

Aus der Klinik für Hals- , Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

(Direktor: Prof. Dr.med. P. Ambrosch)

Im Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Expression des Protoonkogens Ets2 in
Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches
– eine immunhistochemische Untersuchung

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Berenike Oetke, geb. Edling

aus Erfurt

Kiel 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S Gottschlich

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Allgemeine Einführung	1
1.1.1. Risikofaktoren und Tumorentstehung von Plattenepithelkarzinomen	1
1.1.2. Prognose und Therapieformen	2
1.2. Ets2 und seine biologischen Funktionen	3
2. Fragestellung	5
3. Material und Methoden	6
3.1. Material und Datenerhebung	6
3.2. Klinische und histologische Daten	6
3.3. Statistische Methoden	10
3.4. Immunhistochemische Untersuchungen	10
3.4.1. Verwendete Antikörper	11
3.4.2. Herstellung der Schnitte	11
3.4.3. Vorbehandlung der Präparate	12
3.4.4. Antigendemaskierung	12
3.4.5. Färbemethodik	13
3.4.6. Dehydration und Fixierung der Objektträger	14
3.5. Auswertung der immunhistochemischen Färbung	14
4. Ergebnisse	16
4.1. Expression von Ets2 in benignen und malignen Gewebeproben	16
4.2. Expression von Ets2 in Abhängigkeit von Geschlecht und Grading	17 17
4.3. Expression von Ets2 in Abhängigkeit vom histopathologischen Staging	19 19
5. Diskussion	21
5.1. Expression von Ets2 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Halsbereiches	21
5.2. Expression von Ets2 in Malignomen anderer Gewebe	24

5.3. Expression von Ets2 in Adenokarzinomen	26
6. Zusammenfassung	31
7. Literaturverzeichnis	33
8. Anhang	38
Tab. 1 Anhang	38
histopathologische und färbemethodische Daten	38
9. Danksagung	50
10. Lebenslauf	51

Abkürzungen

ABC-Komplex	= Avidin-Biotin-Komplex
CSF-1	= Colony Stimulating Factor 1
EBS	= Ets-Bindungsstelle
EBV	= Epstein-Barr-Viren
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	= Epidermal Growth Factor
Ets2	= V-ets Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 2 (Avian)
EZM	= Extrazellulärmatrix
HPV	= Humane Papillomaviren
HSV	= Herpes-Simplex-Viren
hTERT	= humane Telomerase Reverse Transkriptase
IL	= Interleukin
MAPK	= Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMP	= Matrixmetalloproteinase
PCR	= Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	= Reverse Transcriptase polymerase chain reaction
Stat3	= Signal transducer and activator of transcription 3
TBS	= Tris-buffered Saline
tPA	= tissue-type Plasminogenaktivator
uPA	= Urokinase-Plasminogenaktivator

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung

1.1.1. Risikofaktoren und Tumorentstehung von Plattenepithelkarzinomen

Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Hals-Bereiches stellen heutzutage mit einer Inzidenz von ca. 4.000.000 Neuerkrankungen eine der häufigsten malignen Veränderungen weltweit dar. (*Wang et al., 2012*) Dabei liegt das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle mit 7,9% bei Männern und 3,9% der Frauen an vierter bzw. achter Stelle der Tumormanifestationen. Unter Karzinogenese versteht man den Prozess der Tumorentstehung, der aktuellen Modellvorstellungen zufolge ein multikausales Geschehen darstellt. Risikofaktoren sind genetische Alterationen innerhalb des Plattenepithels, sowie verschiedene Umweltfaktoren und individuelle Faktoren. Hauptrisikofaktoren zur Entstehung von Tumoren sind Tabak- und Alkoholkonsum (*Valavanidis et al., 2009*). Einzelne Studien gehen von einem Anteil von 90% Rauchern unter den erkrankten Personen aus. 75% der erkrankten Personen sind Raucher und konsumieren regelmäßig Alkohol (*Mroz et al., 2013*). Die Kombination von gesteigertem Tabak- und Alkoholkonsum führt zu einem 50-fach erhöhtem Erkrankungsrisiko (*Rodriguez et al., 2004*). Die kanzerogenen bzw. prokanzerogenen Inhaltsstoffe des Tabaks, wie Nitrosamine oder Benz-(a)-pyren, verursachen durch Guanin-Nukleotid-Transversionen Punktmutationen im Genom (*Anderson et al., 2003*). Alkohol wird zu Acetaldehyd metabolisiert und kann in dieser Form zu DNA-Schäden führen (*Seitz et al., 2001; Pöschl et al., 2004*).

Neben diesen Hauptrisikofaktoren existieren eine Vielzahl von nachgewiesenen und mutmaßlichen Faktoren, die zur Karzinogenese beitragen. Dazu zählen u.a. Ernährungsfaktoren und Virusinfektionen wie z.B. durch das humane Papillomavirus (HPV) (*Dayyani et al., 2010 ; Popovic et al., 2010,*) Epstein-Barr-Viren (EBV) bzw. Herpes-Simplex-Viren (HSV) (*López et al 2003; Zheng et al., 2010;*). Virusproteine, wie die HPV-Proteine E6 und E7, können die in Zellproliferation und Apoptose entscheidenden Proteine wie p53 inaktivieren und somit die Tumorentstehung begünstigen (*Barber et al., 2013; Tsimplaki et al., 2014*). P53 konnte mittels immunhistochemischer Färbemethoden bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches vermehrt nachgewiesen

werden (*Cordes et al., 2009*). Desweiteren spielen häufig auftretende und chronische Entzündungen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Neoplasien indem es zu einer verringerten reparativen Gewebeproliferation infolge von Schädigungen der DNA kommt (*Schottenfeld et al., 2006*).

In einer vorausgehenden Studie wurden mittels cDNA-microarray und RT-PCR Gewebeproben von 6 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches untersucht (*Gottschlich et al., 2006*). Es wurden Gewebeproben aus dem Tumorzentrum, aus dem Randbereich und aus gesunder Mukosa der Patienten entnommen. Dabei konnten 22 Gene nachgewiesen werden, die eine Unterscheidung zwischen Tumorgewebe, Mukosa und dem Übergangsbereich ermöglichten. Neben der erhöhten Expression von anti-apoptotisch und verringerten Expression von proapoptotisch wirksamen Genen im Tumorzentrum konnten STAT3 und Ets2 im Tumorgewebe deutlich vermehrt nachgewiesen werden. Dabei konnte Ets2 durch RT-PCR in deutlich höherem Umfang im Tumorgewebe im Vergleich zur gesunden Mukosa mittels sequenzspezifischen Oligonukleotiden detektiert werden, STAT3 wurde ausschließlich in tumorösem Gewebe exprimiert.

1.1.2. Prognose und Therapieformen

Die Prognose maligner Kopf-Hals-Erkrankungen hat sich trotz der Entwicklungen in Diagnostik und Therapie in den letzten Jahren nicht deutlich verbessert und gehört zu den Tumorentitäten mit der höchsten Mortalitätsrate (*Schlumpf et al., 2013; Suzuki et al., 2014*). Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt in den Stadien T1 und T2 zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 80% und 100%, in fortgeschrittenen Stadien bei kombinierter Radio- und Chemotherapie zwischen 55% und 62%. Ausschlaggebend für die Prognose sind neben Tumorgröße v.a. die Metastasierung in regionäre Lymphknoten sowie die Fernmetastasierung in andere Organe. (*Enepekides et al., 1999; Dogan et al., 2014*) Eine einzelne Lymphknotenmetastase (N1) reduziert die Überlebensrate um die Hälfte; bei Tumoren großer lokaler Ausdehnung in Verbindung mit Lymphknotenbefall ist von einer 5-Jahresüberlebensrate von 30% auszugehen (*Lang et al., 2002; Bauer et al., 2008*). Wurde eine Lymphknotenmetastase festgestellt, kommt es nach abgeschlossener

Therapie häufiger zu Rezidiven des Primärtumors sowie Fernmetastasen in andere Organe wie Lunge und Knochenmark (Rodrigo et al., 2014). Bis heute gelten operative Tumorentfernung sowie Radio- und Chemotherapie und deren Kombinationen als Mittel der Wahl. Studien geben an, dass 60-65% der Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Halsbereiches erkrankten durch einen operativen Eingriff und/oder Strahlentherapie geheilt werden konnten (*Licitra et al., 2004; Schlumpf et al., 2013*). Befindet sich die Erkrankung im frühen Stadium (Stadium I-II) wird entweder Chirurgie oder Radiatio angewandt (*Purohit et al., 2013*); im fortgeschrittenen Stadium (III-IV) finden häufig Kombinationen aus radikaler Entfernung des Tumors samt der befallenen Lymphknoten (Neck Dissection) und Radio- bzw. auch Chemotherapie Anwendung (*Rasse, 2008*).

1.2. Ets2 und seine biologischen Funktionen

Das nukleäre Proto-onkogen Ets2 wurde zunächst über seine DNA-Sequenz als Teil des v-ets-Anteils des gag-myb-Ets-fusionproteins des E26 Retrovirus identifiziert und codiert ein 56 kDalton schweres nukleäres Phosphoprotein mit schnellem Turnover und einer Halbwertszeit von 20 min. (*Chatterjee et al., 2013*). Der für Ets2 codierende Abschnitt wurde auf dem langen Arm des Chromosoms 21 lokalisiert (*Rueda et al., 2013*). Das Ets-Proto-onkogen ist ein Transkriptionsfaktor, dessen spezifische Ets-Bindungsdomäne aus 85-90 Aminosäuren besteht. Die für die Ets-Familie typische DNA-Bindungsdomäne enthält einen C- und N-Terminus und eine zusätzlichen Bindungsstelle für die Phosphorylierung durch Matrixmetalloproteinkinasen. Durch zahlreich enthaltene positiv geladene, aromatische Reste ist eine Bindung an purinreiche (GGAA core motif) Segmente der DNA möglich (*Oikawa et al., 2003; Buchwalter et al., 2004*). Im humanen Promoter tritt die Ets-Bindungsstelle als Palindrom auf und weist eine hohe Affinität zu Ets1 und Ets2 auf, deren Interaktion intrazellulär zu einer gesteigerten Transkription führt (*Do et al., 2012*). Mehrere Studien wiesen die strukturelle Funktion von Ets2 im Rahmen der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose nach (*Cooper et al., 2014; Oikawa et al., 2003*).

Makrophagen entstehen als letzte Differenzierung aus Monocyten der myeloischen Reihe und spielen bei der Wundheilung im Rahmen der Entzündung sowie

Abwehrmechanismen des Organismus gegen Infektiöse Krankheiten und Neoplasien eine entscheidende Rolle. Die Expressierung von Ets2 korreliert dabei mit den späteren Stufen der Makrophagendifferenzierung; in dieser Phase startet Ets2 nach Aktivierung durch IL-2 die Funktion der Makrophagen (*Zabuawala et al., 2010*). Ets2 wird sowohl durch den klassischen Ras/raf/MAPK pfad, via elk1, wie auch posttranskriptional durch Phosphorylierung reguliert (*Yordy et al., 2000; Chou et al., 2010*).

Ets-Transkriptionsfaktoren sind maßgeblich an der Bildung von Extrazellulärmatrix und der epithelial-mesenchymalen Entwicklung beteiligt (*Trojanowska et al., 2000*). Während der Embryogenese, des weiblichen Reproduktionszyklus, Angiogenese und Wundheilung findet eine physiologische Synthese, Deposition und Degradation der EZM statt. Pathologisch wird dieser Vorgang durch eine Dysbalance zwischen Synthese und Degradation. Der Verlust einer normalen EZM ist mit Tumorinvasion und Metastasierung assoziiert (*Strilic et al., 2016*).

2. Fragestellung

Dieser Arbeit liegen folgende Fragestellungen zugrunde:

1. Kann die bereits nachgewiesene unterschiedliche Expression in gesundem Epithel und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches von Ets2 auf mRNA-Ebene auch auf Proteinebene bestätigt werden?
2. Gibt es Korrelationen zwischen dem Ets2-Protein-Expressionsgrad in Plattenepithelkarzinombiopsaten und den klinisch-pathologischen Patientendaten und kann Ets2 als potentieller molekularer Tumormarker für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches bewertet werden ?

3. Material und Methoden

3.1. Material und Datenerhebung

Es wurden 141 Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus Primärtumoren der Mundhöhle und des Oropharynx untersucht. Diese stammten von Patienten der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie (Direktorin: Prof. Dr. med. Petra Ambrosch), sowie der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Plastische Operationen (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Wiltfang) des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, und wurden im Zeitraum zwischen 1994 und 2003 im Sinne einer Tumorsektion operativ entnommen.

Gemäß den Vorgaben der TNM-Klassifikation der UICC von 1987 wurden die Gewebeproben klassifiziert. Die klinischen und histopathologischen Diagnosen wurden den Krankenakten bzw. den Berichten der Histopathologie entnommen. Es handelte sich bei den untersuchten Proben ausschließlich um Gewebe aus Primärtumoren der Mundhöhle und des Pharynx.

3.2. Klinische und histologische Daten

73,7% der untersuchten Gewebeproben wurden aus den Bereichen des weichen Gaumens, der Gaumenbögen, Tonsille sowie der Glossotonsillarfurche und des Zungengrundes entnommen. 37 der 141 entnommenen Proben stammen aus dem Bereich des Pharynx, darunter 25 aus dem Oropharynx, 5 aus dem Hypopharynx, 3 aus der Vallecula und 4 aus der Pharynxhinterwand.

In Tab.1 sind die Lokalisationen der untersuchten Primärtumore des Kollektivs nach Lokalisationsschlüssel des ICD-O-Codes aufgeführt.

Lokalisationen	Anzahl Patienten	Anteil am Kollektiv (%)	ICD-O Code
Tonsille	59	41,8	C09
Gaumenbogen	15	10,6	C09.0
Weicher Gaumen	4	2,8	C05.1
Zungengrund	21	14,9	C01.9
Glossotonsillarfurche	2	1,4	C02.4
e	3	2,1	C05.2
Uvula	25	14,2	C10.9
Oropharynx	5	3,5	C13
Hypopharynx	3	2,1	C10.0
Vallecula	4	2,8	C13.2
Pharynxhinterwand			
Gesamt	141	100	

Tab.1 Verteilung der Plattenepithelkarzinome auf Lokalisationen, deren prozentuale Verteilung am Gesamtkollektiv (n=141) und die zugehörigen ICD-O Codes der Lokalisationen der untersuchten Plattenepithelkarzinome

Nach der TNM Klassifikation erfolgte das histopathologische Staging in folgende Gruppen:

22 (15,6%) Plattenepithelkarzinome wurden als Tumorgroße T1, 45 (31,9%) als T2, 32 (22,7%) als T3 und 42 (29,8%) als T4 eingestuft. Lediglich 5 Proben wurden dem Lymphknotenstatus N3 zugeordnet, 110 der untersuchten Proben wiesen einen N0-Status (n=60; 42,6%) oder N2-Status (n=50; 35,5%) auf. Die Zuordnung Nodalstatus N1 erhielten 26 Gewebeproben (18,4%). Unter N2 wurden die Untergruppen N2a-N2c zusammengefasst, die die Verteilung und Größe der betroffenen regionären Lymphknoten detailliert beschreibt. Die Gruppe Nx (=regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden) war nicht vertreten.

Die histopathologische Untersuchung von Tumorgewebe umfasst desweiteren die Beurteilung evtl. vorhandener Fernmetastasen. Hier erfolgt die Unterteilung in M0, d.h. keine Fernmetastasen sind im untersuchten Gewebe vorhanden, M1 beschreibt das Vorhandensein von Fernmetastasen. 135 der untersuchten Patienten (95,7%) zeigten keine Fernmetastasen und wurden dem Status M0 zugeordnet. Nur bei 6 Patienten (4,3%) konnte eine Fernmetastasierung festgestellt werden.

Das histopathologische Grading ergab folgende Einteilung: 4 Tumoren (2,8%) wurden dem Differenzierungsgrad G1 zugeordnet, 97 (68,8%) G2, 39 (27,7%) G3 und 1 Probe (0,7%) G4. (Tabellen zur Einteilung des histopathologischen Stagings und Gradings siehe Anhang). Das Alter der Patienten lag zwischen 38 und 89 Jahren, durchschnittlich bei 58 (+10,4) (siehe Abb.1). 21% der untersuchten Patienten waren weiblichen, 79% männlichen Geschlechts (siehe Abb.2).

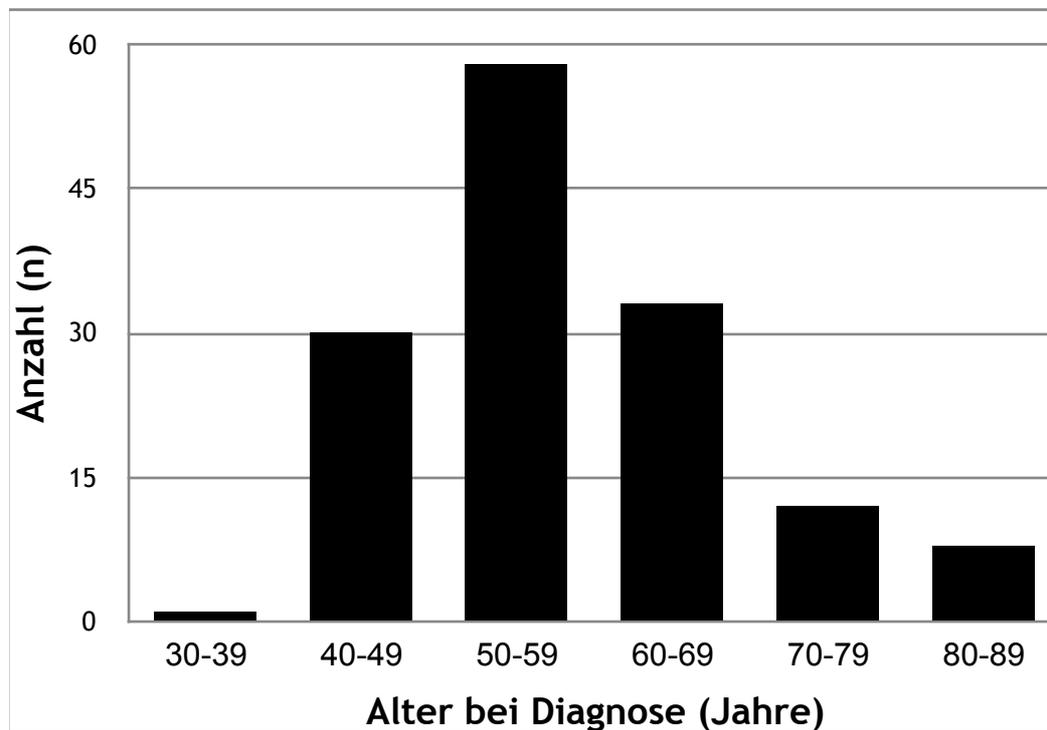


Abb. 1 Verteilung des Alters der untersuchten Patienten bei Diagnosestellung

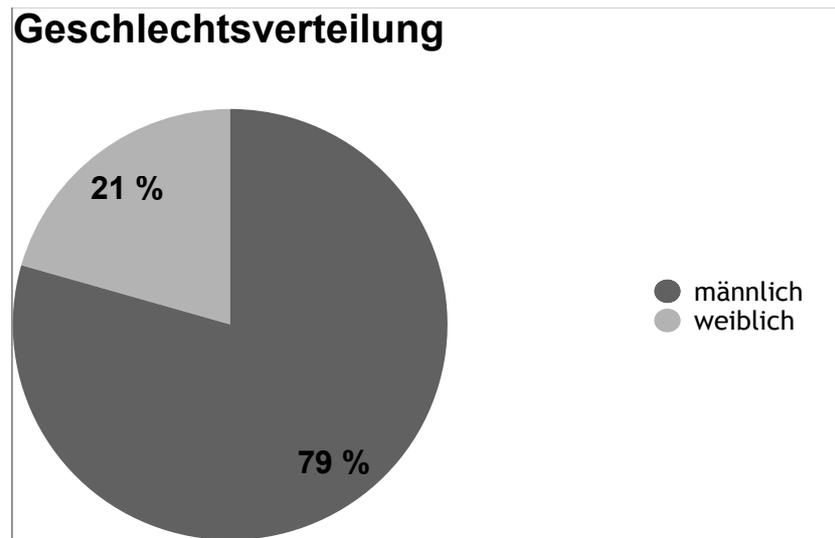


Abb. 2 Anteil von Frauen und Männern im untersuchten Patientenkollektiv

3.3. Statistische Methoden

Das Patientenalter wurde als quantitative Größe anhand von Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie den Quartilen beschreibend dargestellt. Zu ordinal und nominal skalierten Größen wie Geschlecht, Lokalisation, Tumorstadium, Nodalstatus, Fernmetastasierung, ETS-2 und Grading wurden absolute und prozentuale Häufigkeiten angegeben. Abhängigkeiten dieser Größen von ETS-2 wurden anhand von Kontingenztafeln dargestellt und mittels Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend auf Signifikanz geprüft. Bei zu kleinen erwarteten Häufigkeiten wurden exakte Tests berechnet. Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt. Für die Durchführung der statistischen Berechnungen wurde PASW 18 (SPSS Inc. IBM Company, Chicago, USA) eingesetzt.

3.4. Immunhistochemische Untersuchungen

Um die Sensitivität und Effizienz des Nachweises von Proteinen mittels Immunhistochemie zu steigern wurden sog. indirekte Methoden angewendet. In der vorliegenden Untersuchung wurde die ABC-Methode angewandt. Dabei kommt es durch Mehrfachbindung eines markierten Sekundärantikörpers an einen meist nur in geringer Menge in einem Antigen-Antikörper-Komplex gebundenen Primärantikörper zu einer Signalamplifizierung.

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden von drei fachlich kundigen Personen getrennt voneinander bei einer 400-fachen Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop bezüglich der Färbeintensität bewertet, wobei zur einheitlichen Beurteilung folgender Score herangezogen wurde (siehe Tab. 2).

Score 0	Keine Färbung erkennbar
Score1	Schwache Färbung
Score2	Deutliche Färbung
Score 3	Starke Färbung

Tab. 2 Einteilung des immunhistochemischen Scores

Zur Kontrolle wurden Schnitte von gesunder Mukosa des Nasopharynx und Epithelzelllinien des Oropharynx gefärbt und nach erfolgter negativer Färbungskontrolle bei den folgenden Färbungen mitgeführt.

3.4.1. Verwendete Antikörper

Als spezifischer unmarkierter Sekundärantikörper wurde Normal Anti Rabbit der Firma Vectostain in einer Verdünnung von 1:50 verwendet; als primärer spezifischer Antikörper der polyklonale Anti-ets-antikörper der Firma Acris (Herford, Deutschland; Katalog Nr. BP676) in einer Verdünnung von 1:100.

3.4.2. Herstellung der Schnitte

Die ausgewählten in Paraffin eingebetteten Tumorblöcke wurden 24 Stunden vor dem Schneiden bei -20° tiefgefroren. Die Blöcke wurden am Schneidegerät Mikrotom 2050 Supercut (Firma Reichert-Jung, Nußloch) in einer Stärke von 4,5µm

geschnitten. Anschließend erfolgte die Entspannung der gewonnenen Schnitte im Wasserbad gefüllt mit Aqua dest. bei 37°.

Nachdem die Schnitte mit Hilfe von Objektträgern (Superfrost, Firma Menzel, Braunschweig) aus dem Bad entnommen wurden erfolgte eine erste Trocknung auf dem Strecktisch Medax Typ 12801 der Firma Nagel. Abschließend wurden die Schnitte für 24h im Trockenschrank (Firma Memmert, Schwabach) bei 37° getrocknet.

3.4.3. Vorbehandlung der Präparate

Vor der Antigendemaskierung und Färbung wurden die Präparate in für 2x10 min in Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (2x10 min 100% Ethanol, 2x5 min 95%, 5min 80% und 5 min 70%) entparaffiniert und anschließend in destillierten Wasser gespült. Die Rehydratation erfolgte für 10 min in TBS.

3.4.4. Antigendemaskierung

Die Antigendemaskierung dient der Wiederherstellung der Immunreaktivität von formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe.

Gewöhnlich finden Kombinationen von Retrieval-Lösungen und Mikrowellenöfen Einsatz. Um die vorhandenen reaktionsfähigen Epitope zu demaskieren wurden die Schnitte in eine mikrowellengeeignete Schaukel überführt und in 200 ml 0,01M Citratpuffer von pH 6,0 in einer Mikrowelle (Samsung, T.D.S., Daegu, Südkorea) bei 450 Watt für 2x7 min erhitzt. Nach der ersten Erhitzungsphase wurden 50 ml Aqua dest. aufgefüllt, um die durch Verdunstung verlorengegangene Flüssigkeit aufzufüllen. Um eine Schädigung der Objektträger zu vermeiden kühlten die Schnitte für 20 min im Citratpuffer ab und wurden danach mit Aqua dest. gespült.

Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 100ml Lösung, bestehend aus konzentriertem Wasserstoffperoxid 30% (J.T.Baker, Deventer, Holland) und Methanol

(Merck, Darmstadt) im Verhältnis 1:100, neutralisiert. Danach wurden die Schnitte in destilliertem Wasser und anschließend TBS gespült.

3.4.5. Färbemethodik

Zunächst wurde die endogene Peroxidase des Tumorgewebes mit einer Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung im Verhältnis 100:1 geblockt indem die Objektträger in einer Schaukel für 10 min. in der Lösung belassen wurden. Es folgten Spülungen mit Aqua dest und TBS. Das auf den Objektträgern befindliche Gewebe wurde, um eine optimale Verteilung der Antikörperlösungen zu gewährleisten, mit einem DakoPen (Dako Cytomation, Hamburg) umrandet, wodurch ein Auslaufen der Flüssigkeit verhindert wird.

Das anschließende Blocking wurde mit einer Verdünnung des Serums des Antikörpers (Normal Anti Rabbit, Vector Laboratories Inc., USA) in TBS in einem Verhältnis von 1:100 für 15 min durchgeführt. Danach wurden die Objektträger gründlich abgetropft. Der Primärantikörper wurde mit TBS im Verhältnis 1:100 verdünnt und für 60 min bei Zimmertemperatur im Sinne einer Inkubation auf die Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden wiederum in eine Schaukel überführt und 3x5 min. lang mit TBS gespült. Anschließend wurde der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:50 für 30 min auf den Trägern belassen. Um nicht anhaftende Proteine zu entfernen folgten erneut Spülungen mit TBS für 3x 15 min.

ABC-Komplex

Der erste Schritt der Avidin-Biotin-Färbemethode umfasst das Aufbringen des AB-Komplexes, der 30 min zuvor angesetzt wurde. Hierfür wurden 5ml TBS mit je 2 Tropfen der Lösung A und der Lösung B des ABC-kits der Firma Vector (Vectastain Elite ABC Kit) in einem Reagenzglas vermischt.

Nach halbstündiger Einwirkzeit des AB-Komplexes wurden die Träger wiederum für 3x2 min in TBS gespült.

Gemäß dem zweiten Schritt der ABC-methode wurde eine Chromogenlösung (Vector Nova Red Substrate Kit for Peroxidase; Vector Laboratories Inc, USA) nach Verdünnen mit TBS (5ml TBS und 3 Tropfen der Lösung C Vectorstain) für 20 min aufgebracht. Eine Spülung der Schnitte mit TBS für 10 min beendete die Färbung; abschließend wurden Reste der Lösungen mit Aqua dest abgespült. (Vectastain Elite ABCKit PK-6200 , Vector Laboratories Inc., USA)

Um einen optimalen Kontrast zwischen Zellkernen und Zytoplasma des gefärbten Gewebes zu erhalten hat sich die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer etabliert. Angesetzt mit Aqua dest im Verhältnis 1:2 wurde das Hamälaun (Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie, Merck, Darmstadt) für 30 sec. aufgetragen und danach unter fließend Wasser 10 min lang abgespült.

3.4.6. Dehydration und Fixierung der Objektträger

Um das gefärbte Gewebe zu dehydrieren und zu fixieren, wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70%, 80%, 2x96% und abschließend 100% Ethanol für je 5min belassen. Es folgte eine Inkubation in Xylol für 2x10 min und das abschließende Eindecken der Objektträger mithilfe von Eukitt (Eukitt quick hardening mounting medium, Fluka Bio Chemika, Schweiz).

3.5. Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die gefärbten Objektträger wurden bei 400-facher Vergrößerung durch ein Lichtmikroskop (Axioplan, Zeiss Germany, München) durchmustert und repräsentative Bereiche mit einer Digitalkamera (Canon Powershot A 80; Canon Inc., USA) fotografiert.

Bei der Durchmusterung der Objektträger wurde zunächst das gesamte Tumorgewebe in geringerer Vergrößerung beurteilt und bei starker Vergrößerung die genaue Einteilung in die verschiedenen Scores vorgenommen.

Die erste Beurteilung der Färbintensität erfolgte direkt im Anschluß an den Färbevorgang und Eindeckung der Objektträger. Nach Färbung aller 141 Schnitte wurde erneut eine Einteilung in Scores durch zwei Personen unabhängig voneinander vorgenommen. Die Färbungen zeigten dabei keine Veränderungen auch nach mehrwöchiger Lagerung. Es wurden jeweils auch die mitgeführten Negativkontrollen bewertet. Dabei ließen sich die bereits oben genannten Scores 0-3 unterscheiden (siehe Tab. 2).

Es wurden Bilder repräsentativer Gewebeschnitte der Scores 0-3 sowie von mitgefärbten Schnitten gesunder Mukosa des Nasopharynx aufgenommen (siehe Anhang Abb.1-5).

4. Ergebnisse

4.1. Expression von Ets2 in benignen und malignen Gewebeproben

In der vorliegenden immunhistochemischen Untersuchung konnte mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers eine Unterscheidung zwischen gesundem und Tumorgewebe bezüglich der Expression des Ets2-Proteins vorgenommen werden. Während Ets2 in allen (n= 27) untersuchten Proben gesunder Schleimhaut des Nasen- und Rachenraumes nicht detektiert werden konnte, wurde in insgesamt 92 der 141 (65,2%) untersuchten Tumoren Ets2 verstärkt nachgewiesen (siehe Tabelle 3). Während keine deutliche Färbung des Gewebes bei 49 und nur eine geringe Färbung bei 51 der 141 Proben nachgewiesen werden konnte, erhielten 31 Proben die Beurteilung deutlich positive Färbung. 10 Proben wurden als stark gefärbt eingestuft und somit dem Score 3 zugeordnet.

	Score 0	Score1	Score2	Score3	Gesamt
Tonsille	16	21	21	1	59
Gaumen/Uvula	7	8	2	5	22
Vallecula/Pharynx	15	15	4	3	37
Zungengrund/ Glossotonsillarfurche	11	7	4	1	23
Gesamt	49	51	31	10	141

Tab. 3 Verteilung des Kollektivs bezüglich der Lokalisationen und Einteilung des immunhistochemischen Scores

4.2. Expression von Ets2 in Abhängigkeit von Geschlecht und Grading

In der weiterführenden statistischen Untersuchung konnte bezüglich des Alters und des Geschlechts der Patienten keine signifikante Abhängigkeit zur Intensität der Färbung nachgewiesen werden. Sowohl bei den weiblichen wie auch männlichen Patienten wurden Score 0 und 1 gehäuft nachgewiesen, mit ansteigendem Score sank die Anzahl der positiv gefärbten Gewebeprobe(n) (s. Abb 3). Die Expression von Ets2 und dem Geschlecht der untersuchten Patienten korrelieren dabei nicht signifikant ($p=0,911$).

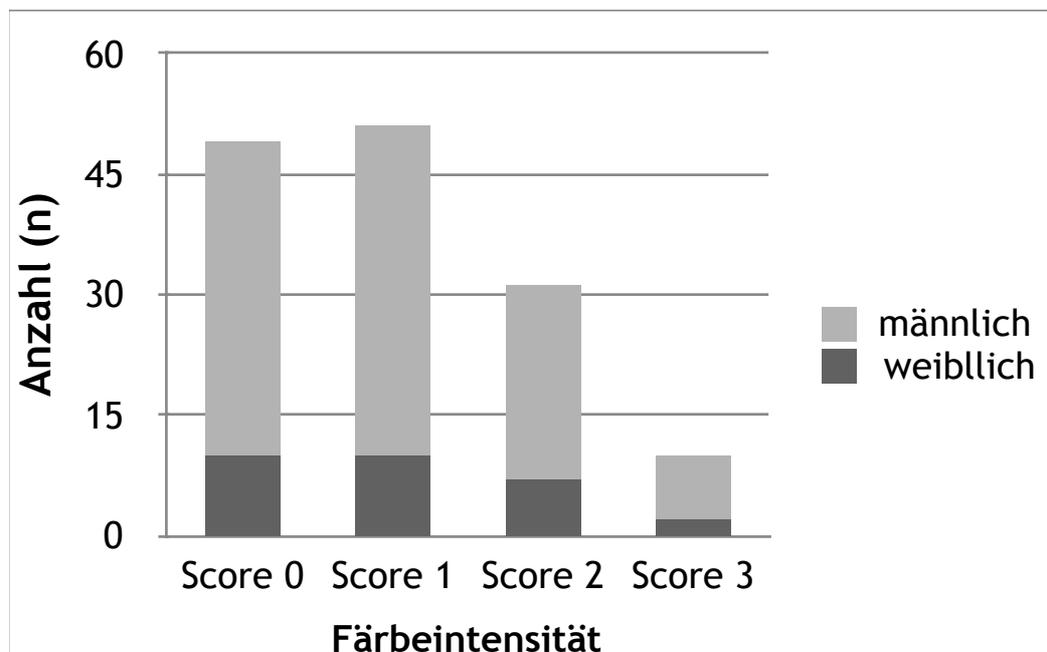


Abb. 3 Darstellung der untersuchten Proben; Zusammenhang zwischen Geschlecht und immunhistochemischen Score bezogen auf Ets2

97 der untersuchten Gewebeprobe(n) wurden den Differenzierungsgraden G2 und 39 G3 zugeordnet, nur 4 Tumoren zeigten sich als gut differenziert (= G1) und 1 Tumor

als schlecht differenziert (=G4). Die immunhistochemischen Ergebnisse zeigten dabei keine signifikante Unterscheidung der einzelnen Differenzierungsgrade untereinander ($p=0,539$); Score 0 und 1 wurden annähernd gleich häufig nachgewiesen, Score 2 und 3 in absteigender Reihenfolge. Es konnte statistisch keine Korrelation ($p=0,539$) zwischen dem Grading und der Intensität der Ets2-Färbung dargestellt werden (siehe Abb.4).

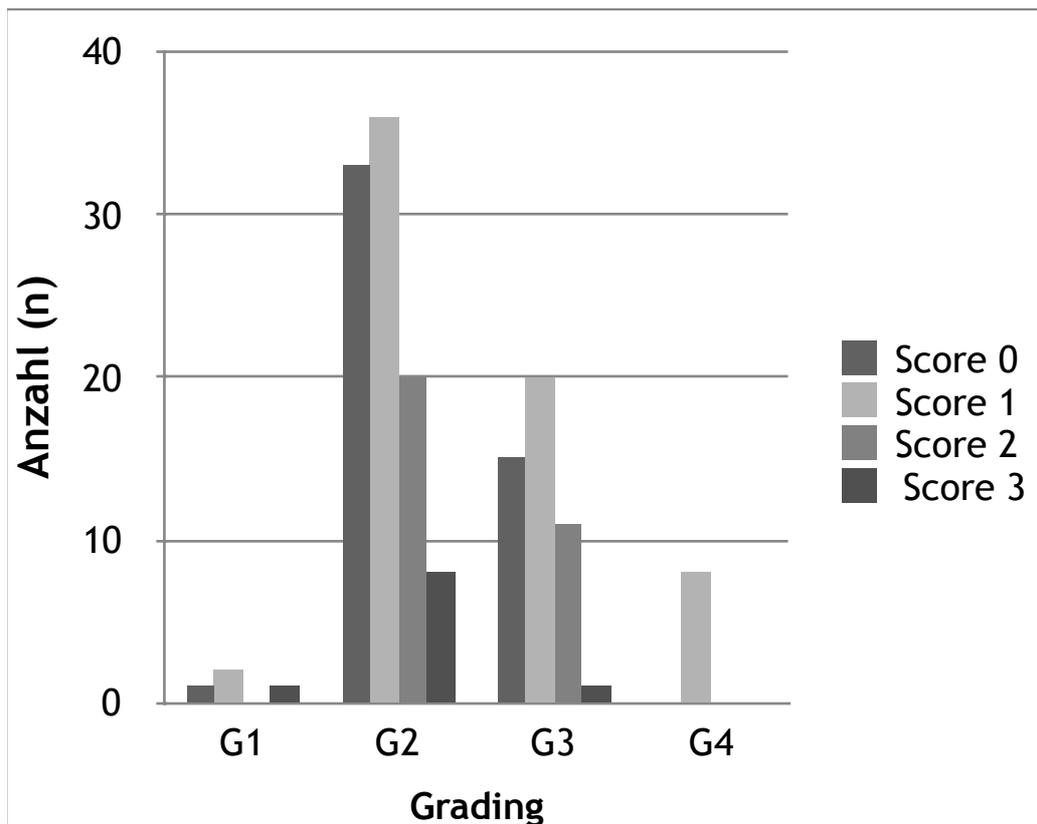


Abb. 4 Immunhistochemisches Färbeergebnis in Scores 0-3 in Abhängigkeit vom histopathologischen Grading G1-G4

4.3. Expression von Ets2 in Abhängigkeit vom histopathologischen Staging

Differenzierter zeigten sich die Ergebnisse bei der Auswertung des Zusammenhangs zwischen Ets2-Nachweis und den Faktoren der TNM-Klassifikation. Während die meisten Tumoren der Größe T2-T4 keine oder nur eine geringe Färbung aufwiesen, zeigten mit zunehmender Tumorgöße immer weniger Tumore eine deutliche oder starke Färbung. Im Status T1 hingegen, zeigten 50% aller Tumore eine schwache Färbung, die restlichen Tumore zeigten jeweils gleichmäßig verteilt keine oder eine deutliche Färbung; es wurde keine starke Färbung in Tumoren der Größe T1 nachgewiesen. (siehe Abb. 5) Insgesamt konnte jedoch kein statistischer Zusammenhang zwischen Tumorgöße und Expression von Ets2 dargestellt werden ($p=0,348$).

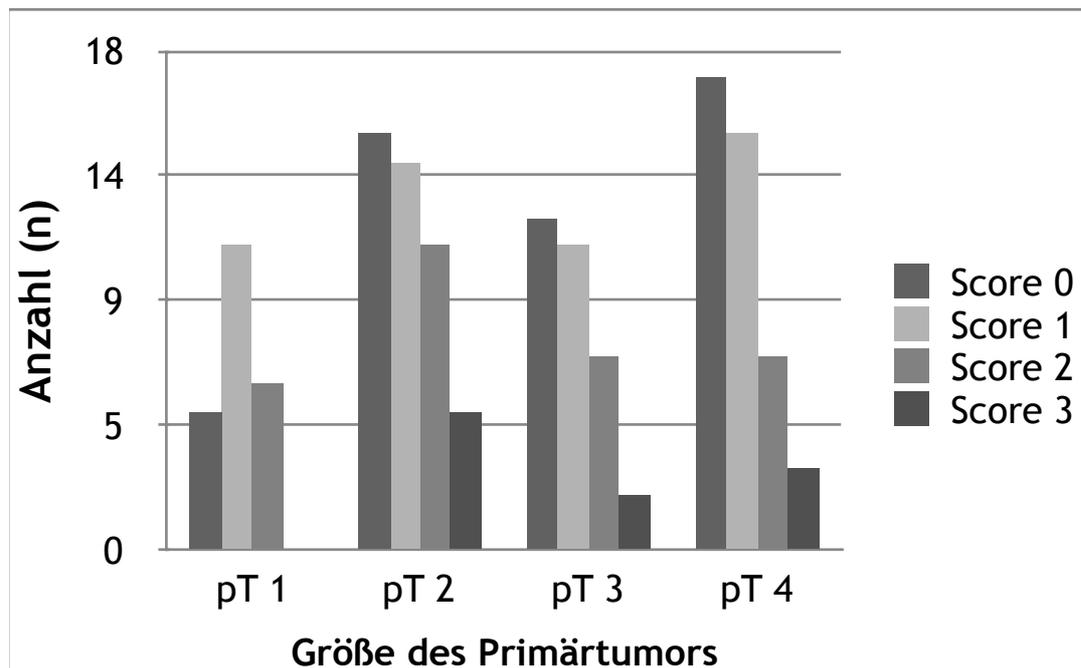


Abb. 5 immunhistochemisches Färbeergebnis in Scores 0-3 in Abhängigkeit von der Größe des Primärtumors

In Abhängigkeit von der Lymphknotenklassifikation N fanden sich folgende Färbeintensitäten: jeweils 5 Tumoren der Klassifikation N0 und N2 wurden dem Score 3 (starke Färbeintensität) zugeordnet. Eine deutliche Färbung (Score 2) zeigten 12 Tumoren des Status N2, 6 des Status N1 und 13 Tumoren des Nodalstatus N0. 100 der untersuchten Tumoren zeigten keine oder eine nur geringe Färbung. (siehe Abb. 6)

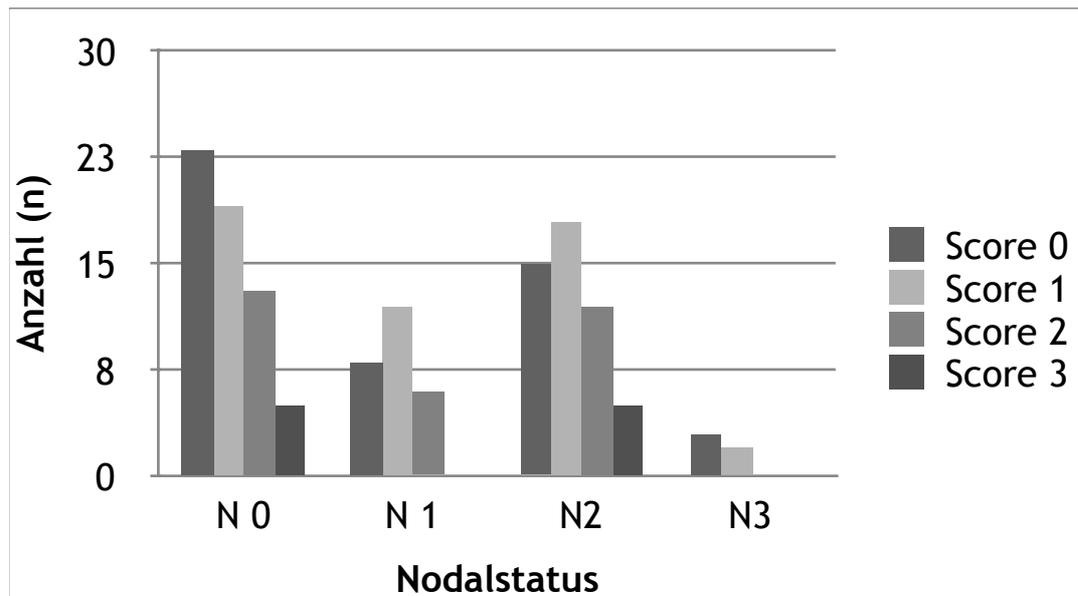


Abb. 6 Immunhistochemisches Färbeergebnis in Scores 0-3 in Abhängigkeit vom Nodalstatus N0 – N3

In 135 der 141 untersuchten Patientenfälle wurde keine Fernmetastasierung festgestellt. In den Gewebeproben dieser Patienten zeigte sich wieder die bereits im Grading beschriebene Verteilung der Scores. Die 6 Tumore mit Fernmetastasierung zeigten in 4 Fällen keine und in 2 Fällen lediglich eine schwache Färbung und damit eine sehr geringe Menge des Ets2-Proteins auf.

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Färbeintensität der Gewebeproben und damit Gehalt an Ets2-Protein sowie den Faktoren der TNM-Klassifikation dargestellt werden.

5. Diskussion

5.1. Expression von Ets2 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden die molekularbiologischen Kenntnisse zur Entstehung von Tumoren immer weiter verbessert. Die wichtigsten Voraussetzungen zur erfolgreichen Bekämpfung von malignen Veränderungen sind zuverlässige Voruntersuchungen um eine optimale Früherkennung zu ermöglichen. Mit Hilfe von validen Biomarkern lässt sich schon im frühen Stadium einer Erkrankung eine prognostische Aussage treffen und so die Diagnosestellung und die Therapiewahl optimieren. Anstoß für die vorliegende Untersuchung war eine vorausgehende Studie, in der Ets2 auf mRNA-Ebene in Plattenepithelkarzinomen des Oro- und Hypopharynx mittels cDNA-microarray-Technik und RT-PCR überexprimiert nachgewiesen werden konnte (*Gottschlich et al., 2006*). Dabei wurden in Gewebeproben von 6 Patienten 22 Gene detektiert, darunter auch Ets2, die eine deutliche Unterscheidung zwischen Tumorgewebe, Mukosa und Übergangsbereich ermöglichten. Ziel der vorliegenden Studie war der quantitative, immunhistochemische Nachweis des Ets2-Proteins in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers wurde das Ets2-Protein in 92 von insgesamt 141 Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches vermehrt nachgewiesen. Die Ergebnisse der vorangehenden Studie auf mRNA-Ebene konnten bestätigt werden. In gesunder Mukosa wurde Ets2 nicht detektiert, was eine Unterscheidung zwischen gesundem und maligne verändertem Gewebe ermöglicht. Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Färbeintensität und Faktoren wie Alter, Geschlecht und Tumor-, Nodal- und Metastasierungsstadium nachgewiesen werden; die prognostische Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse ist daher als gering einzustufen.

Vergleichbare Ergebnisse wurden in einer Untersuchung von Plattenepithelkarzinomen des Oesophagus erzielt, dabei wurde Ets2 ebenfalls auf Proteinebene überexprimiert nachgewiesen (*Li et al., 2003*). Identisch zum Aufbau der vorliegenden Untersuchung wurde zunächst eine erhöhte Ets2-mRNA-

expression mittels RT-PCR und cDNA-microarray-Technik nachgewiesen. Unter Anwendung von Northernblot konnte Ets2 in 75,7% der 37 untersuchten Tumorproben erhöht exprimiert nachgewiesen werden, die Ergebnisse des Westernblots wiesen das Protein Ets2 in 71,4% der Fälle nach. Weiteres Vorgehen war der immunhistochemische Nachweis von Ets2 auf Proteinebene. Dabei wurde ebenfalls als primär spezifischer Antikörper ein polyklonaler Anti-ets2-Antikörper verwendet, allerdings in einer Verdünnung von 1:50. In 75% (12/16) der untersuchten Tumorepithelien konnte Ets2 im Vergleich zu zugehöriger gesunder Schleimhaut des Oesophagus überexprimiert nachgewiesen werden. Es fand sich eine kräftige, diffuse Färbung der Nuklei des Tumorgewebes und eine nur sehr geringe und seltene Färbung des zugehörigen Oesophagusepithels.

In der vorliegenden Untersuchung konnte in 92 der 141 (65%) untersuchten Gewebeproben aus dem Bereich des Oro- und Hypopharynx Ets2 überexprimiert nachgewiesen werden. Es konnte ebenfalls eine grundlegende Unterscheidung zwischen gesundem und malignem Gewebe getroffen werden, wobei gesundes Gewebe keine Färbung des Zytoplasmas und nur die Gegenfärbung der Zellnuklei durch Hämalaun zeigt. In maligne verändertem Gewebe zeigte sich eine je nach Score unterschiedlich starke rot-braune Färbung, wobei das Zytoplasma der Zellen der tumorösen Areale deutlich starker gefärbt war als die Nuklei.

Sowohl in der vorliegenden Untersuchung als auch in der Studie über Oesophaguskarzinome wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, da zum Zeitpunkt der hier vorliegenden Untersuchung kein monoklonaler Antikörper zur Verfügung stand. Problematisch stellt sich dabei das breitere Bindungsspektrum des polyklonalen Antikörpers gegenüber eines monoklonalen Antikörpers dar, da die Spezifität geringer ausfällt (*Harris et al., 2002; Syrbu et al., 2011*).

In Untersuchungen supraglottischer Karzinome wurde Ets2 auf mRNA-Ebene sowohl in metastasierenden als auch nicht-metastasierenden Tumoren überexprimiert nachgewiesen (*Bai et al., 2009*). Veränderungen der Genexpression wurden in dieser Studie mittels cDNA-microarray validiert und durch realtime RT-PCR quantifiziert. Es wurden 2 Tumoren männlicher Patienten untersucht, die entsprechend der TNM-Klassifikation als T3N0M0 und T3N2M0 eingestuft wurden. Es wurden 96 Gene untersucht, von denen 26% (25 von 96) im Tumor mit nodaler Metastasierung, und 18,8% (18 von 96) im Tumor ohne Streuung überexprimiert waren. Ets2 ist dabei in

beiden Tumoren deutlich vermehrt nachgewiesen worden; eine prognostische Aussage bezüglich der Metastasierung des Tumors kann, bedingt durch die nur geringe Anzahl untersuchter Tumoren, nicht getroffen werden. Der Vergleich zu Tumoren früheren Stadiums fehlt in dieser Studie.

In unserer Studie wurden 141 Gewebeproben von 29 weiblichen und 112 männlichen Patienten untersucht. Ein Vergleich der Faktoren Geschlecht des Patienten und immunhistochemischer Ets2- Score mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,911$). Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Ets2-Score und der Metastasierung der Tumoren (M0 und M1) festgestellt werden ($p = 0,148$). Trotz einer deutlich höheren Zahl untersuchter Tumoren lässt sich auch in unserer Studie keine prognostische Aussage anhand der Ets2-Expression treffen.

Dass Ets2 als Protein mittels immunhistochemischer Färbeverfahren sowohl in oesophagealen, supraglottischen und durch die vorliegende Studie auch in Plattenepithelkarzinomen des Oro- und Hypopharynx überexprimiert nachgewiesen werden konnte, lässt annehmen, dass Ets2 als potentieller Marker für Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes fungieren könnte. In den oben genannten Untersuchungen wurde ebenfalls ein polyklonaler Antikörper verwendet, allerdings in einer niedrigeren Verdünnung (1:50). Fraglich bleibt, ob durch eine weniger starke Verdünnung des Primärantikörpers bzw. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers andere Ergebnisse bezüglich der Expression von Ets2 und den Faktoren Geschlecht, Alter und den Kenngrößen der TNM-Klassifikation erzielt werden und genauere Prognosen bezüglich des Verhaltens von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Halsbereiches gestellt werden können.

In Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches wurden in mehreren Studien Humane Papillomaviren nachgewiesen, v.a. Viren des Types HPV 16. (*Rittá et al 2013; Xia et al., 2013; Grce et al., 2014*) In molekularen Studien wurden die viralen Onkoproteine E6 und E7 nachgewiesen, die beide einen starken Einfluß auf zelluläre Ereignisse während Zellzyklus und Apoptose haben. Dabei inaktiviert E6 das Tumorsuppressorgen p53, das die Transkription und Aktivierung von etlichen Transkriptionsfaktoren steuert. Eine Inaktivierung von p53 führt zu einer reduzierten Apoptoserate und damit zu vermehrtem Wachstum von Tumorzellen, Angiogenese und Metastasierung. Durch Punktmutation entsteht das sog. mtp53, das über die

ETS- bindungsstelle (GGAA) in Promotoren die Genexpression seiner Zielgene, darunter auch TDP2, reguliert. Ets2 vermittelt dabei die Bindung von mtp53 an die ETS- bindungsstelle. (Do et al., 2012). TDP2 wiederum reguliert durch seine 5'-Tyrosyl-DNA-phosphodiesterase-aktivität die Reparatur von durch Etoposid verursachten DNA – Doppelstrangbrüchen. In dieser Studie führte die Komplexbildung von Ets2 mit mtp53 zu einer Resistenz gegenüber Etoposid; eine Chemotherapie mit diesem Zytostatikum wäre in diesem Fall wenig erfolbringend und eine schlechtere Prognose die Konsequenz.

Da die Punktmutation von p53 zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorentstehung eintritt, und Ets2 die Bindung von mtp53 an die sog. EBS vermittelt, sind die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, dass Ets2 in gesundem Gewebe nicht und in Tumoren aller Größen T1-T4 nachgewiesen werden konnte, als schlüssig.

5.2. Expression von Ets2 in Malignomen anderer Gewebe

Mit ca 500.000 Neuerkrankungen weltweit pro Jahr stellt das Plattenepithelkarzinom des Cervix Uteri die zweithäufigste maligne Erkrankung bei Frauen weltweit dar (Conesa-Zamora et al., 2013). Obwohl epidemiologische und experimentelle Untersuchungen HPV 16 als Hauptursache dieser Erkrankung hervorheben, werden immer häufiger Co - Faktoren genannt. Dazu gehören Ets2 und ERG, die in 6 von 10 untersuchten Cervix-Karzinomzelllinien überexprimiert gefunden wurden (Simpson et al., 1997). Als ursächlich für das erhöhte Ets2- und ERG-level wird dabei eine numerische Alteration der Gene durch Anlagerung von HPV 16 in der Nähe des ERG und Ets2-lokus, 21q22.2-22.3 angenommen. Bestätigt wird die Annahme, Ets2 sei an der Entstehung und Progression von Cervixkarzinomen beteiligt, durch die vergleichende immunhistochemische Untersuchung gesunden, meta- und dysplastischen Epithels, sowie Tumoren des Cervix uteri (Petrov et al., 1994). Es konnte anhand der Expression von myc, fos, ets2 und p53 eine grundlegende Unterscheidung zwischen Metaplasie, Dysplasie, Tumor und gesundem Gewebe festgestellt werden. Höhere Expressionsraten gehen dabei mit maligne verändertem Gewebe einher. Das entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung.

Allerdings konnte im Vergleich zur Studie zu Cervixkarzinomen in der vorliegenden Arbeit kein statistischer Zusammenhang zwischen TumorgroÙe und Expression von Ets2 ($p = 0,348$) bzw. dem Differenzierungsgrad der Tumoren und der Expression von Ets2 ($p = 0,539$) dargestellt werden.

Die Matrixmetalloproteinase-1 ist durch ihre Fähigkeit, die Extrazellulärmatrix zu degradieren, an der Morphogenese, Angiogenese und Entstehung von Karzinomen beteiligt (Coon et al., 2014). Durch einen Guanininsertionspolymorphismus, d.h. die Anlagerung eines zusätzlichen Guanins erzeugt ein 2G-Allel und erhöht damit die Anzahl vorhandener Ets-bindungsstellen in Karzinomzellen. Dadurch kann vermehrt Ets2 an den Promotor des Zielgens gebunden werden; Effekt ist eine erhöhte Transkriptionsrate. In einer Studie wurden in 64 bzw. 65% der 135 untersuchten fortgeschrittenen intraepithelialen Läsionen des Cervix uteri und 197 invasiven Plattenepithelkarzinomen ein sog. MMP-1-Polymorphismus nachgewiesen. (Lai et al., 2005). Es gab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe; das 2G-Allel trat allerdings gehäuft bei Tumoren in fortgeschrittenem Stadium, das G-Allel in Tumoren mit regionaler Lymphknotenmetastasierung auf. Die längste Überlebensrate wiesen in dieser Untersuchung Patienten mit der heterozygoten Form G/2G auf. Es kann aufgrund des MMP-polymorphismus keine Aussage über das Risiko einer Erkrankung aber eine prognostische Aussage über die Invasivität des Tumors getroffen werden.

Da es sich bei Karzinomen des Cervix Uteri ebenfalls um Plattenepithelkarzinome handelt, lässt sich in Bezug auf Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches ebenfalls eine prognostische Aussage mittels des Vorhandenseins des sog. MMP1-Polymorphismus treffen. In Studien zum funktionellen Polymorphismus des MMP-1-Promotors in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Expressions des 2G-Allels des MMP-1-Gens und Tumorentstehung dargestellt werden (Chaudhary et al., 2010; Lu et al., 2014). Dabei lässt sich annehmen, dass durch eine erhöhte Anzahl von EBS auch eine erhöhte Expression von sich anlagernden Transkriptionsfaktoren wie Ets2 nachweisbar sein sollte. Dies bestätigen die vorliegenden Ergebnisse.

Angenommen MMP-1 zeigt auch bei den untersuchten 141 Plattenepithelkarzinomen einen Guanininsertionspolymorphismus, erscheint die Überexpression von Ets2 in

Tumoren aller Größen T1-T4 sowie in Tumoren mit mäßiger Differenzierung als Ergebnis der erhöhten Ets- Bindungsstellen als schlüssig

Tumorinvasion und Metastasierung sind entscheidend davon abhängig, dass Tumorzellen die Barrieren des umliegenden Gewebes durchdringen können (*Zhao et al., 2013*). Dafür ist eine erhöhte Permeabilität der Extrazellulärmatrix notwendig, die durch eine von Serinproteasen (zu denen die MAPKs gehören) und MMPs ausgelöste Degradation ermöglicht wird (*Foulds et al., 2004*). Ets2-Transkripte sind in der Lage Serinproteasen und MMPs sowie deren Inhibitoren zu aktivieren, wobei eine erhöhte Ets2-expression auf Proteinebene zu einer erhöhten Degradationsrate und damit erhöhten Tumorinvasivität führt. Eine deutlich schlechtere Prognose mit erhöhter Invasivität des Tumors im weiblichen Brustgewebe konnte bei Patienten mit erhöhtem zellulärem MMP-1 festgestellt werden (*Tower et al., 2003*).

5.3. Expression von Ets2 in Adenokarzinomen

Studien an Zelllinien und Tiermodellen zufolge ist Ets2 an der Karzinogenese von Mammakarzinomen beteiligt (*Jordan et al., 2016*). Um den Zusammenhang zwischen der Ets2-expression und den Parametern der Tumorprogression darzustellen wurden Mammakarzinome, Fibroadenome und gesundes Brustgewebe mittels RT-PCR und Westernblots untersucht (*Buggy et al., 2006*). Dabei wurde Ets2-mRNA in 69% der Tumore, in 63% der 43 untersuchten Fibroadenome und in 47% des gesunden Gewebes detektiert. Das Ets2-Proteinlevel in Tumoren war im Vergleich zu den Fibroadenomen als auch zum gesunden Gewebe signifikant erhöht. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Ets2-Protein und dem Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) dargestellt werden. uPA ist eine Protease, die kausal mit Tumorprogression zusammenhängt und als einer der potentesten prognostischen Indikatoren für Mammakarzinome gilt.

In den untersuchten Adenokarzinomen korrelierten die Ets2-Protein- und -mRNA-Level, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten Plattenepithelkarzinomen, nicht. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Proteinexpression von Ets2 untersucht. 49 der 141 untersuchten Gewebeproben zeigten keine Färbung durch den polyklonalen Antikörper. Eine geringe Färbung zeigten 51 Proben, eine deutlich

positive Färbung 31 Proben und eine starke Färbung 10 Proben. In den Voruntersuchungen wurde ebenfalls die Ets2-mRNA mittels cDNA-microarray überexprimiert nachgewiesen. Ursache könnte dabei ein Translationsfehler sein, durch den das Protein Ets2 nicht im selben Maße translatiert wie die mRNA transkribiert wird. Desweiteren können die verschiedenen Turn-over-Raten des sehr instabilen Proteins und der mRNA für diese unterschiedlichen Expressionslevel verantwortlich sein (*Dwyer et al., 2010*).

In einer Arbeit zu malignen Veränderungen der Mamma wurden tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) auf ihren Effekt der bronchialen Metastasierung hin untersucht (*Zabuawala et al., 2010*). Diese TAMs sind nachweislich an Wachstum, Invasion und Angiogenese von Tumoren beteiligt. In klinischen Studien an humanen Mammakarzinomen konnte der Zusammenhang zwischen einer hohen fokalen Infiltration der tumorassoziierten Makrophagen und einer erhöhten Vaskularisierung des Tumors, sowie der Befall axillärer Lymphknoten dargestellt werden. Patienten mit einer erhöhten Anzahl TAMs wiesen eine reduzierte tumorfreie Überlebensrate auf. Ets2 nimmt in dieser Studie dabei über Aktivierung von CSF-1 direkten Einfluß auf die Makrophagenfunktion und – überlebensrate während einer Entzündung. Dabei bewirkt eine Deletion von Ets2 in TAMs eine verringerte Wachstumsrate des Primärtumors und der Metastasen. Ohne nachweisbare Ets2-Transkripte unterlagen die tumorassoziierten Makrophagen der Apoptose. Per microarray wurden 133 Gene identifiziert, die ortholog zu dem Ets2-TAM-Profil retrospektiv eine Aussage über die rückfallfreie Überlebensrate erlauben. Die immunhistochemische Färbung von Makrophagen in Paraffin fixierten Tumorgewebe erfolgte unter Verwendung verschiedener monoklonaler Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:50 bzw. 1:40, die mit den Antigenen F4/80, THBS1 und THBS2, sowie CD31 und SPARC reagierten. Sekundär kamen biotinylierte monoklonale Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 zur Anwendung. Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern erzielt in der immunhistochemischen Färbung eine höhere Spezifität im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie stand kein monoklonaler Antikörper spezifisch für Ets2 zur Verfügung. Sowohl in der Studie zu tumorassoziierten Makrophagen in Mammakarzinomen (*Zabuawala et al., 2010*) als auch in dieser Arbeit wurden ausschließlich in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Präparate immunhistochemisch untersucht. Durch die Fixierung mit

Formalin kommt es zu einer Vernetzung und leichten Denaturierung der Proteine; alternativ steht die Schnellschnittmethode mittels Kryotom zur Verfügung, die eine bessere Erhaltung des Zustandes von Zellen und Gewebe ermöglicht. Eine Fixierung ist zur Erhaltung der Gewebsstrukturen unumgänglich, kann aber für Maskierung von Gewebsantigenen verantwortlich sein und zu falsch-negativen Ergebnissen führen (*Leong et al., 2011*).

Auch bei der Entstehung von Prostatakarzinomen ist Ets2 im frühen Stadium beteiligt. Dabei wird die Funktion von Ets2 kontrovers diskutiert. In einer Studie zur gesamten Familie der Ets-faktoren wurden 29 Primärtumoren und 23 benigne Kontrollen in Hinblick auf ihre Expression verschiedener Gene mithilfe von DNA-Microarrays untersucht. Während ERG (Ets Related Gene) in Karzinomen der Prostata deutlich überexprimiert wurde, konnte in malignen Proben nur eine sehr geringe Ets2-expression festgestellt werden (*Rostad et al., 2007*). Konträre Ergebnisse liefert eine Untersuchung von Prostatakarzinomen, in denen die Ets2-expression mittels sequenzspezifischen Triplex-bildenden Oligonukleotiden (TFO) reduziert wurde (*Carbone et al., 2004*). Folgen der unterdrückten Ets2-Transkription waren wichtige phänotypische Veränderungen der Tumorzellen wie gehemmtes Zellwachstum, verringerte Kolonienbildung, Veränderung des Zellzyklus und einsetzender apoptotischer Zelltod der malignen Zellen. Begleiterscheinung ist eine reduzierte Expression des anti-apoptotisch wirksamen Proteins Bcl-xl und der wachstumsregulierenden Gene Cyclin D1 und c-myc, was zusammen mit einer stark eingeschränkten Ets2-expression zu einer Anhäufung von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus mit simultanem Verlust des G1-Kompartimentes führt. Höchste Ets2-Expressionsraten korrelieren in dieser Studie dabei mit späten Stadien des Prostatakarzinoms; Folge ist eine schlechtere Prognose bei Nachweis hoher Ets2-raten. Die antiproliferative und pro-apoptotische Wirkung der Ets2-TFO wird dabei zum Teil direkt dem Transkriptionsfaktor Ets2 aber auch den durch Ets2 angezielten Genen zugeschrieben, die an kritischen Funktionen der Prostatakarzinomzelle beteiligt sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung werden durch die Untersuchungen zu Prostatakarzinomen insofern unterstützt, als dass ETS2 auf mRNA- und Proteinebene deutlich überexprimiert dargestellt werden konnte und anhand des Expressionslevels eine grundsätzliche Unterscheidung zwischen benignem und

maligne verändertem Gewebe vorgenommen werden kann. Desweiteren ist davon auszugehen, dass die Überexpression von Ets2 ein frühes Ereignis in der Karzinogenese darstellt und infolge dessen der Nachweis von Ets2 in allen Tumoren unabhängig von Größe, Nodalstatus oder Metastasierung ,wie in der vorliegenden Studie dargestellt, folglich richtig ist.

In Neoplasien der Glandula thyroidea wurde eine stark erhöhte transkriptionale Aktivität von Ets und eine Anhäufung der Proteine Ets1, Ets2 und diverser Ets-verwandter Proteine nachgewiesen (*de Nigris et al., 2001*). Es wurde die Expression von Ets1 und Ets2 in humanen gesunden Zellen und neoplastischen Zellen unterschiedlicher Zelllinien (TPC-1, WRO, NPA, ARO und FRO) untersucht. Beide nukleären Proteine fanden sich im Western Blot überexprimiert in neoplastischem Gewebe; während Ets1 in allen 5 Zelllinien stark erhöht auftrat, variierte die Expression von Ets2 innerhalb der verschiedenen Zelllinien. Entsprechend wurde mit einer semiquantitativen RT-PCR die mRNA von Ets1 und Ets2 in den Tumorzelllinien erhöht nachgewiesen. Zur weiteren Verifizierung der Ergebnisse wurden operativ entfernte Thyroideakarzinome und zugehöriges gesundes Gewebe untersucht. Dabei wurden in allen Tumoren hohe Expressionslevel der Proteine Ets1 und Ets2 gefunden. Als Folge der erhöhten Ets2-expression fanden sich uPA und MMP-1, in gesundem Gewebe sonst nicht vertreten, in den Neoplasien ebenfalls stark erhöht. Mit einem Ets-Z dominant negativem Konstrukt wurde die transkriptionale Aktivität von Ets2 supprimiert. Folge waren ein reduziertes c-myc-Level, eine Akkumulation der Zellen in der G1-Phase und letztlich der apoptotische Niedergang der Karzinomzellen. Damit erzielen die Autoren der Studie vergleichbare Ergebnisse zu der vorliegenden Studie: Ets2 kann in gesundem Gewebe nicht nachgewiesen werden bei gleichzeitigem Nachweis von Ets2 in allen Tumoren, unabhängig von Größe, Nodalstatus und Metastasierungsverhalten. Eine prognostische Aussage über die Tumoren anhand der Ets2- Expression konnte in beiden Studien nicht getroffen werden.

Als Transkriptionsfaktor ist das Protein Ets2 an einer Reihe von biologischen Prozessen in gesundem und maligne verändertem Gewebe wie Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose beteiligt. Durch eine onkogene Reaktivierung des embryonalen Transkriptionsfaktors Ets2 finden in multiplen Geweben des menschlichen Organismus maligne Veränderungen statt, die zur Bildung von

Tumoren führen können. Trotz vielfältiger Untersuchungen in den letzten Jahren, ist die genaue biologische und pathophysiologische Funktion von Ets2 noch weitgehend ungeklärt. Die spezifische Funktion ist hauptsächlich von Expressionsmuster, Aktivierung durch Partnerproteine und der Wirkung verschiedener Signaltransduktionswege abhängig.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Ets2 sowohl in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes und des Cervix uteri als auch in anderen Tumorentitäten wie Karzinomen der Mamma, Glandula thyroidea und der Prostata eine Rolle bei der Entstehung, Invasion und Metastasierung der Tumore spielt. Die konkrete Wirkungsweise des Proteins Ets2 wird dabei über diverse komplexe Signalkaskaden vermittelt; der immunhistochemische Nachweis von Ets2 an einem einzelnen Punkt dieses umfangreichen intrazellulären Geschehens ist daher schwierig. In der hier vorliegenden Untersuchung, wie auch in den meisten anderen Studien, gelang der Nachweis einer statistischen Korrelation von Ets2 und den pathologischen Faktoren der Tumore, wie Größe des Primärtumors, Grading, Nodalstatus und Metastasierung nicht. Daher kann mithilfe von Ets2, auch wenn eine prinzipielle Unterscheidung zwischen benignem und maligne verändertem Gewebe vorgenommen werden kann, keine weitere histopathologische Aussage bezüglich des Tumors getroffen werden. Der Nachweis von Ets2 lässt keine weiteren Rückschlüsse auf Therapie und Prognose für den Patienten zu.

6. Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereiches sind die fünft häufigste maligne Veränderung weltweit. Der molekularbiologische Prozess der Tumorentstehung ist dabei noch weitgehend unbekannt. In einer Studie wurde die mRNA – Expression von 22 Genen in Plattenepithelkarzinomen mittels cDNA-microarray untersucht. Dabei wurde Ets2 überexprimiert in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches nachgewiesen.

Die grundlegende Fragestellung der vorliegenden Untersuchung ist, in welchem Ausmaß das Onkoprotein Ets2 mittels immunhistochemischer Färbung in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches nachweisbar ist und ob ein Zusammenhang zwischen Expressionsgrad, den tumorspezifischen Charakteristika der TNM-Klassifikation und dem Alter bzw. Geschlecht der Patienten hergestellt und somit eine prognostische Aussage für den Patienten getroffen werden kann.

Dazu wurden 141 formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus Plattenepithelkarzinomen sowie 27 Gewebeproben gesunder Mukosa aus Mundhöhle, Oro- und Hypopharynx untersucht.

In 92 der 141 Tumoren wurde Ets2 überexprimiert nachgewiesen, davon zeigten 10 Schnitte eine starke Färbung, 31 eine deutliche und 51 eine geringe Färbung. In Gewebeproben gesunder Mukosa wurde Ets2 nicht nachgewiesen. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen Ets2 – Expression und Alter bzw. Geschlecht der Patienten und den tumorspezifischen Charakteristika dargestellt werden.

In Studien zu Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes und des Cervix uteri sowie weiteren Tumorentitäten wie Karzinomen der Mamma, Prostata und der Glandula thyroidea konnte die Beteiligung von Ets2 an Tumorentstehung, Invasion und Metastasierung nachgewiesen werden. In diesen Studien konnte, wie in der vorliegenden Untersuchung kein statistischer Zusammenhang zwischen Ets2 und den pathologischen Faktoren der Tumore wie Stadium, Nodalstatus und Metastasierung dargestellt werden. Eine grundlegende Unterscheidung zwischen benignem und maligne verändertem Gewebe konnte in allen Untersuchungen anhand der Expression von Ets2 vorgenommen werden.

Eine weitere für den Therapieverlauf entscheidende prognostische Aussage kann anhand der Expression von Ets2 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches nicht getroffen werden.

7. Literaturverzeichnis

Anderson, K.E., Kliris J., Murphy L. (2003): Metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen in nonsmoking casino patrons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12, pp.1544-1546

Bai, W., Wang, L., Ji, W. (2009): Expression profiling of supraglottic carcinoma: PTEN and thrombospondin 2 are associated with inhibition of lymphatic metastasis. *Acta Otolaryngol*, 12, pp.569-574

Barber, B.R., Biron, V.L., Klimowicz, A.C. (2013): Molecular predictors of locoregional and distant metastases in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 16, pp.42-53

Bauer, V.L., Braselmann, H., Henke, M. (2008): Chromosomal changes characterize head and neck cancer with poor prognosis. *J Mol Med*, 86, pp.1353-1365

Buchwalter, G., Gross, C., Wasyluk, B. (2004): Ets ternary complex transcription factors. *Gene*, 324, pp.1-14

Buggy, Y., Maguire, T.M., McDermott, E. (2006): Ets2 transcription factor in normal and neoplastic human breast tissue. *Eur J Cancer*, 42, pp.485-491

Carbone, G.M., Napoli, S., Valentini, A. (2004): Triplex DNA-mediated downregulation of Ets2 expression results in growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 32, pp.4358-4367

Chatterjee, A., Dutta, S., Mukherjee, N. (2013): Potential contribution of SIM2 and ETS2 functional polymorphisms in Down syndrome associated malignancies. *BMC Med Genet*, 14, p.12

Chaudhary, A. K., Pandya, S., Mehrotra, R. (2010): Functional polymorphism of the MMP-1 promoter (-1607 1G/2G) in potentially malignant and malignant head and neck lesions in an Indian population. *Biomarkers*, 15, pp.684-92

Chou, Y. T., Lin, H. H., Lien, Y. C. (2010): EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF. *Cancer Res*, 70, pp. 8822-8831

Conesa-Zamora, P., Torres-Morreno, D., Isaac, M. A. (2013): Gene amplification and immunohistochemical expression of ERBB2 and EGFR in cervical carcinogenesis. Correlation with cell-cycle markers and HPV presence. *Exp Mol Pathol*, 95, pp. 151-155

Coon, C.I., Fiering, S., Gaudet, J. (2009): Site controlled transgenic mice validating increased expression from human matrix metalloproteinase (MMP-1) promoter due to naturally occurring SNP. *Matrix Biol*, 28, pp.425-431

- Cooper, C.D., Newman, J. A., Gileadi, O. (2014): Recent advances in structural molecular biology of Ets transcription factors: interactions, interfaces and inhibition. *Biochem Soc Trans*, 42, pp.130-138
- Cordes, C., von Lingen, J., Görögh, T., (2009): Molecular and immunological aspects of p53 and p53-autoantibodies in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 22, pp.1299-1303
- Dayyani, F., Etzel, C.J., Liu, M. (2010): Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol*, 2, p.15
- Dedivitis, R. A., Denardin, O. V., Castro, M. A. (2009): Risk factors for distant metastasis in head and neck cancer. *Rev Col Bras Chir*, 36, pp.478-481
- De Nigris, F., Mega, T., Beger, N. 2001): Induction of ETS-1 and ETS-2 transcription factors is required for thyroid cell transformation. *Cancer Res*, 61, pp.2267-2275
- Do, P. M., Varanasi, L., Fan, S. (2012): Mutant p53 cooperates with ETS2 to promote etoposide resistance. *Genes Dev*, 15, pp.830-845
- Dogan, E., Cetinayak, H.O., Sarioglu, S. (2014): Patterns of cervical lymph node metastases in oral tongue squamous cell carcinoma: implications for elective and therapeutic neck dissection. *J Laryngol Otol*, 19, pp.1-6
- Dwyer, J. M., Liu, J. P. (2010): Ets2 transcription factor, telomerase activity and breast cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37, pp.83-87
- Enepekides, D. J., Sultanem, K., Nguyen, C., Shenouda, G., Black, M. J., Rochon, L. (1999): Occult cervical metastases: immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 120, pp.713-717
- Foulds, C. E., Nelson, M. L., Blaszcak, A. G. (2004): Ras/Mitogen- Activated Protein Kinase signaling activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 recruitment. *Mol Cell Biol*, 24, pp.10954-10964
- Freier, K., Bosch, F.X., Flechtenmacher, C. (2003): Distinct site-specific oncoprotein overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: a tissue microarray analysis. *Anticancer Res*, 23, pp.3971-3977
- Gottschlich, S., Ambrosch, P., Cordes, C., Görögh, T. (2006): Gene expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. *Int J Oncol*, 29, pp.605-613
- Grce, M., Mravak-Stipetic, M. (2014): Human papillomavirus-associated diseases. *Clin Dermatol*, 32, pp.253-258
- Harris, C. L., Lublin, D. M., Morgan, B. P. (2002): Efficient generation of monoclonal antibodies for specific protein domains using recombinant immunoglobulin fusion proteins: pitfalls and solutions. *J Immunol Methods*, 268, pp.245-258

- Jordan, N.V., Bardia, A., Wittner, B.S. (2016): HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells. *Nature*, 537(7618), pp. 102-106.
- Lai, H.C., Chu, C.M., Lin, Y.W. (2005): Matrix metalloproteinase 1 gene polymorphisms as a prognostic predictor of invasive cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 96, pp.314-319
- Lang, S., Wollenberg, B. (2002): Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck. *Laryngorhinotologie*, 81, pp.499-508
- Leong, A. S., Leong, T. Y. (2011): Standardization in immunohistology. *Methods Mol Biol*, 724, pp.37-68
- Li, X., Lu, J. Y., Zhao, L. Q. (2003): Overexpression of ETS2 in human oesophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol*, 9, pp.205-208
- Licitra, L., Locati, L. D., Bossi, P. (2004): Review: Head and Neck cancer. *Ann Oncol*, 15, pp.267-273
- López, L. A., Llorente Pendás, J. L., Melón, S. (2003): Detection of herpes simplex virus and Epstein-Barr virus in squamous cell carcinoma of the upper airways and digestive system. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 12, pp.506-511
- Lu, L., Sun, Y., Li, Y. (2014): The polymorphism MMP1 -1607(1G>2G) is associated with a significantly increased risk of cancers from a meta-analysis. *Tumour Biol*, 36(3), pp.1685-93.
- Mroz, E. A., Rocco, J. W. (2013): MATH, a novel measure of intratumor genetic heterogeneity, is high in poor-outcome classes of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 49, pp.211-215
- Oikawa, T., Yamada, T. (2003): Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*, 1, pp.11-34
- Petrov, S.V., Mazurenko, N.N., Sukhova, N.M. (1994): Cell oncogene expression in normal, metaplastic, dysplastic epithelium and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Arkh Patol*, 56, pp.22-31
- Popović, B., Jekić, B., Novaković, I. (2010): Cancer genes alterations and HPV infection in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 39, pp.909-915
- Pöschl, G., Seitz, H. K. (2004): Review; *Alcohol*, 39, pp.155-165
- Purohit, S., Bhise, R., Lokanatha, D. (2013): Systemic therapy in head and neck cancer: changing paradigm. *Indian J Surg Oncol*, 4, pp.19-26
- Rasse, M. (2008): Indikationen zur chirurgischen Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. *Wien Med Wochenschr*, 10, pp.243-248

- Rittà, M., Landolfo, V., Mazibrada, J. (2013): Human papillomavirus tumor-infiltrating T-regulatory lymphocytes and p53 codon 72 polymorphisms correlate with clinical staging and prognosis of oropharyngeal cancer. *New Microbiol*, 36, pp.133-144
- Rodrigo, J. P., Martinez, P., Allonca, E. (2014): Immunohistochemical markers of distant metastasis in laryngeal and hypopharyngeal Squamous cell carcinomas. *Clin Exp Metastasis*, 31, pp.317-325
- Rodriguez, T., Altieri, A., Chatenoud, L. (2004): Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol*, 40, pp.207-213
- Rostad, K., Mannelqvist, M., Halvorsen, O.J. (2007): ERG upregulation and related ETS transcription factors in prostate cancer. *Int J Oncol*, 30, pp.19-32
- Rueda, N., Flórez, J., Martínez-Cué, C. (2013): Apoptosis in Down's syndrome: lessons from studies of human and mouse models. *Apoptosis*, 18, pp.121-134
- Schlumpf, M., Fischer, C., Naehrig, D. (2013): Results of concurrent radio-chemotherapy for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma in everyday clinical practice with special reference to early mortality. *BMC Cancer*, 13, p.610
- Schottenfeld, D., Beebe-Dimmer, J. (2006): A common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin*, 56, pp.69-83
- Scott R. B. (1993): Leukopenic Myelosis. *Proc R Soc Med*, 32, pp.1429-1434
- Seitz, H. K., Matsuzaki, S., Yokoyama, A. (2001): Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res*, 25, pp.137-143
- Simpson, S., Woodworth, C. D., DiPaolo, J.A. (1997): Altered expression of Erg and Ets-2 transcription factors is associated with genetic changes at 21q22.2-22.3 in immortal and cervical carcinoma cell lines *Oncogene*, 14(18), pp.2149-2157
- Strilic B., Yang L., Albarrán-Juárez J. (2016): Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature*, 536(7615), pp. 215-218
- Suzuki, S., Ishikawa, K. (2014): Combined inhibition of EMMPRIN and epidermal growth factor receptor prevents the growth and migration of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*, 44, pp.912-917
- Syrbu, S.I., Cohen, M.B. (2011): An enhanced antigen-retrieval protocol for immunohistochemical staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol*, 717, pp.101-110
- Tower, G. B., Coon, C. I., Brinckerhoff, C. E. (2003): The 2G single nucleotide polymorphism (SNP) in the MMP-1 promoter contributes to high levels of MMP-1

transcription in MCF-7/ADR breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 82, pp. 75-82

Trojanowska, M. (2000): Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene*, 19, pp.6464-6471

Tsimplaki, E., Argyri, E., Xesfyngi, D. (2014): Prevalence and expression of human papillomavirus in 53 patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 34, pp.1021-1025

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K. (2009): Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health*, 6, pp.445-462

Wang, X. I., Thomas, J., Zhang, S. (2012): Changing trends in human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol*, 16, pp.7-12

Watabe, T., Yoshida, K., Shindoh, M. (1998): The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase gene in response to epidermal growth factor. *Int J Cancer*, 77, pp.128-137

Xia, L. Y., Zeng, X. T., Li, C. (2013): Association between p53 Arg72Pro polymorphism and the risk of human papillomavirus-related head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14, pp. 6127-6130

Yordy, J. S., Muise- Helmericks, R. C. (2000): Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene*, 19, pp.6503-6513

Zabuawala, T., Taffany, D. A., Sharma, S. M. (2010): An Ets-2 driven transcriptional program in tumor-associated macrophages promotes tumor metastasis. *Cancer Research*, 70, pp.1323-1333

Zhao, G., Usui, M.L., Lippman, S.I. (2013): Biofilms and inflammation in chronic wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2, pp.389-399

Zheng, Y., Xia, P., Zheng, H. C. (2010) The screening of viral risk factors in tongue and pharyngolaryngeal squamous carcinoma. *Anticancer Res*, 30, pp.1233-1238

8. Anhang

Tab. 1 Anhang

histopathologische und färbemethodische Daten

Lokalisation	Typ	Alter	Sex	TNM	ETS-2	Grading
Gaumen	P	46	m	T1N0M0	0	G2
Gaumenbogen	P	44	m	T2N0M0	0	G2
Gaumenbogen	P	63	m	T1N0M0	0	G2
Gaumenbogen	P	42	m	T1N0M0	1	G2
Gaumenbogen	P	53	m	T1N0M0	1	G2
Gaumenbogen	P	66	m	T1N0M0	2	G2
Gaumenbogen	P	54	m	T1N0M0	0	G3
Gaumenbogen	P	53	m	T2N0M0	3	G2
Gaumenbogen	P	49	w	T1N0M0	1	G2
Gaumenbogen	P	56	m	T1N0M0	1	G2
Gaumenbogen	P	58	m	T2N0M0	0	G2
Gaumenbogen	P	49	m	T2N0M0	1	G1
Gaumenbogen	P	58	m	T2N2M0	3	G2
Gaumenbogen	P	48	m	T3N2M0	3	G1
Gaumenbogen	P	55	m	T2N2M2	1	G3
Gaumenbogen	P	43	m	T3N2M0	3	G2
Glossotonsillarfurche	P	52	m	T1N0M0	1	G2
Glossotonsillarfurche	P	57	m	T2N1M0	1	G3
Mundboden	P	52	m	T2N0M0	3	G2
Mundboden	P	51	m	T2N0M0	0	G2
Mundboden	P	60	m	T1N0M0	1	G2
Oro-/Hypopharynx	P	50	m	T4N2M0	0	G3
Oro-/Hypopharynx	P	60	m	T3N2M0	0	G3
Oro-/Hypopharynx	P	56	m	T4N2M1	0	G2
Oro-/Hypopharynx	P	45	m	T4N2M0	0	G3
Oro-/Hypopharynx	P	52	m	T2N2M0	1	G2
Oropharynx	P	46	m	T4N2M0	1	G2
Oropharynx	P	70	m	T4N2M0	1	G2
Oropharynx	P	71	m	T4N2M0	1	G2
Oropharynx	N	45	m	T4N3M0	0	G1
Oropharynx	P	44	w	T2N0M0	3	G2
Oropharynx	P	45	w	T2N0M0	0	G2

Oropharynx	P	58	m	T2N0M0	0	G2-G3
Oropharynx	P	50	m	T2N0M0	1	G2-3
Oropharynx	P	69	m	T2N0M0	0	G2
Oropharynx	P	63	m	T3N0M0	2	G2
Oropharynx	P	51	m	T1N0M0	2	G2
Oropharynx	P	72	m	T1N0M0	0	G2
Oropharynx	P	62	m	T4N0M0	0	G2
Oropharynx	P	58	m	T3N1M1	0	G3
Oropharynx	P	63	m	T4N1M0	1	G3
Oropharynx	P	56	m	T3N1M0	0	G2
Oropharynx	P	62	m	T2N1M0	1	G2
Oropharynx	P	53	w	T4N2M0	1	G2
Oropharynx	P	60	m	T4N2M0	3	G3
Oropharynx	P	60	m	T4N2M0	3	G2
Oropharynx	P	59	w	T4N2M0	0	G2-3
Oropharynx	P	57	m	T3N2M0	1	G4
Oropharynx	P	81	m	T4N2M0	2	G2-3
Oropharynx	P	66	m	T3N2M0	1	G1
Oropharynx (rezidiv)	P	58	m	T4N2M0	1	G3
Pharynxhinterwand	P	67	w	T4N0M0	0	G2
Pharynxhinterwand	P	56	m	T2N0M0	1	G2
Pharynxhinterwand	P	73	m	T4N1M0	0	G2
Pharynxhinterwand	P	55	w	T2N1M0	1	G2-3
Tonsille	P	61	w	T2N0M0	2	G2
Tonsille	P	59	w	T3N0M0	0	G2
Tonsille	P	47	m	T2N0M0	2	G2
Tonsille	P	55	m	T4N0M0	2	G2
Tonsille	P	72	m	T2N0M0	2	G2
Tonsille	P	69	w	T3N1M0	1	G3
Tonsille	P	49	m	T3N0M0	0	G2
Tonsille	P	50	m	T1N0M0	2	G2
Tonsille	P	52	w	T1N0M0	1	G2
Tonsille	P	77	m	T4N0M0	3	G2
Tonsille	P	58	m	T2N0M0	1	G2
Tonsille	P	68	m	T3N0M0	0	G2-3
Tonsille	P	61	m	T4N0M0	0	G2

Tonsille	P	68	m	T3N0M0	1	G2
Tonsille	P	51	m	T3N0M0	2	G3
Tonsille	P	72	w	T3N0M0	1	G2
Tonsille	P	64	m	T2N0M0	0	G3
Tonsille	P	86	w	T2N0M0	2	G2
Tonsille	P	89	m	T2N0M0	1	G2
Tonsille	P	55	m	T4N0M0	0	G2
Tonsille	P	55	w	T4N1M0	2	G2
Tonsille	P	74	m	T2N1M0	2	G2
Tonsille	P	57	m	T1N1M0	2	G2
Tonsille	P	69	m	T3N1M0	1	G2
Tonsille	P	46	w	T3N1M0	1	G2
Tonsille	P	67	m	T3N1M0	2	G3
Tonsille	P	59	m	T1N1M0	1	G2
Tonsille	P	55	w	T2N1M0	0	G2-3
Tonsille	P	73	m	T4N1M0	1	G2
Tonsille	P	48	m	T3N1M0	1	G2
Tonsille	P	59	m	T2N1M0	0	G2
Tonsille	P	58	m	T2N1M0	2	G3
Tonsille	P	48	m	T4N2M0	2	G2
Tonsille	P	70	m	T3N2M0	1	G2
Tonsille	P	53	m	T3N2M0	0	G2
Tonsille	P	49	m	T1N2M0	2	G3
Tonsille	P	57	m	T4N2M0	1	G3
Tonsille	P	49	w	T2N2M0	0	G2
Tonsille	P	54	m	T2N2M0	1	G2
Tonsille	P	89	w	T2N2M0	2	G3
Tonsille	P	48	w	T4N2M0	2	G3
Tonsille	P	56	m	T4N2M0	1	G2
Tonsille	P	43	m	T1N2M0	1	G3
Tonsille	P	38	m	T2N2M0	2	G2-3
Tonsille	P	81	m	T3N2M0	2	G2
Tonsille	P	80	m	T4N2M0	2	G2-3
Tonsille	P	59	w	T4N2M0	1	G2
Tonsille	P	53	m	T4N2M0	1	G2-3
Tonsille	P	85	m	T2N2M0	2	G3

Tonsille	P	51	m	T2N2M0	0	G3
Tonsille	P	64	m	T4N2M0	2	G2
Tonsille	P	49	m	T4N2M1	0	G2-3
Tonsille	P	64	m	T4N2M0	0	G3
Tonsille	P	63	m	T4N2M0	1	G2
Tonsille	P	41	m	T4N2M0	1	G2
Tonsille	P	65	m	T4N3M0	1	G2
Tonsille	P	61	m	T3N3M0	0	G2
Tonsille	P	50	w	T3N3M0	0	G2
Tonsille	P	56	m	T2N0M0	0	G2
Uvula	P	46	w	T1N0M0	0	G2
Uvula	P	59	m	T1N0M0	2	G2
Uvula	P	70	w	T1N0M0	1	G2
Vallecula	P	58	m	T1N0M0	1	G2
Vallecula	P	81	m	T3N0M0	1	G3
Vallecula	P	68	m	T2N2M0	2	G2
weicher Gaumen	P	51	w	T2N0M0	3	G2
weicher Gaumen	P	66	m	T2N0M0	1	G2
weicher Gaumen	P	56	m	T4N2M0	0	G2
Zungengrund	P	51	m	T2N0M0	1	G3
Zungengrund	P	64	m	T3N0M0	2	G2
Zungengrund	P	60	m	T2N0M0	0	G3
Zungengrund	P	44	m	T3N0M0	2	G2
Zungengrund	P	53	m	T3N0M0	0	G3
Zungengrund	P	47	m	T2N0M0	0	G2
Zungengrund	P	66	m	T2N1M0	0	G2
Zungengrund	P	57	m	T4N1M1	0	G2
Zungengrund	P	64	m	T4N1M1	1	G2
Zungengrund	P	46	m	T2N1M0	1	G2
Zungengrund	P	59	m	T2N1M0	2	G3
Zungengrund	P	52	w	T4N1M0	0	G2
Zungengrund	P	63	w	T3N2M0	2	G2
Zungengrund	P	49	m	T4N2M0	0	G2
Zungengrund	P	52	m	T3N2M0	0	G2
Zungengrund	P	74	m	T3N2M0	0	G2
Zungengrund	P	48	w	T4N2M0	0	G2

Zungenrund	P	45	w	T3N3M0	1	G2
------------	---	----	---	--------	---	----

P = Primärtumor; **Ets2** = Scoreangaben 0-3, dabei **0**=keine Färbung;
1= schwache Färbung; **2**=deutliche Färbung; **3**=starke Färbung;

Klassifikation der untersuchten Plattenepithelkarzinome

Tab. 3 Anhang

T-Klassifikation von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx

T1	<=2cm
T2	>2cm bis 4cm
T3	>4cm
T4	Infiltration von Nachbarstrukturen

Tab. 4 Anhang

Lymphknotenstatus der regionären Lymphknoten

N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2	Metastase(n) in solitärem oder multiplen, ipsilateralen, bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, jedoch nicht größer als 6cm größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6cm in größter Ausdehnung

Tab. 5 Anhang

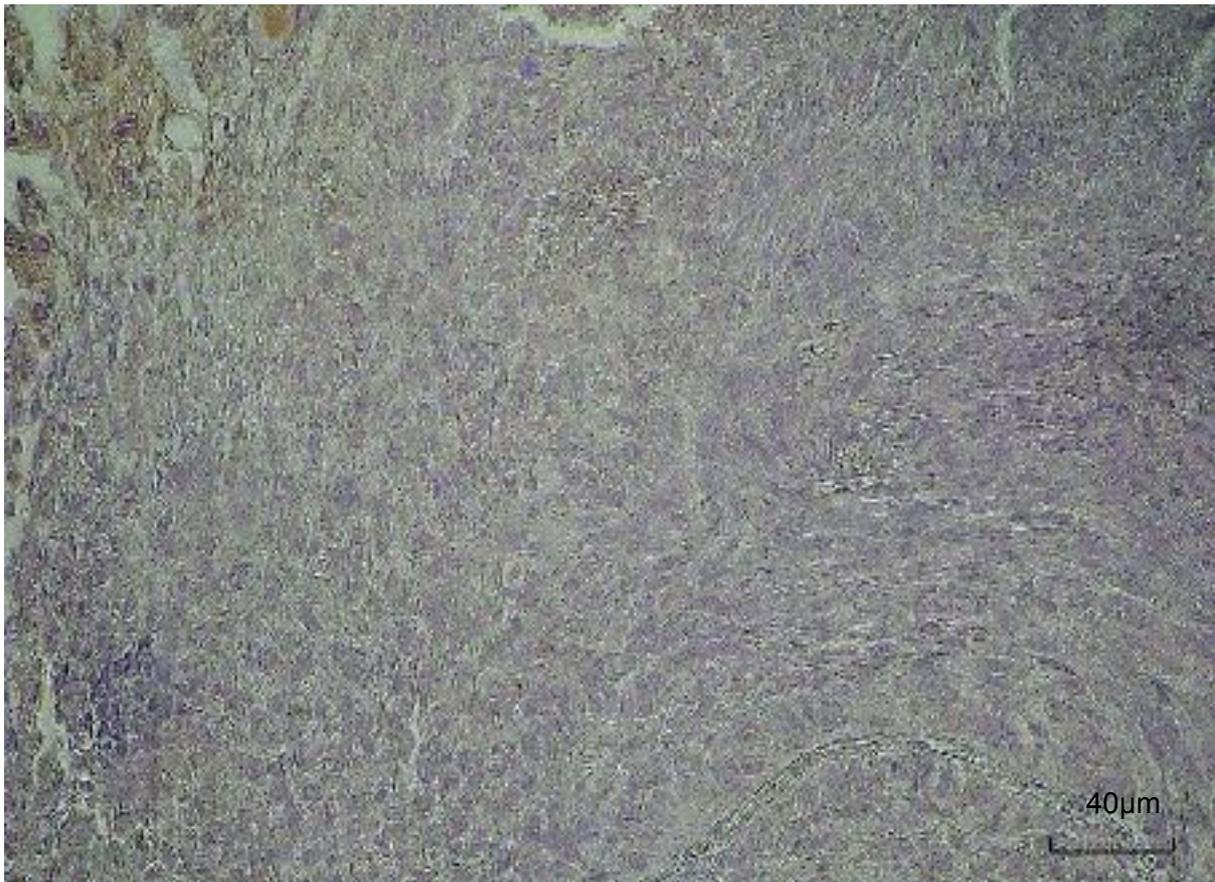
Histopathologisches Grading (Gx, d.h der Differenzierungsgrad konnte nicht bestimmt werden, nicht vertreten im untersuchten Probengut)

G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Tab. 6 Anhang

Stadiengruppierung von Karzinomen

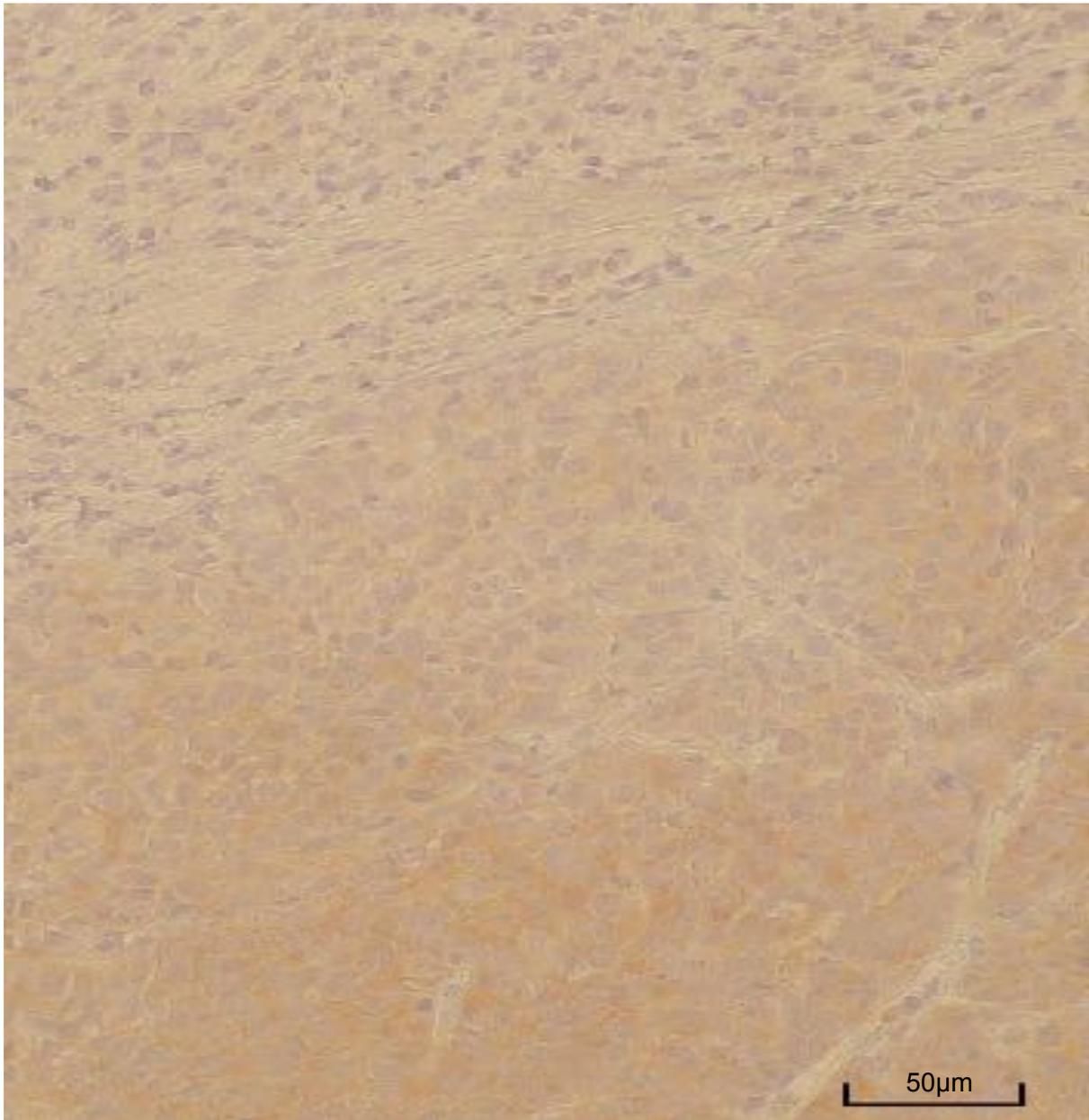
Stadium 0	Tis N0 M0
Stadium I	T1 N0 M0
Stadium II	T2 N0 M0
Stadium III	T3 N0 M0 T1 N1 M0 T2 N1 M0 T3 N1 M0
Stadium IV	T4 N0,N1 M0 Jedes T N2,N3 M0 Jedes T jedes N M1

Bilder zum Abschnitt immunhistochemische Ergebnisse

Vergrößerung 200-fach

Abb.1 Anhang**Bild Score 0****Plattenepithelkarzinom**

Diffuse blaue Färbung des Zytoplasmas durch Gegenfärbung mit Hämalaun, nur sporadisch positive Färbung der Nuklei des Tumorgewebes.



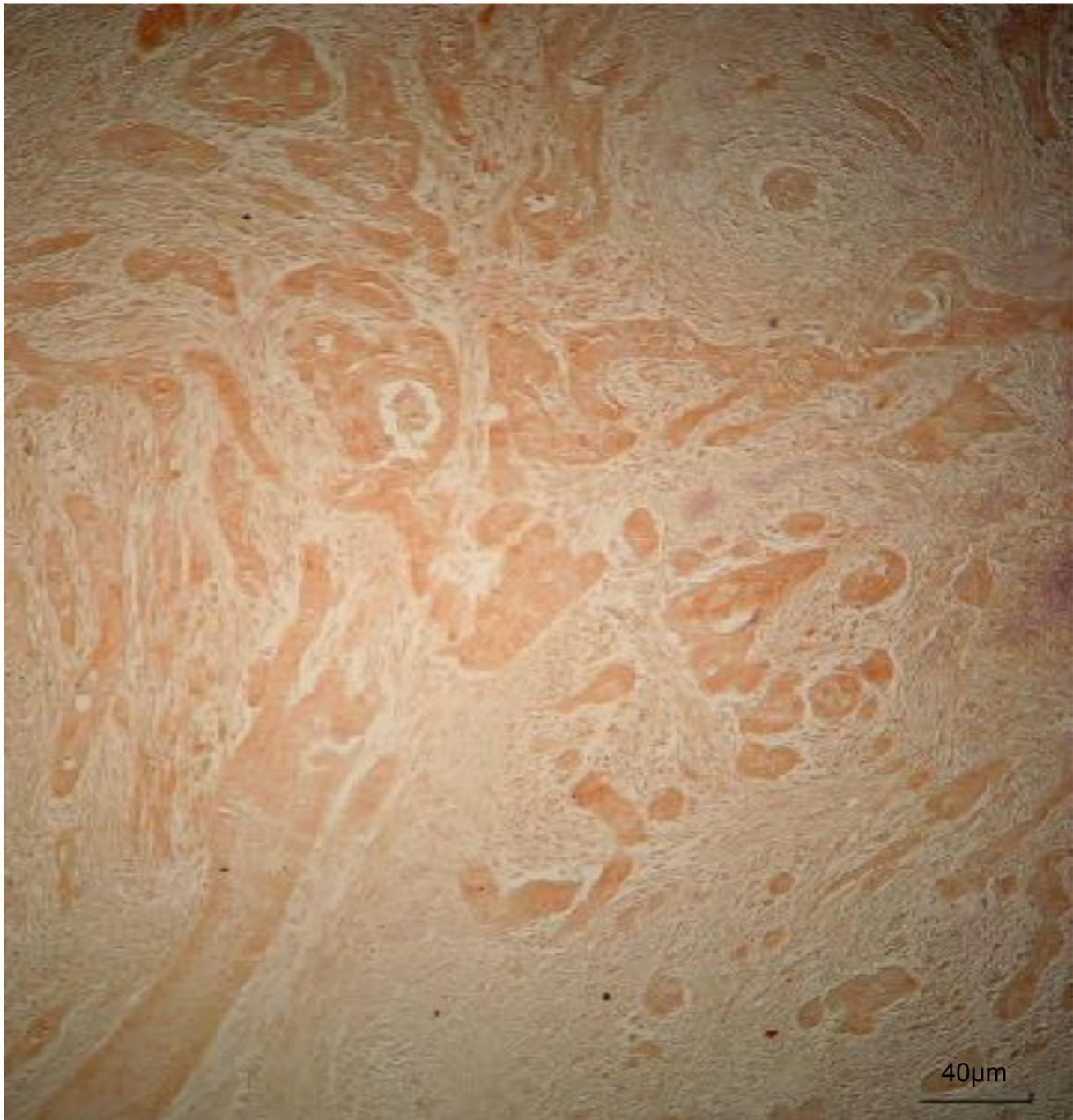
Vergrößerung 250-fach

Abb.2 Anhang

Bild Score 1

Plattenepithelkarzinom

schwache rot-braune Färbung des Tumorgewebes; deutliche Gegenfärbung jedoch nur sehr spezifische Antikörperfärbung der Nuklei , keine Färbung des umgebenden gesunden Gewebes



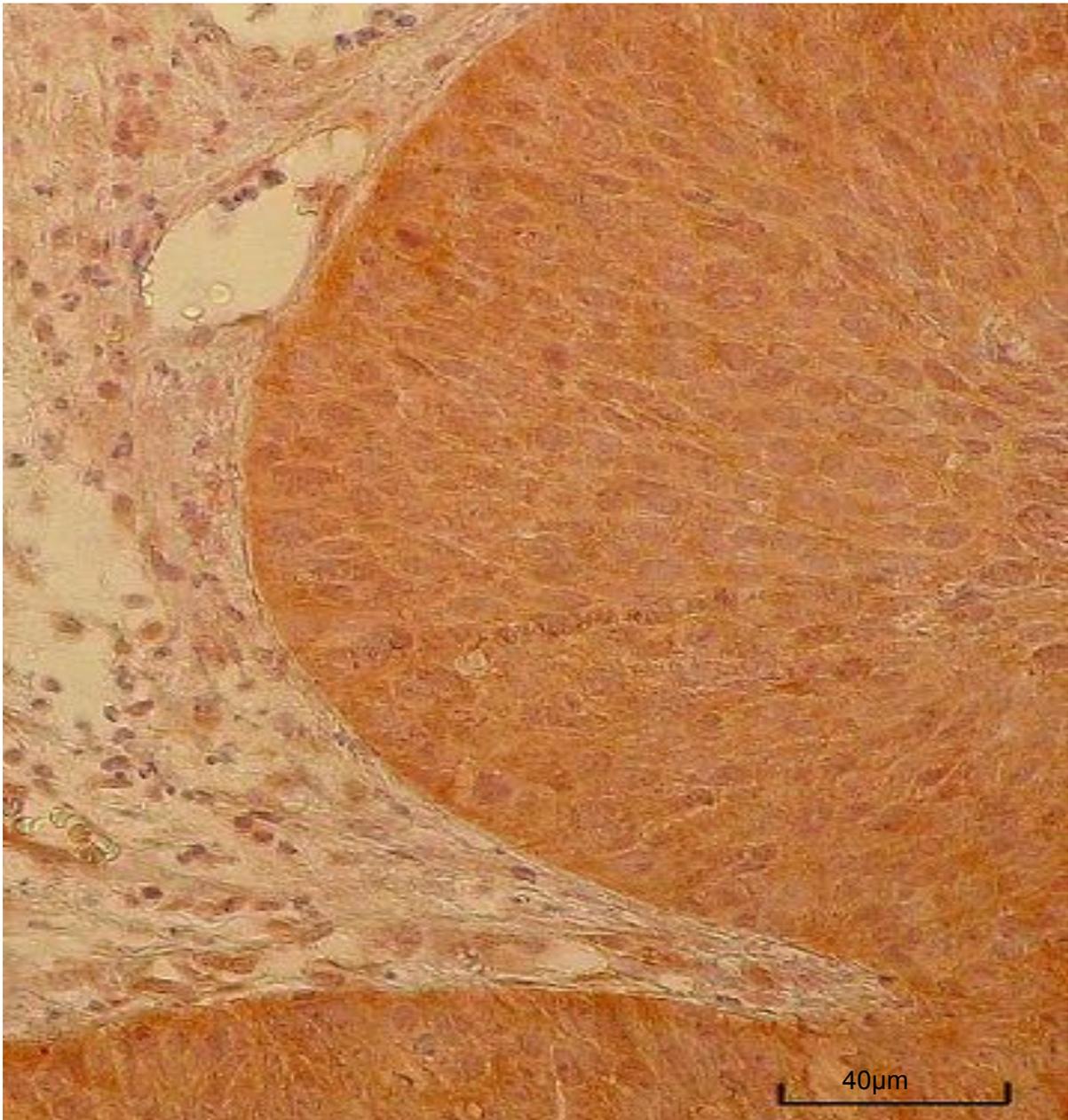
Vergrößerung 150-fach

Abb. 3 Anhang

Bild Score 2

Plattenepithelkarzinom

deutliche rot-braune Färbung des tumorösen Zytoplasmas und Nuklei, disseminierte Tumorareale als Zeichen des infiltrativen Wachstums, gesundes umgebendes Stroma nicht spezifisch gefärbt.



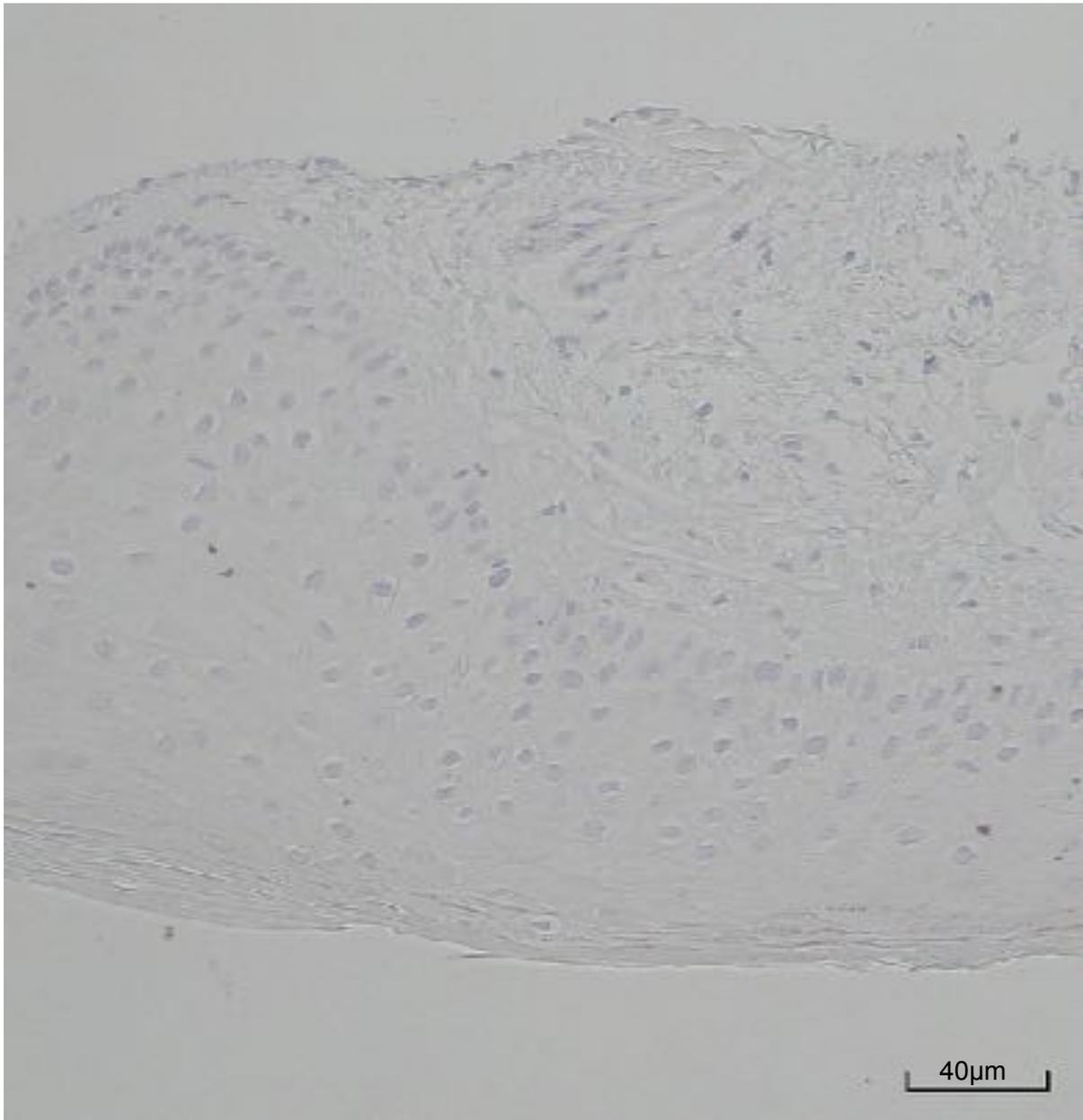
Vergrößerung 400-fach

Abb. 4 Anhang

Bild Score3

Plattenepithelkarzinom

durchgehend starke rot-braune Färbung des Tumorgewebes, dabei stärkere Färbung des Zytoplasmas gegenüber den Nuklei; deutliche Abgrenzung zwischen Tumorgewebe und gesundem Epithel, schwache Gegenfärbung der Nuklei durch Hämalaun.



Vergrößerung 400-fach

Abb. 5 Anhang

Nasenschleimhaut

Gesundes mehrschichtiges Plattenepithel der Nasenhöhle, gefärbt; keine spezifische Färbung des gesamten Gewebes, Gegenfärbung der Zellnuklei durch Hämalaun.

9. Danksagung

Frau Prof. Dr. med. Petra Ambrosch, Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Campus Kiel UK-SH danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im onkologischen Labor und die zur Verfügung gestellten Materialien und Geräte.

Herrn Prof. Dr. med Stefan Gottschlich, ehemals stellvertretender Direktor der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig- Holstein, Campus Kiel, danke ich für die Themenbereitstellung der Arbeit und die sorgsame Betreuung und Hilfestellung während der gesamten Arbeit.

Herrn PD Dr. Tibor Görögh und Frau Anne-Marie Røen schulde ich besonderen Dank für die unermüdliche Betreuung und Einweisung im onkologischen Labor. Desweiteren danke ich Ihnen für die sehr angenehme Zusammenarbeit im Labor und all die Mühe und Hilfsbereitschaft, die sie aufgewendet haben und mir meine Promotionszeit daher immer in bester Erinnerung bleiben wird.

Ich danke Frau Dr. Nele Garbrecht aus dem Institut für Pathologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Beurteilung der Ergebnisse und Bestätigung des angewendeten Scores.

10. Lebenslauf

Name: Berenike Oetke, geb. Edling

Geboren: am 14. Mai 1983 in Erfurt

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung:

1989-1990 Grundschule Erfurt (Thüringen)

1990-1993 Grundschule Helmbrechts (Bayern)

1993-2002 Johann-Christian-Reinhart-Gymnasium, Hof (Bayern);
Abitur

2002-2007 Studium der Zahnheilkunde, Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel; Approbation Dezember 2007

November 2007

– April 2008 Immunhistochemische Untersuchungen im onkologischen
Labor der Klinik für Hals- , Nasen- und Ohrenheilkunde,
Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel

April 2008

– Mai 2010 Zahnärztin in Assistenzzeit

Seit Juni 2010 Angestellte Zahnärztin in der Praxis Weggen, Fischer &
Partner in Bremen

Veröffentlichungen:

Edling B, Görögh T, Garbrecht N, Gottschlich S (2016) :Immunohistochemical Analysis of the Ets2 Oncoprotein in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas; (ePoster-Präsentation während des Kongresses “2nd Onco Update Europe November 25-26, 2016 in Budapest”)