

Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
(Direktorin: Prof. Dr. med. Petra Ambrosch)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNGEN ZUR KLINISCH-
PATHOLOGISCHEN BEDEUTUNG DER VER-
GLEICHENDEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN
SURVIVIN UND LOXL4-EXPRESSION
IN OROPHARYNXKARZINOMEN**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Ivo Diercks

aus Stralsund

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Tibor Görögh
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Hoffmann
Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2017
Zum Druck genehmigt, Kiel den

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes	1
1.2 Lysyloxidasen und LOXL4.....	4
1.3 Survivinexpression in Karzinomen.....	5
2 Zielsetzungen.....	7
3 Material und Methoden.....	8
3.1 Material.....	8
3.2 Methoden.....	10
3.2.1 Immunhistochemie von LOXL4 und Survivin	10
3.2.2 Gesunde Mukosa als Negativkontrolle.....	11
3.2.3 Patientendaten und Statistik.....	12
4 Ergebnisse	14
4.1 Immunhistochemischer Nachweis der LOXL4- und Survivin- Expression in Mundschleimhaut und in Karzinomen	14
4.2 Expression von LOXL4 und Survivin in Abhängigkeit der Tumorgröße (T-Stadium).....	17
4.2.1 LOXL4 Expression in Abhängigkeit der Tumorgröße	17
4.2.2 Survivin Expression in Abhängigkeit der Tumorgröße.....	19
4.3 LOXL4- und Survivin-Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus der Primärtumoren	21
4.3.1 LOXL4- Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus	21
4.3.2 Survivin-Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus.....	24

4.4	Gesamtüberleben aller Tumorpatienten in Abhängigkeit der Tumorgröße (T-Stadium).....	26
4.5	Gesamtüberleben der Tumorpatienten in Abhängigkeit der LOXL4- und Survivin-Expressionsstärke.....	28
4.5.1	Gesamtüberleben der Tumorpatienten in Abhängigkeit der LOXL4-Expressionsstärke.....	28
4.5.2	Gesamtüberleben der Tumorpatienten in Abhängigkeit der Survivin-Expressionsstärke	30
5	Diskussion	32
5.1	Genexpression von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Halsbereiches.....	32
5.2	LOXL-4 und Survivin als Diagnosemarker.....	34
5.3	LOXL-4 und Survivin als Prognosemarker.....	35
6	Zusammenfassung	38
	Literaturverzeichnis.....	39
	Danksagung.....	46
	Lebenslauf.....	47

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Immunhistologischer Nachweis von LOXL4. Tonsillenkarcinom mit fehlender- (A) und mit starker LOXL4-Expression (B). Vergrößerung (x200).....	14
Abb. 2:	Immunhistologischer Nachweis von Survivin. Tonsillenkarcinom mit fehlender- (A) und mit starker Survivin-Expression (B). Vergrößerung (x200).....	15
Abb. 3:	Gesunde Mundschleimhaut ohne Expression von Survivin (A) und LOXL4 (B) (Vergrößerung 200x)	15
Abb. 4:	LOXL4-Expression in Abhängigkeit des Tumorstadiums	18
Abb. 5:	Survivin-Expression in Abhängigkeit des T-Stadiums	21
Abb. 6:	Häufigkeitsverteilung der LOXL4-Expressionsstadien in Abhängigkeit des Nodalstatus unterteilt nach N0 und N+	23
Abb. 7:	Häufigkeitsverteilung der Survivin-Expressionsstadien in Abhängigkeit des Nodalstatus	25
Abb. 8:	Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve aller untersuchter Patienten mit Tonsillenkarcinomen (N=138)	26
Abb. 9:	Kaplan-Meier-Gesamtüberleben in Abhängigkeit des Tumorstadiums.....	27
Abb. 10:	Kaplan-Meier-Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der LOXL4-Expression unterteilt in negativ und positiv.....	29
Abb. 11:	Kaplan-Meier-Gesamtüberleben in Abhängigkeit der LOXL4-Expression unterteilt in gering und hoch.....	29
Abb. 12:	Kaplan-Meier-Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Survivin-Expression unterteilt in negativ und positiv	31
Abb. 13:	Kaplan-Meier-Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Survivin-Expression unterteilt in gering und stark	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verteilung der Patienten mit Oropharynxkarzinomen nach TNM-Klassifikation (nach UICC von 1987).....	9
Tabelle 2:	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von LOXL4- und Survivin Expression in Oropharynxkarzinomen.....	16
Tabelle 3:	Übereinstimmung der immunhistochemischen Untersuchungen von LOXL4- und Survivin Expression in Oropharynxkarzinomen.....	16
Tabelle 4:	LOXL4-Expression in Abhängigkeit des Tumorstadiums.....	17
Tabelle 5:	LOXL4 als diagnostischer Test zur Unterscheidung von Low- und High-Grade-Tumoren.....	18
Tabelle 6:	Survivin-Expression in Abhängigkeit des Tumorstadiums.....	19
Tabelle 7:	Survivin als diagnostischer Test zur Unterscheidung von Low- und High-Grade-Tumoren.....	20
Tabelle 8:	LOXL4-Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus.....	21
Tabelle 9:	LOXL4 als diagnostischer Test zur Identifizierung eines positiven Nodalstatus.....	22
Tabelle 10:	Survivin-Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus.....	24
Tabelle 11:	Survivin als diagnostischer Test zur Identifizierung eines positiven Nodalstatus.....	24
Tabelle 12:	Gesamtüberleben in Abhängigkeit des Tumorstadiums.....	27
Tabelle 13:	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der LOXL4-Expression.....	28
Tabelle 14:	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Survivin-Expression.....	30

Abkürzungsverzeichnis

COX-2	Cyclooxygenase-2
Cyfra-21	Cytokeratin-Fragment
DAKO	DAKO Deutschland GmbH / Firmenname
G	Grading System
HIF-1alpha	Hypoxia Inducible Factor
HPV	Humanes Papillom-Virus
LOX	Lysyl-Oxidasen
Mdm-2	Murine double minute-2 (Oncogene)
mRNA	Messenger ribonuclein acid
N0, Nplus	Nodi-Lymphknoten
NF-kappa-B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
P27	27kD-Protein
P53	53 kD-Protein
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
Pp1	Protein-Phosphatase-1
SRCRs	Scavenger Receptor Cystein Rich Domains
T1 - T4	Tumorstadien
TATA	(TATA-Box) DNA-Sequenzmotiv in der Promoter-Region
TBS	Tris-Buffered Saline
TNM	Tumor Nodes Metastases
UICC	Union International Contre Cancer
Y	Youden-Index

1 Einleitung

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen die Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes. Zum besseren Verständnis dieser malignen Erkrankung soll zunächst auf einige Grundlagen eingegangen werden.

1.1 Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes

Plattenepithelkarzinome sind von den Epithelien der Haut und der Schleimhäute ausgehende bösartige Tumore aus der Gruppe der Karzinome. Treten maligne Tumore im Bereich Mund und Nasenhöhle, Speicheldrüsen sowie Pharynx und Larynx auf, handelt es sich dabei zu neunzig Prozent um Plattenepithelkarzinome. Seltener sind dagegen Adenokarzinome, Sarkome oder Speicheldrüsentumore. Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes repräsentieren über 90% aller Karzinome der Kopf-Hals-Region, sowie 6% aller humaner Malignome insgesamt (Hoffmann et al. 1998).

Ätiologie:

Für die Entstehung der Karzinome im oberen Aerodigestivtrakt werden sowohl exogene als auch endogene Ursachen diskutiert. Zu den exogen wirksamen Faktoren zählen vor allem der Tabak- und Alkoholkonsum als wichtigste ätiologische Faktoren (Copper et al. 2004; Figuero Ruiz 2004; Hirano et al. 2015). Besonders gravierend ist der Alkoholabusus, da er nicht nur ein unabhängiger Risikofaktor zu sein scheint sondern auch das karzinogene Potential von Tabakrauch zu verstärken vermag. Diesbezüglich zeigen Studien, dass es abhängig von Menge und Konzentration des zu sich genommenen Alkohols zu einer zunehmenden Oberflächenschädigung des Schleimhautepithels kommt, wodurch die Aufnahme karzinogener Inhaltsstoffe des Tabakrauches erleichtert wird (Moreno-Lopez, 2000; La Vecchia et al. 1997). Betrachtet man die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen speziell im

Bereich der Mundhöhle kommen auch andauernde mechanische Irritationen, beispielsweise schlecht sitzende Prothesen, in Betracht. Des Weiteren scheint eine allgemein mangelnde Mundhygiene ebenfalls einen potentiell fördernden Einfluss auf die Karzinogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms zu haben (Moreno-López LA, 2000). Weitere potentiell förderliche Faktoren für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf- Halsbereiches sind ionisierende Strahlung, Mangelernährung (insbesondere Vitamin A- und Eisenmangel) sowie Virusinfektionen: Bei über 85% der an einem Nasopharynxkarzinom erkrankten Patienten finden sich positive Antikörperreaktionen gegen das Epstein- Barr- Virus - Kapsidantigen. Neuere Studien belegen außerdem die Rolle des Humanen-Papillom Virus (HPV) in der Onkogenese des oropharyngealen Plattenepithelkarzinoms (Neufcoeur et al. 2009; Vidal und Gillison 2008). Bei den endogenen Faktoren sind neben dem Alter, Geschlecht und Immunstatus auch die individuelle genetische Veranlagung zur Entwicklung einer Tumorerkrankung zu nennen. Es besteht ein höheres Risiko ein Karzinom im Kopf - Halsbereich zu entwickeln, wenn bereits Verwandte ersten Grades an einem solchen Tumor erkrankt sind. Ohne familiäre Prädisposition ist das Risiko geringer (Negri et al. 2009).

Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 50. und 65. Lebensjahr, wobei Männer wesentlich häufiger betroffen sind als Frauen.

Klinik:

Karzinome im Kopf-Halsbereich eröffnen je nach Lokalisation und Tumorprogress eine klinische Bandbreite, die sich von asymptomatischen Befunden mit minimalen Schleimhautveränderungen bis hin zu invasivem und aggressiv infiltrierendem Wachstum sowie einer frühen Metastasierung erstreckt. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wird jedoch bei weit über 2/3 der Patienten ein Karzinom bereits im fortgeschrittenen Stadium (Stadium III und IV) nach der *Union International Contre Cancer - Tumor Nodes Metastases* (UICC-TNM)-Klassifikation vorgefunden (Funk et al. 2002). Zu den typischen Symptomen werden Schmerzen, Fötor ex ore, Sprech-

und Mundöffnungsbehinderung sowie ausstrahlende Schmerzen zum Ohr, Unterkiefer und Hals bei Mundhöhlenkarzinomen, Nasenbluten, erschwerte Nasenatmung und anhaltende Heiserkeit bei Larynxkarzinomen gezählt. Gewichtsverlust, Fieber und Nachtschweiß sowie Tumorblutungen und Anämie können darüber hinaus typische Begleiterscheinungen sein. Differentialdiagnostisch kann eine aufgrund einer bakteriellen Superinfektion des Tumorgewebes einhergehende Schwellung der Halslymphknoten eine Abgrenzung zu Lymphknotenmetastasen erschweren (Watkinson und Gilbert 2012).

Die Anamnese und klinische Untersuchung inklusive Lymphknotenpalpation wird durch die Entnahme von Probebiopsien zur histologischen Diagnosesicherung ergänzt. Darüber hinaus sorgt eine bildgebende Diagnostik mittels Sonographie, Röntgen sowie Computer- und Magnetresonanztomographie für das Tumorstaging und die Therapieplanung. Entscheidend für die allgemeine Überlebensrate ist im Wesentlichen die Beteiligung der regionalen Lymphknoten, so dass sowohl eine Früherkennung als auch eine rechtzeitige Therapie der Erkrankung richtungweisend sind. Nach kurativer Therapie, die in der Regel aus einer chirurgischen Resektion des Tumors mit einer gegebenenfalls notwendigen Rekonstruktion des Defektes sowie bei Befall der zervikalen Lymphknoten aus einer modifiziert radikalen „neck dissection“ gefolgt von einer adjuvanten Radiochemotherapie besteht, entwickeln innerhalb von 5 Jahren wiederum etwa die Hälfte der Patienten ein lokoregionäres Rezidiv (Adelstein et al. 2000). Trotz Fortschritten in der Therapie dieser Erkrankung ist die 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium III-IV seit etwa 20 Jahren bei unter 30% unverändert niedrig (Vokes et al. 1993). Deshalb ist es zwingend notwendig, sowohl durch Präventivmaßnahmen und Aufklärung der Risikofaktoren, als auch durch Optimierung etablierter Therapien, vor allem auch die Diagnostik von Karzinomen im 5. Frühstadium zu verbessern. Durch Identifikation zusätzlicher Prognoseparameter wie zum Beispiel anhand von Biomarkern im Patientenblut oder durch Erstellung von Genexpressionsprofilen auf den Tumoren könnten Hochrisikopatienten identifiziert werden, um einer individuell angepassten Thera-

pie frühzeitig zugeführt zu werden. Als solche Prognoseparameter sind derzeit verschiedene Tumormarker wie p27, p53, Mdm2, PCNA, COX-2, Cyfra-21 sowie Survivin und die Lysyl-Oxidasen (LOX) mit ihren verschiedenen Unterformen (L1-L4) Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen (Alkotyfan et al. 2010; Chang et al. 2004; Denaro et al. 2011; Kapranos et al. 2001; Marioni et al. 2010; Sidari et al. 2003). In dieser Arbeit sollen Survivin und LOX-L4 genauer untersucht werden.

1.2 Lysyloxidasen und LOXL4

Lysyl-Oxidasen (LOX) bilden eine Enzymfamilie, die zu den kupferabhängigen Amin-Oxidasen gehören. Sie sind bekannt für die Quervernetzung von Kollagen und Umwandlung von Kollagen zu Elastin (Rucker et al. 1998; Kagan und Li 2003). Allen Lysyl-Oxidasen gemeinsam ist der Besitz eines Signalpeptids, das aber wahrscheinlich nicht essentiell für die Faltung, die katalytische Funktion und die Sekretion des jeweiligen Proteins ist (Kagan et al. 1995). Diesen Enzymen wurden auch weitere Funktionen im intrazellulären und sogar im intranukleären Bereich zugeschrieben. Dazu zählen beispielsweise die Regulation von Entwicklungsprozessen, Zellwachstumskontrolle (Csiszar et al. 2001) sowie Beteiligung an Zelladhäsion, Seneszenz und Tumorsuppression (Giampuzzi et al. 2001). Diese unterschiedlichen Aufgaben werden wahrscheinlich von den verschiedenen Isoformen (LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 und LOXL4) in zeitlicher und räumlicher Regulation ausgeführt (Csiszar et al. 2001). Bei LOXL2, LOXL3 und LOXL4 ist nicht nur die N-terminale Region ähnlich aufgebaut, sondern diese Isotypen sind durch den Besitz von 4 Scavenger Receptor Cystein Rich Domains (SRCRs) gekennzeichnet, weshalb sie oft als Unterfamilie der Lysyl-Oxidasen zusammengefasst werden (Asuncion et al. 2001). Die ersten Hinweise auf eine Funktion von LOX für die Tumorerkrankung wurden von Kirschmann und Mitarbeitern berichtet, indem sie eine Überregulation der LOX-Expression in invasiven, metastasierenden Mammakarzinomzellen im Vergleich zu gering-invasiven, nicht-metastasierenden Tumorzellen

feststellten (Kirschmann et al. 2002). Andere Untersuchungen zeigten eine Überexpression des LOXL4-Gens in Kopf-Hals-Karzinomen im Vergleich zum benignen Phänotyp (Holtmeier et al. 2003). Es wurde auch gezeigt, dass in den Mechanismus der Überexpression spezifische Transkriptionsfaktoren (TATA und Pp1) involviert sind (Görögh et al. 2008). Das LOXL4-Gen ist auf dem Chromosom 10q24 lokalisiert und codiert für ein ca. 84,5 kDa-Protein (Mäki et al. 2001). Das zugehörige mRNA-Molekül hat eine Länge von ca. 3,5 Kilobasen (kb) und wird in vielen Geweben, u.a. in Pankreas und Hoden exprimiert (Asuncion et al. 2001). Weiterführende retrospektive Untersuchungen zeigten eine signifikante Korrelation zwischen LOXL4-Expression und lokalen Lymphknotenmetastasen und unterstrichen die funktionelle Rolle dieses Gens bei der molekularen Pathogenese der invasiv wachsenden Kopf-Halskarzinome (Görögh et al. 2007; Sebban et al. 2013; Yilmaz et al. 2016). Untersuchungen zur prognostischen Wertigkeit der LOXL4-Expression bei Kopf-Hals-Karzinomen sind nach unserer Kenntnis der wissenschaftlichen Literatur bisher nicht durchgeführt worden. In der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie am UK-SH Campus Kiel wurden von der Arbeitsgruppe Görögh und Weise polyklonale- und monoklonale Anti-LOXL4-Antikörper entwickelt, die für die Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen sensitiv und spezifisch einsetzbar sind.

1.3 Survivinexpression in Karzinomen

Neben der Expression von LOXL4 in Tumoren von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen wurde auch die Expression von Survivin untersucht, um die Wertigkeit beider Antigene nach histopathologischen Kriterien vergleichend zu analysieren. Survivin, ist ein Apoptosehemmer. Der zentrale Mechanismus der Apoptosehemmung erfolgt durch direkte Kaspase- und Pro-Kaspase-Hemmung (hauptsächlich Kaspase 3 und 7) sowie durch Modulation des Transkriptionsfaktors NF-kappa-B (LaCasse et al. 1998). Survivin ist in den meisten soliden und hämatologi-

schen Malignitäten deutlich überexprimiert, hingegen in normalem adulten Gewebe nicht nachzuweisen (Ambrosini et al. 1997; Lo Muzio et al. 2005; Adida et al. 1998). Die Survivin-Expression korreliert mit ungünstigen Verläufen in Neuroblastomen (Adida et al. 1998), mit Rezidivierungen und einer reduzierten Gesamtüberlebensrate bei Kolorektalkarzinomen (Kawasaki et al. 1998; Sarela et al. 2000); Prostatakarzinomen (Gu et al. 2015); nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Monzo et al. 1999; Hirano et al. 2015; Cho et al. 2015), Mammakarzinomen (Tanaka et al. 2000) sowie mit erhöhten Rezidivraten bei Harnblasenkarzinomen (Swana et al. 1999). Einige Autoren folgerten daraus, dass eine hohe Survivin-Expression in Oropharynxkarzinomen auf eine geringere Überlebensrate schließen lässt (Dong et al. 2002; Pizem et al. 2004). Lo Muzio und seine Mitarbeiter überprüften die Survivin-Expression in Oropharynxkarzinomen (Lo Muzio et al. 2005). Die Survivin-Expression war auffällig erhöht in schlecht differenzierten Tumoren, und eine hohe Survivin-Expression korrelierte mit verringerten Überlebensraten bei Oropharynxkarzinomen, was in vorherigen Studien z.B. an Melanomen ebenfalls gezeigt werden konnte (Chiodino 1999). Marioni und Mitarbeiter vermuteten erstmalig, dass bei Patienten mit primären Oropharynxkarzinomen die Survivin-Expression jene Patienten mit schlechterer Prognose identifizieren könnte. Sie konnten dies jedoch statistisch nicht beweisen (Marioni et al. 2005).

2 Zielsetzungen

Das Ziel dieser Studie war es, mittels immunhistochemischer Analyse die Expression von LOXL4 und Survivin im Hinblick auf ihren diagnostischen und prognostischen Wert bei oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen zu vergleichen. Untersucht werden sollten erstens die LOXL4- und Survivin-Expressionen in den einzelnen Tumorproben einer statistisch homogenen und zahlreichen Population bestehend aus Primärtumoren. Zweitens sollten die gemessenen Expressionsintensitäten den histopathologischen Daten (Grading) und dem Tumorstadium (TNM) gegenübergestellt werden. Um statistisch unbekannte Zusammenhänge aufzudecken, wurden die immunhistochemischen Daten gruppiert in negative vs. positive Expression und in geringe vs. starke Expression. Diese Subgruppen sollten sodann auf Abhängigkeiten zur Tumorgröße (T1- bis T4-Stadium) und zum Metastasierungsverhalten des Primärtumors (N0- und Nplus-Stadium) geprüft werden. Ferner sollte die Gesamtüberlebensrate der Patienten anhand klinischer Daten bestimmt werden und die Ergebnisse auf Abhängigkeiten von der Tumorausdehnung sowie der Expressionsstärke jeweils von LOXL4 wie auch Survivin überprüft werden, um etwaige prognostische Kriterien feststellen zu können. Auch hier sollte ein Subgruppenvergleich der Expressionsintensitäten durchgeführt werden. Um die Aussagekraft der Untersuchungen zu erhöhen, sollten entweder Tumorproben und Daten nur eingeschlossen werden, die von Patienten mit einer Nachbeobachtungszeit von mindestens 10 Jahren abstammten oder innerhalb der Mindestnachbeobachtungszeit verstorben waren. Alle Patienten, die innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums verstarben, wurden als verstorben deklariert und berücksichtigt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Untersucht wurden Gewebeproben von 138 Patienten mit vor Therapiebeginn histopathologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx. Diese waren allesamt Tonsillenkarzinome. Davon waren 115 (83,3%) Männer und 23 (16,7%) Frauen im Alter zwischen 38 und 92 Jahren. Der Median lag bei 58 Jahren. Bei 135 (97,8%) der Patienten handelte es sich um Raucher. Bezüglich der Alkohohl-Anamnese lagen keine reproduzierbaren Daten vor. Die Einteilung der Tumoren erfolgte nach der TNM-Klassifizierung der UICC von 1987 (Tabelle 1). Hier werden Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs nach dem Durchmesser des Tumors (T), nach dem Befall der Lymphknoten (N) sowie nach dem Metastierungsverhalten (M) eingeteilt:

Zum Tumordurchmesser:

- T1: bis zu 2 cm
- T2: 2,1 bis 4 cm
- T3: > 4 cm
- T4: Tumorinfiltration in umliegende Strukturen wie beispielsweise Knochen, Halsweichteile, Zungenmuskulatur, unabhängig von der TumorgroÙe.

Zum Lymphknotenbefall:

- N1: ipsilateraler solitärer Befall ≤ 3 cm im Durchmesser
- N2: a) ipsilateral solitär > 3-6 cm im Durchmesser
b) ipsilateral multipel ≤ 6 cm im Durchmesser
c) bilateral und kontralateral ≤ 6 cm im Durchmesser
- N3: Befall über 6 cm im Durchmesser

Zum Vorliegen von Fernmetastasen:

M0: Fernmetastasen liegen nicht vor

M1: Fernmetastasen liegen vor

Tabelle 1: Verteilung der Patienten mit Oropharynxkarzinomen nach TNM-Klassifikation (nach UICC von 1987)

Klassifizierung	Anzahl	Prozentualer Anteil
T1	16	11,6%
T2	37	26,8%
T3	36	26,1%
T4	49	35,5%
N0	48	34,0%
N1	25	18,1%
N2	60	43,5%
N3	5	3,6%
M0	131	94,9%
M1	7	5,1%

61,6% der Tumoren waren im fortgeschrittenen Stadium (T3+T4) und etwa 2/3 der Patienten (65,2%) wiesen positive Halslymphknoten (N1-N3) auf. Bei 131 (94,9%) von 138 Patienten waren keine Fernmetastasen durch Oberbauch-Sonografie und Röntgen-Thorax festzustellen (M0). Darüber hinaus wird die Differenzierung der Tumorzellen bzw. die Entdifferenzierung der Tumorzellen in Bezug auf das Ausgangsgewebe beurteilt und eingeteilt. Hierbei wird das so genannte Grading (G) System verwendet. Es gibt drei Stufen zur Einteilung:

G1: gut differenziert (low grade)

G2: mäßig differenziert (intermediate grade)

G3: schlecht differenziert bis undifferenziert (high grade).

In der vorliegenden Stichprobe waren bezüglich der Grading-Verteilungshäufigkeit der Tumoren zwei Tumoren hoch differenziert (G1: 2), 86 Tumoren mäßig (G2: 86) und 50 Tumoren niedrig differenziert (G3: 50).

Die Daten zur Bestimmung der Gesamtüberlebensraten wurden den Patientenakten und den Datenbanken entnommen. Alle Patienten und Probanden hatten eine schriftliche Einverständniserklärung zum wissenschaftlichen Gebrauch der Tumorproben gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Universität Kiel (AZ: D438/10) unterschrieben.

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemie von LOXL4 und Survivin

Die in 4%-igem Formalin fixierten Tumorbiopsate wurden in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 80%, 96% und 100%) jeweils 30 Minuten entwässert und anschließend mit Aceton behandelt. Danach wurden sie über 24 Stunden in flüssigem Paraffin bei 56°C inkubiert, in frischem Paraffin eingebettet, bei Raumtemperatur erhärtet und bei -20°C eingefroren. Mit Hilfe eines Mikrotomes (Reichert-Jung, Nußloch) wurden 4-5µm dicke histologische Feinschnitte hergestellt, auf Objektträger (Superfrost, Menzel) überführt und über Nacht bei 37°C getrocknet. Es folgte Entparaffinieren in Xylol 2x6 Minuten und Behandlung der Präparate in Äthanol absteigender Konzentration (100%, 96%, 80% und 70%) jeweils 5 Minuten. Nach Waschen der Präparate in Aqua dest wurden sie 10 Minuten in 0.05M Tris-HCl 0,15M NaCl -Puffer (TBS) rehydriert, in 0.01M Citratpuffer aufgenommen und 2x7 Minuten in der Mikrowelle erhitzt.

Zur Beseitigung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 10 Minuten in 100ml Methanol plus 1ml 30% Wasserstoffsuperoxid inkubiert, kurz in Aqua dest getaucht und mit TBS gespült. Die Präparate wurden dann 60 Minuten mit 100µl 1:400 verdünntem polyklonalen Kaninchen-anti-LOXL4-Antikörper (Eigenherstel-

lung PD. Dr. Görögh, HNO-Klinik Kiel) überschichtet. Der Nachweis von Survivin erfolgte mit 100µl 1:400 verdünntem polyklonalem Kaninchen anti-Survivin Antikörper (Survivin-Ab-6; LabVision, Fremont, USA). Es folgte Waschen mit TBS je 3x5 Minuten und Behandlung mit einem sekundären biotinmarkierten anti-Kaninchen-Antikörper (DAKO, Hamburg) über 30 Minuten. Nach erneutem Spülen mit TBS folgte eine Inkubation der Präparate in einer Peroxidase-konjugierten Streptavidin-Biotin-Komplex-Lösung (Biologo, Kiel) über 30 Minuten. Nach nochmaligem Spülen mit TBS folgte die Zugabe des Farbsubstrates (Vector Nova-red Substratkit; Biologo, Kiel) für 20 Minuten. Die Gegenfärbung der Präparate erfolgte mit Hämalaun für ca. 30 Sekunden. Danach wurden sie je 10 Sekunden mit Äthanol aufsteigender Konzentration (70%, 80%, 96% und 100%) und dann 2x10 min mit Xylol behandelt. Schließlich wurden sie mit Eukit (Kindler, Freiburg) überschichtet, mit einem Deckgläschen abgedeckt und am Lichtmikroskop (Zeiss Axio-plan, Hamburg) bewertet.

Die Spezifität des Antikörpers für das LOXL4 Protein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot überprüft und es wurde keine Kreuzreaktion mit anderen Proteinspecies nachgewiesen (Görögh et al. 2007) Auch der gegen das Survivin-Protein gerichtete Antikörper wies nach den Angaben zur Spezifitätskontrolle der Herstellfirma LabVision, Fremont, USA keine Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen auf.

3.2.2 Gesunde Mukosa als Negativkontrolle

Zehn Mundschleimhautproben von gesunden Probanden, die im Rahmen von geplanten Eingriffen zur Schnarchtherapie am weichen Gaumen entnommen wurden, und deren schriftliches Einverständnis zur wissenschaftlichen Verwendung der Gewebe vorlag, dienten als Negativkontrollen.

Zur Bestimmung der LOXL4- und Survivin-Proteinlevel wurden jeweils 300 Zellen bestimmt in 5 Zählfeldern bei 400-facher Vergrößerung. Dann wurde der durch-

schnittliche Prozentsatz von positiven Tumorzellen bestimmt, um sie in vier folgenden Kategorien einzuteilen:

1. (- bzw. negativ) <5%
2. (+) 5-30%
3. (++) 31-75%
4. (+++) > 75%.

In dieser Arbeit wurden zum einen die negativ bewerteten Fälle (-) im Vergleich zu den positiv bewerteten Fällen (+), (++) und (+++) betrachtet, zum anderen wurden Verteilungsunterschiede in den Gruppen mit schwacher Expression der Klasse (-) und (+) denen mit starker Expression (++) und (+++) gegenübergestellt. Für die Überlebenszeitanalyse wurden die LOXL4 - und Survivin-Expressionen in folgende Kategorien eingeteilt: unter / gleich 30% (-) und (+) und in hohe Expression über 30% (++) und (+++) der durchschnittlichen prozentualen immunpositiven Zellen innerhalb der Tumorbiopsien, wie es u.a. in vergleichbaren Studien (Erlor et al. 2007) gehandhabt wurde. Dieses entspricht der Einteilung in "gering" und "stark".

3.2.3 Patientendaten und Statistik

Alle Tumorpatienten wurden in Abhängigkeit ihrer Tumorausdehnung sowie Morbidität primär operiert oder primär bestrahlt oder erhielten eine Kombinationstherapie aus Operation mit nachfolgender Strahlentherapie. In den Fällen von fortgeschrittenem Tumorstadium waren auch adjuvante Radiochemotherapien durchgeführt worden. Zur Feststellung der klinischen und histopathologischen Daten erfolgte eine retrospektive Auswertung der Krankenakten.

Sowohl bei den Expressionsstufen der hier untersuchten Tumormarker LOXL4 und Survivin als auch bei den zu prüfenden Einflussfaktoren wie Tumorstadium und Nodalstatus handelte es sich um ordinal skalierte Merkmale, die beschreibend

anhand von absoluten und prozentualen Häufigkeiten dargestellt wurden. Je zwei dieser Parameter wurden in Kontingenztafeln gegenübergestellt, so dass mit dem Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, der im Gegensatz zum Chi-Quadrat-Test nach Pearson zusätzlich das ordinale Skalenniveau nutzt, geprüft werden konnte, inwieweit sich Abhängigkeiten nachweisen ließen. Um die Möglichkeiten der Marker als diagnostischen Test hinsichtlich des Aufdeckens von High-Grade-Tumoren oder positivem Nodalstatus zu untersuchen, wurden Sensitivitäten und Spezifitäten sowie positive und negative Vorhersagewerte für die dichotomisierten Expressionsstärken berechnet. Der Vergleich der in dieser Arbeit vorgenommenen Einteilungen der Expressionsstärke in negativ (-) vs. positiv (+/++/+++), sowie schwach (-/+), vs. stark (++/+++), hinsichtlich der Eignung als diagnostischer Test zur Feststellung von High-Grade-Tumoren oder positivem Lymphknotenbefall erfolgte anhand des Youden-Indexes (Y). Die Übereinstimmung der Expression von LOXL4 und Survivin wurde mittels Cohen's Kappa (κ) quantifiziert und mit dem Symmetrietest nach Bowker auf Signifikanz getestet. Zudem erfolgte eine Kaplan-Meier-Analyse zum Gesamtüberleben seit Erstdiagnose. Der Einfluss von Tumorstadium, Nodalstatus und dichotomisierter Expressionsstärke auf das Überleben wurde mittels Log-Rang-Test geprüft.

Es wurde zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt. Eine Alpha-Adjustierung für multiples Testen fand nicht statt, die Ergebnisse haben demnach explorativen und beschreibenden Charakter. Für die Durchführung der statistischen Berechnungen wurde IBM SPSS Statistics 21 (SPSS Inc. an IBM Company, Chicago, IL) eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemischer Nachweis der LOXL4- und Survivin-Expression in Mundschleimhaut und in Karzinomen

In den 138 histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx, die alle von primären Tonsillenkarzinomen abstammten, wurde die Expression von LOXL4 und Survivin immunhistochemisch überprüft.

Abbildung 1 veranschaulicht exemplarisch den immunhistochemischen Nachweis der LOXL4-Expression

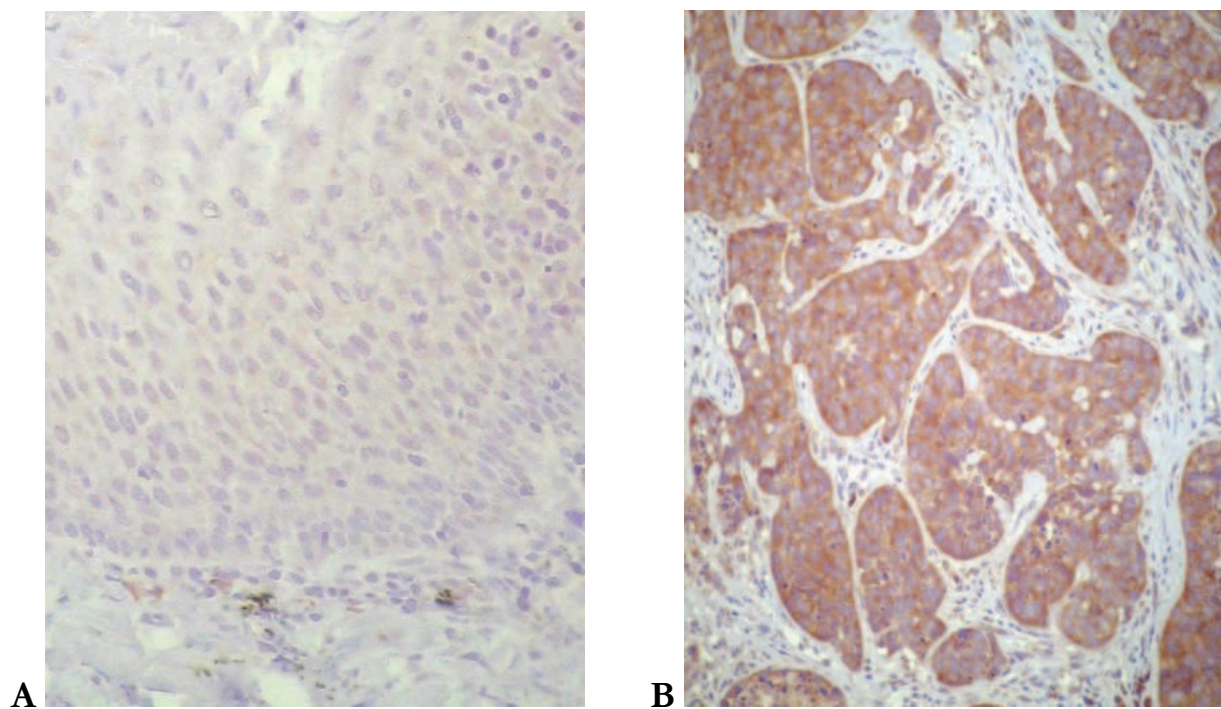


Abb. 1: Immunhistologischer Nachweis von LOXL4. Tonsillenkarzinom mit fehlender- (A) und mit starker LOXL4-Expression (B). Vergrößerung (x200)

Wie bei LOXL4 soll auch bei Survivin die Abbildung 2 exemplarisch den immunhistochemischen Nachweis der Survivin-Expression veranschaulichen.

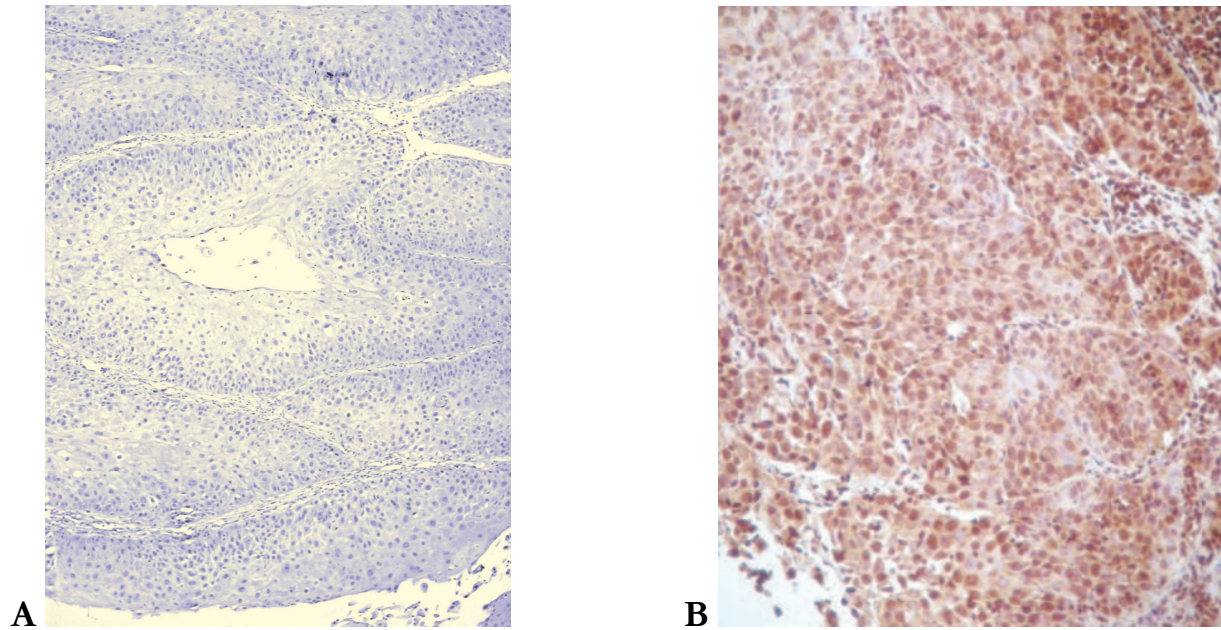


Abb. 2: Immunhistologischer Nachweis von Survivin. Tonsillenkarzinom mit fehlender- (A) und mit starker Survivin-Expression (B). Vergrößerung ($\times 200$)

In allen zehn untersuchten Proben der gesunden Mundschleimhaut der Kontrollgruppe hingegen konnte bei gleichen experimentellen Bedingungen keine Expression von LOXL4 oder Survivin nachgewiesen werden, wie die folgende Abbildung zeigt.

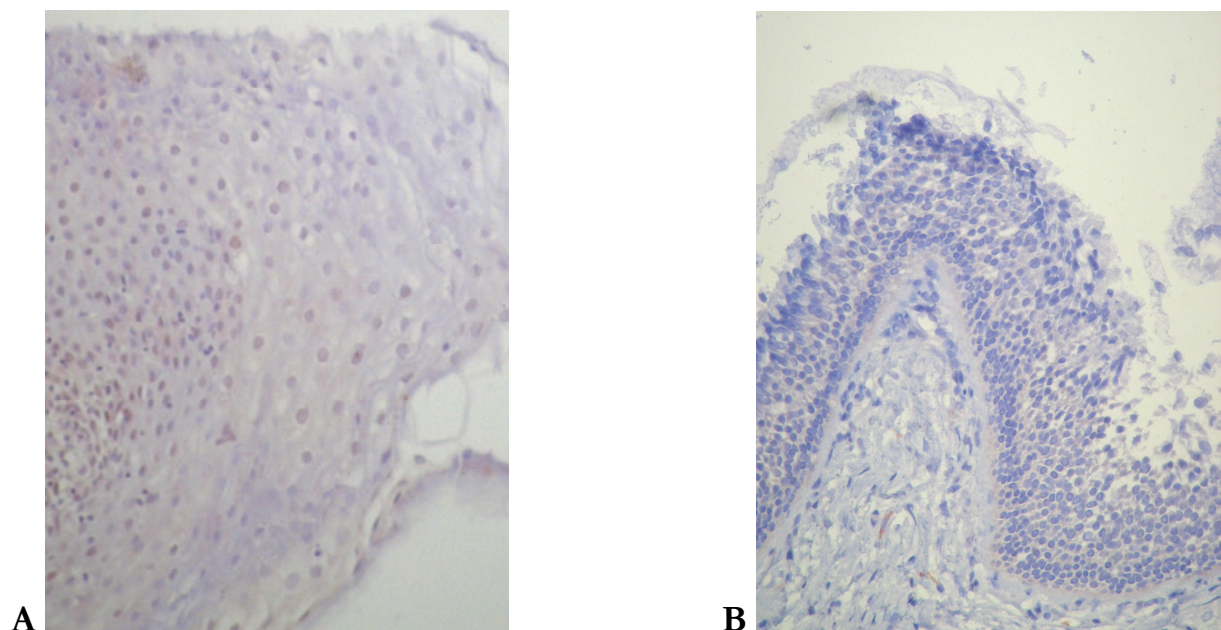


Abb. 3: Gesunde Mundschleimhaut ohne Expression von Survivin (A) und LOXL4 (B) (Vergrößerung 200 \times)

Für die Expressionstärken der beiden Marker lassen sich folgende Ergebnisse berichten: In den 138 histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx, fanden sich sowohl für LOXL4 wie auch für Survivin die Expressionstärken (-) bis (+++), wobei diese bei den beiden untersuchten Markern nicht in der gleichen Häufigkeit auftraten. Etwa 6,5% aller Tumorproben waren negativ für LOXL4 und 16,7% für Survivin, dagegen zeigten über 2/3 aller Tumorproben eine starke Expression (++ und +++) für sowohl LOXL4 als auch Survivin (Tabelle 2 und Tabelle 3).

Tabelle 2: *Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von LOXL4- und Survivin Expression in Oropharynxkarzinomen*

Expression		LOXL4	Survivin
< 30%	-	9 (6,5%)	23 (16,7%)
	+	37 (26,8%)	25 (18,1%)
≥ 30%	++	47 (34,1%)	36 (26,1%)
	+++	45 (32,6%)	54 (39,1%)
Total		138 (100,0%)	138 (100,0%)

Anhand der folgenden Tabelle 3 ist zusätzlich der Übereinstimmungsgrad der beiden Marker dargestellt.

Tabelle 3: *Übereinstimmung der immunhistochemischen Untersuchungen von LOXL4- und Survivin Expression in Oropharynxkarzinomen*

LOXL4	Survivin Expression				Gesamt
	neg	+	++	+++	
neg	2 (1,4%)	1 (0,7%)	3 (2,2%)	3 (2,2%)	9 (6,5%)
+	7 (5,1%)	9 (6,5%)	7 (5,1%)	14 (10,1%)	37 (26,8%)
++	10 (7,2%)	6 (4,3%)	16 (11,6%)	15 (10,9%)	47 (34,1%)
+++	4 (2,9%)	9 (6,5%)	10 (7,2%)	22 (15,9%)	45 (32,6%)
Gesamt	23 (16,7%)	25 (18,1%)	36 (26,1%)	54 (39,1%)	138 (100,0%)

In 49 Fällen (35,5%) gab es ein übereinstimmendes Ergebnis, in 43 Fällen (31,2%) lag die Survivin-Expression über der LOXL4-Expression und in 46 Fällen war der Expressionsgrad durch LOXL4 höher als der mit Survivin ermittelte. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Einstufungen obiger Marker konnte nicht nachgewiesen werden (Symmetrietest nach Bower, $p=0,102$), wohingegen aber auch der Grad der Übereinstimmung anhand des Kappa-Koeffizienten nach Cohen mit $\kappa=0,11$ als gering einzustufen ist.

4.2 Expression von LOXL4 und Survivin in Abhängigkeit der Tumorgroße (T-Stadium)

4.2.1 LOXL4 Expression in Abhängigkeit der Tumorgroße

Tabelle 4 zeigt die LOXL4-Expressionsstärke in Abhängigkeit des Tumorstadiums der hier untersuchten Proben. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, $p=0,018$).

Tabelle 4: LOXL4-Expression in Abhängigkeit des Tumorstadiums

LOXL4	Tumorstadium				Gesamt
	T1	T2	T3	T4	
-	3 (18,8%)	2 (5,4%)	1 (2,8%)	3 (6,1%)	9 (6,5%)
+	3 (18,8%)	13 (35,1%)	11 (30,6%)	10 (20,4%)	37 (26,8%)
++	7 (43,8%)	13 (35,1%)	15 (41,7%)	12 (24,5%)	47 (34,1%)
+++	3 (18,8%)	9 (24,3%)	9 (25,0%)	24 (49,0%)	45 (32,6%)
Gesamt	16 (100%)	37 (100%)	36 (100%)	49 (100%)	138 (100%)

Die verschiedenen Ausprägungen der LOXL4-Expression in Abhängigkeit des Tumorstadiums sind in Abbildung 4 dargestellt.

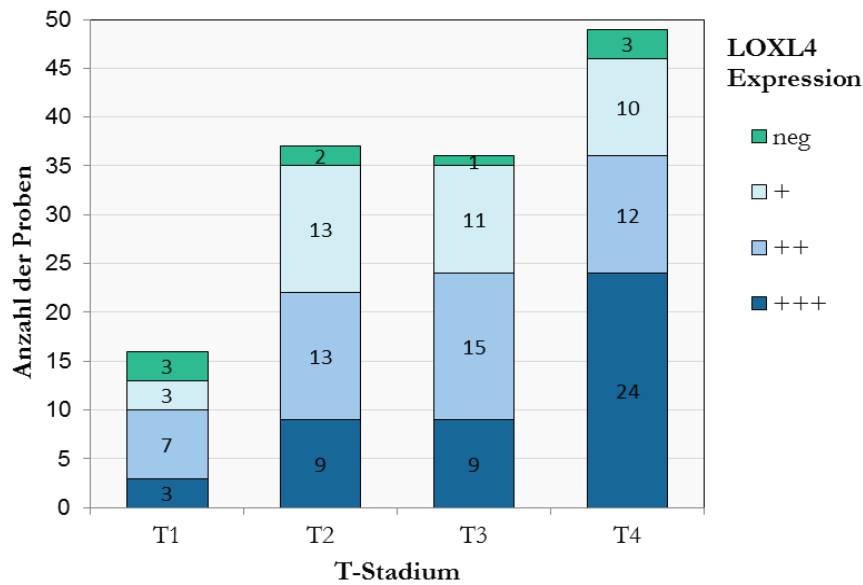


Abb. 4: LOXL4-Expression in Abhängigkeit des Tumorstadiums

Es wird ersichtlich, dass der Anteil der hohen LOXL4-Expressionen mit zunehmendem Tumorstadium steigt, wobei keine klaren Grenzen erkennbar sind. Um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen, werden die Sensitivitäten für das Aufdecken von High-Grade-Tumoren (T3/T4) im Vergleich zu Low-Grade-Tumoren (T1/T2) mittels LOXL4 anhand variierender Grenzen gegenübergestellt, wie folgende Tabelle 5 zeigt:

Tabelle 5: LOXL4 als diagnostischer Test zur Unterscheidung von Low- und High-Grade-Tumoren

LOXL4	Tumorstadium		Gesamt	Sensitivität (positiver prädiktiver Wert)	Spezifität (negativer prädiktiver Wert)
	T1/T2 (Low-Grade)	T3/T4 (High-Grade)			
-	5 (9,4%)	4 (4,7%)	9 (6,5%)	95,3%	9,4%
+ / ++ / +++	48 (90,6%)	81 (95,3%)	129 (93,5%)	(62,8%)	(55,6%)
- / +	21 (39,6%)	25 (29,4%)	46 (33,3%)	70,6%	39,6%
++ / +++	32 (60,4%)	60 (70,6%)	92 (66,7%)	(65,2%)	(45,7%)
Gesamt	53 (100%)	85 (100,0%)	138 (100%)		

Für den Fall, dass man zwischen negativer und positiver LOXL4-Expression unterscheidet, werden von 85 High-Grade-Tumoren 81 richtig erkannt, was einer Sensitivität von 95,3% entspricht. Die Spezifität liegt bei dieser Einteilung jedoch nur bei 9,4%, es werden nur 5 von 53 Low-Grade-Tumoren richtig eingestuft. Bei der Verschiebung der Grenze auf negativ und einfach positiv vs. zweifach und dreifach positiv, verringert sich die Sensitivität auf 70,6%, die Spezifität steigt dabei auf 39,6% an. Gemessen am Youden-Index Y ($Y = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$) ist die Einteilung in schwach und stark positiv mit $Y=0,102$ vs. $Y=0,047$ höher im Sinne eines diagnostischen Tests zu bewerten. Die Vorhersagewerte liegen für beide Einteilungen dicht bei 50%, wie obige Tabelle zeigt. Die Wahrscheinlichkeit für einen High-Grade-Tumor bei positiver LOXL4-Expression liegt mit 62,8% etwas unter der Wahrscheinlichkeit bei starker LOXL4-Expression mit 65,2%. Die negativen prädiktiven Werte liegen mit 55,6% und 45,7% noch dichter an der Wahrscheinlichkeit, zufällig ein Ergebnis aus zweien auszuwählen.

4.2.2 Survivin Expression in Abhängigkeit der Tumorgröße

Auch hinsichtlich der Survivin-Expression zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zum Tumorstadium (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, $p=0,001$). Bei zunehmendem Tumorstadium der Proben steigt auch hier der Anteil höhergradiger Survivin-Expressionen, wie aus der folgenden Tabelle 6 erkennbar wird.

Tabelle 6: *Survivin-Expression in Abhängigkeit des Tumorstadiums*

Survivin	T-Stadium				Gesamt
	T1	T2	T3	T4	
-	5 (31,3%)	10 (27,0%)	3 (8,3%)	5 (10,2%)	23 (16,7%)
+	7 (43,8%)	6 (16,2%)	5 (13,9%)	7 (14,3%)	25 (18,1%)
++	2 (12,5%)	7 (18,9%)	14 (38,9%)	13 (26,5%)	36 (26,1%)
+++	2 (12,5%)	14 (37,8%)	14 (38,9%)	24 (49,0%)	54 (39,1%)
Gesamt	16 (100%)	37 (100%)	36 (100%)	49 (100%)	138 (100%)

In gleicher Weise wie zur LOXL4-Expression wurden auch hier die Sensitivitäten und Spezifitäten sowie positive und negative Vorhersagewerte zur Unterscheidbarkeit von Low- und High-Grade-Tumoren anhand der Survivin-Expression mit variierenden Grenzen ermittelt. Diese sind in der folgenden Tabelle 7 dargestellt. Bei der Einteilung in negative und positive Survivin-Expressionen wird eine höhere Sensitivität (90,6% vs. 76,5%) und auch ein höherer positiver prädiktiver Wert (67,0% vs. 58,3%) erzielt als bei der Einteilung in schwache und starke Expression. Spezifität (28,3% vs. 52,8%) und negativer Vorhersagewert (65,2% vs. 72,2%) fallen niedriger aus in der Einteilung negativ vs. positiv im Vergleich zu "schwach" vs. "stark". Vergleicht man die beiden LOXL4-Einteilungen wieder anhand des Youden-Indexes, so liegt dieser mit $Y=0,293$ wiederum für die Einteilung in eine schwach und stark positive Expression höher als bei der Einteilung in eine negative und positive Expression, bei der ein Index von $Y=0,189$ erzielt wird.

Tabelle 7: *Survivin als diagnostischer Test zur Unterscheidung von Low- und High-Grade-Tumoren*

Survivin	Tumorstadium		Gesamt	Sensitivität (positiver prädiktiver Wert)	Spezifität (negativer prädiktiver Wert)
	T1/T2 (Low-Grade)	T3/T4 (High-Grade)			
-	15 (28,3%)	8 (9,4%)	23 (16,7%)	90,6%	28,3%
+ / +++ / +++ +	38 (71,7%)	77 (90,6%)	115 (83,3%)	(67,0%)	(65,2%)
- / +	28 (52,8%)	20 (23,5%)	48 (34,8%)	76,5%	52,8%
++ / +++	25 (47,2%)	65 (76,5%)	90 (65,2%)	(58,3%)	(72,2%)
Gesamt	53 (100%)	85 (100%)	138 (100%)		

Abbildung 5 zeigt die Survivin-Expression in Abhängigkeit des Tumorstadiums anhand von gestapelten Balken.

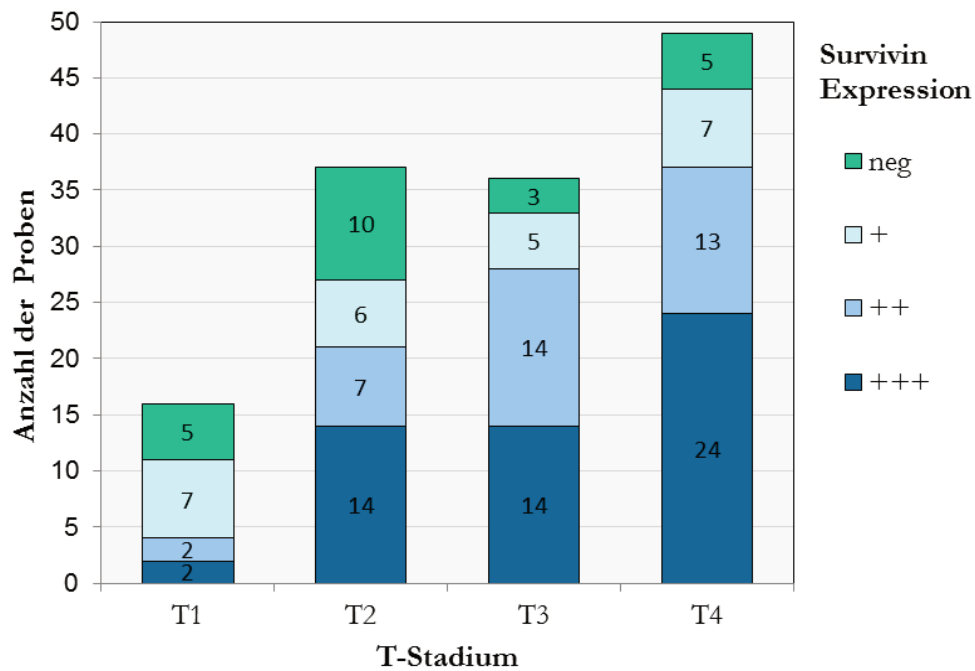


Abb. 5: Survivin-Expression in Abhängigkeit des T-Stadiums

4.3 LOXL4- und Survivin-Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus der Primärtumoren

4.3.1 LOXL4- Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus

Die nachfolgende Tabelle 8 zeigt die LOXL4-Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus.

Tabelle 8. LOXL4-Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus

LOXL4 Expression	Nodalstatus				Gesamt
	N0	N1	N2	N3	
-	2 (4,2%)	2 (8,0%)	4 (6,7%)	1 (20,0%)	9 (6,5%)
+	18 (37,5%)	4 (16,0%)	15 (25,0%)	0 (0,0%)	37 (26,8%)
++	15 (31,3%)	10 (40,0%)	20 (33,3%)	2 (40,0%)	47 (34,1%)
+++	13 (27,1%)	9 (36,0%)	21 (35,0%)	2 (40,0%)	45 (32,6%)
Gesamt	48 (100,0%)	25 (100,0%)	60 (100,0%)	5 (100,0%)	138 (100,0%)

Es konnte keine signifikante Abhängigkeit zwischen der LOXL4-Expression und dem Nodalstatus nachgewiesen werden (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, $p=0,412$). Auch die oben dargestellten prozentualen Häufigkeiten lassen nicht erkennen, dass ein hohes LOXL4-Stadium mit einem hohen Nodalstatus einhergeht. Wie im vorherigen Kapitel soll auch hier geprüft werden, inwieweit sich LOXL4 als diagnostischer Test in der Vorhersage des Nodalstatus eignet. Dazu wurden die Expressionsstärken zusammengefasst in negative (-) und positive (+/++/+++), sowie in der zweiten Darstellung in niedrige (-/+), und hohe Expressionsstärken (++/+++). Die Ausprägungen des Nodalstatus wurden ebenfalls in negativ (N0) und positiv (N+) zusammengefasst.

Tabelle 9: LOXL4 als diagnostischer Test zur Identifizierung eines positiven Nodalstatus

LOXL4	Nodalstatus			Sensitivität (positiver prädiktiver Wert)	Spezifität (negativer prädiktiver Wert)
	N0	N+	Gesamt		
-	2 (4,2%)	7 (7,8%)	9 (6,5%)	92,2%	4,2%
+ / ++ / +++	46 (95,8%)	83 (92,2%)	129 (93,5%)	(64,3%)	(22,2%)
-/+	20 (41,7%)	26 (28,9%)	46 (33,3%)	71,1%	41,6%
++/+++	28 (58,3%)	64 (71,1%)	92 (66,7%)	(69,6%)	(43,5%)
Gesamt	48 (100,0%)	90 (100,0%)	138 (100,0%)		

In obiger Tabelle 9 sind Spezifitäten (Anteil der durch LOXL4 richtig diagnostizierten N0-Tumorproben) und Sensitivitäten (Anteil der richtig diagnostizierten N+-Tumorproben) für die beiden LOXL4-Expressionseinteilungen dargestellt, sowie auch die positiven und negativen Vorhersagewerte, die die Wahrscheinlichkeit wiedergeben, bei einem negativen bzw. positiven Einstufen laut Expression, eine richtige Entscheidung getroffen zu haben. Die Sensitivität ist mit 92,2% bei der Einteilung in negative und positive Expressionen sehr hoch, allerdings auf Kosten der

Spezifität, die für diese Einteilung nur bei 4,2% liegt. Die Unterscheidung in schwache und starke Expressionen zeigt zwar mit 71,1% eine niedrigere Sensitivität, allerdings erreicht man mit dieser Einteilung eine Spezifität von 41,6%. Gemessen am Youden-Index, der für die Expressionsstärken negativ und positiv bei $Y=0,036$ liegt, im Vergleich zu $Y=0,127$ bei der Einteilung in eine niedrige und hohe Expression, ist letztere eindeutig besser zu bewerten. Ein negativer Youden-Index besagt an sich schon, dass sich die Einteilung in negative und positive LOXL4-Expression nicht als diagnostischer Test zur Aufdeckung von positivem Lymphknotenbefall eignet. Positiver und negativer Vorhersagewert sind ebenfalls bei der Einteilung in niedrige und hohe LOXL4-Expression den entsprechenden Werten der Expressionseinteilung in negativ und positiv überlegen. Abbildung 6 zeigt die Ausprägungen der LOXL4-Expression in Abhängigkeit des zusammengefassten Nodalstatus.

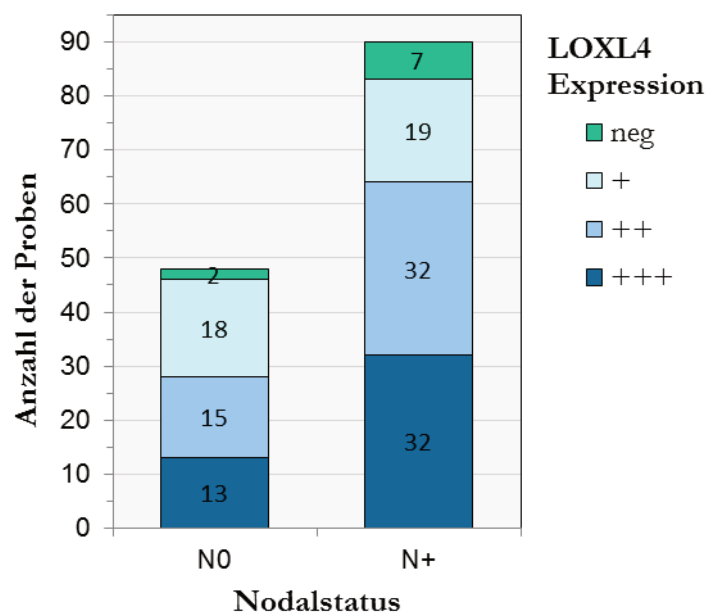


Abb. 6: Häufigkeitsverteilung der LOXL4-Expressionsstadien in Abhängigkeit des Nodalstatus unterteilt nach N0 und N+

4.3.2 Survivin-Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus

In folgender Tabelle 10 ist die Häufigkeitsverteilung der Survivin-Expression aller untersuchter Karzinome in der vierfach gestuften Einteilung, in Abhängigkeit der Lymphknotenmetastasierung dargestellt.

Tabelle 10: *Survivin-Expression in Abhängigkeit des Nodalstatus*

Survivin-Expression	Nodalstatus				Gesamt
	N0	N1	N2	N3	
-	11 (22,9%)	4 (16,0%)	8 (13,3%)	0 (0,0%)	23 (16,7%)
+	17 (35,4%)	2 (8,0%)	6 (10,0%)	0 (0,0%)	25 (18,1%)
++	10 (20,8%)	7 (28,0%)	16 (26,7%)	3 (60,0%)	36 (26,1%)
+++	10 (20,8%)	12 (48,0%)	30 (50,0%)	2 (40,0%)	54 (39,1%)
Gesamt	48 (100,0%)	25 (100,0%)	60 (100,0%)	5 (100,0%)	138 (100,0%)

Anhand der gesamten und prozentualen Häufigkeiten ist erkennbar, dass die Survivin-Expressionsstärke mit zunehmendem Nodalstatus ansteigt. Es zeigt sich zudem eine signifikante Abhängigkeit zwischen diesen beiden Parametern (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, $p < 0,001$).

Tabelle 11: *Survivin als diagnostischer Test zur Identifizierung eines positiven Nodalstatus*

Survivin	Nodalstatus			Sensitivität (positiver prädiktiver Wert)	Spezifität (negativer prädiktiver Wert)
	N0	N+	Gesamt		
-	11 (22,9%)	12 (13,3%)	23 (16,7%)	86,7%	22,9%
+ / ++ / +++	37 (77,1%)	78 (86,7%)	115 (83,3%)	(67,8%)	(47,8%)
- / +	28 (58,3%)	20 (22,2%)	48 (34,8%)	77,8%	58,3%
++ / +++	20 (41,7%)	70 (77,8%)	90 (65,2%)	(77,8%)	(58,3%)
Gesamt	48 (100,0%)	90 (100,0%)	138 (100,0%)		

Analog zu der Darstellung aus dem vorherigen Kapitel (3.2.1) ist auch für die Survivin-Expression ermittelt worden, inwieweit Rückschlüsse anhand der Expressionsstärke auf einen positiven Nodalstatus möglich sind. Aus vorangegangener Tabelle 11 wird ersichtlich, dass insbesondere bei der Survivin-Einteilung in niedrig (-/+) vs. hoch (+/++) eine Sensitivität von 77,8% und einer Spezifität von 58,3% erreicht wird, was einem Youden-Index von $Y=0,361$ entspricht. Auch diese Einteilung eignet sich hier besser als diagnostischer Test, als die Einteilung in negative (-) vs. positive (+/++/+++) Expressionen, bei der eine Sensitivität von 86,7% und eine Spezifität von 22,9% und damit ein Youden-Index von nur $Y=0,096$ erreicht wird. Die positiven und negativen prädiktiven Werte sprechen ebenfalls für die Einteilung in niedrige vs. hohe Survivin-Expressionsstärken. Folgende Abbildung 7 zeigt die Verteilung der Survivin-Expressionsgrade in Abhängigkeit des Nodalstatus.

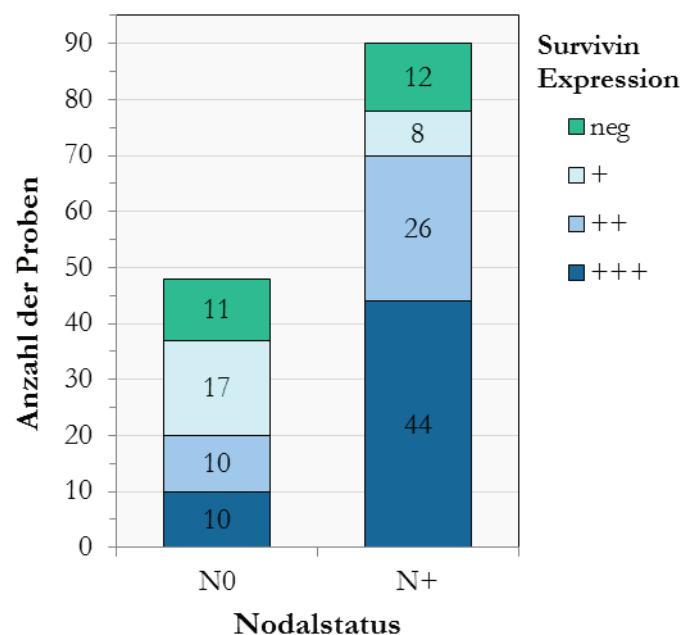


Abb. 7: Häufigkeitsverteilung der Survivin-Expressionsstadien in Abhängigkeit des Nodalstatus

4.4 Gesamtüberleben aller Tumorpatienten in Abhängigkeit der Tumorgröße (T-Stadium)

Das Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Probeentnahme und vor Therapiebeginn zwischen 38 und 92 Jahren und im Mittel bei $58,6 \pm 10,9$ Jahren. 115 (83,3%) Patienten waren männlich und 23 (16,7%) weiblich. Das 2-Jahres-Gesamtüberleben betrug $82,5\% (\pm 3,2\%)$, hingegen das 5-Jahres-Gesamtüberleben nur $66,8\% (\pm 4,1\%)$. Der Mittelwert für die Überlebenszeit aller Patienten mit Oropharynxkarzinomen in unserer Untersuchung belief sich auf 84,6 Monate. Die folgende Abbildung 8 zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenskurve zum Gesamtüberleben aller hier untersuchter Patienten. In der vorliegenden Studie bestand eine Überlebenswahrscheinlichkeit am Ende der Beobachtungszeit von knapp unter 60%.

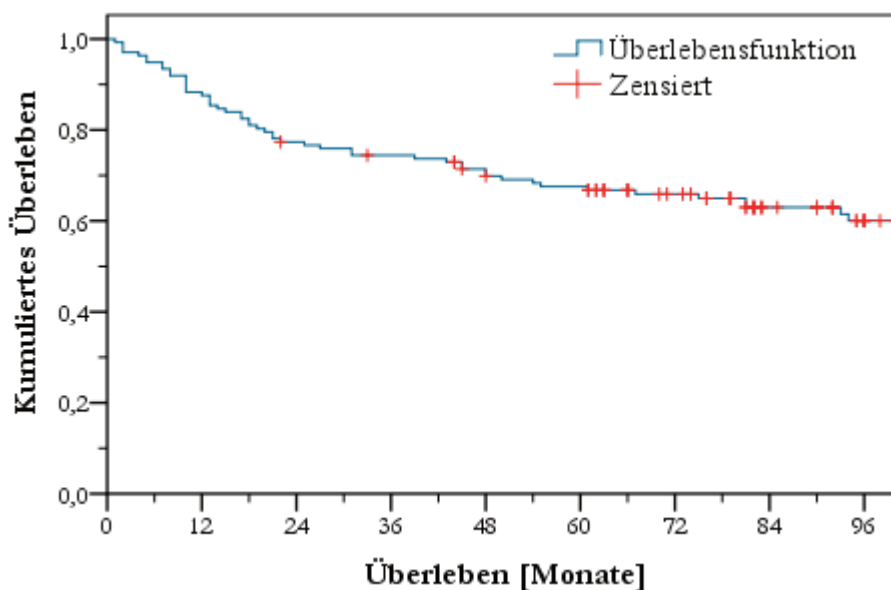


Abb. 8: Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve aller untersuchter Patienten mit Tonsillenkarzinomen ($N=138$)

Als wichtiges prognostisches Kriterium für das Überleben der Patienten ist die Tumorausdehnung bzw. die Tumorgröße. Diese findet sich wieder im T-Stadium der TNM-Klassifikation.

Tabelle 12 zeigt die Maßzahlen zur Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit des Tumorstadiums. Es zeigte sich erwartungsgemäß eine signifikant kürzere Überlebenszeit in der Gruppe der Patienten mit Tumorstadium T3-T4 im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit Tumorstadium T1-T2 (Log-Rang-Test, $p=0,02$), wie auch in Abbildung 9 deutlich erkennbar wird.

Tabelle 12: Gesamtüberleben in Abhängigkeit des Tumorstadiums

Tumor-Stadium	Ereignisse N (%)	Zensierungen N (%)	2-Jahres Über- lebensrate	5-Jahres Über- lebensrate	Mittlere Überlebens- zeit [Mon]	Log- Rang- Test
T1-T2	14 (26,4)	39 (73,6)	86,8%	71,0%	96,5	p=0,020
T3-T4	38 (45,2)	46 (54,8)	71,4%	61,8%	77,1	

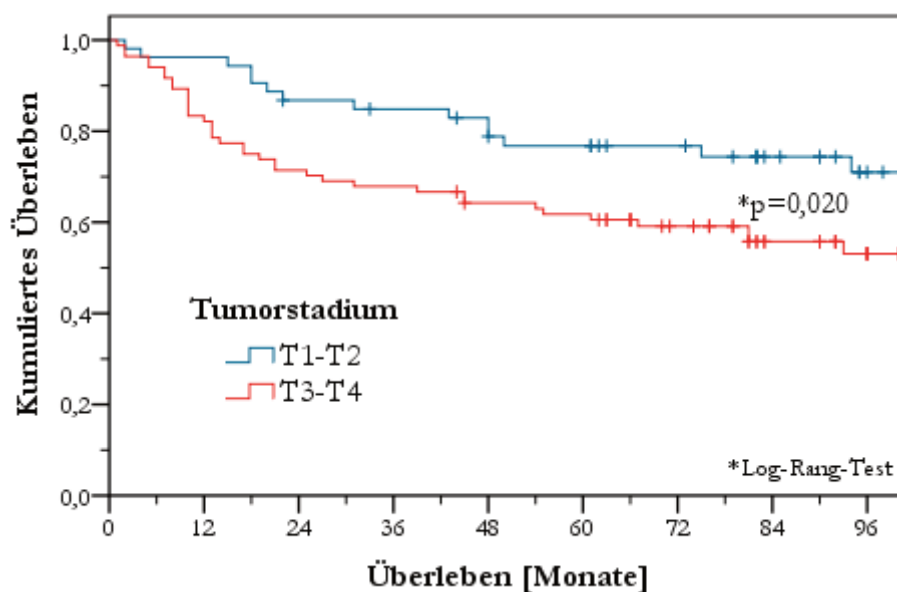


Abb. 9: Kaplan-Meier-Gesamtüberleben in Abhängigkeit des Tumorstadiums

4.5 Gesamtüberleben der Tumorpatienten in Abhängigkeit der LOXL4- und Survivin-Expressionsstärke

4.5.1 Gesamtüberleben der Tumorpatienten in Abhängigkeit der LOXL4-Expressionsstärke

Tabelle 13 beinhaltet die Kennzahlen zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit der beiden untersuchten LOXL4-Expressionseinteilungen. Es ist kein Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und dem Überleben nachweisbar (Log-Rang-Test: $p=0,838$ in der Einteilung negativ/positiv sowie $p=0,935$ in der Einteilung gering/stark).

Tabelle 13: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der LOXL4-Expression

LOXL4-Expression	Ereignisse N (%)	Zensierungen N (%)	2-Jahres Über- lebensrate	5-Jahres Über- lebensrate	Mittlere Überlebens- zeit [Mon]	Log- Rang- Test
negativ	3 (33,3%)	6 (66,7%)	66,7%	66,7%	83,9	$p=0,838$
positiv	49 (38,3%)	79 (61,7%)	88,3%	67,6%	84,6	
gering	18 (39,1%)	28 (60,9%)	64,9%	56,4%	83,7	$p=0,935$
hoch	34 (37,4%)	57 (62,6%)	76,9%	67,6%	84,9	

Die folgenden Abbildungen zeigen die Kaplan-Meier-Kurven für das Überleben in Abhängigkeit der LOXL4-Expression für beide Einteilungen. Es wird ersichtlich, dass sich beide Expressionsstufen hinsichtlich des Überlebens jeweils kaum unterscheiden.

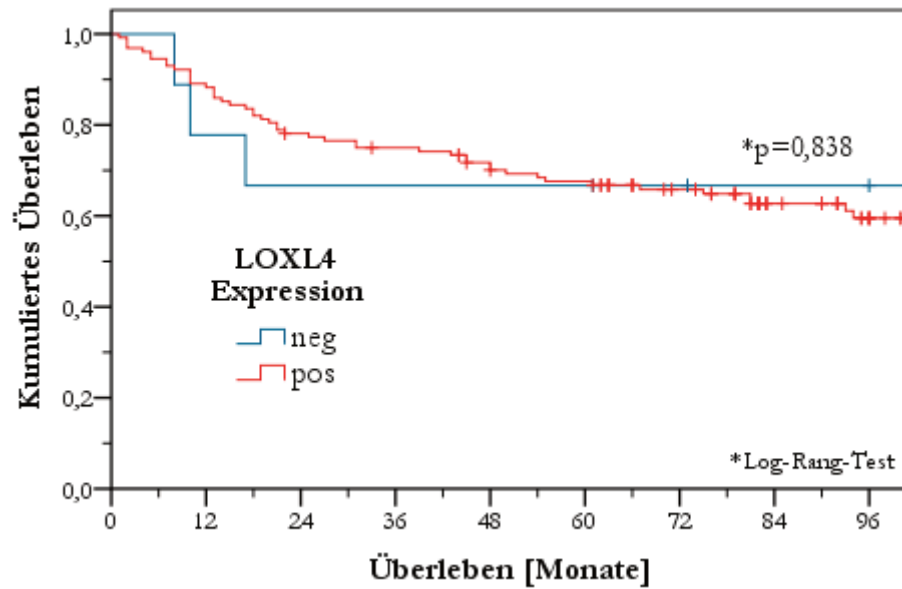


Abb. 10: Kaplan-Meier-Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der LOXL4-Expression unterteilt in negativ und positiv

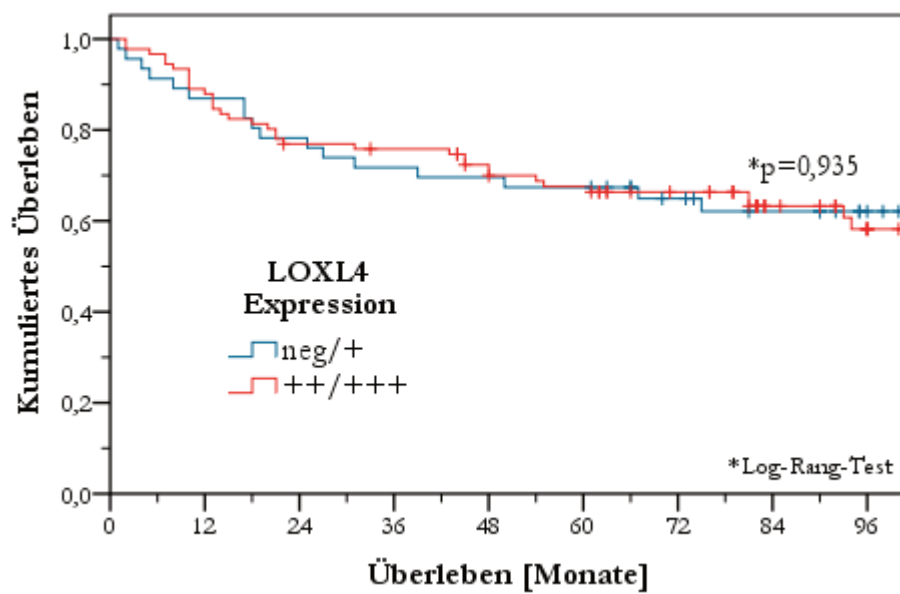


Abb. 11: Kaplan-Meier-Gesamtüberleben in Abhängigkeit der LOXL4-Expression unterteilt in gering und hoch

4.5.2 Gesamtüberleben der Tumorpatienten in Abhängigkeit der Survivin-Expressionsstärke

Auch hinsichtlich der Survivin-Expression kann in keiner der beiden untersuchten Einteilungen negativ (-) vs. positiv (+/++/+++) und gering (-/+) vs. hoch (++/+++) eine signifikante Abhängigkeit hinsichtlich des Gesamtüberlebens nachgewiesen werden (Log-Rang-Test, $p=0,830$ für negativ vs. positiv bzw. $p=0,265$ für gering vs. hoch). Die folgende Tabelle 14 zeigt die Anzahl der Ereignisse (Todesfälle) und Zensierungen, Überlebensraten nach zwei und fünf Jahren sowie die mittlere Überlebenszeit zur Beurteilung des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit der beiden hier untersuchten Survivin-Expressionseinteilungen. Auch diese Werte lassen sich für beide Expressionsstufen kaum unterscheiden. Dieser Sachverhalt wird ebenfalls deutlich anhand der sich anschließenden zugehörigen Kaplan-Meier-Kurven.

Tabelle 14: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Survivin-Expression

Survivin-Expression	Ereignisse N (%)	Zensierungen N (%)	2-Jahres Über- lebensrate	5-Jahres Über- lebensrate	Mittlere Überlebens- zeit (Mon)	Log-Rang- Test
negativ	9 (39,1)	14 (60,9)	78,3%	68,1%	85,1	$p=0,830$
positiv	43 (37,7)	71 (62,3)	77,2%	64,7%	82,7	
gering	15 (31,2)	33 (68,8)	85,4%	72,6%	91,0	$p=0,265$
hoch	37 (41,6)	52 (58,4)	73,0%	64,9%	81,2	

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen das Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Survivin-Expression unterteilt in negativ vs. positiv bzw. in gering vs. stark.

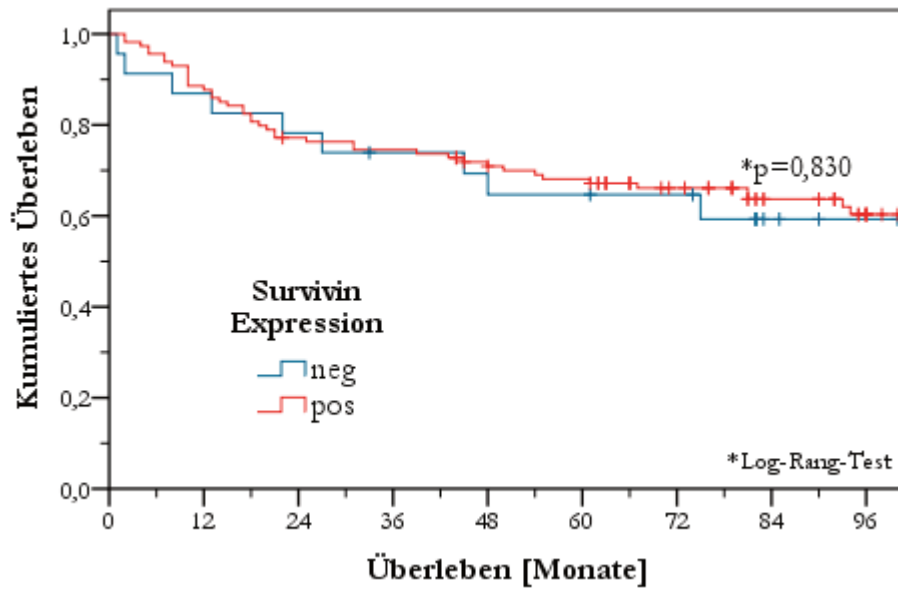


Abb. 12: Kaplan-Meier-Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Survivin-Expression unterteilt in negativ und positiv

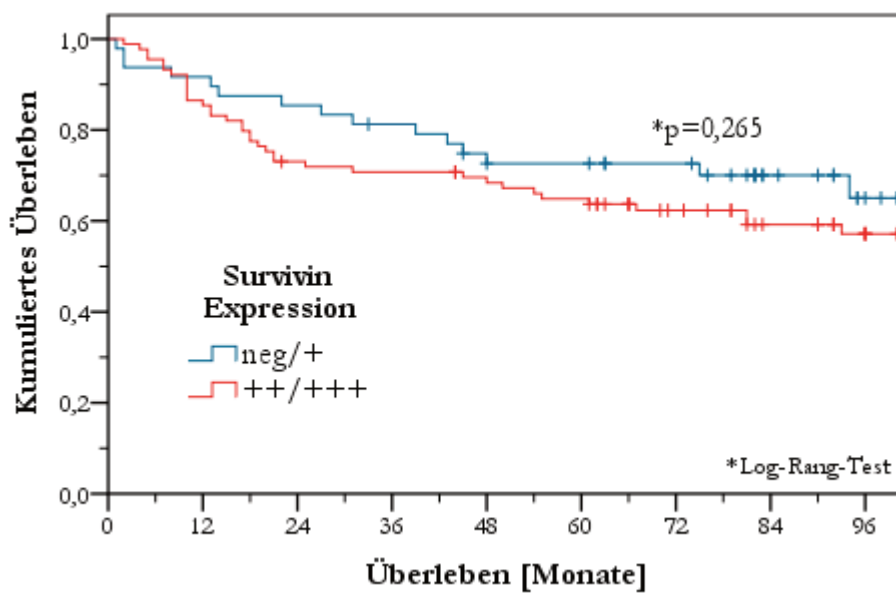


Abb. 13: Kaplan-Meier-Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Survivin-Expression unterteilt in gering und stark

5 Diskussion

5.1 Genexpression von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches

Die Enzyme der LOX-Familie sind in der Vergangenheit schon vielfach auf ihre Bedeutung im Zusammenhang mit karzinomatösen Erkrankungen untersucht worden. In vorangegangenen Studien wurde überwiegend die erste entdeckte Isoform, das LOX-Protein untersucht. He et al. (2002) wiesen eine verminderte LOX-mRNA-Expression in Plattenepithelkarzinomen des oberen Digestivtraktes im Vergleich zu gesunden Zellen nach und stellten eine Korrelation zwischen der LOX-mRNA-Expression und infiltrierten Lymphknoten fest. Ebenso wurde ein Rückgang der LOX-mRNA-Expression an Colon-Karzinomen (Csiszar et al. 2002) sowie an tumorösen Nierenfibroblasten der Ratte gezeigt (Giampuzzi et al. 2001). LOX gilt in der Literatur als ein Enzym, das sowohl für die Formation der Extrazellulärmatrix als auch für die Regulation des Hypoxia Inducible Factors (HIF-1alpha) von Bedeutung ist (Le et al. 2004; Lunt et al. 2009). Es wurde berichtet, dass die LOX-Expression paradoxerweise sowohl mit der Tumorsuppression wie auch mit der Tumorprogression assoziiert sein könnte (Erler et al. 2006), in hypoxischem Tumorgewebe erhöht ist und die Expressionslevel mit der Hypoxie in Patienten mit Brustkrebs und Kopf-Hals-Karzinomen korreliert sind. Darüber hinaus korrelierte ein hoher LOX-Level in Primärtumoren mit dem Metastasierungsverhalten, dem Tumorwachstum und einer niedrigeren Gesamt- und tumorspezifischen Überlebensrate bei diesen Patienten (Albinger-Hegyí et al. 2010; Le et al. 2009; Erler et al. 2006).

Andere Veröffentlichungen zeigen eine potentielle Rolle von LOX und weiteren Isoformen LOXL und LOXL2 bei der Genese von Mammakarzinomen (Kirschmann et al. 2002 und Aikiri et al. 2003). Nach der Entdeckung eines fünften Isoenzym der humanen Lysyloxidasen, welches LOXL-4 genannt wurde (Mäki et

al. 2001), zeigten Görögh und Mitarbeiter erstmalig eine selektive Hochregulation des LOXL-4 Gens in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Regionen (Görögh et al. 2007). In der Arbeitsgruppe von Weise et al. wurde 2008 eine weitere Publikation vorgestellt, in der sie das LOXL-4 Protein in 92,7% der Primärtumoren und in 97,8% der Lymphknotenmetastasen, hauptsächlich abstammend aus Larynx-, Hypopharynx- und Oropharynxkarzinomen, detektierten konnten und daraufhin postulierten, mit LOXL-4 ein Kandidatengens gefunden zu haben, dass für die Diagnostik von Kopf-Hals-Karzinomen von Bedeutung sei. Allerdings ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Höhe der LOXL-4 Expression und den klinischen Tumorparametern nach der TNM-Klassifikation nachweisen (Weise et al. 2008). Im Gegensatz dazu wurde für Survivin, einem Anti-Apoptose-Inhibitorprotein, eine Assoziation von hoher Expressionsstärke mit geringerer Überlebensrate in Oropharynxkarzinomen von anderen Arbeitsgruppen gefunden. LoMuzio et al. regten deshalb an, dass die Survivin-Expression Tumore mit aggressiverem Wachstum selektieren könnte (Lo Muzio et al. 2003 und 2005). Des Weiteren berichteten Freier et al., dass Patienten mit oropharyngealen Karzinomen und einer höheren Survivin-Expression ein besseres Ansprechen auf Strahlentherapie zeigten und dass somit Survivin helfen könnte, Patienten zu selektieren, die von einer entsprechenden Therapie profitieren würden (Freier et al. 2007).

Ein gleichzeitiger Vergleich der Expression beider Proteine in Oropharynxkarzinomen und die Validierung der Ergebnisse mit klinischen und histopathologischen Daten wurde bisher nach unserem Kenntnisstand in der wissenschaftlichen Literatur nicht beschrieben und erschien uns daher von besonders hohem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit führten wir deshalb eine Analyse der LOXL-4- und Survivin-Proteine in einer großen Patientenkohorte durch, die an Oropharynxkarzinomen erkrankt waren. Diese Untersuchung stellt die erste wissenschaftliche Arbeit dar, die über eine LOXL-4-Expression in 138 verschiedenen Tumorproben

ausschließlich aus der Gaumentonsille berichtet und diese mit der Survivin-Expression im selben Tumorgewebe vergleicht.

5.2 LOXL-4 und Survivin als Diagnosemarker

Sowohl LOXL-4 wie auch Survivin sind in gesunder Mundschleimhaut nicht oder nur in sehr geringer Konzentration nachweisbar, sehr wohl aber in sehr hoher Frequenz und Intensität in primären Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes.

Dabei zeigte sich allerdings eine unterschiedliche Sensitivität. Mit dieser Studie konnten wir nachweisen, dass die LOXL-4-Expression mit 93,5% eine deutlich höhere Sensitivität als Tumormarker bei Oropharynxkarzinomen zeigt als die Survivin-Expression mit 83,3%. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Arbeiten aus der wissenschaftlichen Literatur, die vergleichbare Werte in geringeren Patientenzahlen aufwiesen (Weise et al. 2008; Lo Muzio et al. 2003). Auch fanden Scola und Görögh eine bessere Spezifität einer jeweils hohen Expression von LOXL4 im Vergleich zu EGFR (epidermal growth factor receptor) bei Oropharynxkarzinomen. Sie postulierten, dass die LOXL4-Expression als selektiver Marker bei primären wie auch bei metastasierenden Oropharynxkarzinomen dienen könnte (Scola und Görögh 2010).

Da bisher kein Vergleich beider Parameter in einer gleichen Tumorprobe durchgeführt wurde, konnten unsere Ergebnisse zeigen, dass über die Kombination von immunhistochemischer LOXL-4- und Survivin-Bestimmung in 98,6% der Proben mindestens eines von beiden Antigenen nachweisbar ist. Eine gleichzeitige Antigenexpression mit übereinstimmenden Expressionsstärken fand sich nur bei 48 von 138 Patientenproben, also in ca. 35% der Fälle, wobei die detaillierte Expressionsstärke in der Funktion als Diagnosemarker auch von sekundärer Bedeutung scheint.

Wir sehen daher durch die Verwendung beider Antikörper zur immunhistochemischen Detektion von Plattenepithelkarzinomen der Tonsille eine viel versprechende Möglichkeit, die Diagnosesicherheit zu erhöhen. Ob sich diese Zuverlässigkeit in Kombination mit anderen Tumormarkern noch steigern lässt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

5.3 LOXL-4 und Survivin als Prognosemarker

Über die prognostische Bedeutung der LOXL-4 Proteinexpression in Plattenepithelkarzinomen der Tonsille liegen bisher keine wissenschaftlichen Erkenntnisse vor. Jedoch zeigten Görögh et al. in verschiedenen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches eine Hochregulation der LOXL-4-mRNA, die mit dem Tumorstadium und der Metastasierungshäufigkeit proportional direkt korrelierte (Görögh et al. 2007). Weise et al. untersuchten daraufhin verschiedene Primär- und Lymphknotentumoren des Kopf- und Halsbereiches von 257 Patienten und fanden jedoch auf Proteinebene keinen Zusammenhang zwischen der LOXL-4 Expressionsstärke, der klinischen TNM-Klassifikation oder dem Gesamtüberleben (Weise et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Analyse ausschließlich auf Plattenepithelkarzinome der Tonsillenregion fokussiert, die Probenzahl erhöht und zusätzlich ein zweites Antigen, das Survivin, in die immunhistochemische Bestimmung mit aufgenommen. Außerdem wurden nur Patientenproben eingeschlossen, die für ein klinisches Follow-Up von mindestens 10 Jahren, also dem offiziellen Endpunkt der Nachsorge in der Tumorsprechstunde, zur Verfügung standen. Alle Patienten, die innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes verstarben, wurden als verstorben berücksichtigt. Patienten, die weniger als 10 Jahre beobachtet werden konnten (z.B. durch Ortswechsel, Abbruch der Nachsorge oder unvollständige Aktenlage) wurden ebenso ausgeschlossen. Dadurch garantierten wir eine langfristige Beobachtung, um prognostische Abhängigkeiten der LOXL-4 und Survivin Expression und

der Höhe der Expressionslevel auf die Überlebenszeit unabhängig von der Therapieform zu bestimmen.

Dass nach Diagnosesicherung und Therapie das kumulative Überleben in einer Funktion zurzeit abnimmt, ist ein bekanntes Phänomen, die sich auch in unserer Kohorte widerspiegelte. Der Mittelwert für die Überlebenszeit aller Patienten mit Oropharynxkarzinomen in unserer Untersuchung belief sich auf 84,6 Monate. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Überlebenszeit finden sich auch in anderen Studien (Albinger et al. 2009; Le et al. 2009). Ebenso hatte das Tumorstadium einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Von allen Patienten mit T1 und T2 –Stadien lebten nach 2 Jahren noch über 86% und nach 5 Jahren noch 71%. Dagegen waren von den Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren, also T3 und T4-Stadium, schon nach 2 Jahren nur noch 71% am Leben und nach 5 Jahren knapp 62%. Die mittlere Überlebenszeit sank von über 96 Monaten auf 77 Monate mit einer Zunahme des Tumorstadiums von T1-T2 auf T3-T4. Auch dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Erfahrungen der Onkologen und den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Forastiere et al. 2001).

Hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft des LOXL-4 Expressionsgrades ließ sich in dieser Studie feststellen, dass sich lediglich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der detaillierten LOXL-4 Ausprägung und der Tumorgroße nachweisen ließ. Sowohl die Gruppierungen (nach positiv/negativ sowie nach gering/stark) der LOXL-4 Expression bezüglich der Tumorgroße, wie auch alle weiteren Untersuchungen von LOXL-4 im Hinblick auf das Metastasierungsverhalten sowie das Gesamtüberleben der Patienten ergaben keine statistisch signifikanten Korrelationen. Diese Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen von Weise und Mitarbeitern in anderen Lokalisationen, wie am Beispiel von Larynx- und Hypopharynxkarzinomen (Weise et al. 2008).

Die Survivin Expression zeigte in der vorliegenden Untersuchung dagegen einen statistischen Zusammenhang zu der Tumorgroße ($p=0,001$) und auch zum Metas-

tasierungsverhalten ($p < 0,001$). Wir fanden darüber hinaus bei Patienten mit hoher Expression (++ und +++) einen Trend zu einer schlechteren Prognose ($p = 0,265$). Die Überlebenszeit war knapp zehn Monate geringer, jedoch nicht statistisch signifikant aufgrund der zu geringen Anzahl der Sterbefälle. Diese Ergebnisse deuten in eine ähnliche Richtung wie die von Lo Muzio publizierten Arbeiten, in denen eine Korrelation zwischen der Survivin-Expression und einer ungünstigeren Gesamtüberlebenszeit aufgezeigt wurde (Lo Muzio et al. 2005). Daraus ließe sich folgern, dass die Survivin-Expression eher Aufschlüsse über die zukünftige Entwicklung und Aggressivität eines oropharyngealen Tumors zulässt, was wiederum Konsequenzen in der Therapie nach sich zieht

In der Gesamtbetrachtung scheint der LOXL4-Antikörper, im Besonderen in Kombination mit Survivin, geeignet zu sein als diagnostischer Marker für Oropharynxkarzinome zu fungieren.

Eine erhöhte Survivin-Expression im Primärtumor korrelierte mit einem fortgeschrittenem Primärtumorstadium, einem lokalem Lymphknotenbefall und eingeschränkt auch mit einer schlechteren Prognose und könnte somit als prognostischer Marker geeignet sein, Patienten mit einem aggressiveren Tumorwachstum zu selektieren, die einer umfangreicheren Therapie bedürfen.

6 Zusammenfassung

Eine Kohorte von 138 histopathologisch gesicherten Tumorproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Gaumentonsille wurde immunhistochemisch analysiert. Davon wurden 129 Proben (93,5%) positiv auf LOXL4 und 115 (83,3%) positiv auf Survivin getestet. Eine Übereinstimmung der individuellen LOXL4- und Survivin-Expressionsgrade als sogenanntes immunhistologisches Crossmatching zeigte sich bei 49 von 138 Patienten (35%). Zwischen den Graden der Immunreaktion von LOXL4 und den Tumorstadien fand sich ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,018$), nicht aber bezüglich der LOXL4-Expression mit dem Metastasierungsverhalten und mit der Gesamtüberlebensrate.

Dagegen korrelierte die Survivin-Expression signifikant mit der Tumorgröße bzw. Tumorstadium ($p=0,001$) und mit dem Nodalstatus ($p<0,001$). Patienten mit einer hohen Survivin-Expressionsrate hatten eine signifikant geringere Zweijahresüberlebensrate ($p<0,05$). Auch zeigte sich ein Trend in Richtung einer geringeren Fünf- und Zehnjahresüberlebensrate, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen.

Daher scheint die immunhistochemische Bestimmung von Survivin zur Beurteilung der Tumoraggressivität und zur Selektion von Hochrisikopatienten geeignet zu sein, während eine LOXL4-Expressionsbestimmung eher Vorteile als diagnostischer Marker aufweist aufgrund einer hohen Sensitivität, die sich insbesondere in Kombination mit einer Survivin-Bestimmung auf 98,6% erhöht. Damit könnten beide Antikörper auch als Target für eine klinische Anwendung von Nutzen sein. Die hier erstmalig simultan nachgewiesene Survivin- und LOXL4-Antigenexpression in einer Tumorentität von Kopf- und Halskarzinomen stellt somit einen viel versprechenden Ansatz in zukünftigen neoadjuvanten Therapien für Tonsillenkarzinome dar.

Literaturverzeichnis

- Adelstein, D.J., Lavertu, P., Saxton, J.P., Secic, M., Wood, B.G., Wanamaker, J.R., Eliachar, I., Strome, M., Larto, M.A.** (2000) Mature results of a phase III randomized trial comparing concurrent chemoradiotherapy with radiation therapy alone in patients with stage III and IV squamous cell carcinoma of the head and neck, *Cancer* 88: 876-883
- Adida, C., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Reyes-Mugicia, M., Altieri, D.C.** (1998) Anti-apoptosis-gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma, *Lancet* 351: 882-883
- Albinger-Hegy, A., Stoeckli, S.J., Schmid, S., Storz, M., Iotzova, G., Probst-Hensch, N.M., Rehrauer, H., Tinguely, M., Moch, H., Hegyi, I.** (2010) Lysyl oxidase expression is an independent marker of prognosis and a predictor of lymph node metastasis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC), *Int J Cancer* 126: 2653-2662
- Alkotyfan, K., Wiegand, S., Müller, H.H., Windfuhr, J.P., Werner, J.A., Sesterhenn, A.M.** (2010) Cyfra 21-1 as a tumor marker for follow-up of patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx, *Anticancer Res.* 30: 2291-2296
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C.** (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma, *Nat Med*: 917-921
- Asuncion, L., Fogelgren, B., Fong, K.S., Fong, S.F., Kim, Y., Csiszar, K.** (2001) A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has a altered scavenger receptor cysteine rich domain, *Matrix Biol.* 20 (7): 487-491
- Chang, BW., Kim, DH., Kowalski, DP., Burleson, JA., Son, YH., Wilson, LD., Haffty, BG.** (2004) Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in oropharyngeal squamous cell carcinoma, *Clin Cancer Res.* 10: 1678-1684
- Chiodino, C., Cesinaro, A.M., Ottani, D., Fantini, F., Giannetti, A., Trentini, G.P., Pincelli, C.** (1999) Communication: expression of the novel inhibitor of apoptosis survivin in normal and neoplastic skin, *J Invest Dermatol.* 113(3): 415-418

- Cho, H.J., Kim, H.R., Park, Y.S., Kim, Y.H., Kim, D.K., Park, S.L.** (2015) Prognostic value of survivin expression in stage III non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based therapy. *Surg Oncol.* 24 (4): 329-34
- Cooper, J.S., Pajak, T.F., Forastiere, A.A., Jacobs, J., Campbell, B.H., Saxman, S.B., Kish, J.A., Kim, H.E., Cmelak, A.J., Rotman, M., Machtay, M., Ensley, J.F., Chao, K.S., Schultz, C.J., Lee, N., Fu, K.K.** (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
- Csiszar, K.** (2001) Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70: 1-32
- Denaro, N., Lo Nigro, C., Natoli, G., Russi, E. G., Adamo, V., & Merlano, M. C.** (2011) The role of p53 and MDM2 in head and neck cancer, *ISRN otolaryngology*, 2011
- Dong, Y., Sui, L., Watanabe, Y., Sugimoto, K., Tokuda, M.** (2002) Survivin expression in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic implications, *Anticancer Res.* 22: 2377-2383
- Engels, K., Knauer, S.K., Metzler, D., Simf, C., Struschka, O., Bier, C., Mann, W., Kovács, A.F., Stauber, R.H.** (2007) Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker, *J Pathol.* 211(5): 532-540
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Nicolau, M., Dornhöfer, N., Kong, C., Le, Q.T., Chi, J.T., Jeffrey, S.S., Giaccia, A.J.** (2006) Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis, *Nature* 440(7088): 1222-1226
- Fakhry, C., Westra, W.H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J.A., Pinto, H., Forastiere, A., Gillison, M.L.** (2008) Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial, *J Natl Cancer Inst.* 100(4): 261-269
- Figuro Ruiz, E., Carretero Peláez, M.A., Lapiedra, R.C., Esparza Gómez, G., Moreno López, L.A.** (2004) Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer, *Med Oral.* 9(1): 14-23

- Forastiere, A., Koch, W., Trotti, A., Sidransky, D.** (2001) Head and neck cancer, *N Engl J Med.* 345(26): 1890-1900
- Forastiere, A., Leong, T., Rowinsky, E., Murphy, B.A., Vlock, D.R., DeConti, R.C., Adams, G.L.** (2001) Phase III comparison of high-dose paclitaxel + cisplatin + granulocyte colony-stimulating factor versus low-dose paclitaxel + cisplatin in advanced head and neck cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1393, *J Clin Oncol.* 19(4): 1088-1095
- Freier, K., Pungs, S., Sticht, C., Flechtenmacher, C., Lichter, P., Joos, S., Hofele, C.** (2007) High survivin expression is associated with favorable outcome in advanced primary oral squamous cell carcinoma after radiation therapy, *Int J Cancer* 120(4): 942-946
- Funk, G.F., Karnell, L.H., Robinson, R.A., Zhen, W.K., Trask, D.K., Hoffman, H.T.** (2002) Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a National Cancer Data Base report, *Head Neck* 24: 165-180
- Giampuzzi, M., Botti, G., Cilli, M., Gusmano, R., Borel, A., Sommer, P., Di Donato, A.** (2001) Down-regulation of lysyl oxidase-induced tumorigenic transformation in NRK-49F cells characterized by constitutive activation of ras proto-oncogene, *J Biol Chem.* 276(31): 29226-29232
- Görögh, T., Weise, J.B., Holtmeier, C., Rudolph, P., Hedderich, J., Gottschlich, S., Hoffmann, M., Ambrosch, P., Csiszar, K.** (2007) Selective upregulation and amplification of the lysyl oxidase like-4 (LOXL4) gene in head and neck squamous cell carcinoma, *J Pathol.* 212(1): 74-82
- Görögh, T., Holtmeier, C., Weise, J.B., Hoffmann, M., Ambrosch, P., Laudien, M., Csiszar, K.** (2008) Functional analysis of the 5' flanking domain of the LOXL4 gene in head and neck squamous cell carcinoma cells, *Int J Oncol.* 33(5): 1091-1098
- Gu, J., Ren, L., Wang, X., Qu, C., Zhang, Y.** (2015) Expression of livin, survivin and caspase-3 in prostatic cancer and their clinical significance. *Int J Clin Exp Pathol.* 8 (11): 1403-9
- Hirano, H., Maeda, H., Yamaguchi, T., Yokoda, S., Mori, M., Sakoda, S.** (2015) Survivin expression in lung cancer: association with smoking, histological types and pathological stages. *Oncol Lett.* 10 (3): 1456-1462

- Hoffmann H.T, Karnell L.H, Funk G.F., et al.** (1998) The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head, Neck Surg.* 124: 951-962
- Holtmeier, C., Görögh, T., Beier, U., Meyer, J., Hoffmann, M., Gottschlich, S., Heidorn, K., Ambrosch, P., Maune, S.** (2003) Overexpression of a novel lysyl oxidase-like gene in human head and neck squamous cell carcinomas, *Anticancer Res.* 23: 2585-2591
- Kagan, H.M., Reddy, V.B., Panchenko, M.V., Nagan, N., Boak, A.M., Gacheru, S.N., Thoma, K.M.** (1995) Expression of lysyl oxidase from cDNA constructs in mammalian cells: the propeptide region is not essential to the folding and secretion of the functional enzyme, *J Cell Biochem.* 59(3): 329-338
- Kagan, H.M., Li, W.** (2003) Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell, *J Cell Biochem.* 88(4): 660-672
- Kapranos, N., Stathopoulos, G.P., Manolopoulos, L., Kokka, E., Papadimitriou, C., Bibas, A., Yiotakis, J., Adamopoulos, G.** (2001) p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value, *Anticancer Res.* 21: 521-528
- Kawasaki, H., Altieri, D.C., Lu, C.D., Toyoda, M., Tenjo, T., Tanigawa, N.** (1998) Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer, *Cancer Res.* 58(22): 5071-5074
- Kirschmann, D.A., Seftor, E.A., Fong, S.F., Nieva, D.R., Sullivan, C.M., Edwards, E.M., Sommer, P., Csiszar, K., Hendrix, M.J.** (2002) A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion, *Cancer Res.* 62, 4478-4483
- LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., MacKenzie, A.E.** (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer, *Oncogene* 17, 3247-3259
- La Vecchia, C., Tavani, A., Franceschi, S., Levi, F., Corrao, G., Negri, E.** (1997) Epidemiology and prevention of oral cancer, *Oral Oncol.* 33(5): 302-312

- Le, Q.T., Denko, N.C., Giaccia, A.J.** (2004) Hypoxic gene expression and metastasis, *Cancer Metastasis Rev.* 23(3-4): 293-310
- Le, Q.T., Harris, J., Magliocco, A.M., Kong, C.S., Diaz, R., Shin, B., Cao, H., Trotti, A., Erler, J.T., Chung, C.H., Dicker, A., Pajak, T.F., Giaccia, A.J., Ang, K.K.** (2009) Validation of lysyl oxidase as a prognostic marker for metastasis and survival in head and neck squamous cell carcinoma: Radiation Therapy Oncology Group trial 90-03, *J Clin Oncol.* 27(26): 4281-4286
- Lo Muzio, L., Farina, A., Rubini, C., Pezzetti, F., Stabellini, G., Laino, G., Santarelli, A., Pannone, G., Bufo, P., de Lillo, A., Carinci, F.** (2005) Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity, *Cancer Lett.* 225: 27-33
- Lunt, S.J., Chaudary, N., Hill, R.P.** (2009) The tumor microenvironment and metastatic disease, *Clin Exp Metastasis* 26(1): 19-34
- Mäki, J.M., Tikkanen, H., Kivirikko, K.I.** (2001) Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme: the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains, *Matrix Biol.* 20(7): 493-496
- Marioni, G., Bedogni, A., Giacomelli, L., Ferraro, S.M., Bertolin, A., Facco, E., Staffieri, A., Marino, F.** (2005) Survivin expression is significantly higher in pN+ oral and oropharyngeal primary squamous cell carcinomas than in pN0 carcinomas, *Acta Otolaryngol.* 125(11): 1218-1223
- Marioni, G., D'Alessandro, E., Bertolin, A., Staffieri, A.** (2010) Survivin multifaceted activity in head and neck carcinoma: current evidence and future therapeutic challenges, *Acta Otolaryngol.* 130: 4-9
- Monzó, M., Rosell, R., Felip, E., Astudillo, J., Sánchez, J.J., Maestre, J., Martín, C., Font, A., Barnadas, A., Abad, A.** (1999) A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancer, *J Clin Oncol.* 17(7): 2100-2104

- Moreno-Lopez, L.A., Esparza-Gómez, G.C., González-Navarro, A., Cerero-Lapiedra, R., González-Hernández, M.J., Domínguez-Rojas, V.** (2000) Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain, *Oral Oncol*, 36(2): 170-174
- Neufcoeur, P.E., Arafa, M., Delvenne, P., Saussez, S.** (2009) Involvement of human papillomavirus in upper aero-digestive tracts cancers, *Bull Cancer* 96(10): 941-950
- Negri, E., Boffetta, P., Berthiller, J., Castellsague, X., Curado, M.P., Maso, L.D., Daudt, A.W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wünsch-Filho, V., Franceschi et al.** (2009) Family history of cancer: Pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium, *Int. J. Cancer* 124: 394–401
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P.** (2005) Global Cancer Statistics, 2002. CA, *A Cancer Journal for Clinicians* 55: 74–108
- Pizem, J., Cör, A., Gale, N.** (2004) Survivin expression is a negative prognostic marker in laryngeal squamous cell carcinoma and is associated with p53 accumulation, *Histopathology* 45, 180-186
- Rucker, R.B., Kosonen, T., Clegg, M.S., Mitchell, A.E., Rucker, B.R., Uriu-Hare, J.Y., Keen, C.L.** (1998) Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking, *Am J Clin Nutr.* 67(5 Suppl): 996-1002
- Sarela, A.I., Macadam, R.C., Farmery, S.M., Markham, A.F., Guillou, P.J.** (2002) Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma, *Gut.* 46(5): 645-650
- Sebban, S., Golan-Gerstl, R., Karni, R., Vaksman, O., Davidson, B., Reih, R.** (2013) Alternatively spliced lysyl oxidase-like 4 isoforms have a pro-metastatic role in cancer. *Clin Exp Metastasis.* 30 (1:) 103-17
- Sidari, L., Tirelli, G., Papanikolla, L., Sasso, F., Russolo, M., Melato, M.** (2003) Flow cytometry expression of p53 and PCNA in oral/oropharynx carcinomas and their lymph node metastases, *Anticancer Res.* 23: 4127-4132
- Scola, N., Görögh, T.** (2010) LOXL4 as a selective molecular marker in primary and metastatic head/neck carcinoma, *Anticancer Res.* 30(11): 4567-4571

- Swana, H.S., Grossman, D., Anthony, J.N., Weiss, R.M., Altieri, D.C.** (2009) Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer, *N Engl J Med.* 341(6): 452-453
- Tanaka, K., Iwamoto, S., Gon, G., Nohara, T., Iwamoto, M., Tanigawa, N.** (2000) Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas, *Clin Cancer Res.* 6(1): 127-134
- Vidal, L., Gillison, M.L.** (2008) Human papillomavirus in HNSCC: recognition of a distinct disease type, *Hematol Oncol Clin North Am.* 22(6): 1125-42, vii
- Vokes, E.E., Weichselbaum, R.R., Lippman, S.M., Hong, W.K.** (1993) Head and neck cancer, *N Engl J Med.* 328(3): 184-194
- Watkinson, J.C., Gilbert, R.W.** (2012) Stell & Maran's Textbook of Head and Neck Surgery and Oncology, Fifth Edition: 1079
- Weise, J.B., Rudolph, P., Heiser, A., Kruse, M.L., Hedderich, J., Cordes, C., Hoffmann, M., Brant, O., Ambrosch, P., Csiszar, K., Görögh, T.** (2008) LOXL4 is a selectively expressed candidate diagnostic antigen in head and neck cancer, *Eur J Cancer.* 44(9): 1323-1331
- Yilmaz, M., Suer, I., Karatas, O.F., Cansis, H., Ozen, M.** (2016) Differential expression of LOXL4 in normal and Tumor tissue samples of laryngeal squamous cell carcinoma, *Clin Otolaryngol.:* 41 (3): 206-10

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Ambrosch, Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Des Weiteren danke ich besonders Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. Tibor Görögh für die Überlassung des Themas und die kompetente und geduldige Unterstützung während der gesamten Promotionszeit sowie Herrn Priv. Doz. Dr. Jan Bernd Weise für die ebenso kompetente und geduldige Unterstützung bis zu seinem Wechsel in die Selbstständigkeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren 4. Juni 1966 in Stralsund
Familienstand Verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit deutsch

Schule

1986 Abitur am Gymnasium Wellingdorf in Kiel

Hochschulausbildung

1986-1993 Zahnmedizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
1993 Approbation als Zahnarzt

Berufstätigkeit

1993 - 1994 Assistenzzeit beim zahnärztlichen Sanitätsdienst bei der Bundeswehr in Flensburg
1994 - 1995 Assistenzzeit in der Zahnarztpraxis Dr. Jaroslav Dolezal in Hamburg
1995 - 1996 Angestellter Zahnarzt in der Zahnarztpraxis Dr. Andreas Gleichfeld in Kiel
1996 Angestellter Zahnarzt in der Zahnarztpraxis Dr. Erhard Sayk in Kiel
1996 - 2004 Praxisübernahme und Praxisinhaber einer Zahnarztpraxis in Kiel / Gaarden zusammen mit Kollege Dr. Tim Rasper

-
- Seit 2004 Lfd. Praxisinhaber der Zahnarztpraxis Diercks und Dr. Bauersachs in Kiel / Holtenauer Straße
- Seit 2012 Lfd. Praxisinhaber einer zweiten Praxis Diercks in Kiel / Südfriedhof
- Januar 2015 Diercks, I.; Görögh, T.; Weise, J.B. (2015): Immunohistochemical analysis of clinical and pathological relevance of LOXL4- and Survivin expressions in oropharyngeal carcinomas. Paper presented at the 1st international symposium in head and neck cancer in conjunction with the 5th annual meeting on experimental and translational head and neck oncology, Essen, Germany.
- Kiel, Juli 2016