gewebeproben, die keine oder nur eine geringe Anfärbung der Zellen und dementsprechend eine niedrige Cyclin B1 Expression zeigten. Der Gruppe 2 wurden Präparate zugeteilt, in der die Intensität der Färbung der Zellen stärker war und somit eine hohe Cyclin B1 Expression anzeigte. Analog wurden die Kontrollpräparate bewertet, die allerdings keine merkliche cytoplasmatische Färbung in der Reaktion zeigten.

3.3 p53 Mutationsanalyse

Für die Bestimmung des p53 Status der Gewebeproben wurden diese durch Pathologen (T.L. Whiteside, S. Finkelstein, Pittsburgh, USA) untersucht und Tumor-repräsentative Areale für die Mutationsanalyse ausgewählt sowie aufbereitet. Dafür wurden die Proben mit einer finalen Konzentration von 100µg/ml für 2 Stunden mit Proteinase K behandelt und anschließend 5 Minuten lang gekocht, um die restliche Proteaseaktivität zu entfernen. Anschließend wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die gewonnenen PCR Produkte wurde durch Elektrophorese in 4% Agarosegel aufgespalten und die mit Ethidium-Bromid gefärbten Banden wurden herausgeschnitten und anschließend isoliert. Für die DNA Sequenz wurden antisense PCR Primer für jedes Exon mit (33P) dATP als Reporter Molekül verwendet. Die Sequenzanalyse wurde abgelesen, nachdem die Autoradiogramme eine Nacht lang 6%-igem Polyacrylamidgel ausgesetzt waren (Hoffmann et al. 2002).

3.4 Statistische Auswertung

Um die Zellen mit Cyclin B1 Expression und die restlichen Zellen des betroffenen Epithels vergleichen zu können, wurde die Intensität der Färbung berücksichtigt und als Grundlage für weitere Untersuchungen zwei Kategorien für die Cyclin B1 Expression festgelegt.

Mögliche Zusammenhänge zwischen der Cyclin B1 Expression bzw. p53 mit klinisch-pathologischen Parametern wurden mittels parameterfreien Wilcoxon Mann Whitney Test untersucht. Testergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als signifikant bewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Klinisch-pathologische Charakteristika der Patienten

Alle relevanten klinisch-pathologischen Parameter der 26 untersuchten Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches sind in Tabelle 1 dargestellt.

Charakteristika		Patienten
Geschlecht		
	weiblich	4
	männlich	22
Alter		
	Bereich (Jahre)	54-94
	Median (Jahre)	73,8
Tumorlokalisation		
	Mundhöhle	4
	Oropharynx	5
	Hypopharynx	2
	Larynx	13
	Lippe	1
	CUP	1
T-Status		
	T1	7
	T2	9
	T3	1
	T4	8
	Tx (entspricht CUP)	1
N-Status		
	N0	18
	N1	4
	N2	4
	N3	0
Fernmetastasen		
	M0	26
	M1	0
Differenzierung		
	gut differenziert (G1)	3
	mäßig differenziert (G2)	16
	schlecht differenziert (G3)	7
Rezidiv		
	ja	7
	nein	19

Tabelle 1

Klinisch-pathologische Parameter von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches

Es wurden insgesamt 22 Männer und 4 Frauen in einem mittleren Alter von 73,8 Jahren (Median von 54-94 Jahren) in die Arbeit einbezogen. Aus den insgesamt 26 histologisch untersuchten und histopathologisch bestätigten Plattenepithelkarzinomen entstammten 4 Tumore der Mundhöhle, 5 dem Oropharynx, 2 dem Hypopharynx, 13 dem Larynx, 1 Karzinom der Lippe und die letzte Tumorprobe wurde als Lymphknotenmetastase eines unbekanntes Primärtumors, als CUP-Syndrom eingeteilt (Tx). Entsprechend des durchgeführten histopathologischen Gradings waren 3 Tumore als gut differenziert (G1), 16 als mäßig differenziert (G2) und schließlich 7 als schlecht differenzierte Plattenepithelkarzinome (G3) bewertet worden. Alle Fälle wurden gemäß der TNM-Klassifikation eingeteilt, die eine Ausdehnung des Primärtumors, die regionalen Lymphknoten und seine eventuellen Fernmetastasen berücksichtigt. Daraus ging hervor, dass insgesamt 7 der untersuchten Tumore einem T1-Stadium, 9 einem T2-Stadium, ein Tumor einem T3-Stadium und 8 einem T4-Stadium zuzuordnen waren. Das CUP-Syndrom entspricht einem Tx. 18 Patienten hatten zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Lymphknotenmetastasen (N0), 4 Patienten wiesen ein N1- und 4 weitere Betroffene ein N2-Stadium auf. Keiner der 26 untersuchten Patienten wies zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Fernmetastasen auf (M0). Allerdings entwickelten 7 der insgesamt 26 berücksichtigten Patienten (27%) ein lokales Tumorrezidiv innerhalb der Nachbeobachtungszeit von 4,2 Jahren.

4.2 Cyclin B1 Expression

Die immunhistochemische Analyse von Cyclin B1 in 26 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches zeigte, dass Cyclin B1 in allen Tumorproben exprimiert wurde. Cyclin B1 wurde ebenfalls im normalen Epithelverband der Kontrollpräparate und im Bereich außerhalb des Tumoreals demarkiert, jedoch zeigte sich grundsätzlich ein anderes Muster der Färbung. Im normalen Epithel mit gesunden Zellen zeigten diese eine nukleäre Anfärbung nur in den basalen und parabasalen Schichten des Zellverbandes (Abbildung 1). Sie markierten Areale mit einer hohen Mitosesrate. Nur vereinzelte Zellen zeigten eine cytoplasmatische Anfärbung. Da sich gesundes Plattenepithel von den basalen Schichten aus regeneriert und entsprechend dort die Proliferationsraten im Vergleich zu den restlichen Zellen im Verband erhöht sind, scheint es verständlich, dass in den genannten Arealen hohe Konzentrationen an nukleärem Cyclin B1 markiert wurden. Im Gegensatz dazu, zeigten die Tumorbereiche in der immunhistochemischen Färbung v.a. eine cytoplasmatische Cyclin B1 Expression. Einzelne Zellen mit Cyclin B1 Expression im Cytoplasma waren in den gesamten Tumorealen verteilt. Abbildung 2 zeigt exemplarisch die cytoplasmatische Cyclin B1 Expression in einzelnen Tumorzellen.

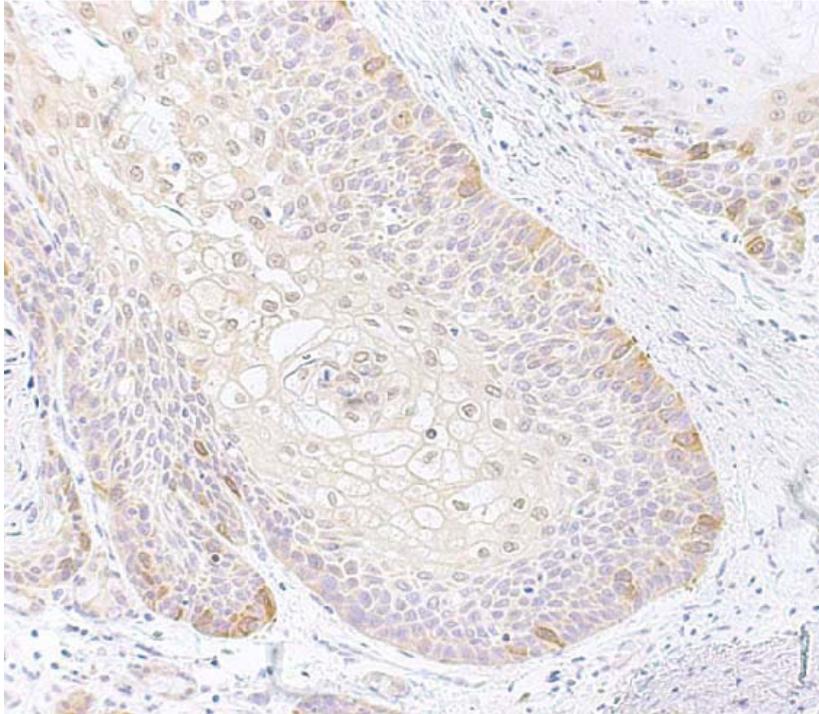


Abbildung 1

In gesundem, den Tumor umgebenden Gewebe sind nur die basalen und parabasalen Epithelschichten in ihren Kernen reich an Cyclin B1 und markieren regenerierungsfähiges Gewebe im Zellverband.

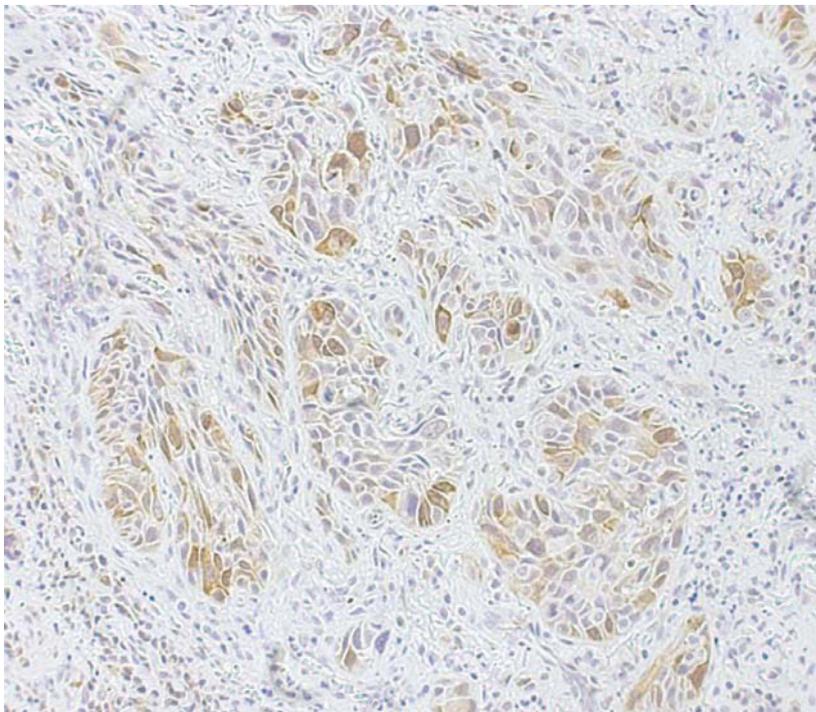


Abbildung 2

Cytoplasmatische Cyclin B1 Expression in Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereiches. Einzelne Zellen im Tumorgewebe zeigen eine cytoplasmatische Anfärbung für Cyclin B1.

Die Tatsache, dass sich die Cyclin B1 Expression im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Epithel nicht nur in der Stärke der Ausprägung, aber auch in ihrer Lokalisation maßgeblich unterscheidet zeigt, dass Tumorgewebe ungehemmt proliferiert und die Zelle ihre Kontrollfunktion über den Zellzyklus eingebüßt hat.

Die cytoplasmatische Cyclin B1 Expression in den 26 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches wurde in 2 Kategorien unterschieden. Kategorie 1 mit schwacher Anfärbung der Zellen und Kategorie 2 mit starker Cyclin B1 Expression. Letztgenannte steht für eine Überexpression von Cyclin B1 Protein in einzelnen Zellen in den Tumorarealen.

Die immunhistochemische Analyse der 26 Präparate zeigte, dass in 14 Tumoren (53,8%) eine schwache Färbung im Cytoplasma der Zellen vorherrschte. Diese Tumoren wurden der Kategorie 1 gemäß einer schwachen Cyclin B1 Expression zugeordnet.

Zur zweiten Gruppe zählen 12 Präparate (46,2%) mit einer starken Intensität der Färbung in den betroffenen Zellarealen. Sie repräsentieren die Kategorie 2 mit einer Cyclin B1 Überexpression der Tumorzellen. So sind demnach 14 Karzinome (53,8%) der Kategorie 1, und 12 Karzinome (46,2%) der Kategorie 2 zuzuordnen.

4.3 Zusammenhang zwischen Cyclin B1 und klinisch-pathologischen Parametern

Es wurden mögliche Zusammenhänge zwischen der Cyclin B1 Expression und den klinisch-pathologischen Parametern wie dem Geschlecht, Tumor-Status (T), Lymphknoten-Status (N), dem histopathologischen Differenzierungsgrad (G) und einem Rezidiv untersucht. Im Bezug zum Geschlecht der Patienten zeigten von den insgesamt 22 männlichen Patienten 12 (54,5%) eine schwache und 10 (45,5%) eine hohe Cyclin B1 Expression in den Tumorarealen. Von den 4 weiblichen Patienten die an der Studie teilnahmen, zeigten 2 (50%) eine schwache und 2 (50%) eine hohe Expression von Cyclin B1 in den Tumorpräparaten.

Weiterhin wurde die Expression von Cyclin B1 in den Tumorproben mit der Primärtumorausdehnung in Zusammenhang gebracht. Dabei ergab sich, dass von 16 Patienten mit einem T1- oder T2-Stadium des Primärtumors, 8 (50%) eine schwache und 8 (50%) eine starke Expression von Cyclin B1 in den Tumorarealen aufwiesen. 6 der 9 Patienten (67%) mit einem T3- oder T4-Karzinom exprimierten das Protein schwach (Kategorie 1). Die übrigen 3 T3- oder T4-Karzinome zeigten eine Cyclin B1 Überexpression (Kategorie 2). Der Patient mit dem CUP-Syndrom (TxN1) zeigte ebenfalls eine Cyclin B1 Überexpression (Kategorie 2).

9 von 18 Patienten (50%) ohne Lymphknotenmetastasen (N0) zeigten eine schwache und 9 (50%) eine starke Expression des untersuchten Cyclins.

Ferner zeigten 5 von 8 Patienten (67%) mit Lymphknotenbefall (N1 oder N2) eine schwache Cyclin B1 Expression in den Tumorzellen, 3 von 8 (37%) wiederum eine starke. Bei

7 Patienten trat innerhalb einer Nachbeobachtungszeit von 4,2 Jahren ein Tumorrezidiv auf. Davon waren 4 Patienten (57,1%) der Kategorie 1 und 3 Patienten (42,9%) der Kategorie 2 zuzuordnen.

Zusammenfassend konnte kein Zusammenhang zwischen der Cyclin B1 Expression und dem Geschlecht ($p=0,9020$), dem T-Status (T, $p=0,4490$), dem Lymphknoten-Status (N, $p=0,5850$) und einem Rezidiv ($p=0,5251$) festgestellt werden ($p>0,05$ für alle genannten Kategorien mittels Mann Whitney U Test).

Als Nächstes wurde der histopathologische Differenzierungsgrad der Zellen (Grading) mit der Höhe der Cyclin B1 Expression untersucht. Eine Cyclin B1 Überexpression war häufiger in schlecht differenzierten (G3) Tumoren als in mäßig (G2) oder gut differenzierten (G1) Tumoren zu beobachten. Während 71% (5/7) der schlecht differenzierten Tumore (G3) eine Cyclin B1 Überexpression zeigten, hatten nur 43% (7/16) der mäßig differenzierten Tumore (G2) und keiner (0/3) der gut differenzierten Tumore (G1) eine Cyclin B1 Überexpression (Abbildung 3). Daraus ließ sich ein Zusammenhang zwischen dem cytoplasmatischen Cyclin B1 Ausprägungsgrad in der Tumorzelle und ihrer Differenzierung feststellen, der statistisch signifikant war ($p=0,0496$). Das histopathologische Grading war signifikant höher in Tumoren mit Cyclin B1 Überexpression als in Tumoren mit schwacher Cyclin B1 Expression (Kategorie 1).

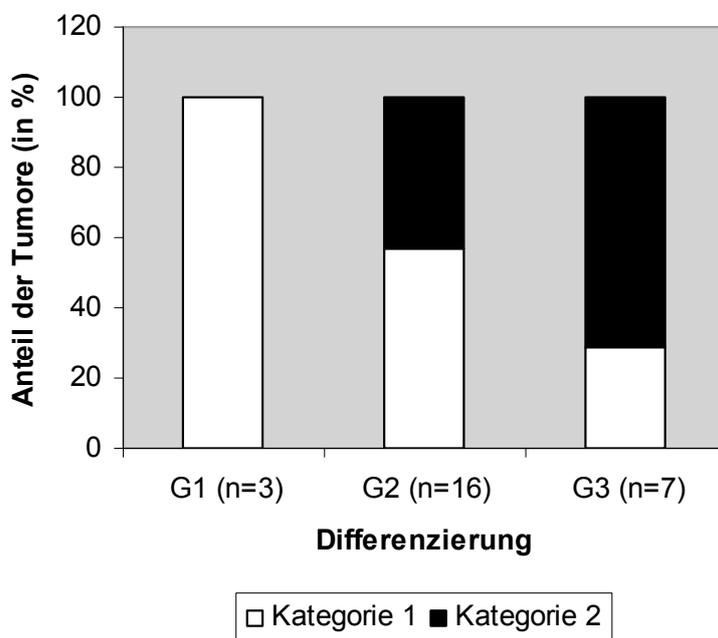


Abbildung 3

Zusammenhang zwischen der Cyclin B1 Expression und dem histopathologischen Grading in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Cyclin B1 wurde in 26 Plattenepithelkarzinomen exprimiert (Kategorie 1 = schwache Cyclin B1 Expression, Kategorie 2 = starke Cyclin B1 Expression/Überexpression). 71% der G3-Tumore zeigten eine Cyclin B1 Überexpression ($p<0,05$ im Mann Whitney U Test).

4.4 p53 Expression und Mutationsanalyse

In Plattenepithelkarzinomen ist das p53 Tumorsuppressorgen häufig mutiert oder funktionsunfähig. Daher wurde eine Mutationsanalyse von p53 durchgeführt und in Bezug zur Cyclin B1 Expression gebracht um mögliche Zusammenhänge in den Tumoren zu untersuchen. Von 25 der verfügbaren 26 Proben (Nr. 10 stand für die Untersuchung nicht zur Verfügung) wurde mit Hilfe von PCR eine Sequenzierung des p53 Genoms Exons 5-8 (Hotspots) durchgeführt. Es ergaben sich in 12 von 26 Fällen Mutationen im p53 Gen (Tabelle 2). Die übrigen 13 Fälle zeigten einen p53-Wildtyp. Insgesamt handelt es sich um 10 Punktmutationen, eine Deletion (Nr. 14) und eine Stop-Mutation (Nr. 11).

In der immunhistochemischen Analyse zeigte sich, dass p53 in 14 von 26 der untersuchten Tumorproben akkumuliert wird (53,8%, Tabelle 2). 10 dieser Präparate mit p53 Überexpression hatten in der Analyse eine Mutation im Genom. 3 Fälle (Nr. 3, 7 und 17) zeigten eine Diskrepanz zwischen dem p53-Genotyp und der p53 Expression. Die Tumore exprimierten den p53-Wildtyp aber akkumulierten das p53. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass hier eine Mutation entweder außerhalb des Exons 5-8, oder eine Mutation in Genen vorliegen könnte, die auf die Stabilität von p53 einwirken, wie z.B. mdm2 (Lane et al. 1997, Balz et al. 2003).

Patient	TNM-Status	Differenzierung	p53 Genotyp*	p53 Akkumulation**	Cyclin B1 Expression***
1	T4N0	G2	E8E271K	+	2
2	T1N0	G2	E7 R248W	+	1
3	T1N0	G3	wt	+	2
4	T2N0	G2	wt	-	2
5	T1N0	G2	wt	-	1
6	T4N1	G2	wt	-	2
7	T3N0	G2	wt	+	1
8	T1N0	G3	wt	-	2
9	T2N0	G2	Y220C	+	2
10	T4N0	G2	n.a.	+	1
11	T4N2	G2	E6 213 Stop	-	1
12	T4N0	G2	wt	-	1
13	T2N0	G3	E8R273H	+	2
14	T4N0	G2	Exon 6 Deletion	-	1
15	T4N2	G3	E5 S149C	+	1
16	T2N0	G1	E5 H168Y	+	1
17	T1N0	G1	wt	+	1
18	T2N2	G2	wt	-	1
19	T1N2	G3	wt	-	1
20	T2N0	G2	wt	-	2
21	T2N0	G2	E5 V157F	+	2
22	T2N1	G2	wt	-	1
23	T4N1	G3	E8 E286K	+	2
24	T1N0	G1	G226R	+	1
25	T2N0	G2	wt	-	2
26	TxN1	G3	E5 T150R	+	2

* Ergebnisse der p53 Mutationsanalyse

** In der immunhistochemischen Analyse zeigte sich, dass p53 in 14 von 26 der untersuchten Tumorproben akkumuliert wurde (53,8%).

*** Einteilung der Cyclin B1 Expression gemäß der festgelegten Kategorien;
Kategorie 1 = schwache Cyclin B1 Expression, Kategorie 2 = starke Cyclin B1 Expression/Überexpression

Tabelle 2

Zusammenfassung von TNM-Status, Grading, p53 Genotyp, p53 Akkumulation, sowie Cyclin B1 Expression bei 26 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.

4.5 Zusammenhang zwischen p53 und klinisch-pathologischen Parametern

Es wurden mögliche Zusammenhänge zwischen der p53 Überexpression und klinisch-pathologischen Parametern untersucht (Tabelle 3). Es konnte kein Zusammenhang zwischen einer Überexpression von p53 und dem Geschlecht des Patienten ($p=0,3054$), dem Tumor-Status (T, $p=0,8190$), dem Lymphknoten-Status (L, $p=0,2888$) oder einem Rezidiv

($p=0,8672$) gefunden werden ($p>0,05$ im Mann Whitney U Test). Die 3 G1-Tumore zeigten alle eine p53 Überexpression (100%, 3/3). Von 16 G2-Tumoren akkumulierten 6 (37,5%, 6/16) p53. Es gab 7 G3-Tumore in der vorliegenden Studie, davon zeigten 5 (71,4%, 5/7) eine p53 Überexpression.

Zusammenfassend konnte kein Zusammenhang zwischen der p53 Expression und dem histopathologischen Differenzierungsgrad der Tumore gefunden werden ($p=0,9763$) ($p>0,05$ im Mann Whitney U Test).

4.6 Zusammenhang zwischen Cyclin B 1 Expression und p53 Status

Da p53 eine bedeutende Rolle in der Regulation des Zellzyklus am G2/M-Übergang spielt, wurde der Zusammenhang zwischen dem p53 Status und der Cyclin B1 Expression in den Tumorproben untersucht. p53 fand sich in 14 von 26 Karzinomen überexprimiert (54%). In den p53-positiven Tumoren konnte in 7 von 14 Fällen (50%) eine schwache Cyclin B1 Konzentration (Kategorie 1) nachgewiesen werden. Die anderen 7 Tumorproben mit p53 Expression (50%) zeigten eine Cyclin B1 Überexpression, entsprechend Kategorie 2 (Tabelle 3). In 12 Proben von 26 Kopf-Hals-Karzinomen (46%) konnte keine p53 Akkumulation nachgewiesen werden. 7 dieser Fälle (58%) sind einer Cyclin B1 Expression der Kategorie 1 zuzuordnen, 5 (42%) der 2. Kategorie (Tabelle 3). Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Cyclin B1 Expression und der p53 Immunreaktion ($p=0,6988$).

Von den 12 Tumorproben mit Cyclin B1 Überexpression (Kategorie 2) waren 5 im p53-Wildtyp-Status ohne p53 Akkumulation (Tabelle 2). Die anderen 7 hatten entweder eine p53 Mutation im Genom oder eine p53 Akkumulation in den Zellen: 6 Tumore hatten p53 Mutationen und akkumulierten das Protein (Nr. 1, 9, 13, 21, 23 und 26). Ein Tumor (Nr. 3) zeigte keine Mutation, akkumulierte aber p53. Aus der Kategorie 1 der Cyclin B1 Expression zeigten 5 von insgesamt 13 einen Wildtyp und keine Akkumulation (Nr. 5, 12, 18, 19 und 22). 4 Tumore (Nr. 2, 15, 16, 24) zeigten eine p53 Mutation und Akkumulation, 2 Tumore (Nr. 11 und 14) zwar eine Mutation, aber keine Überexpression. Weitere 2 Tumore (Nr. 7 und 17) zeigten im Genom einen Wildtyp, aber überexprimierten das Protein.

Zusammenfassend gab es keinen wesentlichen Unterschied in Tumoren mit fehlerhaftem p53, sei es infolge einer Mutation oder Überexpression, ob die Cyclin B1 Expression niedrig (Kategorie 1) oder hoch, bzw. überexprimiert (Kategorie 2) war (Tabelle 3).

Parameter		Patienten	Cyclin B1 Expression	
			Kategorie 1 (schwach)	Kategorie 2 (stark)
Geschlecht				
	Männlich	22	12 (55%)	10 (45%)
	Weiblich	4	2 (50%)	2 (50%)
Lymphknoten-Status				
	N0	18	9 (50%)	9 (50%)
	N1-N2	8	5 (63%)	3 (37%)
Tumor-Stadium				
	T1-T2	16	8 (50%)	8 (50%)
	T3-T4	9	6 (67%)	3 (33%)
	Tx	1	0 (%)	1 (100%)
Fernmetastasen				
		0		
Differenzierung				
	G1	3	3 (100%)	0(0%)
	G2	16	9(57%)	7(43%)
	G3	7	2(29%)	5(71%)
Rezidiv				
	Nein	19	11 (58%)	8 (42%)
	Ja	7	3 (43%)	4 (57%)
p53 Überexpression				
	Nein	12	7 (58%)	5 (42%)
	Ja	14	7 (50%)	7 (50%)
p53 Mutation				
	wt	13	7 (54%)	6 (46%)
	Ja	12	6 (50%)	6 (50%)
	n.a.	1	1 (100%)	0 (0%)

Tabelle 3

Cyclin B1 Expression in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches im Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern und dem p53 Status der Patienten.

5. Diskussion

Cycline spielen eine wesentliche Rolle in der Regulierung der Zellzyklusabläufe. Während normale gesunde Zellen dieses Protein in kleinen Mengen zu einem festgelegten Zeitpunkt im Zellzyklus exprimieren, ist festgestellt worden, dass viele Tumore eine erhöhte Expression verschiedener Cycline aufweisen (Hunt et al. 1991; Kim et al. 2009; Kushner et al. 1999; Mashal et al. 1996; Nozoe et al. 2002; Soria et al. 2000). In der Vergangenheit sind in vielen Studien gezielt bestimmte Cycline in Karzinomen untersucht worden. Dabei ist vor allem der Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase während der Replikation, der durch Cyclin D1 reguliert wird, analysiert worden (Michalides et al. 1995; Bartkova et al. 1995; Bellacosa et al. 1996; Kotelnikov et al. 1997). Aber auch der Übergang von der G2- in die Mitosephase wird präzise durch Cycline reguliert. Im Falle einer fehlerhaften Funktion dieser Zellproteine kann es zu einer unkontrollierten Zellproliferation kommen. Andere Zellproteine wie das Tumorsuppressorgen p53 kontrollieren zusätzlich wichtige Schlüsselpunkte während der Zellproliferation und spielen daher zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Kanzerogenese. p53 beeinflusst die Expression von Cyclin B1 indem es die cdk2-Kinase inhibiert und damit die Transkription von cdk2 und Cyclin B1 supprimiert (Park et al. 2000; Taylor et al. 2001). Ist das Gen das für p53 kodiert, mutiert oder fehlerhaft ausgebildet, dann entfällt diese Kontrollfunktion im Zellzyklus, was in einer ungehemmten Proliferation der betroffenen Zelle resultiert. Ein Kontrollverlust der Zelle über die Proliferation ist das Merkmal in Tumorzellen. Eine Überexpression von p53 infolge einer Mutation oder Deletion und ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Cyclin B1 Expression ist daher Kernpunkt der vorliegenden Arbeit. Es wurden Gewebeproben von 26 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, des Kehlkopfes, der Lippe, des Oro- und Hypopharynx und eines CUP-Syndroms untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf eine Überexpression, sowie Veränderung der Lokalisation innerhalb der Zelle, Nukleus versus Cytoplasma, von Cyclin B1 gelegt. Anschließend wurde eine Mutationsanalyse des p53 Genoms durchgeführt und ein möglicher Zusammenhang zur Höhe der Cyclin B1 Expression in den Zellen untersucht. Daraus ergab sich, dass Cyclin B1 in 46% der Tumore überexprimiert wurde. Gesundes, den Tumor umgebendes Gewebe exprimierte Cyclin B1 vornehmlich im Zellkern der Zellen in den basalen Epithelschichten, wo es als Zellzyklusprotein seiner physiologischen Funktion nachkommt. In den Tumorpräparaten konnte Cyclin B1 im Cytoplasma einzelner Zellen ungeordnet im gesamten Tumorbereich nachgewiesen werden. Diese veränderte Lokalisation innerhalb der Zelle einerseits, und die Überexpression von Cyclin B1 andererseits, sind Hinweise für den Kontrollverlust entarteter Zellen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnte in der Vergangenheit eine Überexpression von Cyclin B1 in Mammakarzinomen gezeigt werden (Winters et al. 2001).

Darüber hinaus untersuchte eine Studie den Zusammenhang zwischen der Cyclin B1 Expression und der Wirkung von Strahlentherapie auf Plattenepithelkarzinomzellen (Hassan et al. 2002). Hier kamen die Autoren zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Höhe der Expression von Cyclin B1.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Cyclin B1 Expression und dem histopathologischen Grading der Karzinome zeigen. Es konnte hervorgehoben werden, dass eine umgekehrte Relation zwischen der Höhe der Cyclin B1 Expression und dem Differenzierungsgrad der Tumore besteht. Bemerkenswerterweise konnte keiner der gut differenzierten (G1) Tumore eine Cyclin B1 Überexpression aufweisen, während 43% der mäßig differenzierten (G2) und sogar 71% der schlecht differenzierten (G3) Tumore das Protein überexprimierten. Betrachtet man die klinischen Merkmale von Tumorgrad und –differenzierung, leitet diese Erkenntnis dazu, dass eine Cyclin B1 Expression mit einer aggressiveren Dignität des Tumors und einer schlechteren Prognose für den Patienten einhergehen kann (Cojocariu et al. 2009). Weitere klinisch-pathologische Faktoren wie das Alter, das Geschlecht, die TNM-Klassifikation und mögliche Rezidive wurden untersucht, konnten jedoch keinen Zusammenhang zur Cyclin B1 Expression oder zum p53 Status hervorheben.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde kürzlich eine große Studie mit 1348 Teilnehmern veröffentlicht, in der auch gezeigt werden konnte, dass eine Cyclin B1 Überexpression mit einer schlechteren Prognose für die Patienten einherging (Aaltonen et al. 2009). Darüber hinaus gab es übereinstimmende Aussagen zur Höhe der Cyclin B1 Expression und der Prognose in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, der Lunge und des Larynx in weiteren Veröffentlichungen (Murakami et al. 1999; Soria et al. 2000, Dong et al. 2002). Hier korrelierte ebenfalls eine hohe Cyclin B1 Expression in den Tumoren mit einer schlechteren Prognose. Studien mit höheren Studienteilnehmerzahlen sollten in Zukunft eine genauere Aussage zur prognostischen Wertigkeit von Cyclin B1 machen.

Eine p53 Überexpression infolge von Mutation kann ein Indikator für ein fehlerhaftes und funktionsunfähiges p53 sein und wird häufig in Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit hatten 54% (14 von 26) der Tumore eine p53 Überexpression. Zwei weitere Tumore zeigten zwar Genmutationen, reicherten das Protein aber nicht übermäßig an. Es gab keinen Zusammenhang zwischen einer p53 Überexpression und anderen klinisch-pathologischen Faktoren.

p53 kontrolliert in Zellen den Mitoseeintritt und reguliert Cyclin B1 in Tumorzellen (Yu et al. 2001, Innocente et al. 1999 und 2005). In dieser Studie konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer p53 Überexpression oder p53 Mutation und einer Cyclin B1 Expression gefunden werden. Eine andere Arbeit konnte übereinstimmend mit unseren

Ergebnissen auch keinen Zusammenhang zwischen dem p53 Status und einer erhöhten Cyclin B1 Expression in Mammakarzinomzellen hervorheben (Winters et al. 2001). Daraus ist folglich zu schließen, dass es sich um andere Faktoren handeln muss, die Cyclin B1 in Tumorzellen in vivo beeinflussen müssen. Dennoch zeigte eine andere kürzlich veröffentlichte Arbeit mit höheren Teilnehmerzahlen eine Assoziation zwischen den beiden genannten Proteinen in Mammakarzinomen (Aaltonen et al. 2009). Es ist in Zukunft erforderlich, dass entsprechend großen Studien mit zahlreichen Teilnehmern durchgeführt werden, damit dieser Zusammenhang auch in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches bestätigt werden kann. Zusätzlich kann dann eine verlässliche Aussage gemacht werden, ob Cyclin B1 und p53 in Zukunft als Tumormarker verlässlich genutzt werden können, um eine Prognoseaussage und/oder Therapieerfolg vorauszusagen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit eine cytoplasmatische Überexpression von Cyclin B1 einzelner Zellen in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Diese Überexpression ging mit einem höheren histopathologischen Grading, also einer schlechteren Differenzierung der Tumore einher, und legt deren Eignung als potentieller Prognosemarker, eventuell in der Kombination mit anderen Parametern, nahe.

6. Zusammenfassung

Für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches wurde kürzlich eine Überexpression des für die Zellzyklusprogression relevanten Proteins Cyclin B1 nachgewiesen. Auch das Tumorsuppressor-Genprodukt p53 hat eine bekannte Überwachungsfunktion, indem es am G2/M-Übergang durch Inhibierung der cdk2-Kinase die Ausbildung von Cyclin B1 unterdrückt.

Der bislang ungeklärte Zusammenhang zwischen einer Cyclin B1 Überexpression in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und eines infolge von Genmutation überexprimierten p53 ist Gegenstand der vorliegenden Inauguraldissertation.

Alle Tumorproben zeigten in der Immunhistochemie eine heterogene Cyclin B1 Expression die sich in solche mit schwacher, sowie solche mit Überexpression unterteilen ließ. Eine im Gegensatz zu normalem Epithel (nukleäre Färbung) gefundene cytoplasmatische Überexpression von Cyclin B1 stellte sich in fast der Hälfte (46%) der Tumorproben dar und war mit einem höheren Differenzierungsgrad (G3) der Karzinome assoziiert, wenngleich sich kein weiterer Zusammenhang zu anderen klinisch-pathologischen Parametern (Alter, Geschlecht, TNM-Stadium, Rezidivhäufigkeit) herstellen ließ. Insgesamt zeigten 71% der untersuchten G3-Tumore eine Überexpression von Cyclin B1, während dieser Kategorie keiner der gut differenzierten G1-Tumore zugewiesen werden konnte.

Eine p53 Überexpression konnte in 54% der Tumore festgestellt werden von welchen 79% eine p53 Genmutation aufwiesen. Ein Zusammenhang zwischen der Cyclin B1 und p53 Expression konnte nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigte sich eine Cyclin B1 Überexpression in fast der Hälfte der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches und war mit einer (prognostisch schlechten) höheren Tumordifferenzierung assoziiert. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass Cyclin B1 als potentieller prognostischer Biomarker verwendet werden könnte, was jedoch in prospektiven Studien mit höheren Fallzahlen bestätigt werden müsste.

7. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Thomas Hoffmann für die gute und stets geduldige Betreuung und die nötige Hilfestellung bei der vorliegenden Arbeit bedanken. Ich bedanke mich auch für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. D. Hafner danke ich für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung der Zusammenhänge.

Prof. Dr. T. L. Whiteside danke ich für die Überlassung der Tumorproben.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung und stets aufmunternden Worte und nötigen Mutzusprechungen danken.

8. Literaturverzeichnis

Aaltonen, K., Amini, R.M., Heikkilä P. et al.:

High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer

Br J Cancer 100:1055-1060, 2009

Allan, K., Jordan, R.C., Ang L.C. et al.:

Overexpression of Cyclin A and B1 Proteins in astrocytomas

Arch Pathol Lab Med 124(2):216-20, 2000

Arigis, A., Karamouzis, M.V., Raben, D. et al.:

Head and Neck Cancer

Lancet 371:1695-1709, 2008

Arduino, P.G., Carrozzo, M., Chiecchio, A. et al.:

Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases

J Oral Maxillofac Surg. 66:1570-9, 2008

Balz, V., Scheckenbach, K., Götze, K. et al.:

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):1188-91, 2003

Barbosa, M.S., Vass, W.C., Lowy, D.R. et al.:

In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential

J Virol 65:292-8, 1991

Bartkova, J., Lukas, J., Müller, H. et al.:

Abnormal Patterns of D-Type Cyclin Expression and G1 Regulation in Human Head and Neck Cancer

Cancer Res 55(4):949-956, 1995

Bellacosa, A., Almadori G., Cavallo, S. et al.:

Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications

Clin Cancer Res 2(1):175-180, 1996

Cojocariu O.M., Huguet, F., Lefevre, M. et al.:

Prognosis and predictive factors in head-and-neck cancers

Bull Cancer ;96(4):369-78. Review. French., 2009

Daling, J.R., Sherman, K.J., Weiss, N.S. et al.:

Risk factors for condyloma acuminatum in women

Sex Transm Dis 13:16-8, 1986

Dong, Y., Sui L., Watanabe, Y. et al.:

Clinical relevance of cyclin B1 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma

Cancer Lett 177(1): 13-9, 2002

Gage, J.R., Meyers, C., Wettstein, F.O. et al.:

The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties

J Virol 64:723-30, 1990

Ganzer, U., Arnold, W.,

Checkliste Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

Thieme Verlag 2005

Gillison, M.L., Koch, W.M., Capone, R.B. et al.:

Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers

J Natl Cancer Inst 92:709-20, 2000

Halbert, C.L., Demers, G.W., Galloway, D.A. et al.:

The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells

J Virol 66:2125-34, 1992

Haraf, D.J., Nodzenski, E., Brachman, D. et al.:

Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival
Clin Cancer Res 2:755-62, 1996

Harris C.C.:

Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues and rational cancer
therapeutic strategies

J. National Cancer Inst., 88:1442-1455, 1996

Hassan, K.A., Ang, K.K., El-Naggar, A.K. et al.:

Cyclin B1 overexpression and resistance to radiotherapy in head and neck squamous cell
carcinoma

Cancer Res 62:6414-6417, 2002

Hassan, K.A., El-Naggar, A.K., Soria J.C. et al.:

Clinical significance of cyclin B1 protein expression in squamous cell carcinoma of the
tongue

Clin Cancer Res 7:2458-2462, 2001

Hoffmann, T.K., Donnenberg, A.D., Finkelstein, S.D. et al.:

Frequencies of tetramer+ T cells specific for the wild-type sequence p53 264-272 peptide in
the circulation of patients with head neck cancer

Cancer Res 62:3521-9, 2002

Hoffmann, T.K., Sonkoly, E., Hauser U. et al.:

Alterations in the p53 pathway and their association with radio- and chemosensitivity in head
and neck squamous cell carcinoma

Oral Oncol. 44:1100-9, 2008

Hunt, T.:

Cyclins and their partners: From a simple idea to complicated reality

Seminars in cell biology 2:213-222, 1991

Innocente S.A., Abrahamson J.L., Cogswell J.P. et al.:

p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1

Proc Natl Acad Sci USA 96(5):2147-52, 1999

Innocente, S.A., Lee J.M.:

p53 is a NF-Y and p21-independent, Sp 1-dependent repressor of cyclin B1 transcription
FEBS Lett; 579:1001-1007, 2005

Kao, H., Marto, J.A., Hoffmann T.K. et al.:

Identification of cyclin B1 as a shared human epithelial tumor-associated antigen recognized
by T cells

J Exp Med 194(9):1313-23, 2001

Kawamoto, H., Koizumi, H., Uchikoshi T.:

Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and
malignant human breast lesions: immunocytochemical and quantitative image analyses.

Am J Pathol 150(1):15-23, 1997

Kim, J.K., Diehl, J.A.:

Nuclea cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer

J Cell Physiol 220(2):292-6, 2009

Koch, W., Brennan, J., Zahurak, M. et al.:

p53 Mutation and Locoregional Treatment Failure in Head and Neck Squamous Cell
Carcinoma

JNCI Journal of the National Cancer Institute 88(21):1580, 1996

Kotelnikov, V., Coon J.S., Mundle, S. et al.:

Cyclin D1 Expression in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck and in Oral
Mucosa in Relation to Proliferation and Apoptosis"

Clin Cancer Res 3(1):95-101, 1997

Kushner, J., Bradley, G., Young, B. et al.:

Aberrant expression of cyclin A and cyclin B1 proteins in oral carcinoma.

J Oral Pathol Med 28(2):77-81, 1999

Lane, D.P., Hall, P.A.:

MDM2-arbiter of p53's destruction

Trends Biochem. Sci., 22:372-374, 1997

Marur, S., Forastiere, A.A.:

Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment

Mayo Clin Proc 83:489-501, 2008

Mashal, R. D., Lester, S., Corless, C. et al.:

Expression of cell cycle-regulated proteins in prostate cancer.

Cancer Res 56(18):4159-63, 1996

Michalides, R., van Veelen, N., Hart, A. et al.:

Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck.

Cancer Res 55(5):975-978, 1995

Murakami, H., Furihata, M., Ohtsuki, Y. et al.:

Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma.

Virchows Arch 434(2):153-8, 1999

Nindl, I., Lotz, B., Kuhne-Heid, R. et al.:

Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non-radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay

J Clin Pathol 52:17-22, 1999

Nozoe, T., Korenaga D., Kabashima, A. et al.:

Significance of Cyclin B1 Expression as an Independent Prognostic Indicator of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus

Clinical Cancer Res 8: 817-822, 2002

Nuovo, G.J.:

Detection of human papillomavirus in Papanicolaou smears: correlation with pathologic findings and clinical outcome

Diagn Mol Pathol 7:158-63, 1998

Nurse, P.:

Universal control mechanism regulating onset of M-phase

Nature 344:503-508, 1990

Olmi, P., Crispino, S., Fallai, C. et al.:

Locoregionally advanced carcinoma of the oropharynx: conventional radiotherapy vs. accelerated hyperfractionated radiotherapy vs. concomitant radiotherapy and chemotherapy – a multicenter randomized trial.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 55:78-92, 2003

Park, M., Chae, H.D., Yun, J. et al.:

Constitutive activation of cyclin B1 associated cdc2 kinase overrides p53-mediated G2-M arrest

Cancer Res 60:542-545, 2000

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay J. et al.:

Global cancer statistics 2002

CA Cancer J Clin 55:74-108, 2005

Paz, I.B., Cook, N., Odom-Maryon, T. et al.:

Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer 's tonsillar ring

Cancer 79:595-604, 1997

Reiss, M., Brash, D.E., Munoz-Antonia, T. et al.:

Status of the p53 tumor suppressor gene in human squamous carcinoma cell lines. Oncol Res 4(8-9): 349-57, 1992

Riede, U.N., Werner, M., Schäfer, H.E. et al.:

Lehrbuch der Allgemeinen und speziellen Pathologie

Georg Thieme Verlag Stuttgart, S.350 f., 2004

Robbins, K.T., Medina J.E., Wolfe, G.T. et al.:

Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology

Arch Otolaryngol Head Neck Surg;117(6):601-5, 1991

Shen, M., Feng, Y., Gao, C. et al.:

Detection of cyclin b1 expression in g(1)-phase cancer cell lines and cancer tissues by postsorting Western blot analysis.

Cancer Res 64:1607-1610, 2004

Somers, K.D., Merrick M.A., Lopez, M.E. et al.:
Frequent p53 Mutations in Head and Neck Cancer
Cancer Res 52():5997-6000, 1992

Soria, J.C., Jang S.J., Khuri, F.R. et al.:
Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical
implication.
Cancer Res 60(15):4000-4, 2000

Takeno, S., Noguchi, T., Kikuchi, R. et al.:
Prognostic value of Cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Cancer
94(11):2874-81, 2002

Taylor, W. R., Stark, G.R.:
Regulation of the G2/M transition by p53.
Oncogene 20(15):1803-15, 2001

Unger, E.R., Vernon, S.D., Hewan-Lowe, K.O. et al.:
An unusual cervical carcinoma showing exception to epitheliotropism of human
papillomavirus
Hum Pathol 30:483-5, 1996

Wang, A., Yoshimi, N., Ino, N. et al.:
Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers
J Cancer Res Clin Oncol 123(2):124-7, 1997

Winters, Z.E., Hunt, N.C., Bradburn, M.J. et al.:
Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21(WAF1/CIP1) in breast cancer. association
and prognosis
Eur J Cancer, 2002

Yu, M., Zhan, Q., Finn, O.J.:
Immune recognition of cyclin B1 as a tumor antigen is a result of its overexpression in human
tumors that is caused by non-functional p53
Molecular immunology; 38:981-987, 2002

9. Lebenslauf

Kornelia-Marina Okulicz, geboren in Essen am 15. Oktober 1982 als Tochter der Eltern Dr. med. Grazyna Okulicz (20.12.1947) und Prof. Dr. ing. Konrad Okulicz (30.08.1946).

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: römisch-katholisch

Ausbildung:

1988 - 2002	Schulausbildung
06/2000	Amerikanisches High School Diplom, Bloomfield, Indiana, USA
06/2002	Allgemeine Hochschulreife, Luisen-Gymnasium Düsseldorf
2002 - 2003	Studium der Betriebswirtschaftslehre Justus-Liebig-Universität, Giessen; kein Abschluss
2003 - 2009	Studium der Humanmedizin
2003 - 2005	Vorklinischer Abschnitt, Ludwigs-Maximilians-Universität, München
03/2005	Ärztliche Vorprüfung
2005 - 2009	Klinischer Abschnitt, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
02/2008 – 01/2009	Medizinstudentin im Praktischen Jahr Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf
06/2008 – 10/2008	Unterassistentin der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik Kantonsspital Olten, Schweiz
06/2009	Ärztliche Prüfung
07/2009	Approbation als Ärztin
08/2009 – 09/2010	Assistenzärztin der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf
Seit 10/2010	Assistenzärztin der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik Klinikum Frankfurt Höchst

Kornelia-Marina Okulicz