

DIE ROLLE VON FHL2 ALS TRANSKRIPTIONSKOFAKTOR IN DER KARZINOGENESE
ORALER PLATTENEPITHELKARZINOME

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER RHEINISCHEN FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT
BONN

MARTA MALGORZATA HENKE GEB. MIGULETZ
AUS TARNOWITZ (POLEN)

2007

ANGEFERTIGT MIT GENEHMIGUNG DER
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT BONN

1. GUTACHTER: PROF. DR. MED. R. BÜTTNER
2. GUTACHTER: PD DR. MED. A. TÜRLER

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 2. APRIL 2007

AUS DEM INSTITUT FÜR PATHOLOGIE DER UNIVERSITÄT BONN
DIREKTOR: PROF. DR. MED. R. BÜTTNER

DIESE DISSERTATION IST AUF DEM HOCHSCHULSCHRIFTENSERVER DER ULB BONN
[HTTP://HSS.ULB.UNI-BONN.DE/DISS_ONLINE](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) ELEKTRONISCH PUBLIZIERT

Für meine Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	5
2	Abkürzungsverzeichnis	7
3	Einleitung	8
3.1	Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle	9
3.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	9
3.1.2	Klinik und Diagnose	10
3.1.3	Makroskopische und mikroskopische Klassifikation.....	10
3.1.4	Therapiestrategien	12
3.1.5	Prognosefaktoren.....	14
3.2	Das LIM-only Protein FHL2.....	16
3.2.1	LIM-Proteine.....	16
3.2.2	FHL-Subtypen.....	17
3.2.3	Genetische Kodierung und Struktur von FHL2	18
3.2.4	Zelluläre Lokalisation von FHL2.....	18
3.2.5	Funktionen von FHL2 in unterschiedlichen Geweben.....	19
3.2.5.1	Herz	19
3.2.5.2	Muskulatur	19
3.2.5.3	Knochen	20
3.2.6	FHL2 als Transkriptionskofaktor	20
3.2.7	FHL2 in der Karzinogenese	22
3.3	Das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin.....	24
3.4	Fragestellung	26
4	Material und Methoden	27
4.1	Patientenkollektiv.....	27
4.2	Immunhistochemie.....	30
4.2.1	Vorgehen bei der Einzelfärbung von FHL2.....	31
4.2.2	Vorgehen bei der Einzelfärbung von E-Cadherin.....	32
4.2.3	Rezepte.....	33

4.3	Mikroskopische Auswertung	33
4.4	Statistische Auswertung.....	34
5	Ergebnisse.....	35
5.1	Tumorumgebendes, nicht-neoplastisches Epithel.....	35
5.1.1	FHL2	36
5.1.2	E-Cadherin	37
5.2	Primäres Plattenepithelkarzinomgewebe	38
5.2.1	FHL2	39
5.2.2	E-Cadherin	40
5.3	Intraindividuelle Korrelation von Intensität und prozentualem Anteil.....	43
5.3.1	Tumorumgebendes nicht-neoplastisches Epithel.....	43
5.3.1.1	FHL2	43
5.3.1.2	E-Cadherin	44
5.3.2	Primäres Plattenepithelkarzinomgewebe	45
5.3.2.1	FHL2	45
5.3.2.2	E-Cadherin	46
6	Diskussion	48
6.1	Ergebnisse E-Cadherin.....	48
6.2	Ergebnisse FHL2.....	49
6.3	Zellbiologische Funktionen von FHL2 und E-Cadherin.....	50
6.4	Hypothesen.....	51
6.5	Schlussfolgerungen	52
7	Zusammenfassung	54
8	Literaturverzeichnis.....	55
9	Danksagung.....	62

2 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACT	Activator of CREM in testis
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
BRCA	Breast Cancer
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-binding protein
CREB	cAMP responsive element binding protein
CREM	cAMP responsive element modulator protein
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxy ribonucleic acid
DRAL	Down regulated in rhabdomyosarkoma LIM-protein
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FAB	French American British
FHL	Four-and-Half-LIM-Domänen
HPV	Humane Papillomaviren
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LIM	LIN-11, ISL-1, MEC-3
MAPkinase	Mitogen activated protein kinase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
SLIM	Skeletal muscle LIM-protein
SPP	Spinghosin-1-Phosphat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid

3 Einleitung

Im Bereich der Onkologie konnten in den letzten Jahrzehnten durch ein tieferes Verständnis der Pathogenese der Tumorentstehung große Fortschritte erzielt werden. So gelingt es zunehmend, Malignome frühzeitig zu erkennen und Erfolg versprechende Therapieansätze zu entwickeln, so dass für eine Vielzahl von Neoplasien die Überlebenszeit der Patienten verlängert werden konnte. Zur Beurteilung epithelialer Neoplasien dient der Tumormarker E-Cadherin, welcher durch seine verminderte Expression in hochmalignen Tumoren eine zunehmende Dedifferenzierung des Gewebes anzeigt, sowie zugleich die Pathogenese der Tumorprogression veranschaulicht. E-Cadherin ist ubiquitär auf der Zelloberfläche aller epithelialen Zellen vorhanden und dient dort der Zelldifferenzierung und der Ausbildung von interzellulären Zell-Zell-Kontakten. Entartet ein epitheliales Gewebe, kommt es zu einer Dedifferenzierung der Zellen und zu einer Lösung der interzellulären Zelladhäsion. Dieser Prozess wird durch eine verminderte Expression von E-Cadherin im Tumorgewebe angezeigt. So korreliert die Herunterregulation von E-Cadherin mit einem hochmalignen Tumorstadium und damit mit einer schlechteren Prognose für den Patienten. Ein ähnlich viel versprechendes Protein, welches sowohl Hinweise für die Mechanismen der Karzinogenese liefert, als auch potenziell als Tumormarker zur Prognoseeinschätzung dienen kann, wurde im Protein FHL2 gefunden. FHL2 gehört zu der Gruppe der LIM-only Proteine, welche biochemisch aus mehreren Zinkfingern aufgebaut sind und vielfältige Vorgänge in der Zelle regulieren. Dazu gehören beispielsweise die Kontrolle von Zelldifferenzierung und Wachstum sowie die Formation von Multiproteinkomplexen. Noch ist jedoch das Wissen über die Rolle des LIM-only Proteins FHL2 lückenhaft. Vermutlich kontrolliert FHL2 als selektiver Transkriptionsfaktor im Zellkern die Umsetzung bestimmter DNA-Abschnitte. In Prostatakarzinomen konnte eine verstärkte Expression von FHL2 beobachtet werden, so dass FHL2 in seiner Rolle als selektiver Transkriptionsfaktor einen wichtigen Anteil an der Tumorentstehung haben könnte.

In der hier vorliegenden Studie wird die Rolle von FHL2 in der Karzinogenese von oralen Plattenepithelkarzinomen untersucht. Läge auch hier wie bei Prostatakarzinomen eine verstärkte Expression von FHL2 in stark dedifferenzierten und metastasierten Karzinomen vor, so wäre dies ein wichtiger Hinweis auf die Mechanismen der Karzinomentstehung. Die immunhistochemischen Ergebnisse des FHL2-Proteins werden mit dem etablierten Tumormarker E-Cadherin ver-

glichen, um an diesem „Goldstandard“ die Rolle von FHL2 in der Karzinogenese von oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen zu bewerten.

3.1 Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle

3.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Maligne Tumoren des Mundraumes (Hornstein, 1996; AWMF-Leitlinien 2002) haben ihren Ursprung hauptsächlich in der epithelialen Mucosa und entstehen meist auf dem Boden einer präkanzerösen Läsion (Leukoplakie).

Intraorale Karzinome umfassen in Europa etwa 4 Prozent aller Karzinome bei Männern und 2 Prozent bei Frauen, jedoch zeichnen sich schon seit einigen Jahrzehnten eine deutliche Zunahme und eine Geschlechtsverschiebung ab. So stieg beispielsweise die Inzidenzrate von 12 auf 15-18 pro 100 000 Personen im letzten Jahrzehnt. Den größten Zuwachs hat dabei die Gruppe der Frauen erhalten, was sicherlich auf die Übernahme von bisher typisch männlichen Risikofaktoren, wie starker Zigaretten- oder Alkoholkonsum, zurückzuführen ist. Neben der unterschiedlichen Karzinomhäufigkeit bei Männern und Frauen lassen sich auch regionale Unterschiede feststellen. Während in den westlichen Industriestaaten die Prävalenz bei 2-4 Prozent und die Inzidenz bei 15-18/100 000 liegt, beträgt der Anteil der Mundhöhlenkarzinome in einigen Staaten Indiens und Südostasiens 15-45 Prozent, bei einer Inzidenzrate bis zu 34/100000 z.B. in Bombay.

Kaum eine andere Karzinomart ist in ihrer Ätiopathogenese so gut untersucht wie das Mundhöhlenkarzinom. Hier gelten die ursächlichen Risikofaktoren schon seit langem als gesichert. Dabei ist zu beachten, dass viele dieser Risikofaktoren nicht isoliert für sich zu betrachten sind, sondern dass sie im Sinne einer multifaktoriellen Genese mit anderen Faktoren vergesellschaftet sind. Zu den wichtigsten Faktoren zählen langjähriger Zigarettenabusus, Alkoholismus und eine mangelhafte Mundhygiene mit schlechtem Zahn- und Parodontalstatus. Zudem wurde eine erhöhte Karzinomhäufigkeit bei chronischem Eisenmangel (besonders bei postklimakterischen Frauen), allgemeiner exo- oder endogener Mangelernährung (Alkoholiker, Patienten mit chronisch-entzündlichen Magen-Darm-Erkrankungen), sowie bei Allgemeinerkrankungen mit Immunsuppression beobachtet. Nach einer externen Radiotherapie der Kopf-Hals-Region zeigte sich ein bis zwei Jahrzehnte später eine erhöhte Karzinomhäufigkeit. Ebenso wie bei Genitalkarzinomen

scheinen auch bei Mundhöhlenkarzinomen humanpathogene Papillomaviren (HPV 11 und HPV 16) eine Rolle zu spielen. Durch Ausschaltung bestimmter Tumorsuppressorgene wie dem p53-Gen kann eine initiiierende Mutation im Genom erfolgen, die dann durch weitere Noxen wie Rauchen oder Alkohol verstärkt wird. Dies führt zur Akkumulation multipler genetischer Defekte im Rahmen einer Mehrschritt-Karzinogenese.

3.1.2 Klinik und Diagnose

Die Klinik des oralen Plattenepithelkarzinoms ist zu Beginn meist diskret und daher kommt es häufig erst in fortgeschrittenen Stadien zur Diagnosestellung. In frühen Tumorstadien haben die Patienten meist außer einem diffusen rauen Schleimhautgefühl ("wie Sandpapier") keinerlei Beschwerden. Zum Teil bestehen schmerzlose Ulcera mit derbem Rand oder verruköse oder gesprenkelte Leukoplakien an den Prädilektionsstellen (untere und hintere Mundhöhle). Erst in fortgeschrittenen Stadien (T3, T4, N1 bis N3, M1) kommt es zu subjektiven Beschwerden des Patienten, die ihn möglicherweise zum Arztbesuch veranlassen. Mögliche Symptome sind hier loko-regionäre Schmerzen, eingeschränkte Zungenbeweglichkeit sowie Dysphagie bei der Nahrungsaufnahme. Eventuell ist auch eine klassische B-Symptomatik mit unklarem Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust vorhanden. Klinisch sind harte und vergrößerte regionäre Lymphknoten feststellbar.

Für die Diagnosestellung von Mundhöhlenkarzinomen ist folgendes Vorgehen sinnvoll und etabliert: Anamneseerhebung insbesondere der Risikofaktoren, Inspektion der gesamten Mundhöhle (besonders gründlich unterer und hinterer Bereich), Palpation suspekter Areale und aller regionären Lymphknoten sowie ggf. anschließend bioptisch-histologische Sicherung.

3.1.3 Makroskopische und mikroskopische Klassifikation

Das morphologische Erscheinungsbild von Plattenepithelkarzinomen im Frühstadium ist variabel. Grundsätzlich wird ein exophytisch-verruköses von einem endophytisch-infiltrativem Wachstum unterschieden. Eine genauere Unterteilung findet sich in der deskriptiven Beschreibung des Malignoms in exophytische (ca. 10 Prozent), ulzero-exophytische (ca. 20 Prozent), primär ulzeröse (ca. 20 Prozent) und ulzerös-invasive Karzinomformen (ca. 50 Prozent). Hierbei ist jedoch zu

betonen, dass sich in fortgeschrittenen Stadien (T3, T4) die Merkmale der Karzinomformen immer mehr angleichen.

Bezüglich der Lokalisation kommen Plattenepithelkarzinome (ebenso wie Präkanzerosen) bei Europäern am häufigsten in der unteren Hälfte der Mundhöhle vor. So sind etwa 10 Prozent der intraoralen Karzinome am Zungenrücken lokalisiert, 29 Prozent am Zungenrand, möglicherweise wegen des ständigen Kontakts mit kariösen Zähnen, 23 Prozent der Karzinome befinden sich am Mundboden.

Für die mikroskopische Klassifikation ist zum einen die Bestimmung von Wachstums- und Ausbreitungsstadien ("tumor staging") anhand der TNM-Klassifikation etabliert, zum anderen wird der Tumor anhand seiner Pathohistologie ("tumor grading") bewertet.

Zur Ermöglichung einer vergleichbaren Dokumentation der Diagnose und der Therapieergebnisse von Malignomen wurde von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) (Spiessl et al., 1985) eine einheitliche Systematik geschaffen. Die TNM-Klassifikation wurde von einem deutsch-österreichischen Arbeitskreis (DÖSAK) (Platz et al., 1982) auch für die im Kiefer- und Gesichtsbereich lokalisierten Tumore übernommen. Diese Stadieneinteilung beruht auf der Beurteilung des Primärtumors, der regionären Lymphknoten und möglicher Fernmetastasen. Die prätherapeutische Einteilung stützt sich dabei auf bildgebende Verfahren wie Röntgen, Ultraschall, Computertomographie und Kernspintomographie, welche zugleich zur Operationsplanung dienen. Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick der TNM-Klassifikation oraler Karzinome:

T = Primärtumor	N = regionale Lymphknoten	M = Fernmetastasen
Tx = Primärtumor nicht beurteilbar	Nx = regionale Lymphknoten nicht beurteilbar	Mx = keine Fernmetastasen feststellbar
T0 = kein Hinweis auf Primärtumor	N0 = regionale Lymphknoten ohne Metastasen tastbar	M0 = keine Fernmetastasen außerhalb des Halsbereichs
Tis = Carcinoma in situ	N1 = regionale ipsilaterale Lymphknoten mit Metastasen	M1 = Fernmetastasen
T1 = Tumordurchmesser < 2cm	N2 = regionale ipsi- und bilaterale Lymphknoten	
T2 = Tumordurchmesser 2-4 cm	N2a = einzelne ipsilaterale Metastase mit Durchmesser 3-6cm	
T3 = Tumordurchmesser > 4cm	N2b = multiple ipsilaterale Metastasen	

	mit Durchmesser bis 6cm	
T4 = Tumorinvasion in benachbarte Gewebestrukturen	N2c = bilaterale Metastasen mit Durchmesser bis 6cm	
	N3 = ipsi- und bilaterale Lymphknotenmetastasen mit Durchmesser > 6cm	

Tabelle 1: TNM-Klassifikation oraler Karzinome

Maligne Tumoren zeigen einen Verlust der zellulären und geweblichen Ausreifung im Vergleich zum Ausgangsgewebe, welche als Zellatypien zusammengefasst werden. Diese dienen als diagnostische Kriterien zur Unterscheidung von benignen und malignen tumorösen Veränderungen (Boecker et al., 1997). Hierzu gehören insbesondere:

Zellpolymorphie: Variabilität von Zellgröße und –form,

Anisonukleose: Auftreten unterschiedlich großer Kerne,

Kernpolymorphie: unterschiedliche Kernformen,

Kernhyperchromasie: vergrößertes und stärker anfärbares Kernchromatin aufgrund eines erhöhten DNA-Gehaltes der Tumorzellkerne,

Mitosefiguren: atypische Kernteilungsfiguren wie z. B. tri- oder tetrapolare Mitosen

Nukleolenvergrößerung,

Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns,

vermehrte zytoplasmatische Basophilie der Tumorzellen.

Anhand dieser zellulären Atypien lässt sich der Differenzierungsgrad eines Tumors und folglich das Grading des Tumors von gut differenziert (G1), mäßig differenziert (G2), schlecht differenziert (G3) bis undifferenziert (G4) bestimmen. Innerhalb eines tumorösen Gewebes kann dieser Differenzierungsgrad jedoch variieren.

Ebenso wie die TNM-Klassifikation trägt das pathohistologische Grading wesentlich zur Prognoseeinschätzung bei.

3.1.4 Therapiestrategien

Die Therapie oraler Malignome (Hornstein, 1996; AWMF-Leitlinien, 2000) hängt im Wesentlichen vom TNM-Stadium und ihrer Lokalisation ab. Grundsätzlich ist die Totalresektion des Tu-

mors anzustreben. Bei einer R0-Resektion sind die peripheren Gewebebegrenzungen des Resektats histologisch tumorfrei abgesichert. Die Durchführung einer abgestuften Diagnostik und Therapie der Mundhöhlenkarzinome anhand der TNM-Klassifikation ist prinzipiell sinnvoll. Allerdings weist ein solches Vorgehen auch gewisse Mängel auf. So werden beispielsweise sehr kleine knocheninfiltrierende Tumore als T4 klassifiziert. Unter diesem Gesichtspunkt ist die besondere Wichtigkeit einer individuell zugeschnittenen Therapieplanung mit multimodalen Therapiestrategien hervorzuheben. Es hat sich gezeigt, dass ein radio-chemotherapeutisch-chirurgisches Vorgehen die Langzeitprognose der Patienten erheblich verbessert (AWMF-Leitlinien, 2000).

Bei frühen Stadien (T1, T2) reicht die operative Entfernung des Tumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand zum umliegenden Gewebe. Liegt eine tiefere Infiltration, zum Beispiel mit Befall des Knochens vor, muss dieser mitreseziert werden. Bei großer Ausdehnung (T3-4, N1-2) ist es nötig, den Kiefer en bloc zu entfernen, ebenso wie befallene regionäre Lymphknoten. In noch ausgedehnteren Fällen muss eine radikale ein- oder beidseitige "neck dissection" in Erwägung gezogen werden.

Nach ausgedehnter Tumorsektion können funktionell beeinträchtigende Defekte entstehen, die mit Hilfe rekonstruktiver Verfahren verschlossen werden. So können Kontinuitätsdefekte alloplastisch beispielsweise durch titanhaltige Metallplatten überbrückt werden. Zur Deckung des Schleimhautdefekts kann ein Myokutanlappen oder transplantierte Dünndarmmukosa verwendet werden. Eine ausreichende Deckung und Wundheilung des Primärdefekts ist von großer Bedeutung für das weitere Befinden des Patienten, um Infektionen und andere Komplikationen zu verhindern. In der Folgebehandlung kann ein weiteres chirurgisches Eingreifen nötig werden. Ein bis zwei Jahre nach der Erst-Operation kann eine osteoplastische Rekonstruktion erfolgen, und die Metallimplantate können durch autologen Knochen ersetzt werden. Hierzu eignen sich Knochen-spanen von der Schädelkalotte, Rippe, Beckenkamm oder Spongiosamaterial, welches in ein an den Unterkieferstümpfen befestigtes Metallsieb gefüllt wird.

Auch bei inoperablen Tumoren oder bei Tumorrezidiven kann ein palliatives chirurgisches Vorgehen zur Verbesserung der Lebensqualität des Patienten beitragen. Meist haben diese Eingriffe die Aufrechterhaltung wichtiger Funktionen wie Atmung, Stimme und Schlucken zum Ziel.

Neben der chirurgischen Therapie sind die Radio- und Chemotherapie weitere Standbeine eines multimodalen Therapiekonzepts in der Behandlung von oralen Plattenepithelkarzinomen. Prinzipiell wird die Radiotherapie entweder als alleinige Behandlungsmethode oder als zusätzliche

Maßnahme präoperativ (neoadjuvant) oder postoperativ (adjuvant) eingesetzt. So kann beispielsweise vor chirurgischer Resektion der Tumor durch Bestrahlung (mit oder ohne Chemotherapie) zunächst verkleinert und anschließend das Restkarzinomgewebe entfernt werden. Die Bestrahlung kann mittels interstitieller Radiotherapie (temporäre intratumorale Insertion von Trägerröhrchen zur Applikation von Radionukliden), externer Hochvolt-Therapie und simultan oder sequentiell kombinierter Radio-Chemotherapie durchgeführt werden. Wichtig ist eine gründliche Sanierung der Zähne vor einer chirurgischen Resektion bei Patienten, die eine Radio- bzw. Chemotherapie erhalten haben. Dies ist notwendig, um die Gefahr einer odontogenen Osteomyelitis im bestrahlten Knochen und im abwehrgeschwächten Organismus zu verhindern.

Die alleinige Chemotherapie wird bislang nur innerhalb eines palliativen Therapiekonzepts bei Patienten mit Metastasen oder bei Tumorrezidiv ohne weitere chirurgische oder strahlentherapeutische Optionen eingesetzt. Folgende Wirkstoffe, die allein oder in Kombination miteinander eingesetzt werden können, haben sich als wirksam erwiesen: Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Methotrexat, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Vincaalcaloide und Paclitaxel. Die höchsten Remissionsraten zeigen die Kombinations-Chemotherapie mit Cisplatin bzw. Carboplatin und einer 5-Fluorouracil-Dauerinfusion. Jedoch ist die deutlich höhere Toxizität einer Polychemotherapie im Vergleich zu einer Monotherapie abzuwägen. Zur Verhinderung unerwünschter Nebenwirkungen kann auf zusätzliche Medikation zurückgegriffen werden. So kann beispielsweise die myelotoxische Wirkung (Granulozytopenie) von Carboplatin durch Gabe von Granulozytenstimulierendem Wachstumsfaktor (G-CSF) abgemildert oder sogar vermieden werden.

Darüber hinaus gibt es noch weitere Möglichkeiten der Supportivtherapie, um die Wundheilung zu beschleunigen, Schmerzen des Tumorpatienten zu lindern und Nebenwirkungen der Radio-Chemotherapie (Übelkeit, Appetitlosigkeit, Brechreiz, Strahlendermatitis) abzumildern.

3.1.5 Prognosefaktoren

Die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten, die posttherapeutisch rezidivfreie Zeit sowie der allgemeine Verlauf der Tumorerkrankung werden durch bestimmte Prognosefaktoren beeinflusst. Diese werden in drei Kategorien zur Festlegung der individuellen Prognoseabschätzung eingeteilt:

1. Tumorkorrelierte Faktoren wie Tumorgröße und –lokalisation, Einteilung in die TNM-Klassifikation sowie pathohistologische Kriterien,
2. Tumorunabhängige Faktoren, welche sich auf den Patienten beziehen, beispielsweise Alter, Geschlecht, Allgemeinerkrankungen, Immunstatus,
3. Therapieabhängige Faktoren, z.B. Zeitpunkt der Diagnosestellung, Wahl des Therapieverfahrens (Radiotherapie, Chemotherapie, chirurgische Resektion), Operationsart, R-Klassifikation und Rehabilitation.

Einen entscheidenden Schritt zur Tumorentstehung trägt die Aktivierung von zellulären Onkogenen bzw. die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bei. Diese Gene, welche physiologisch eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellproliferation und –differenzierung spielen, sind die Zielscheibe von potenziell malignominduzierenden Noxen. Eine Störung der physiologischen Funktion dieser Gene spielt bei der Initiation, Transformation und Progression von Tumoren eine zentrale Rolle. Eines der bekanntesten Tumorsuppressorgene ist das p53-Gen, welches unter physiologischen Bedingungen die Zellproliferation hemmt. Kommt es zu einer Mutation dieses Gens durch exogene Noxen, kann hierdurch eine maligne Zelltransformation induziert werden. Mutationen des p53-Gens werden insbesondere in weit fortgeschrittenen Tumoren unterschiedlicher Herkunft gefunden und verschlechtern die Prognose des Tumorträgers.

Nachdem es zur Tumorinitiation gekommen ist, wird die Prognose des Patienten im Wesentlichen durch die Fähigkeit des Tumors zur Größenzunahme und Invasion bzw. Metastasierung in andere Körperregionen bestimmt. Das Tumorwachstum ist in hohem Maße von einer tumoreigenen Gefäßversorgung abhängig. Durch Sezernierung des Tumor-Angiogenese-Faktors und anderen Wachstumsfaktoren kommt es zu einer Einsprossung von Kapillaren und Fibroblasten. Dies induziert eine Neubildung von tumoreigenen Gefäßen, welches als Tumorangiogenese bezeichnet wird. Je besser die Tumorangiogenese mit dem Tumorwachstum Schritt hält, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit für eine weitere Ausbreitung und Proliferation des Tumors. Besonders hohe Aussagekraft über die Malignität des Tumors haben die am Tumorrand erhobenen Zeichen für invasives und destruierendes Wachstum. Durch Auflösung von extrazellulärer Matrix, wie der Basalmembran, wird dem Tumor die Invasion in angrenzende Gewebestrukturen sowie der Anschluss an das körpereigene Gefäßsystem ermöglicht. Durch Infiltration von Lymphbahnen sowie Blutgefäßen ist der erste Schritt der Metastasierungskaskade vollzogen und somit die Prognose des Patienten deutlich verschlechtert.

Karzinome der Mundschleimhaut haben abhängig von ihrer TNM-Klassifikation und den oben genannten Faktoren eine 5-Jahre-Überlebensrate von 30 bis 70 Prozent. Bei Karzinomen der Zunge, des Mundbodens sowie der Kieferhöhlen ist die Prognose mit 20 bis 25 Prozent 5-Jahre-Überlebensrate am ungünstigsten. Zeichen einer Nerveninfiltration (Parästhesien im Trigemini-versorgungsareal), Befall regionärer Lymphknoten mit fehlender Verschieblichkeit oder subjektive Symptome wie Dysphagie verschlechtern die Überlebenschancen des Patienten.

Engmaschige Nachuntersuchungen nach Abschluss der Therapie sind daher unbedingt erforderlich. In den ersten beiden Jahren sind dreimonatige Nachuntersuchungsintervalle empfehlenswert, welche dann ab dem dritten Jahr auf sechsmonatige Abstände verlängert werden können.

Eine vollständige Rehabilitation des Patienten erfordert neben einer optimalen somatischen Therapie und engmaschigen Nachuntersuchungen auch die Wiederintegration in das soziale und berufliche Umfeld. Hierfür können rehabilitative Maßnahmen, psychosoziale Betreuung und die Anbindung an eine Selbsthilfegruppe förderlich sein.

3.2 Das LIM-only Protein FHL2

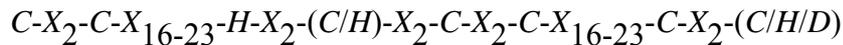
3.2.1 LIM-Proteine

FHL2 gehört zu der Gruppe der LIM-Proteine, welche in der Zelle vielfältige Vorgänge regulieren. Dazu gehören die Kontrolle der Zelldifferenzierung und des Wachstums. Sie können sowohl mit dem Aktinzytoskelett assoziieren als auch Aufgaben im Bereich der Transkription übernehmen. LIM-Proteine stellen den Kontakt zwischen spezifischen zellulären Proteinen her, um so die Formation von Multiproteinkomplexen zu ermöglichen (Bach, 2000; Kadrmas und Beckerle, 2004).

Unter dem Aspekt ihres biomolekularen Aufbaus werden LIM-Proteine in zwei Untergruppen eingeteilt (Sanchez-Garcia und Rabbits, 1994; Jurata und Gill, 1998). Zum einen gibt es LIM-only Proteine, welche ausschließlich aus LIM-Domänen bestehen. Zum anderen gibt es LIM-plus Proteine, deren LIM-Domänen mit anderen Strukturen, wie zum Beispiel mit LIM-Kinasen, assoziiert sind.

FHL-Proteine gehören zu der Untergruppe der LIM-only Proteine, da sie ausschließlich aus LIM-Domänen aufgebaut sind. LIM-Domänen enthalten die folgende Aminosäuresequenz, die reich an

Cysteinen ist (Chan et al., 1998):



LIM-Domänen bilden eine doppelte Zinkfingerstruktur, welche jeweils zwei Zinkionen binden kann und Wechselwirkungen zu anderen Proteinen vermittelt (Bach, 2000; Dawid et al., 1998; Kadrmas und Beckerle, 2004). FHL-Proteine haben in ihrem strukturellen Aufbau eine gewisse Besonderheit: Sie enthalten eine ungerade Anzahl von LIM-Domänen, nämlich Four-and-Half-LIM-Domänen (FHL). Sie bestehen somit aus vier doppelten und einem einzelnen Zinkfinger und können somit insgesamt 9 Zinkionen binden (Morgan und Madgwick, 1996; Genini et al., 1997).

3.2.2 FHL-Subtypen

Man unterscheidet mehrere FHL-Subtypen: Dazu gehören FHL1, FHL2, FHL3, FHL4 und ACT (activator of CREM in testis), welches in seinem strukturellen Aufbau den FHL-Proteinen gleicht (Morgan und Whawall, 2000). Das gewebsspezifische Vorkommen von FHL-Proteinen und ACT ist unterschiedlich. FHL1 zeigt als einziges Protein der FHL-Familie eine relativ ubiquitäre Verteilung im menschlichen Gewebe, ist jedoch ebenso wie FHL3 am stärksten in der Skelettmuskulatur exprimiert (Morgan und Madgwick, 1999). FHL2 findet sich besonders stark in der Herz- und Skelettmuskulatur, außerdem in geringerem Maße in den Ovarien, den Hoden, der Prostata und in anderen endokrinologischen Strukturen (Hypophyse, Nebennierenmark) (Chan et al., 1998; Fimia et al., 2000; Genini et al., 1997; Kong et al., 2001; Muller et al., 2000; Scholl et al., 2000; Tanahashi und Tabira, 2000). FHL3 ist ebenfalls stark in der Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert, schwächer in den Ovarien, der Milz und dem Nebennierenmark (Morgan und Madgwick, 1999). FHL4 ist hingegen ausschließlich im Hoden (in den Tubuli seminiferi) zu finden, was eine Rolle dieses Proteins in der Spermatogenese nahe legt (Morgan und Madgwick, 1999). Das strukturell verwandte ACT-Protein ist ebenfalls nur im Hoden zu finden, aber im Gegensatz zu FHL4 tritt es temporär begrenzt in bestimmten Phasen der Spermatogenese auf (Fimia et al., 1999; Morgan und Whawell, 2000).

3.2.3 Genetische Kodierung und Struktur von FHL2

Der genetische Code des FHL2 Gens wurde 1997 entschlüsselt und ist auf dem Chromosomenabschnitt 2q12-q13 lokalisiert und besteht aus 7 Exons (Chan et al., 1998). Durch Vergleich dieser Gensequenz mit der Nukleotid Datenbank der Gen-Bank wurde festgestellt, dass FHL2 identisch mit zwei anderen, bereits bekannten Proteinen ist. Bei dem einen Protein handelt es sich um SLIM-3 (skeletal muscle LIM-protein 3), welches besonders stark in der in der Skelettmuskulatur exprimiert wird (Morgan und Madgwick, 1996). Das andere Molekül mit homologer Struktur zu FHL2 wird als DRAL (down regulated in rhabdomyosarkoma LIM-protein) bezeichnet (Genini et al., 1996). Da jedoch FHL2 auch in einer Vielzahl von anderen Geweben exprimiert wird, erscheint der Name FHL2, der sich auf die molekularbiochemische Struktur des Proteins bezieht, sinnvoller als die Bezeichnungen SLIM-3 und DRAL, die ausschnittartig das Vorkommen des Proteins charakterisieren.

Das FHL2 Gen wird in ein etwa 1,5kb großes RNA-Molekül transkribiert, welches in ein Protein aus 279 Aminosäuren translatiert wird. Der Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen FHL2 und den anderen Proteinen der FHL-Familie einschließlich ACT zeigt, dass sich diese nicht nur in ihrem strukturellen Aufbau, sondern auch in der Abfolge ihrer Gensequenzen gleichen, was auf eine gemeinsame genetische Abstammung hinweist. So ist menschliches FHL2 zu 47,9% identisch mit humanem FHL1, zu 51,8% mit humanem FHL3, zu 47,1% mit FHL3 der Maus sowie zu 58,5% mit ACT (Morgan und Whawell, 2000). Anhand dieser Zahlen wird deutlich, dass die größte Ähnlichkeit im Aufbau zwischen den LIM-only Proteinen FHL2 und ACT besteht, wobei diese Moleküle zum Teil an unterschiedlichen zellulären Funktionen beteiligt sind.

3.2.4 Zelluläre Lokalisation von FHL2

Das LIM-only Protein FHL2 ist an einem weiten Spektrum von zellulären Vorgängen beteiligt. Hierbei spielt seine Lokalisation in der Zelle eine entscheidende Rolle. Auf der einen Seite ist es an der Zellmembran lokalisiert und übernimmt dort Aufgaben der Zelladhäsion, Zellidentität und Zelldifferenzierung. Zum anderen ist FHL2 im Zellkern zu finden, wo es als Transkriptionskofaktor selektiv die Expression bestimmter DNA-Abschnitte stimuliert (Hill und Riley, 2004; Du et al., 2002; Labalette et al., 2004; Li et al., 2001; Chu et al., 2000).

Da die Molekularmasse von FHL2 32 kDa beträgt und damit deutlich den Grenzwert von 50 kDa für einen aktiven Transportmechanismus zwischen Zytoplasma und Zellkern unterschreitet, ist es wahrscheinlich, dass FHL2 durch passive Mechanismen zwischen den Zellkompartimenten pendelt. Einige Autoren vertreten die Ansicht, dass das Vorkommen von FHL2 im Zellkern durch verschiedene Mechanismen beeinflusst werden kann. So stimulieren die Serumkomponenten Lysinphosphatsäure sowie Sphingosin-1-Phosphat die nukleäre Translokation von FHL2 in einer Rho-GTPase abhängigen Signalkaskade (Li et al., 2001; Morlon und Sassone-Corsi, 2003; Muller et al., 2002).

3.2.5 Funktionen von FHL2 in unterschiedlichen Geweben

FHL2 ist am häufigsten in Herz- und Skelettmuskulatur zu finden, kommt jedoch in unterschiedlichem Maße auch in anderen Geweben vor (Chan et al., 1998; Fimia et al., 2000; Genini et al., 1997; Kong et al., 2001; Muller et al., 2000; Scholl et al., 2000; Tanahashi und Tabira, 2000):

3.2.5.1 Herz

Da FHL2 in der Embryonalentwicklung in hoher Konzentration im Herzgewebe als auch im sich entwickelnden Gefäßsystem vorhanden ist, lag die Vermutung nahe, dass FHL2 für die Entwicklung des kardiovaskulären Systems von entscheidender Bedeutung sei. Hier zeigte sich jedoch, dass FHL2-defiziente Mäuse (FHL2-Null-Mäuse) keinerlei Entwicklungsstörung des kardiovaskulären Systems aufwiesen (Chu et al., 2000a, 2000b).

Im adulten kardialen Gewebe scheint FHL2 einer durch β -adrenerge Stimulation ausgelösten Hypertrophie des Herzens entgegenzuwirken. So zeigten FHL2-Null-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe eine überschießende Hypertrophie des Herzens durch β -adrenerge Stimulation (Kong et al., 2001). Darüber hinaus scheint FHL2 die Induzierung einer kardialen Hypertrophie durch ERK2 in der MAPkinase Signalkaskade zu antagonisieren. So zeigen FHL2-Null-Mäuse eine höhere ERK2-Konzentration als die Kontrollgruppe und damit eine erhöhte kardiale Hypertrophie (Purcell et al., 2004).

3.2.5.2 Muskulatur

Mehrere Studien belegen eine wichtige Rolle von FHL2 in zellulären Vorgängen von Myozyten. So bindet FHL2 im zytoplasmatischen Raum von Myoblasten an β -Catenin und beeinflusst auf

diese Weise die Muskelzelldifferenzierung (Martin et al., 2002). Des Weiteren fungiert FHL2 als Verbindungsmolekül zwischen Titin und metabolischen Enzymen wie der muskulären Kreatinkinase, Adenylatzyklase und Phosphofruktokinase, so dass FHL2 auf diese Weise eine Funktion in der Energieversorgung der Zelle während der Muskelkontraktion erfüllt (Langes et al., 2002). Eine weitere Funktion von FHL2 in Muskelzellen ist die Wechselwirkung mit Integrinen. So bindet FHL2 an zytoplasmatische α - und β -Integrine und scheint damit an der Umsetzung extrazellulärer Signale in intrazelluläre Mechanismen beteiligt zu sein (Wixler et al., 2000).

3.2.5.3 Knochen

FHL2 wurde neben Myoblasten und Kardiomyozyten auch in hoher Konzentration in menschlichen Osteoblasten gefunden. Dabei ist die Expression von FHL2 während der Verwandlung von Knochenmarkszellen in Osteoblasten um ein Mehrfaches gesteigert. Durch die Wirkung von Glukokortikoiden, natürlichen Inhibitoren der Knochenentwicklung, wird die Konzentration von FHL2 jedoch abgesenkt. Dies lässt auf eine wesentliche Rolle von FHL2 in der Osteogenese schließen (Chu et al., 2000b; Amaar et al., 2002). Ein weiterer Beleg für die Bedeutung von FHL2 in der Knochenentwicklung zeigt sich darin, dass FHL2-Null-Mäuse aufgrund der verminderten Aktivität von Osteoblasten eine ausgeprägte Osteopenie entwickeln, während FHL2-knock-in-Mäuse mit einer Überexpression von FHL2 eine deutlich erhöhte Knochendichte aufweisen (Guenther et al., 2005).

3.2.6 FHL2 als Transkriptionsfaktor

Von großer Bedeutung ist die Funktion von FHL2 im Zellkern, wo es Funktionen im Rahmen selektiver und gewebsspezifischer Genaktivierung ausübt. Im Zellkern wirkt FHL2 ebenso wie ACT als Transkriptionsfaktor und bindet an spezifische nukleäre Rezeptoren sowie an Transkriptionsfaktoren der CREB- und CREM-Familie.

Der bisher bekannte, klassische Weg der Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren besteht in der Phosphorylierung einer bestimmten Serinsequenz (Ser 133) der Transkriptionsfaktoren CREB/CREM und der anschließenden Wechselwirkung mit dem ubiquitär vorhandenen Transkriptionsfaktor CBP (CREB-binding protein) (Chrivia et al., 1993).

Dieser klassische Mechanismus der Genaktivierung lässt jedoch offen, wie eine selektive Aktivierung bestimmter Genabschnitte erzielt wird. Die Frage, wie eine selektive und gewebsspezifische

sche Genexpression erreicht wird, war bislang zum größten Teil noch ungeklärt. Hier liefern die Untersuchungen der LIM-only Proteine neue Erkenntnisse:

ACT (activator of CREM in testis) bindet in männlichen Keimzellen an den Transkriptionsfaktor CREM und ermöglicht eine vom klassischen Weg der Genexpression unabhängige Aktivierung. ACT fungiert als ein gewebspezifischer Transkriptionskofaktor von CREM, der zeitgleich mit CREM während der Keimzellendifferenzierung vorhanden ist. Das LIM-only Protein ACT bindet direkt an Transkriptionsfaktoren der CREM- und CREB-Familie und umgeht auf diese Weise den klassischen Weg der Phosphorylierung und CBP-Bindung zur Genaktivierung (Fimia et al., 1998).

Interessanterweise besitzt nicht nur ACT diese Fähigkeit zur selektiven Genaktivierung, sondern in unterschiedlichem Maße auch die anderen Mitglieder der LIM-only Proteinfamilie. So kann beispielsweise FHL2 sowohl an CREM als auch an CREB binden (Fimia et al., 2000). FHL2 ist das Protein mit der größten strukturellen Ähnlichkeit zu ACT, jedoch zeigen beide Proteine unterschiedliche Aktivierungspotenziale für die Transkriptionsfaktoren. FHL2 ist ein starker Aktivator von CREB (Johannessen et al., 2004) und nur ein schwacher Aktivator von CREM, während sich ACT in seinem Aktivierungspotenzial genau umgekehrt verhält.

Dieser Sachverhalt ist wahrscheinlich in der unterschiedlichen relativen Anordnung der LIM-Domänen begründet. Experimentelle Deletionen einzelner Abschnitte der LIM-only Proteine haben gezeigt, dass die einzelnen LIM-Domänen unterschiedlich stark zum Aktivierungspotenzial beitragen. Der N-Terminus der halben LIM-Domäne ist von essentieller Bedeutung für die Funktion der LIM-only Proteine, da seine Deletion in einer reduzierten Funktionsfähigkeit von FHL2 bzw. ACT resultiert. Die alleinige Deletion der dritten LIM-Domäne hingegen verringerte nicht die Funktion von FHL2 als Transkriptionskofaktor (Muller et al., 2002; Yan et al., 2003a), während FHL2-Moleküle nach Ausschaltung der LIM4-Domäne komplett funktionslos waren. Interessanterweise jedoch bleibt die Funktionsfähigkeit von FHL2 bei gleichzeitiger Deletion der LIM3- und LIM4-Domäne erhalten, was darauf hindeutet, dass die LIM4-Domäne essentiell wichtig für die Funktion von FHL2 als Transkriptionskofaktor ist, während die LIM3-Domäne als negativer Regulator fungiert (Yan et al., 2003b).

FHL2 spielt auch eine Rolle als Transkriptionskofaktor in der Regression des Müllerschen Gangs und damit der weiblichen Geschlechtsorgane in der männlichen Geschlechtsentwicklung. Hierbei interagiert FHL2 mit dem Wilms Tumor Suppressorgen (WT1) und induziert auf diese Weise die

Bildung des Anti-Müller-Hormons, welches die Regression des Müllerschen Gangs bewirkt (Du et al., 2002).

Ein weiterer Beleg für die Rolle von LIM-only Proteinen in der selektiven und gewebsspezifischen Genaktivierung ist ihre spezifische Stimulierung von bestimmten nukleären Steroidrezeptoren. FHL2 dient als Übermittler von extrazellulären Signalen beispielsweise durch Spingosin-1-Phosphat (SPP) in den Zellkern und aktiviert dort in seiner Funktion als Transkriptionskofaktor selektiv bestimmte Genabschnitte. SPP dockt an die extrazelluläre Membran an und aktiviert die Rho Signalkaskade. Je stärker die Rho-GTPasen aktiviert sind, desto stärker transloziert FHL2 von der Zellmembran in den Zellkern und desto stärker ist seine Wirkung als selektiver Transkriptionskofaktor (Muller et al., 2002).

Im Zellkern bindet FHL2 spezifisch an bestimmte nukleäre Rezeptoren wie den Androgenrezeptor in Epithelzellen der Prostata. Hierbei ist bemerkenswert, dass FHL2 ausschließlich Androgenrezeptoren stimuliert und keine Wirkung auf andere steroidale Hormonrezeptoren wie beispielsweise für Gluko- und Mineralokortikoide oder Progesteron hat. FHL2 erhöht die Transkriptionsaktivität von Androgenrezeptoren selektiv, wenn Agonisten des Androgenrezeptors anwesend sind. So resultiert eine erhöhte Expression von FHL2 in Prostataepithelzellen in einer verstärkten Sekretion von Probasin, dessen Genkodierung durch den Androgenrezeptor kontrolliert wird (Muller et al., 2000). Durch das Zusammenwirken von FHL2, CBP/p399 und β -Catenin wird die Transkription bestimmter Genabschnitte durch den Liganden-aktivierten Androgenrezeptor synergistisch verstärkt (Labalette et al., 2004).

Androgenrezeptoren spielen nicht nur eine wichtige Rolle in der physiologischen Funktion der Prostata, sondern sind auch entscheidend an der Entwicklung von Prostatakarzinomen beteiligt, da diese gerade zu Beginn ihres Wachstums androgenabhängig sind (Gregory et al., 1998). In späteren Stadien verläuft das Tumorwachstum weitgehend androgenunabhängig. Eine mögliche Erklärung beruht auf der Annahme, dass diese veränderte Androgenabhängigkeit durch eine Veränderung der Transkriptionskofaktoren des Androgenrezeptors hervorgerufen wird (Muller et al., 2000).

3.2.7 FHL2 in der Karzinogenese

Im gesunden Prostataepithel ist FHL2 an der Zellmembran lokalisiert, hingegen findet sich FHL2

in Prostatakarzinomgewebe vermehrt im Zellkern. Diese Translokation von FHL2 in entarteten Zellen spricht für eine Beteiligung des Proteins in seiner Funktion als selektiver Transkriptionsfaktor an der Tumorgenese. Einige Studien belegen einen Zusammenhang zwischen einer verstärkten Expression von FHL2 in Tumorgewebe von Prostatakarzinomen im Vergleich zu nicht-entartetem Prostatagewebe sowie eine Korrelation zwischen Stärke der FHL2-Expression und Ausmaß der Dedifferenzierung der malignen Zellen (Kinoshita et al., 2005; Muller et al., 2000). Jedoch scheint die vermehrte Expression von FHL2 nicht in allen Zelllinien von Prostatakarzinomen erhöht zu sein (Nessler-Menardi et al., 2000). Weiterhin ist festzustellen, dass eine vermehrte Translokation von FHL2 von der Zellmembran zum Zellkern mit einer zunehmenden Dedifferenzierung des Prostatakarzinomgewebes korreliert. In späten Tumorstadien finden sich ein stark erhöhte Expression von FHL2 und Rho-GTPasen, welche durch ihre Signalkaskade die Translokation von FHL2 in den Zellkern steuern (Muller et al., 2002). Rho-GTPasen sind auch in anderen Tumorgeweben, wie beispielsweise dem Mammakarzinom, im verstärkten Maße vorhanden, so dass ihre Beteiligung an der Tumorgenese nahe liegt (Fritz et al., 1999).

Des Weiteren zeigte sich eine erhöhte Anzahl von mRNA-FHL2 in Patienten mit einer FAB-M7 Unterform von akuter myeloischer Leukämie im Vergleich zu anderen Leukämieformen mit besserer Überlebensprognose (Ross et al., 2004).

FHL2 war des Weiteren in verstärktem Maße in Biopsien von Bronchialkarzinomen exprimiert, während sich in gesundem Lungengewebe kein FHL2 fand. Interessanterweise korrelierte die Prognose der an Lungenkrebs erkrankten Patienten signifikant mit der Stärke der FHL2-Expression, so dass Patienten mit starker Immunreaktivität für FHL2 im Tumorgewebe eine verkürzte Lebenserwartung hatten gegenüber Patienten mit geringer Immunreaktivität (Borczuk et al., 2004; Kong et al., 2001).

Auch in Tumorbiopsaten von Ovarialkarzinomen konnte eine im Vergleich zu gesundem Ovarialgewebe erhöhte Expression von FHL2 festgestellt werden (Gabriel et al., 2004).

Unterschiedliche Untersuchungsergebnisse gibt es zu der Expressionsrate von FHL2 in Tumorgewebe von Mammakarzinomen. In einigen Studien wird ein verringertes Vorkommen von FHL2 mRNA und/oder BRCA1 Mutanten beschrieben, welche die Fähigkeit zur FHL2 induzierten Transkription verloren haben (Genini et al., 1997; Yan et al., 2003a, 2003b). Jedoch gibt es neue Forschungsergebnisse, welche eine positive Korrelation zwischen der Expression von FHL2 im Tumorgewebe und der Überlebensprognose von Patientinnen mit Brustkrebs beschreiben (Fritz et

al., 1999; Gabriel et al., 2006).

Neben den oben genannten Malignomen, welche eine deutliche Überexpression von FHL2 im Tumorgewebe zeigen, wurde in Rhabdomyosarkomzellen eine Herunterregulierung von FHL2 festgestellt. So ist die Expressionsrate von FHL2 in Tumorzellen von Rhabdomyosarkomen im Vergleich zu gesunden Myoblasten reduziert (Genini et al., 1997).

3.3 Das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin

Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) sind ubiquitär auf der Oberfläche von allen Zellen vorhanden. Sie interagieren entweder mit Molekülen der extrazellulären Matrix, oder sie binden an andere Zelloberflächenrezeptoren und vermitteln auf diese Weise spezifische Zell-Zell-Kontakte. Dabei dienen diese Zelladhäsionsmoleküle nicht nur dem Erhalt der Zellstruktur, sondern sie fungieren auch als Signalrezeptoren, die extrazelluläre Signale im Rahmen von Zell-Zell-Kontakten übermitteln. Auf diese Weise spielen CAMs eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen innerhalb eines Zellverbandes, wie beispielsweise bei der Zellteilung, Zellmigration und Zelldifferenzierung (Barth et al., 1997; Takeichi, 1991).

Eine der wichtigsten Familien von Zelladhäsionsmolekülen stellt die Gruppe der Cadherine dar, welche auf der Zelloberfläche lokalisiert sind und den Zusammenhalt des Zellverbandes über Zonula adherens gewährleisten (Gumbiner, 1996). Cadherine gehen dabei kalziumabhängig zum Großteil homophile Verbindungen mit anderen Zelloberflächenrezeptoren ein. Als transmembranöse Proteine haben Cadherine große extrazelluläre Domänen, eine singuläres transmembranöses Segment und eine kurze zytoplasmatische Domäne, welche über alpha-, beta- und gamma-Catenine mit dem intrazellulären Aktinzytoskelett verbunden ist (Humphries und Newham, 1998; Lewis et al., 1995; Shapiro et al., 1995). Sämtliche Cadherine teilen mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa (Smith und Pignatelli, 1997) eine gemeinsame Molekularstruktur und einen gemeinsamen genetischen Ursprung. Bislang bestehen die Gene aller klassischen Cadherine aus 16 Exonen, welche durch 15 Introne unterteilt werden. Als Genort von E-Cadherin wurde 16q22.1 lokalisiert (Berx et al., 1995), P-Cadherin liegt nur 32kb davon entfernt (Bussemakers et al., 1994).

Aufgrund des unterschiedlichen Vorkommens der großen Gruppe der Cadherine differenziert man verschiedene Untergruppen. So kommt E-Cadherin ausschließlich auf Epithelzellen vor, P-Cadherin ist auf Trophoblasten und zu einem geringeren Anteil auch auf Epithelzellen zu finden,

N-Cadherin ist Bestandteil neuronaler Zellen. Cadherine gehen größtenteils homophile Verbindungen ein, d.h. sie docken an identische Zelladhäsionsmoleküle benachbarter Zellen an. So bindet E-Cadherin nur an E-Cadherin, nicht aber an P- oder N-Cadherin (Nose et al., 1988).

Des Weiteren scheint E-Cadherin nicht nur Signalempfänger von extrazellulären Signalen zur Regulierung der Zelladhäsion zu sein, sondern auch als Signalgeber zu fungieren, um Prozesse wie Zellmigration, Proliferation und Zelldifferenzierung zu steuern (Barth et al., 1997; Hulsken et al., 1994). Ihre entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von Zellprozessen macht daher eine strenge Regulation der Cadherine notwendig, um deren zelluläre Stabilität zu gewährleisten.

Epithelzellen, die chronischen Entzündungsprozessen unterliegen, zeigen weiterhin ein stabiles Vorkommen von E-Cadherin. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Expression von E-Cadherin nicht leicht durch äußere Umgebungseinflüsse zu verändern ist (Shiozaki et al., 1991). Auf der anderen Seite kommt es hingegen bei einer Vielzahl von malignen Prozessen zu einem Verlust der durch E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion (Guilford, 1999; Shiozaki et al., 1991; Smith und Pignatelli, 1997), so beispielsweise bei hepatozellulären Karzinomen (Shimoyama und Hirohashi, 1991), Magenkarzinomen (Mayer et al., 1993), Kolonkarzinomen (Kinsella et al., 1993), Prostatakarzinomen (Umbas et al., 1994), Mammakarzinomen (Gamallo et al., 1993) und Plattenepithelkarzinomen des oberen Gastrointestinaltrakts (William et al., 1998; Shinohara et al., 1998). Charakteristisch für maligne Karzinomzellen sind der Verlust einer differenzierten Epithelmorphologie, verminderte interzelluläre Adhäsion und damit verbunden eine erhöhte zelluläre Motilität mit der Gefahr von Metastasenabsiedelungen. Somit geht ein Verlust von E-Cadherin mit einer Verminderung der interzellulären Zelladhäsion einher. Viele immunhistochemische Studien haben gezeigt, dass dabei der Grad der Herunterregulation von E-Cadherin mit dem Grad der Dedifferenzierung der Malignomzellen korreliert (Guilford, 1999; Shiozaki et al., 1991). In oralen Plattenepithelkarzinomen ist die Expression von E-Cadherin abhängig vom Differenzierungsgrad der Tumorzellen. Malignomzellen mit einem geringen Vorkommen von E-Cadherin zeigen eine höhere Invasivität in die umgebenden Zellverbände als Malignomzellen mit einem höheren Anteil von E-Cadherin (Hoteiya et al., 1999). E-Cadherin korreliert dabei signifikant mit einer schlechten Prognose bezüglich Überlebenszeit des Patienten und dem Auftreten von Rezidiven (Bankfalvi et al., 2002; Mattijssen et al., 1993).

3.4 Fragestellung

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, gibt es deutliche Hinweise darauf, dass FHL2 in seiner Funktion als selektiver Transkriptionsfaktor an der Karzinomentstehung beteiligt ist. Eine Korrelation zwischen Dedifferenzierung des Tumorgewebes und einer verstärkten Expression von FHL2 bzw. Rho-GTPasen konnte bereits für Prostatakarzinome und Mammakarzinome nachgewiesen werden (Fritz et al., 1999; Muller et al., 2002). Somit stellt sich die Frage, ob eine verstärkte Expression von FHL2 auch in anderen Typen von entarteten Epithelzellen zu beobachten ist. Mit dieser Fragestellung wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle durchgeführt. Läge auch hier eine verstärkte Expression von FHL2 in stark dedifferenziertem Tumorgewebe vor, so würde dieses Ergebnis die Hypothese der Beteiligung von FHL2 an der Tumorgenese erhärten.

Daneben soll geklärt werden, ob sich aus der Bestimmung der FHL2-Expression im Tumorgewebe prognostische Parameter gewinnen lassen. Da es bisher keinen etablierten Tumormarker zur Verlaufskontrolle und damit zur Prognoseeinschätzung der Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle gibt, könnte FHL2 als Parameter für die zunehmende Dedifferenzierung diese diagnostische Lücke schließen.

Konkret soll diese Studie daher folgende Aspekte untersuchen:

1. Wird FHL2 in Tumorgewebeproben von Patienten mit Tumorprogression (Metastasen/Rezidiv) in höherem Maße exprimiert als in Proben von Patienten ohne Tumorprogression (d.h. ohne Metastasen/Rezidiv)?
2. Ist es sinnvoll, FHL2 als histopathologischen Prognosefaktor für Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen zu verwenden?
3. Ist eine Translokation von FHL2 von der Zellmembran zum Zellkern zu beobachten?
4. Besteht ein reziproker Zusammenhang zwischen der Expression von FHL2 und E-Cadherin in stark dedifferenzierten Tumorzellen?

4 Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

In dieser Studie wurden am Institut für Pathologie der Universität Bonn die Präparate von 43 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle untersucht, welche im Zeitraum von 1985 bis 2001 durch eine chirurgischen Tumorsektion gewonnen worden waren. Die Gewebeproben wurden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von den 43 Patienten waren 36 Männer und 7 Frauen, das Durchschnittsalter bei Behandlung betrug 58,3 Jahre.

Im Sinne einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie wurden Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen gesucht, die sich nur durch das Merkmal Metastasen- bzw. Rezidivbildung nach Tumorsektion voneinander unterschieden. Um eine möglichst große Strukturgleichheit zu erzielen, wurden die Patienten in einem randomisierten Verfahren ausschließlich aufgrund ihrer TNM-Klassifikation ausgewählt. Schematisch stellt sich die Zusammenstellung der Patientenkollektive folgendermaßen dar:

Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom nach chirurgischer Resektion:

- Gruppe A umfasst 21 Patienten, die nach erfolgreicher Resektion des Tumors ein Rezidiv oder eine Metastasenbildung erlitten haben
⇒ Patientengruppe mit Tumorprogression (Tabelle 2),
- Gruppe B umfasst 22 Patienten, die nach erfolgreicher Resektion des Tumors nach 5 Jahren weiterhin rezidiv- und metastasenfrei sind
⇒ Patientengruppe ohne Tumorprogression (Tabelle 3).

	Geburtsjahr	♀ / ♂	Lokalisation des Oropharynxkarzinoms	TNM – Klassifikation	In der Klinik behandelt bis:	Alter bei Behandlung
1	1933	m	Lateraler Oropharynx rechts	pT1 N3 M0	2002	69
2	1939	w	Tonsille links	pT2 N2b M0	1998	59
3	1942	m	Zungenrand links	pT1 N1 M0	1993	51
4	1941	m	Mundboden	pT2 N0 M0	1998	57
5	1932	m	Zungenunterfläche rechts	pT1 N5 M0	1985	53
6	1957	w	Zungenrand rechts	pT1 N1 M0	2002	45
7	1924	m	Gaumenbögen	pT2 N0 M0	1993	69
8	1912	m	Zungenrand links	pT2 N0 M0	1997	85
9	1928	m	Alveolarkamm rechts	pT2 N2 M0	2000	72
10	1953	m	Valecula epiglottica bds.	pT2 N3 M0	1997	44
11	1927	m	Lateraler Oropharynx rechts	pT1 N3 M0	1998	71
12	1947	m	Vorderer Gaumenbogen rechts	pT1 N2c M0	2001	54
13	1943	m	Mundboden rechts	pT2 N2c M0	1997	54
14	1959	m	Oropharynx links lateral	pT4 N1 M0	2001	42
15	1931	m	Rechts sublingual	pT2 N0 M0	1999	68
16	1928	m	Zungenrand rechts	pT1 N0 M0	2000	72
17	1948	m	Zungengrund links	pT1 N2 M0	2001	53
18	1958	m	Zunge rechts	pT2 N0 M1	2001	43
19	1923	w	Zungenrand links	pT2 N0 M0	2001	78
20	1942	m	Lateraler Oropharynx links	pT1 N2 M0	2001	59
21	1938	m	Lateraler Oropharynx rechts	pT1 N3 M0	1990	52

mittleres Alter	59,5
-----------------	------

Tabelle 2: Patientengruppe mit Tumorprogression

	Geburtsjahr	♀ / ♂	Lokalisation des Oropharynxkarzinoms	TNM – Klassifikation	In der Klinik behandelt bis:	Alter bei Behandlung
1	1963	m	Zungenrand rechts	pT1 N0 M0	1995	32
2	1921	w	Mundboden links	pT2 N0 M0	1994	73
3	1943	w	rechter Zungengrund	pT1 N0 M0	2002	59
4	1936	m	Zungenrand links	pT2 N0 M0	2000	64
5	1930	m	Tonsille rechts	pT4c N0 M0	1996	66
6	1927	w	Zungenrand rechts	pT1 N0 M0	1992	65
7	1926	m	Zungenrand rechts	pT2 N0 M0	1999	73
8	1944	m	linker Zungenrand	pT1 N0 M0	2001	57
9	1921	m	Mitte d. harten Gaumens	pT1 N0 M0	1992	71
10	1952	m	links sublingual	pT2 N0 M0	2001	49
11	1951	m	Zungengrund beidseits	pT4 N0 M0	1994	43
12	1955	m	mittlerer Zungenrand links	pT1 N0 M0	1994	39
13	1944	m	Carcinoma in situ rechts sublingual	cT1 N0 M0	2001	57
14	1927	m	rechter Zungenrand	pT2 N0 M0	1992	65
15	1947	w	rechter Zungenrand	pT1 N0 M0	2002	55
16	1947	m	Zungenrand rechts	pT2 N0 M0	2001	54
17	1944	m	Zunge rechts	pT1 N0 M0	1998	54
18	1933	m	sublingual links	pT1 N0 M0	1998	65
19	1944	m	Zungenrand links	pT2 N0 M0	1990	46
20	1938	m	rechter unterer Alveolar-kamm	pT2 N0 M0	2001	63
21	1949	m	rechter vorderer Mundboden	pT1 N0 M0	2002	53
22	1948	m	sublingual rechts	pT1 N0 M0	2001	53

mittleres Alter	57,1
-----------------	------

Tabelle 3: Patientengruppe ohne Tumorprogression

4.2 Immunhistochemie

Für beide in dieser Studie angewandten immunhistochemische Färbungen (FHL2 und E-Cadherin) wurde die Avidin-Biotin-Methode verwendet. Dieses spezielle Immunperoxidaseverfahren beruht auf ein dreistufiges System, welches auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin basiert, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden.

Im ersten Schritt bindet ein spezifischer unkonjugierter Primärantikörper an das zu markierende Epitop. An den Primärantikörper bindet im zweiten Schritt ein Sekundärantikörper, welcher mit Biotin konjugiert ist. Im dritten Schritt kommt ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex zum Einsatz. Hierbei binden die freien Stellen des Avidins an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase – und damit letztlich das gesuchte Epitop – wird mit dem Chromogen DAB (3,3Diaminobenzidin) sichtbar gemacht. Die Schnitte werden zwischen jedem Inkubationsschritt gewaschen. Zuletzt wird der Gewebeschnitt mit Hämalaun gegengefärbt, eingedeckt und die Anfärbung unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

Diese immunhistochemischen Färbungen wurden an formalinfixierten, paraffineingebetteten 4µm dicken Präparaten durchgeführt, welche insgesamt 25 Minuten in der Mikrowelle vorbehandelt wurden, um die Paraffingängigkeit der Antikörper zu erhöhen (Hazelbag et al., 1995; Shi et al., 1995). Durch die Formalinfixierung und anschließende Einbettung in Paraffin sind manche Epitope für die Antikörper nicht mehr zugänglich. Erst durch den Einsatz der Mikrowelle können viele nicht fixierungsresistente Antigene für routinemäßig eingesetzte Antikörper wieder erreichbar gemacht werden. Somit kann durch die Mikrowellenbehandlung der Präparate eine Antigen-Demaskierung erreicht werden. Um ein Abschwimmen der Präparate vom Objektträger während der Mikrowellenbehandlung zu verhindern, wurden die Präparate über Nacht bei einer Temperatur von 60°C getrocknet und ausschließlich Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger verwendet.

Da die Mikrowellenvorbehandlung nicht nur das gesuchte Epitop, sondern eine Vielzahl von Antigenen demaskiert, entsteht oft eine relativ starke unspezifische Hintergrundfärbung der Präparate. Am erfolgreichsten kann dieser Effekt durch Hinzufügen einer neutralen Proteinlösung verhindert werden, die vor Zugabe des Primärantikörpers aufgetragen wird. Dieses Protein lagert sich an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente der Präparate an und verhindert auf diese Weise die Adsorption des Primärantikörpers. Am häufigsten wird als Proteinlösung Normalserum (=Non- bzw. Nicht-Immuserum) derselben Spezies verwendet, aus der der Brücken-

Antikörper stammt. Dies verhindert eine falsch-positive Anfärbung durch die Bindung des Sekundärantikörpers an Komponenten der Proteinlösung. Des Weiteren kann der unerwünschte Effekt der unspezifischen Hintergrundfärbung durch Zugabe von 2%-igem Milchpulver zur Pufferlösung bzw. zur Verdünnungslösung der Antikörper deutlich verringert werden.

Die Bindung zwischen gesuchtem Epitop und Primärantikörper wird bei der hier verwendeten Avidin-Biotin-Methode letztendlich durch die Färbung des an den ABC-Komplex gekoppelten Enzyms Peroxidase durch Chromogen sichtbar gemacht. Diese Substrat-Chromogenreaktion lässt keine Unterscheidung zu, ob es sich bei dem nachgewiesenen Enzym um das Enzym handelt, das durch die Immunreaktion das zelluläre Antigen lokalisiert, oder ob es sich um eine enzymatische Aktivität handelt, die im Präparat schon vor Beginn der Anfärbung vorhanden war. Daher besteht die Notwendigkeit, solch eine endogene Peroxidaseaktivität des zu untersuchenden Gewebes vor Zugabe des Primärantikörpers irreversibel zu hemmen. Daher wurde vor Durchführung der Immunperoxidasefärbung eine Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität des Gewebes durch Einstellung der Präparate in ein Methanol-Wasserstoffperoxid-Bad erreicht.

4.2.1 Vorgehen bei der Einzelfärbung von FHL2

1. Präparate über Nacht bei 60°C trocknen,
2. Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung,
3. Hemmung der endogenen Peroxidase, dafür werden die Schnitte für 20 Minuten in ein H₂O₂-Methanol-Bad eingestellt,
4. Antigendemaskierung in der Mikrowelle für 5x5 Minuten bei 600 Watt in Tris-Puffer, danach langsames Abkühlen und Spülen mit PBS-Pufferlösung,
5. Zur Verhinderung unspezifischer Hintergrundfärbung Bedecken der Schnitte mit Normalserum in der Verdünnungsstufe 1:10 mit 2%-iger Milchpulver-Lösung für 15 Minuten,
6. Inkubation mit dem vom Bonner Institut für Pathologie selbst hergestellten polyklonalen Primärantikörper α -FHL2 in der Verdünnungsstufe 1:600 für 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer,
7. Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (goat anti-rabbit, Dako) in der Verdünnungsstufe 1:500 für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer,

8. Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Komplex) in der Verdünnungsstufe 1:100 für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer,
9. Färbung der Peroxidase mit dem Chromogen DAB (3,3Diaminobenzidin) für 1 Minute,
10. Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt) für 2 Minuten, anschließend 5 Minuten Bläuen in Leitungswasser,
11. Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%, Xylol) für jeweils 5 Minuten,
12. Eindecken der fertig gefärbten Präparate.

4.2.2 Vorgehen bei der Einzelfärbung von E-Cadherin

1. Präparate über Nacht bei 60°C trocknen,
2. Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung,
3. Hemmung der endogenen Peroxidase, dafür werden die Schnitte für 20 Minuten in H₂O₂-Methanol-Bad eingestellt,
4. Antigendemaskierung in der Mikrowelle für 5x5 Minuten bei 600 Watt in Tris-Puffer, danach langsames Abkühlen und Spülen mit PBS-Pufferlösung,
5. Zur Verhinderung unspezifischer Hintergrundfärbung Bedecken der Schnitte mit Normalserum in der Verdünnungsstufe 1:10 mit 2%-iger Milchpulver-Lösung für 15 Minuten,
6. Inkubation mit dem monoklonalen Primärantikörper E-Cadherin (Santa Cruz Biotechnology, Inc) in der Verdünnungsstufe 1:10 für 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer,
7. Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (goat anti-mouse, Dako) in der Verdünnungsstufe 1:500 für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer,
8. Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Komplex) in der Verdünnungsstufe 1:100 für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer,
9. Färbung der Peroxidase mit dem Chromogen DAB (3,3Diaminobenzidin) für 1 Minute,
10. Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt) für 2 Minuten, anschließend 5 Minuten Bläuen in Leitungswasser,
11. Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%, Xylol) für jeweils 5 Minuten,
12. Eindecken der fertig gefärbten Präparate.

4.2.3 Rezepte

H₂O₂ -Methanol-Lösung:

50ml Methanol + 2ml H₂O₂.

Tris-HCl-Puffer 0,05M:

Stammlösung: 60,57g Tris in 500ml Aqua dest, mit etwa 370ml 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen,

Gebrauchslösung: 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

PBS-Puffer:

40g NaCl + 1g KCl + 5,8g Na₂HPO₄ + 1g KH₂PO₄ in 500ml Aqua dest. lösen, pH 7,4,

Gebrauchslösung 1:10 verdünnen.

Milchpulver-Lösung:

2g Magermilchpulver in 100ml PBS-Puffer lösen.

ABC-Komplex:

Lösung A 10µl + Lösung B 10µl + PBS 1000µl.

DAB-Färbung:

0,3g Tris-Puffer + 50ml Aqua dest. auf pH 7,6 einstellen, dann 3 DAB-Tabletten dazugeben und 30 Minuten im Dunkeln mixen, kurz vor Gebrauch mit 15µl H₂O₂ aktivieren.

4.3 Mikroskopische Auswertung

Die Ergebnisse wurden sowohl quantitativ (Anteil der reagierenden Zellen) als auch qualitativ (Intensität der erreichten immunhistochemischen Reaktion) ausgewertet:

Quantitativer Auswertescore: Prozentualer Anteil der gefärbten Zellen

0-25%; 25-50%; 50-75%; 75-100%.

Qualitativer Auswertescore: Immunhistochemische Färbeintensität

sehr schwache Reaktion = 0;

schwache Reaktion = 1;

starke Reaktion = 2;

sehr starke Reaktion = 3.

Anschließend wurde das Patientenkollektiv mit Tumorprogression mit dem Patientenkollektiv ohne Tumorprogression für die beiden Parameter FHL2 und E-Cadherin verglichen.

Das Patientenkollektiv ohne Tumorprogression umfasste 22 Patienten, das Patientenkollektiv mit Tumorprogression wurde von 21 Patienten gebildet. Unterschiede in der Anzahl der Gewebeproben kommen durch Fehlen von nicht-neoplastischem Epithel in der Gewebeprobe bzw. durch mehrfache Gewebeproben pro Patient zustande.

4.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden statistisch mit Hilfe des Cochran-Armitage-Tests beurteilt, welcher auch als Trend-Test bekannt ist (Sachs, 1992). Dieser Test prüft einen Trend für eine binomial verteilte Variable (ja-/nein- Variable) über die Stufen einer zweiten kategorialen Variable, in diesem Fall jeweils immunhistochemische Färbeintensität und prozentualer Anteil der gefärbten Zellen.

Als statistisch signifikante p-Werte wurden p-Werte $\leq 0,05$ festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Tumorumgebendes, nicht-neoplastisches Epithel

In der Patientengruppe ohne Tumorprogression mit 22 Patienten war in 20 Fällen nicht-neoplastisches Epithel in der unmittelbaren Tumorumgebung vorhanden. In der Patientengruppe mit Tumorprogression mit 21 Patienten war bei 17 Gewebeschnitten normales Plattenepithel vorhanden. Die erzielten Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung für FHL2 und E-Cadherin werden in den Tabellen 4 und 5 veranschaulicht.

		FHL2				E-Cadherin			
Intensität		0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+
Patientengruppe ohne Tumorprogression (n=20)									
prozentual		15%	25%	30%	30%	0%	0%	5%	95%
absolut		3	5	6	6	0	0	1	19
Patientengruppe mit Tumorprogression (n=17)									
prozentual		12%	23%	35%	29%	0%	6%	12%	82%
absolut		2	4	6	5	0	1	2	14
					p-Wert 0,826		p-Wert 0,174		

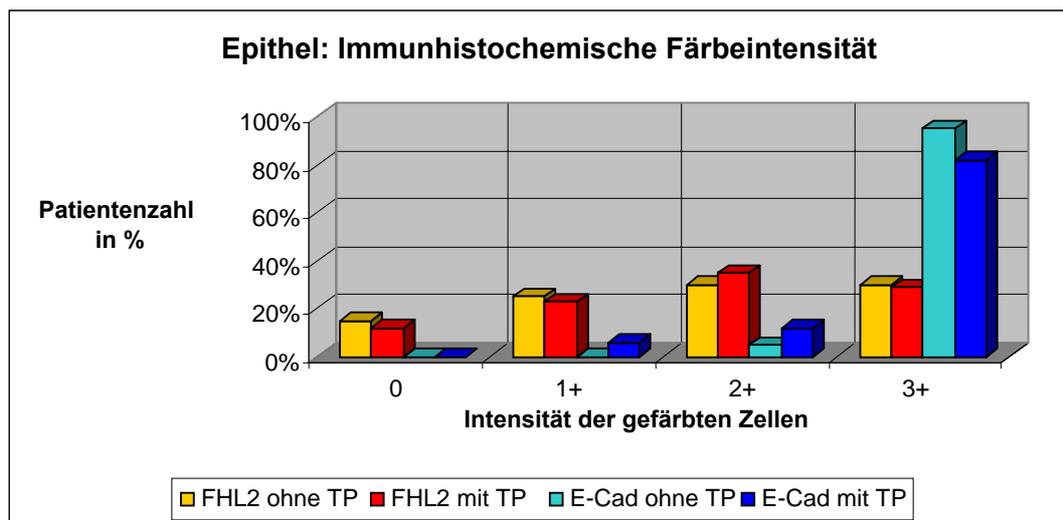


Tabelle und Grafik 4: Epithel - Immunhistochemische Färbeintensität; TP: Tumorprogression, E-Cad: E-Cadherin

Prozent	FHL2				E-Cadherin			
	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	5-100 %
Patientengruppe ohne Tumorprogression (n=20)								
prozentual	25%	5%	0%	70%	0%	0%	0%	100%
absolut	5	1	0	14	0	0	0	20
Patientengruppe mit Tumorprogression (n=17)								
prozentual	23%	6%	6%	65%	0%	0%	0%	100%
absolut	4	1	1	11	0	0	0	17
p-Wert 0,94				p-Wert nicht sinnvoll				

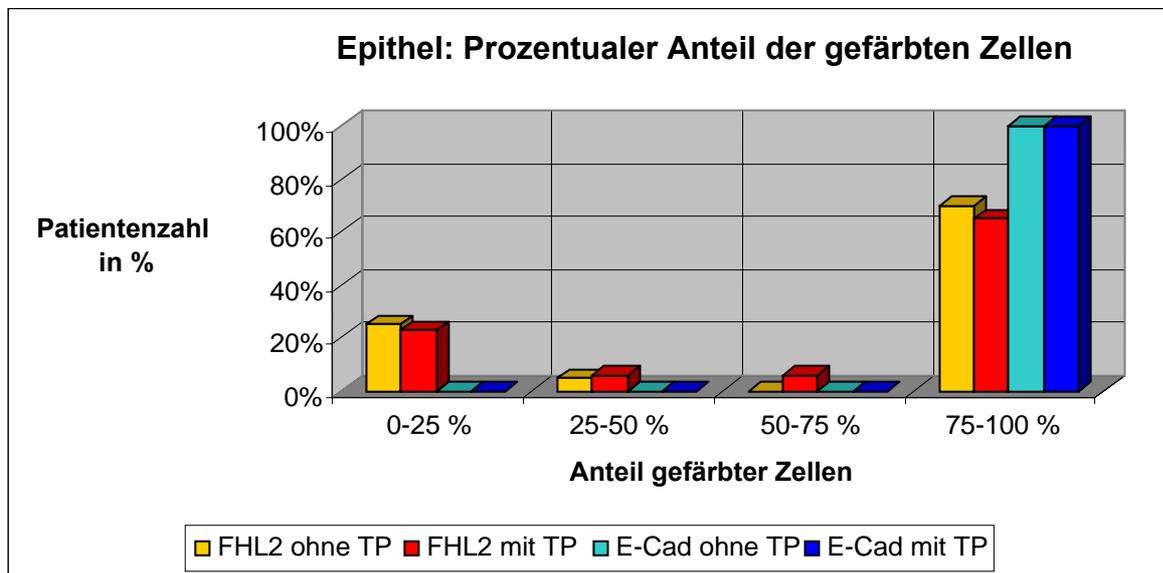


Tabelle und Grafik 5: Epithel - Prozentualer Anteil der gefärbten Zellen; TP: Tumorprogression, E-Cad: E-Cadherin

5.1.1 FHL2

In der Gruppe ohne Tumorprogression färbte sich die gesunde Schleimhaut in 14 der 20 Gewebeschnitte zwischen 75% und 100% für FHL2 an, in 6 Gewebeschnitten war der prozentuale Anteil der reagierenden Zellen unter 50%.

Unter qualitativem Aspekt war die Intensität der erzielten immunhistochemischen Reaktion in 12 der 20 Epithelproben stark oder sehr stark, die übrigen 8 Proben zeigten eine schwache bis sehr schwache immunhistochemische Reaktion.

Im Patientenkollektiv mit Metastasen oder Rezidiv zeigten 12 der 17 Epithelproben eine mehr als 50%-ige Reaktivität für FHL2, davon 11 mit einer starken oder sehr starken immunhistochemischen Reaktion. In 5 Epithelproben im Patientenkollektiv mit Tumorprogression färbte sich weniger als 50% der gesunden Schleimhaut an, in 6 Fällen konnte nur eine schwache bis sehr schwache immunhistochemische Reaktion erzielt werden.

Zusammenfassend besteht sowohl bezüglich der immunhistochemischen Färbeintensität als auch dem prozentualen Anteil der gefärbten Zellen bei p-Werten von 0,826 bzw. 0,94 kein signifikanter Unterschied der FHL2-Expression zwischen der Patientengruppe ohne bzw. mit Tumorprogression.

5.1.2 E-Cadherin

In der Patientengruppe ohne Tumorprogression wurden mehr als 75% aller Zellen des nicht-neoplastischen Epithels in sämtlichen 20 Gewebeschnitten für E-Cadherin angefärbt. Zudem zeigten alle untersuchten Gewebeproben eine starke bis sehr starke immunhistochemische Reaktion.

In der Patientengruppe mit Tumorprogression reagierten ebenfalls alle der 17 Epithelproben mit mehr als 75% der gesunden Schleimhaut. In 16 dieser Gewebeschnitte wurde eine starke bis sehr starke Reaktion erzielt, in einer einzelnen Gewebeprobe fiel die Reaktion für E-Cadherin nur schwach aus.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Färbeintensität bei E-Cadherin keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen mit und ohne Tumorprogression (p-Wert 0,174), so dass eine Herunterregulierung nicht gezeigt werden konnte. Bei der Beurteilung des prozentualen Anteils der gefärbten Zellen macht der Cochran-Armitage Trend Test zur Ermittlung eines signifikanten Unterschiedes der E-Cadherin Expression statistisch gesehen keinen Sinn, da bis auf eine einzelne Gewebeprobe in allen untersuchten Schnitten mehr als 75% der Zellen eine positive Reaktion für E-Cadherin zeigten.

5.2 Primäres Plattenepithelkarzinomgewebe

Im Patientenkollektiv ohne Tumorprogression wurden 22 Karzinomgewebe untersucht, während in dem Patientenkollektiv mit Metastasen oder Rezidiv 24 Karzinomproben vorhanden waren, da bei einigen Patienten mehrfache Biopsien aus dem Tumorgewebe entnommen worden waren. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an Proben aus primärem oralem Plattenepithelkarzinomgewebe werden in den Tabellen 6 und 7 veranschaulicht. Immunhistochemische Beispiele für HE-/FHL2- und E-Cadherin-Färbungen des Plattenepithelkarzinomgewebes sind in den Abbildungen 1 bis 12 zu sehen.

Intensität	FHL2				E-Cadherin			
	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+
Patientengruppe ohne Tumorprogression (n=22)								
prozentual	9%	23%	32%	36%	4%	36%	50%	9%
absolut	2	5	7	8	1	8	11	2
Patientengruppe mit Tumorprogression (n=24)								
prozentual	21%	12%	42%	25%	0%	37%	37%	25%
absolut	5	3	10	6	0	9	9	6
p-Wert 0,417				p-Wert 0,286				

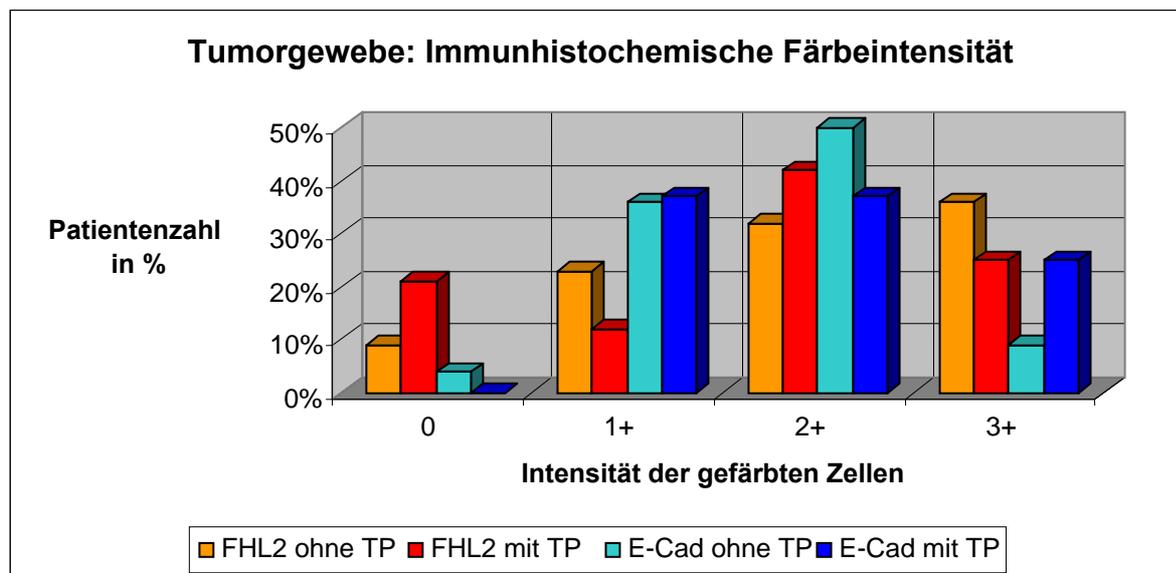


Tabelle und Grafik 6: Tumorgewebe – Immunhistochemische Färbeintensität; TP: Tumorprogression, E-Cad: E-Cadherin

	FHL2				E-Cadherin			
Prozent	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100
Patientengruppe ohne Tumorprogression (n=22)								
prozentual	23%	18%	4%	54%	4%	4%	9%	82%
absolut	5	4	1	12	1	1	2	18
Patientengruppe mit Tumorprogression (n=24)								
prozentual	33%	8%	8%	50%	13%	17%	8%	63%
absolut	8	2	2	12	3	4	2	15
	p-Wert 0,684				p-Wert 0,106			

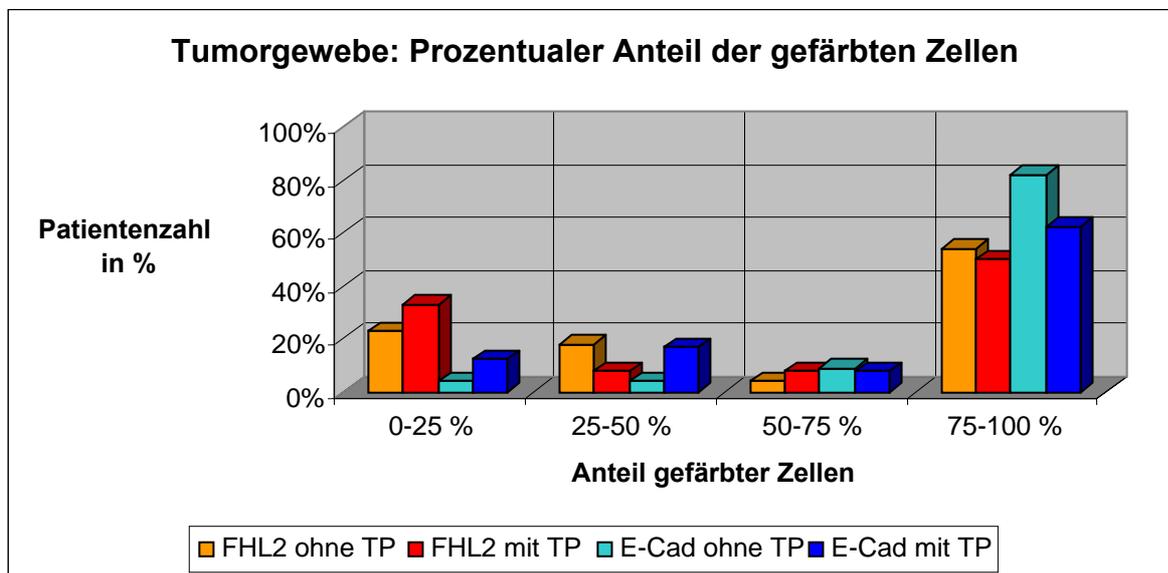


Tabelle und Grafik 7: Tumorgewebe – Prozentualer Anteil der gefärbten Zellen; TP: Tumorprogression, E-Cad: E-Cadherin

5.2.1 FHL2

Im Patientenkollektiv ohne Tumorprogression war in 13 der 22 Fälle das untersuchte Tumorgewebe zwischen 75% und 100% für FHL2 gefärbt. 4 Tumorproben zeigten zwischen 25% und 50% Reaktivität für FHL 2, und fünfmal betrug die Reaktivität der Zellen weniger als 25%.

In der Patientengruppe mit Tumorprogression war in 14 der 24 Fälle in mehr als 50% der Tumorzellen FHL2 exprimiert. Die übrigen 10 Tumorproben zeigten entsprechend weniger als 50% Reaktivität.

Bezüglich der Intensität der immunhistochemischen Reaktion zeigten 15 der 22 Tumorproben in

der Gruppe ohne Tumorprogression eine starke oder sehr starke Reaktion für FHL 2. Bei den übrigen 7 Gewebeschnitten war die Reaktion entsprechend nur schwach oder sehr schwach. Innerhalb des Patientenkollektivs mit Tumorprogression war in 16 von 24 Fällen eine starke oder sehr starke immunhistochemische Reaktion für FHL2 zu erzielen, während in 8 Tumorproben nur eine schwache bis sehr schwache Färbung erreicht wurde.

Zusammenfassend zeigt die statistische Testung auf eine Veränderung der Expression von FHL2 zwischen der Patientengruppe ohne bzw. mit Tumorprogression keine signifikanten Unterschiede. So betragen die p-Werte bezüglich der Färbeintensität 0,417 und bezüglich des prozentualen Anteils 0,684 und sind damit nicht signifikant.

5.2.2 E-Cadherin

18 der 22 Fälle innerhalb des Patientenkollektivs ohne Tumorprogression zeigten eine mehr als 75%-ige Reaktion für E-Cadherin in quantitativer Hinsicht. In 4 Tumorproben war in weniger als 75% der Tumorzellen E-Cadherin exprimiert. Im Patientenkollektiv mit Tumorprogression waren in 17 der 24 Tumorproben mehr als die Hälfte der Karzinomzellen für E-Cadherin gefärbt. In 7 Gewebeschnitten war E-Cadherin in weniger als 50% der Karzinomzellen zu finden.

Hinsichtlich der qualitativen Beurteilung ergaben sich folgende Ergebnisse: In der Patientengruppe ohne Tumorprogression zeigten 2 der 22 Tumorproben eine sehr starke immunhistochemische Reaktion für E-Cadherin. In 11 Gewebeschnitten war eine starke Reaktion für E-Cadherin zu erzielen, in 9 Proben eine schwache bis sehr schwache Reaktion.

Innerhalb des Patientenkollektivs mit Tumorprogression war in 15 der 24 Tumorproben E-Cadherin stark bis sehr stark exprimiert, in den übrigen 9 Fällen nur schwach.

Die statistische Testung auf eine Veränderung der Expression von E-Cadherin zwischen der Patientengruppe ohne bzw. mit Tumorprogression zeigt zusammenfassend keine signifikanten Unterschiede: Die p-Werte betragen bezüglich der Färbeintensität 0,286 und bezüglich des prozentualen Anteils 0,106.

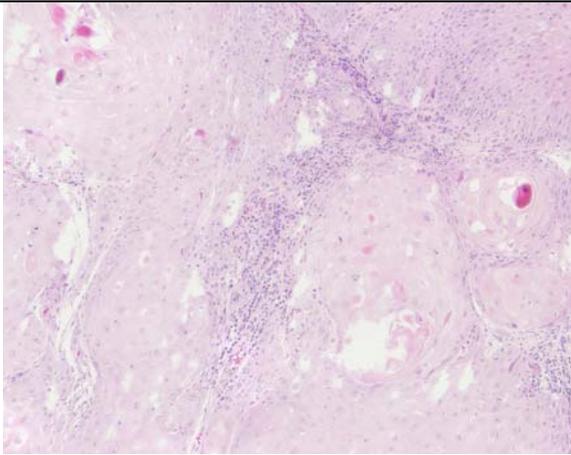


Abbildung 1: HE-Färbung, Tumorgewebe von Patient 1 ohne Tumorprogression

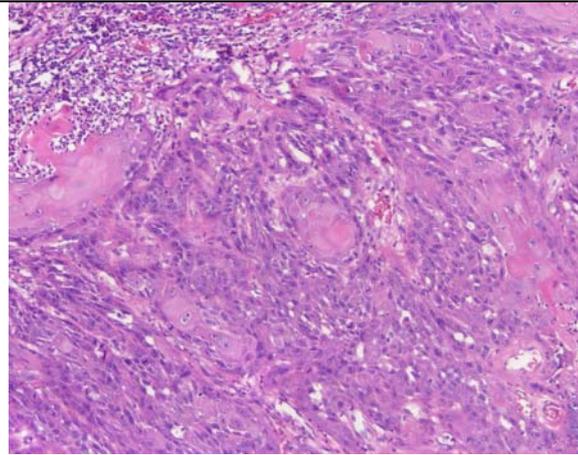


Abbildung 4: HE-Färbung, Tumorgewebe von Patient 2 ohne Tumorprogression

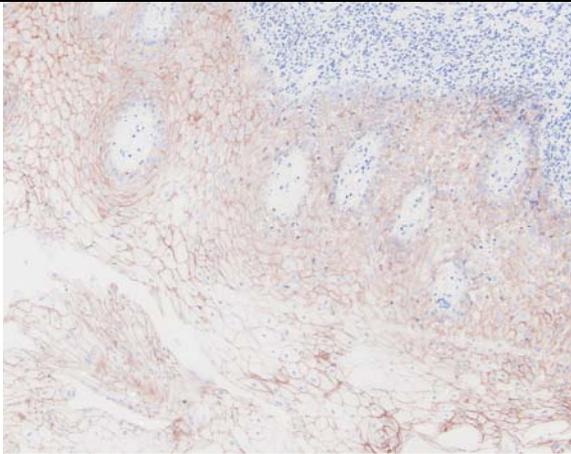


Abbildung 2: E-Cadherin-Färbung, Tumorgewebe von Patient 1 ohne Tumorprogression

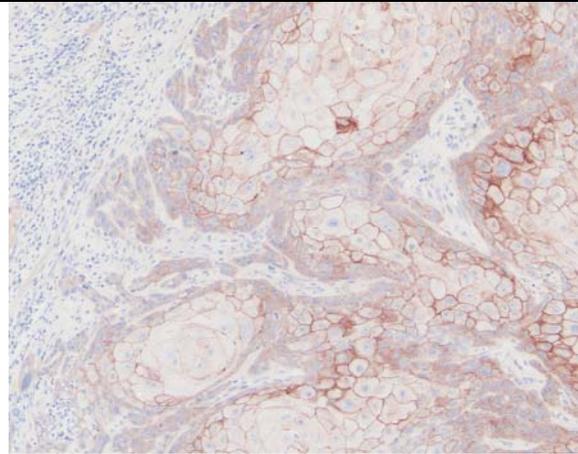


Abbildung 5: E-Cadherin-Färbung, Tumorgewebe von Patient 2 ohne Tumorprogression

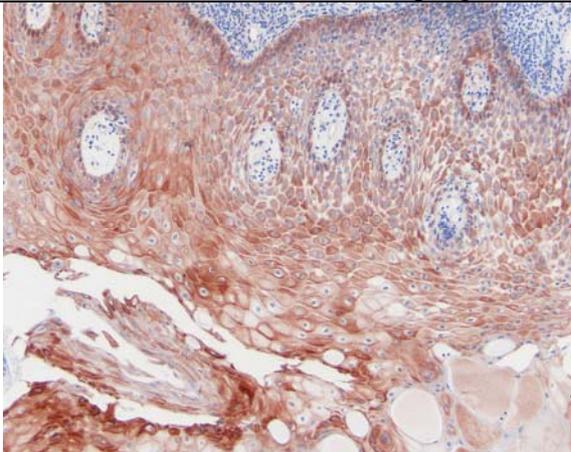


Abbildung 3: FHL2-Färbung, Tumorgewebe von Patient 1 ohne Tumorprogression

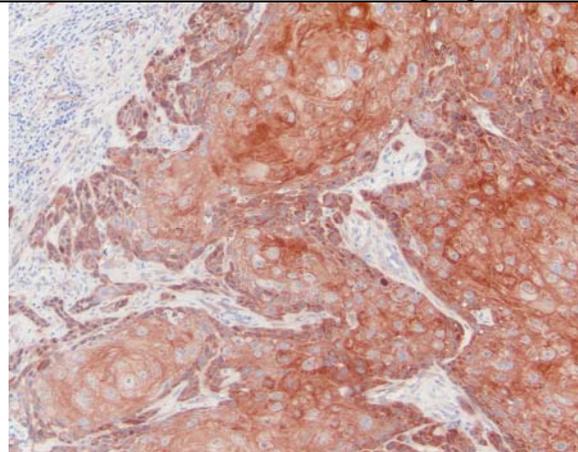


Abbildung 6: FHL2-Färbung, Tumorgewebe von Patient 2 ohne Tumorprogression

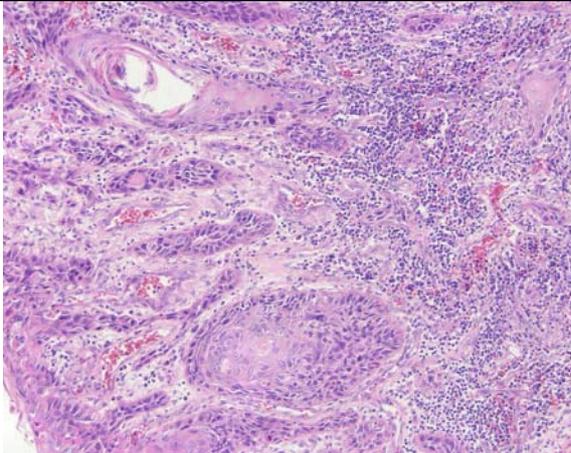


Abbildung 7: HE-Färbung, Tumorgewebe von Patient 3 mit Tumorprogression

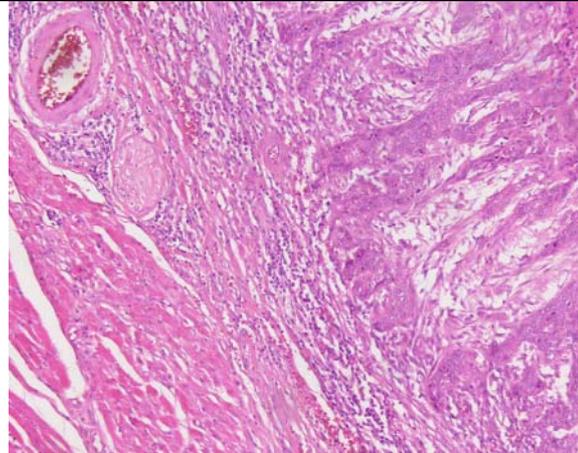


Abbildung 10: HE-Färbung, Tumorgewebe von Patient 4 mit Tumorprogression

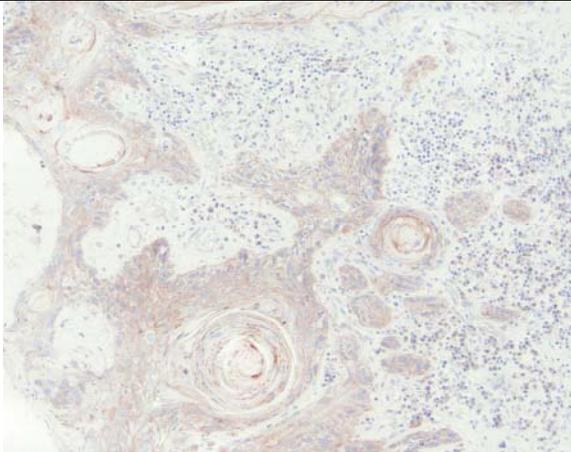


Abbildung 8: E-Cadherin-Färbung, Tumorgewebe von Patient 3 mit Tumorprogression

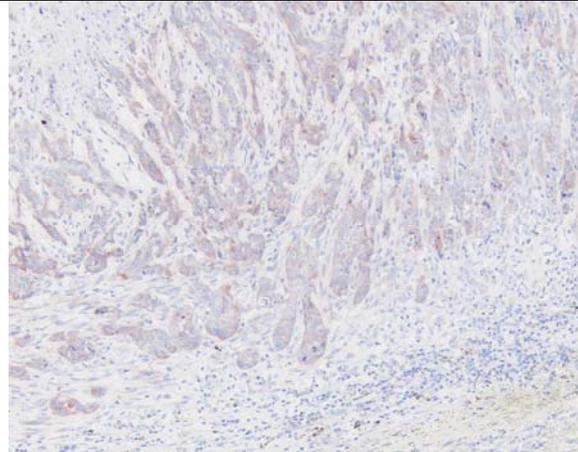


Abbildung 11: E-Cadherin-Färbung, Tumorgewebe von Patient 4 mit Tumorprogression

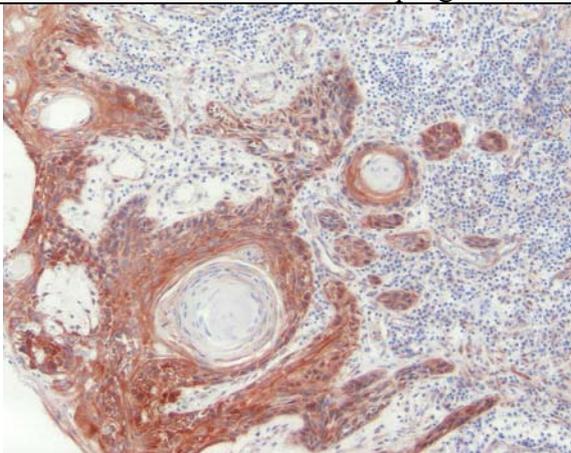


Abbildung 9: FHL2-Färbung, Tumorgewebe von Patient 3 mit Tumorprogression

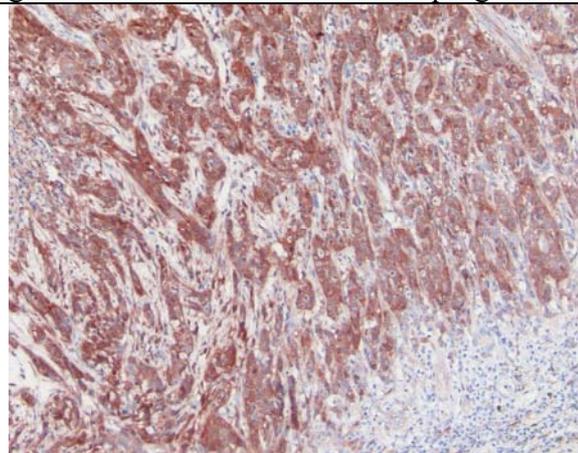


Abbildung 12: FHL2-Färbung, Tumorgewebe von Patient 4 mit Tumorprogression

5.3 Intraindividuelle Korrelation von Intensität und prozentualen Anteil

5.3.1 Tumorumgebendes nicht-neoplastisches Epithel

5.3.1.1 FHL2

Im Patientenkollektiv ohne Tumorprogression war in 12 der 20 Gewebeproben mit nicht-neoplastischem Epithel eine Expression von FHL2 in über 75% der Epithelzellen und zugleich eine starke bis sehr starke immunhistochemische Reaktion für FHL2 zu beobachten. In 2 Gewebeproben waren zwar über 75% der Epithelzellen für FHL2 gefärbt, diese zeigten jedoch nur eine schwache immunhistochemische Reaktion. In 6 der 20 Fälle reagierte weniger als die Hälfte der Epithelzellen mit einer schwachen Reaktion auf FHL 2.

In der Patientengruppe mit Tumorprogression zeigten 10 der 17 Epithelproben eine über 75%-ige Reaktivität mit zugleich starker bis sehr starker immunhistochemischer Färbung für FHL 2. In 4 Fällen sprachen weniger als 25% der Zellen mit einer schwachen bis sehr schwachen Reaktion auf FHL2 an. Die übrigen 3 Gewebeproben verteilten sich im Mittelfeld hinsichtlich des prozentualen Anteils der reagierenden Zellen und der Intensität der erreichten immunhistochemischen Reaktion.

Die Ergebnisse der intraindividuellen Korrelation hinsichtlich Quantität und Qualität der immunhistochemischen Reaktion für FHL2 im gesunden Plattenepithel werden in den Tabellen 8 und 9 zusammengefasst.

n = 20	0-25 %	25-50 %	50-75 %	75 - 100 %
0	3			
1+	2	1		2
2+				6
3+				6

Tabelle 8: Patienten ohne Tumorprogression; FHL2-Färbung des nicht-neoplastischen Epithels

n = 17	0-25 %	25-50 %	50-75 %	75-100 %
0	2			
1+	2		1	1
2+		1		5
3+				5

Tabelle 9: Patienten mit Tumorprogression; FHL2-Färbung des nicht-neoplastischen Epithels

5.3.1.2 E-Cadherin

Innerhalb des Patientenkollektivs ohne Tumorprogression zeigten alle der 20 Gewebeproben eine starke bis sehr starke immunhistochemische Reaktion für E-Cadherin, wobei gleichzeitig der Anteil der reagierenden Zellen deutlich über 75% lag.

In der Patientengruppe mit Metastasen oder Rezidiv war in 16 der 17 Gewebeproben eine starke bis sehr starke immunhistochemische Reaktion für E-Cadherin zu beobachten. Auch hier lag der Anteil der gefärbten Zellen gleichzeitig über 75%. In einer Gewebeprobe zeigte sich nur eine schwache Expression von E-Cadherin, dies jedoch ebenfalls in mehr als 75% der gesunden Schleimhautepithelzellen.

Diese Resultate der immunhistochemischen Untersuchungen für E-Cadherin in gesundem Schleimhautgewebe werden in den Tabellen 10 und 11 veranschaulicht.

n = 20	0-25 %	25-50 %	50-75 %	75 - 100 %
0				
1+				
2+				1
3+				19

Tabelle 10: Patienten ohne Tumorprogression; E-Cadherin-Färbung des nicht-neoplastischen Epithels

n = 17	0-25 %	25-50 %	50-75 %	75-100 %
0				
1+				1
2+				2
3+				14

Tabelle 11: Patienten mit Tumorprogression; E-Cadherin-Färbung des nicht-neoplastischen Epithels

5.3.2 Primäres Plattenepithelkarzinomgewebe

5.3.2.1 FHL2

Bei der Untersuchung des Tumorgewebes der Patientengruppe ohne Tumorprogression war in 13 der 22 Fälle eine starke bis sehr starke immunhistochemische Reaktion für FHL2 zu verzeichnen, wobei in diesen Fällen über die Hälfte der Tumorzellen gefärbt waren. In 2 Gewebeproben reagierten weniger als die Hälfte der Zellen auf FHL 2, dies jedoch mit einer starken bis sehr starken immunhistochemischen Färbung. Die übrigen 7 Fälle der Patientengruppe ohne Tumorprogression zeigten eine schwache bis sehr schwache Expression von FHL2 in weniger als 50% der Karzinomzellen.

Innerhalb des Patientenkollektivs mit Tumorprogression war in 14 der 24 Fälle eine starke bis sehr starke immunhistochemische Reaktion für FHL2 in über der Hälfte der Tumorzellen zu verzeichnen. In 2 Fällen reagierten zwischen 25% und 50% der Zellen mit einer starken Reaktion. In den übrigen 8 Tumorproben war FHL2 in weniger als 25% der Karzinomzellen nur schwach bis

sehr schwach exprimiert.

Die Ergebnisse der Zusammenschau von prozentualem Anteil und Intensität der immunhistochemischen Reaktion für FHL2 im Tumorgewebe werden in den Tabellen 12 und 13 zusammengefasst.

n = 22	0-25 %	25-50 %	50-75 %	75-100 %
0	2			
1+	2	3		
2+		1	1	5
3+	1			7

Tabelle 12: Patienten ohne Tumorprogression; FHL2-Färbung des Karzinomgewebes

n = 24	0-25 %	25-50 %	50-75 %	75-100 %
0	5			
1+	3			
2+		2	2	7
3+				5

Tabelle 13: Patienten mit Tumorprogression; FHL2-Färbung des Karzinomgewebes

5.3.2.2 E-Cadherin

In der Patientengruppe ohne Tumorprogression zeigen 13 der 22 Gewebeschnitte eine starke bis sehr starke Reaktivität für E-Cadherin in mehr als der Hälfte aller Karzinomzellen. In 7 Proben war E-Cadherin in mehr als der Hälfte der Zellen schwach exprimiert. Nur 2 der 22 Tumorproben zeigten eine schwache bis sehr schwache immunhistochemische Reaktion für E-Cadherin in weniger als 50% der Karzinomzellen.

Innerhalb der Patientengruppe mit Tumorprogression war in 13 der 24 Fälle eine starke bis sehr starke Expression von E-Cadherin in mehr als 75% der Tumorzellen zu sehen. In 5 Fällen wurde nur eine schwache immunhistochemische Reaktion in weniger als 50% der Karzinomzellen erzielt. In weiteren 4 Fällen war ebenfalls nur eine schwache immunhistochemische Färbung zu verzeichnen, dies allerdings in mehr als der Hälfte der vorhandenen Tumorzellen. 2 Gewebe-

schnitte zeigten eine starke Expression von E-Cadherin in 25-50% der Karzinomzellen.

Diese beobachteten Ergebnisse für E-Cadherin im Karzinomgewebe werden in den Tabellen 14 und 15 veranschaulicht.

n = 22	0-25 %	25-50 %	50-75 %	75-100 %
0	1			
1+		1	1	6
2+			1	10
3+				2

Tabelle 14: Patienten ohne Tumorprogression; E-Cadherin-Färbung des Karzinomgewebes

n = 24	0-25 %	25-50 %	50-75 %	75-100 %
0				
1+	3	2	2	2
2+		2		7
3+				6

Tabelle 15: Patienten mit Tumorprogression; E-Cadherin-Färbung des Karzinomgewebes

6 Diskussion

Um die Rolle des bisher wenig bekannten Zellmoleküls FHL2 in der Karzinogenese zu bewerten, haben wir uns für E-Cadherin als Vergleichsparameter entschieden. Ein Verlust von E-Cadherin gilt als etablierter Marker für die zunehmende Dedifferenzierung in einer Vielzahl von Karzinomen und kann somit als „Goldstandard“ herangezogen werden, um an diesem die potenzielle Relevanz des Transkriptionskofaktors FHL2 für die Karzinogenese in oralen Plattenepithelkarzinomen zu beurteilen.

6.1 Ergebnisse E-Cadherin

Wie in vorausgegangenen Studien zeigen auch die Ergebnisse unserer immunhistochemischen Untersuchungen, dass es eine Divergenz zwischen der Expression von E-Cadherin im gesunden tumorumgebenden Gewebe und im Karzinomgewebe gibt.

In der gesunden Schleimhaut ist E-Cadherin in beiden Probenkollektiven vollständig exprimiert. Im Gegensatz hierzu ist E-Cadherin im Tumorgewebe insbesondere des Patientenkollektivs mit Tumorprogression vermindert exprimiert. Diese Herunterregulation von E-Cadherin im Tumorgewebe wird in den Tabellen über den intraindividuellen Vergleich für E-Cadherin veranschaulicht (Tabellen 10-15). Während in der gesunden Schleimhaut des Patientenkollektivs ohne Tumorprogression 100% der Proben eine starke bis sehr starke Reaktion für E-Cadherin aufweisen, sinkt dieser Anteil in den Tumorgewebeproben derselben Gruppe auf nur noch 59%. Einen ähnlich starken Verlust von E-Cadherin zeigt der Vergleich zwischen gesundem Epithel und Karzinomgewebe im Patientenkollektiv mit Tumorprogression. Hier sinkt der Anteil von starker bis sehr starker Reaktion für E-Cadherin von 94% im gesunden Epithel auf 62% im Tumorgewebe. Im Tumorgewebe der Patientengruppe mit Tumorprogression ist E-Cadherin in 11 der 24 Proben schwach bis sehr schwach und/oder in weniger als 75% der Zellen exprimiert. In drei dieser Gewebeproben ist E-Cadherin nur mit einer schwachen Reaktion in weniger als 25% der Karzinomzellen vorhanden.

Unsere Ergebnisse stehen damit im Einklang zu einer Vielzahl von bisher durchgeführten Studien (Guilford, 1999; Shiozaki et al., 1991), welche eine Herunterregulation von E-Cadherin in dedifferenziertem Tumorgewebe beschreiben.

6.2 Ergebnisse FHL2

Im Gegensatz hierzu lässt sich für die Expression des Transkriptionskofaktors FHL2 eine geringfügige Hochregulation im Vergleich zwischen gesunder Schleimhaut und Tumorgewebe feststellen, welche jedoch in unserer Studie nicht im signifikanten Bereich liegt.

Im gesunden Epithel innerhalb der Patientengruppe ohne Tumorprogression war FHL2 in 12 von 20 Proben in über 75% der Zellen stark bis sehr stark exprimiert. Die übrigen 8 Gewebeproben zeigten eine schwache bis sehr schwache Reaktion zumeist in weniger als 50% der Zellen. Im Tumorgewebe der selben Gruppe war in 15 von 22 Proben eine starke bis sehr starke Expression von FHL2 meist in über 75% der Zellen zu verzeichnen, während die restlichen 7 Proben mit weniger als der Hälfte der Zellen schwach bis sehr schwach reagierten.

Zusammenfassend zeigt der Vergleich zwischen gesunder Schleimhaut und Tumorgewebe innerhalb der Patientengruppe ohne Tumorprogression, dass eine geringgradige Hochregulation von FHL2 zu verzeichnen ist. Während im gesunden Epithel 60% der Gewebeproben eine starke bis sehr starke Expression von FHL2 zeigen, so sind es im Tumorgewebe 68% der Gewebeproben.

Unter der Annahme, dass FHL2 eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielt, sollte eine verstärkte Expression insbesondere in Tumorgewebeproben des Patientenkollektivs mit Tumorprogression erfolgen. Dieser Zusammenhang konnte bereits anhand von Studien an Prostatakarzinomen nachgewiesen werden (Muller et al., 2000). Allerdings lassen sich diese Ergebnisse in unserer Studie an oralen Plattenepithelkarzinomen nicht reproduzieren, das heißt, in unserer Studie konnte keine signifikante Hochregulation von FHL2 gezeigt werden.

In der Patientengruppe mit Metastasen oder Rezidiv war FHL2 im gesunden Epithel in 11 von 17 Proben stark bis sehr stark in zumeist über 75% der Zellen exprimiert. Die anderen 6 Gewebeproben reagierten nur schwach oder sehr schwach. Im Tumorgewebe ist FHL2 in 16 der 24 Proben stark bis sehr stark in zumeist mehr als der Hälfte aller Zellen exprimiert. 8 Proben zeigen eine schwache Reaktion für FHL2 in weniger als 25% der Zellen. So zeigt der Vergleich zwischen gesundem Epithel und Tumorgewebe innerhalb des Patientenkollektivs mit Tumorprogression nur eine minimale Hochregulation von FHL2. In der gesunden Schleimhaut ist FHL2 in 65% der Gewebeproben stark bis sehr stark exprimiert, im Karzinomgewebe desselben Patientenkollektivs reagierten 67% der Gewebeproben stark bis sehr stark für FHL2.

Zusammenfassend zeigt sich in unserer Studie keine signifikante Hochregulation von FHL2 in

Tumorgewebe, weder in dem Patientenkollektiv ohne Tumorprogression noch in dem Patientenkollektiv mit Tumorprogression. So gibt es keine bedeutende Diskrepanz zwischen den Patientenkollektiven ohne bzw. mit Tumorprogression hinsichtlich der verstärkten Expression von FHL2.

Vereinzelt lässt sich eine Translokation von FHL2 von der Zellmembran in den Zellkern feststellen. Beispiele hierzu sind in den Abbildungen Nr. 9 und Nr. 12 zu sehen. Dies könnte auf eine Beteiligung von FHL2 an der Transkription von tumorförderlichen DNA-Abschnitten hinweisen. Allerdings sind diese Beobachtungen zu singulär, um daraus generalisierte Schlussfolgerungen abzuleiten und müssen daher noch an einem größeren Kollektiv bestätigt werden.

6.3 Zellbiologische Funktionen von FHL2 und E-Cadherin

Aus der Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse von E-Cadherin und FHL2 ergibt sich folgende Frage:

Wie lässt sich die gegenläufige Expression von FHL2 und E-Cadherin im Tumorgewebe erklären, wenn für beide Proteine eine relevante Rolle in der Karzinogenese postuliert wird?

Die Antwort hierzu ist aus den physiologischen Funktionen von E-Cadherin und FHL2 und den sich daraus für die Karzinogenese ergebenden Konsequenzen abzuleiten.

In gesunden Epithelverbänden ist E-Cadherin an der Zelloberfläche lokalisiert und dort entscheidend an interzellulären Vorgängen der Zelladhäsion, Zellidentität und Zelldifferenzierung beteiligt (Barth et al., 1997; Gumbiner, 1996; Takeichi, 1991). Neoplastisches Gewebe hingegen zeichnet sich jedoch gerade durch einen Verlust von Zelldifferenzierung und interzellulären Adhäsion aus. Somit scheint es folgerichtig, dass eine zunehmende Dedifferenzierung und Lösung der interzellulären Adhäsion im Sinne einer Metastasierung mit einer Herunterregulation von E-Cadherin einhergehen. Dementsprechend gilt E-Cadherin als etablierter Marker für einen Verlust der interzellulären Zelladhäsion im Rahmen der Karzinogenese. Für eine Vielzahl von epithelialen Malignomen konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von E-Cadherin mit einer zunehmenden Dedifferenzierung der entarteten Zellen und damit einer schlechteren Prognose für das Überleben des Patienten korreliert.

Das LIM-only Protein FHL2 ist ebenso wie E-Cadherin an der Zellmembran lokalisiert und übernimmt zum Teil ähnliche Aufgaben. So ist FHL2 im gesunden Gewebe in Prozesse der Zelldifferenzierung und Herstellung von interzellulären Multiproteinkomplexen involviert (Dawid et al., 1994; Dawid et al., 1998). Überdies hinaus ist FHL2 aber nicht nur an der Zellmembran zu finden, sondern kann insbesondere in Karzinomzellen in den Zellkern translozieren. Es konnte gezeigt werden, dass FHL2 dort an der Regulierung von Transkriptionsvorgängen beteiligt ist (Muller et al., 2002). So fungiert FHL2 als Transkriptionskofaktor, um selektiv die Transkription bestimmter Gene zu kontrollieren. Daher scheint es vorstellbar, dass FHL2 im Rahmen seiner physiologischen Funktion als Transkriptionskofaktor verstärkend auf bestimmte Mechanismen der Karzinomentwicklung wirkt und beispielsweise die Transkription von tumorförderlichen Genen unterstützt.

Die Translokation von FHL2 in den Zellkern wird über eine Signalkaskade mittels Rho-GTPasen gesteuert (Muller et al., 2002), welche verstärkt auch in anderen Tumorgeweben wie beispielsweise dem Mammakarzinom vorhanden ist (Fritz et al., 1999).

So gibt es eine Vielzahl von Hinweisen, dass FHL2 eine wichtige Rolle in der Tumorgenese von verschiedenen Karzinomen wie Prostata- oder Mammakarzinomen spielt. Jedoch lassen sich diese Ergebnisse einer verstärkten Expression von FHL2 in dedifferenziertem Tumorgewebe in unserer Studie nicht für orale Plattenepithelkarzinome bestätigen.

6.4 Hypothesen

Folglich stellt sich die Frage nach möglichen Erklärungen für die fehlende Höherregulierung von FHL2 in oralen Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu Prostatakarzinomen bzw. Mammakarzinomen. Hierzu sind im Wesentlichen zwei mögliche Ursachen denkbar:

Zum einen sind alle drei Tumorarten (Prostatakarzinom, Mammakarzinom, orales Plattenepithelkarzinom) epithelialen Ursprungs, jedoch handelt es sich um unterschiedliche Epithelarten. So handelt es sich bei Prostatakarzinomen um Adenokarzinome, welche aus einschichtigem, kubischen bis hochprismatischen Epithel entstehen. Ebenso können Mammakarzinome aus kubischem Epithel hervorgehen, während oropharyngeale Karzinome aus mehrschichtigem Plattenepithel entstehen.

Zum anderen spielen bei oralen Plattenepithelkarzinomen so genannte „Lifestyle-Faktoren“ wie beispielsweise Rauchen, Alkoholkonsum, mangelhafte Mundhygiene eine weitaus größere Rolle als bei anderen Tumorentitäten. Demgegenüber haben bei Prostata- und Mammakarzinomen genetische und hormonelle Faktoren einen größeren Anteil im Vergleich zu Umweltfaktoren. So handelt es sich beispielsweise beim Prostatakarzinom um ein typisches Alterskarzinom. Es gibt Hinweise darauf, dass 60-70% aller Männer über 80 Jahre betroffen sind. Des Weiteren scheinen hormonelle Faktoren großen Einfluss auf die Karzinogenese von Prostata- und Mammakarzinomen zu haben, was auch therapeutisch im Sinne einer Tamoxifen- bzw. Östrogentherapie genutzt wird. So liegt die Vermutung nahe, dass eine Hauptursache in der fehlenden Hochregulation von FHL2 in oropharyngealen Karzinomen im Vergleich zu Prostata- bzw. Mammakarzinomen in der größeren ätiologischen Bedeutung von bestimmten „Lifestyle-Faktoren“ gegenüber hormonellen bzw. genetischen Faktoren für die Karzinogenese liegt. Auch der heterogene epitheliale Ursprung (kubisches, hochprismatisches Epithel, mehrschichtiges Plattenepithel) der oben genannten Karzinome könnte eine weitere Ursache für die differente Expression von FHL2 im Tumorgewebe sein.

6.5 Schlussfolgerungen

Eine Vielzahl von Studien konnte bislang eine Höherregulierung von FHL2 in unterschiedlichen Tumoren wie Prostatakarzinomen, Mammakarzinomen, Ovarialtumoren oder Bronchialkarzinomen zeigen. In anderen Tumoren, wie beispielsweise dem Rhabdomyosarkom, wurde jedoch eine verminderte Expression von FHL2 verzeichnet. In den von uns untersuchten Gewebeproben von oralen Plattenepithelkarzinomen konnte keine signifikante Veränderung der FHL2-Expression zwischen gesundem Epithel und maligne entartetem Gewebe festgestellt werden. Während FHL2 in hormonempfindlichen Tumoren wie dem Prostata- oder dem Mammakarzinom an der Transkription von tumorförderlichen Genen beteiligt ist, scheint es für hormonunempfindliche, durch Noxen hervorgerufene Karzinome wie den oralen Plattenepithelkarzinomen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Um weiteren Aufschluss über die Rolle des LIM-only Protein FHL2 in der Karzinogenese zu erhalten, sind daher weitere Untersuchungen mit einem größeren Probenumfang und an unterschiedlichen Karzinomentitäten nötig. Dabei ist es wichtig, Karzinome unterschiedlichen epithe-

lialen Ursprungs (Plattenepithel, Zylinderepithel, Flimmerepithel etc.) und unterschiedlicher Pathogenese (familiäre Belastung, hormonelle Faktoren, exogene Noxen etc.) zu untersuchen.

Des Weiteren muss die Grundlagenforschung über die Familie der LIM-only Proteine und dabei speziell von FHL2 vertieft werden. Fundiertes Wissen über die physiologischen Funktionen von FHL2 in der gesunden Zelle könnte den Schlüssel zum Verständnis über die Rolle von FHL2 in der Karzinogenese erbringen.

7 Zusammenfassung

In neueren Studien wurde eine vermehrte Expression von FHL2 im Sinne einer Hochregulation beispielsweise bei Prostata- und Mammakarzinomen gezeigt, insbesondere bei einer fortgeschrittenen Dedifferenzierung des Gewebes oder bei bereits metastasierten Karzinomen.

Kontrolliert FHL2 somit als selektiver Transkriptionskofaktor die Umsetzung bestimmter Gene, welche im Rahmen der Karzinogenese die Tumorprogression fördern?

Um diese Frage zu beantworten und weitere Aufschlüsse über die Rolle von FHL2 in der Karzinogenese zu erhalten, wurde die Expression von FHL2 in gesunder Schleimhaut und in Plattenepithelkarzinomgewebe von Patientenkollektiven ohne bzw. mit Tumorprogression untersucht. Als Vergleichsparameter diente der Verlust in der Expression von E-Cadherin, welcher als etablierter Marker für die Dedifferenzierung bei einer Vielzahl von Karzinomen gilt.

In unseren Versuchen zeigte sich im Vergleich zu gesunder Schleimhaut nur eine geringfügige Hochregulation von FHL2 in dedifferenziertem Tumorgewebe, welche statistisch nicht signifikant war. Hingegen konnte eine verminderte Expression von E-Cadherin in entartetem Gewebe gezeigt werden.

Eine mögliche Erklärung für die ausgebliebene Hochregulation von FHL2 sehen wir zum einen im heterogenen epithelialen Ursprung der Karzinome (Platten-, Zylinder-, Flimmerepithel), zum anderen in der differentiellen hormonellen Empfindlichkeit, sowie der unterschiedlichen Bedeutung exogener Risikofaktoren wie Nikotinabusus, Alkoholkonsum oder mangelnder Mundhygiene in der Karzinogenese.

Daher scheint es möglich, dass die Rolle von FHL2 als Promoter der Tumorprogression auf Karzinome beschränkt ist, welche vorwiegend auf endogenen Faktoren wie familiärer Belastung und bestimmten Konstellationen im Hormonhaushalt beruhen.

Die Funktion des LIM-only Proteins FHL2 in der Karzinogenese oraler Plattenepithelkarzinome kann somit nach dem jetzigen Stand des Wissens nicht endgültig geklärt werden. Hier sind weiterführende Studien zur Funktion von FHL2 an unterschiedlichen Karzinomentitäten notwendig, insbesondere an Karzinomen unterschiedlichen epithelialen Ursprungs und unterschiedlicher Pathogenese (familiäre Belastung, hormonelle Faktoren, exogene Noxen etc.).

8 Literaturverzeichnis

- 1 AMAAR YG, THOMPSON GR, LINKHART TA, CHEN ST, BAYLINK DJ, MOHAN S. *Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2)*. J Biol Chem 2002; 277: 12053-12060
- 2 AWMF-LEITLINIEN, *Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2002*, Dt. Krebsgesellschaft, 13. Auflage
- 3 BACH I. *The LIM Domain: regulation by association*. Mech Dev 2000; 91: 5–17
- 4 BANKFALVI A, KRASORT M, BUCHWALO IB, VEGH A. *Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and β -catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression*. J Pathol 2002; 198: 343-351
- 5 BARTH AI, NATHKE IS, NELSON WJ. *Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways*. Curr Opin Cell Biol 1997; 9: 683-690
- 6 BERX G, STAES K, VAN HENGEL J, MOLEMANS F, BUSSEMAKERS MJ, VAN BOKHOVEN A, VAN ROY F. *Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDHI)*. Genomics 1995; 26: 281-289
- 7 BOECKER W, DENK H, HEITZ U, ed., In: *Pathologie*. München-Berlin-Baltimore: Verlag Urban & Schwarzenberg, 1997: 163-164
- 8 BORCZUK AC, SHAH L, PEARSON GDN, WALTER KL, WANG L, AUSTIN JHM. *Molecular signatures in biopsy specimens of lung cancer*. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170: 167-174
- 9 BUSSEMAKERS MJ, VAN BOKHOVEN A, VOELLER M, SMIT FP, SCHALKEN JA. *The genes for the calcium-dependent cell adhesion molecules P- and E-cadherin are tandemly arranged in the human genome*. Biochem Biophys Res Commun 1994; 203: 291-294
- 10 CHAN KK, TSUI SK, LEE SM, LUK SC, LIEW CC, FUNG KP, WAYE MM, LEE YL. *Molecular cloning and characterization of FHL2, a novel LIM domain protein preferentially expressed in human heart*. Gene 1998; 210: 345–350
- 11 CHRIVIA JC, KWOK RP, LAMB N, HAGIWARA M, MONTMINY MR, GOODMAN RH. *Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP*. Nature 1993;

- 365: 855–859
- 12 CHU PH, BARDWELL WM, GU Y, ROSS JJ, CHEN J. *FHL2 (SLIM3) is not essential for cardiac development and function*. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 7460–7462
- 13 CHU PH, RUIZ-LOZANO P, ZHOU Q, CAI C, CHEN J. *Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system*, *Mech Dev* 2000; 95: 259–265
- 14 DAWID IB, BREEN JJ, TOYAMA R. *LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions*. *Trends Genet* 1998; 14: 156–162
- 15 DAWID IB, TOYAMA R, TAIRA M, *LIM domain proteins*. *C R Acad Sci* 1994; 318: 295-306
- 16 DU X, HUBLITZ P, GUNTHER T, WILHELM D, ENGLERT C, SCHULE R. *The LIM-only coactivator FHL2 modulates WT1 transcriptional activity during gonadal differentiation*. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1577: 93-101
- 17 FIMIA GM, DE CESARE D, SASSONE-CORSI P. *A family of LIM-only transcriptional coactivators: tissue-specific expression and selective activation of CREB and CREM*. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 8613–8622
- 18 FIMIA GM, DE CESARE D, SASSONE-CORSI P. *CBP-independent activation of CREB and CREM by the LIM-only protein ACT*. *Nature* 1999; 398: 165–169
- 19 FIMIA GM, DE-CESARE D, SASSONE-CORSI P. *Mechanisms of activation by CREB and CREM: phosphorylation, CBP, and a novel coactivator, ACT*. *Quant Biol* 1998; 63: 631–642
- 20 FRITZ G, JUST I, KAINA B. *Rho GTPases are over-expressed in human tumors*. *Int. J. Cancer* 1999; 81: 682–687
- 21 GABRIEL B, FISCHER DC, ORLOWSKA-VOLK M, ZUR HAUSEN A, SCHULE R, MULLER JM, HASENBURG A. *Expression of the transcriptional coregulator FHL2 in human breast cancer: a clinicopathologic study*. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13: 69-75
- 22 GABRIEL B, MILDENBERGER S, WEISSER CW, METZGER E, GITSCH G, SCHULE R. *Focal adhesion kinase interacts with the transcriptional coactivator FHL2 and both are overexpressed in epithelial ovarian cancer*. *Anticancer Res* 2004; 24: 921-927
- 23 GAMALLO C, PALACIOS J, SUAREZ A, PIZARRO A, NAVARRO P, QUINTANILLA M,

- CANO A. *Correlation of E-cad expression with differentiation grade and histological type in breast carcinomas*. Am J Pathol 1993; 142: 987-993
- 24 GENINI M, SCHWALBE P, SCHOLL FA, REMPPIS A, MATTEI MG, SCHAFER BW. *Substractive cloning and characterization of DRAL, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma*. DNA Cell Biol 1997; 16: 433–442
- 25 GENINI M, SCHWALBE P, SCHOLL FA, SCHAFER BW. *Isolation of gene differently expressed in human primary myoblasts and embryonal rhabdomyosarcoma*. Int J Cancer 1996; 66: 571–577
- 26 GREGORY CW, HAMIL KG, KIM D, HALL SH, PRETLOW TG, MOHLER JL, FRENCH FS. *Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer is associated with increased expression of androgen-regulated genes*. Cancer Res 1998; 58: 5718–5724
- 27 GUILFORD P. *E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire?*. Mol Med Today 1999; 5: 172-177
- 28 GUMBINER BM. *Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*. Cell 1996; 84: 345-357
- 29 GUNTHER T, POLI C, MULLER JM, CATALA-LEHNEN P, SCHINKE T, YIN N. *FHL2 deficiency results in osteopenia due to decreased activity of osteoblasts*. EMBO J 2005; 24: 3049-3056
- 30 HAZELBAG HM, VAN DEN BROEK LJ, VAN DORST EB, OFFERHAUS GJ, FLEUREN GJ, HOGENDOORN PC. *Immunostaining of chain-specific keratins on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: a comparison of various antigen retrieval systems using microwave heating and proteolytic pre-treatments*, J Histochem Cytochem 1995; 43: 429–437.
- 31 HILL A, RILEY PR. *Differential regulation of Hand1 homodimer and Hand1-E12 heterodimer activity by the cofactor FHL2*. Mol Cell Biol 2004; 24: 9832-9847
- 32 HORNSTEIN OP ed., In: *Erkrankungen des Mundes - Ein interdisziplinäres Handbuch und Atlas*-. Stuttgart-Berlin-Köln: Verlag Kohlhammer, 1996: 515–525
- 33 HOTEIYA T, HAYASHI E, SATOMURA K, KAMAT N, NAGAYAMA M. *Expression of E-cadherin in oral cancer cell lines and its relationship to invasiveness in SCID mice in vivo*. J Oral Pathol Med 1999; 28: 107-111
- 34 HULSKEN J, BIRCHMEIER W, BEHRENS H. *E-Cadherin and APC compete for the*

- interaction with β -catenin and the cytoskeleton.* J Cell Biol 1994; 127: 2061-2069
- 35 HUMPHRIES MJ, NEWHAM P. *The structure of cell-adhesion molecules.* Trends Cell Biol 1998; 8: 78-83
- 36 JOHANNESSEN M, DELGHANDI MP, MOENS U. *What turns CREB on?* Cell Signal 2004; 16: 1211-1227
- 37 JURATA LW, GILL GN. *Structure and function of LIM domains.* Curr Top Microbiol Immunol 1998; 228: 75-113
- 38 KADRMAS JL, BECKERLE MC. *The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus.* Nat Rev Mol Cell Biol 2004; 5: 920-931
- 39 KINOSHITA M, NAKAGAWA T, SHIMIZU A, KATSUOKA Y. *Differently regulated androgen receptor transcriptional complex in prostate cancer compared with normal prostate.* Int J Urol 2005; 12: 390-397
- 40 KINSELLA AR, GREEN B, LEPTS GC, HILL CL, BOWIE G, TAYLOR BA. *The role of the cell adhesion molecule E-cad in large bowel tumour cell invasion and metastasis.* Br J Cancer 1993; 67: 904-909
- 41 KONG Y, SHELTON JM, ROTHERMEL B, LI W, RICHARDSON JA, BASSEL-DUBY R. *Cardiac-specific LIM protein FHL2 modifies the hypertrophic response to beta-adrenergic stimulation.* Circulation 2001; 103:2731-2738
- 42 LABALETTE C, RENARD CA, NEUVEUT C., BUENDIA MA, WEI Y. *Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CPB/p300 and β -catenin.* Mol Cell Biol 2004; 24: 10689-10702
- 43 LANGE S, AUERBACH D, MCLOUGHLIN P., PERRARD E, SCHAFFER BW, PERRIARD JC. *Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL2.* J Cell Sci 2002; 115: 4925-4936
- 44 LEWIS JE, JESEN PJ, JOHNSON KR, WHEELLOCK MJ. *E-cadherin mediates adherens junction organisation through protein kinase C.* J Cell Sci 1995; 107: 3615-3621
- 45 LI HY, KOTAKA M, KOSTIN S, LEE SM, KOK LD, CHAN KK. *Translocation of a human focal adhesion LIM-only protein, FHL2, during myofibrillogenesis and identification of LIM2 as the principal determinants of FHL2 focal adhesion localization.* Cell Motil Cytoskeleton 2001; 48: 11-23. Erratum in: Cell Motil Cytoskeleton 2001; 49: 112-114
- 46 LI HY, NG EK, LEE SM, KOTAKA M, TSUI SK, LEE CY. *Protein-protein interaction*

- of *FHL3* with *FHL2* and visualization of their interaction by green fluorescent protein (GFP) two-fusion fluorescence resonance energy transfer (FRET). *J Cell Biochem* 2001; 80: 293-303
- 47 MARTIN B, SCHNEIDER R, JANETZKY S, WAIBLER Z, PANDUR P, KUHL M, BEHRENS J, VON DER MARK K, STARZINSKI-POWITZ A, WIXLER V. *The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts.* *J Cell Biol* 2002; 159: 113–122
- 48 MATTIJSSSEN V, PETERS HM, SCHALKWIJK L, MANNI JJ, VAN 'T HOF-GROOTENBOER B, DE MULDER PH, RUITER DJ. *E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome.* *Int J Cancer* 1993; 55: 580-585
- 49 MAYER B, JOHNSON JP, LEITL F, JAUCH KW, HEISS MM, SCHILDBERG FW, BIRCHMEIER W, FUNKE I. *E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer; down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration.* *Cancer Res* 1993; 53:1690-1695
- 50 MORGAN MJ, MADGWICK AJ. *Slim defines a novel family of LIM-proteins expressed in skeletal muscle.* *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 632–638
- 51 MORGAN MJ, MADGWICK AJ. *The fourth member of the FHL family of LIM proteins is expressed exclusively in the testis.* *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255 : 251–255
- 52 MORGAN MJ, MADGWICK AJ. *The LIM proteins FHL1 and FHL3 are expressed differently in skeletal muscle.* *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 245–250
- 53 MORGAN MJ, WHAWELL SA. *The structure of the human LIM protein ACT gene and its expression in tumor cell lines.* *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 776-783
- 54 MORLON A, SASSONE-CORSI P. *The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3977-3982
- 55 MULLER JM, ISELE U, METZGER E, REMPEL A, MOSER M, PSCHERER A, BREYER T, HOLUBARSCH C, BUETTNER R, SCHULE R. *FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor.* *EMBO J* 2000; 19: 359–369
- 56 MULLER JM, METZGER E, GRESCHIK H, BOSSERHOFF AK, MERCEP L, BUETTNER R, SCHULE R. *The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the*

- cell membrane into the nucleus*, EMBO J 2002; 21: 736–748
- 57 NESSLER-MENARDI C, JOTOVA I, CULING Z, EDER IE, PUTZ T, BARTSCH G. *Expression of androgen receptor coregulatory proteins in prostate cancer and stromal-cell culture models*. Prostate 2000; 45: 124-131
- 58 NOSE A, NAGAFUCHI A, TAKEICHI M. *Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model system*. Cell 1988; 54: 993-1001
- 59 PLATZ H, FRIES R, HUDEC M. *Retrospektive DÖSAK-Studie über Karzinome der Mundhöhle. Die prognostische Relevanz verschiedener Faktoren zum Zeitpunkt der Erstaufnahme des Patienten*. Dtsch Z Mund-Kiefer-Gesichts-Chir 1982; 6: 185-196
- 60 PURCELL NH, DARWIS D, BUENO OF, MULLER JM, SCHULE R, MOLKENTIN JD. *Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes*. Mol Cell Biol 2004; 24: 1081-1095
- 61 ROSS ME, MAHFOUZ R, ONCIU M, LIU HC, ZHOU X, SONG G. *Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia*. Blood 2004; 104: 3679-3687
- 62 SACHS S., In: *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*. Berlin: Springer Verlag, 7. Auflage, 1992: 589-602
- 63 SANCHEZ-GARCIA I, RABBITS TH. *The LIM Domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins*. Trends Genet 1994; 10: 315–320
- 64 SCHOLL FA, MCLOUGHLIN P, EHLER, E, DE GIOVANNI C, SCHAFFER BW. *DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis*. J Cell Biol 2000; 151: 495-506
- 65 SHAPIRO L, FANNON AM, KWONG PD, THOMPSON A, LEHMANN MS, GRUBEL G, LEGRAND JF, ALS-NIELSEN J, COLMAN DR, HENDRICKSON WA. *Structural basis of cell-cell-adhesion by cadherins*. Nature 1995; 374: 327-336
- 66 SHI SR, KEY ME, KALRA KL. *Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections*, J Histochem Cytochem 1995; 43: 193–201
- 67 SHIMOYAMA Y, HIROHASHI S. *Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas; loss of E-cad expression in an undifferentiated carcinoma*, Cancer Lett 1991; 57: 2185-2191
- 68 SHINOHARA M, HIRAKI A, IKBEBE T, NAKAMURA S, KURAHARA S, SHIRASUNA K,

- GARROD DR. *Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining and with tumour behavior.* J Pathol 1998; 184: 369-381
- 69 SHIOZAKI H, TAHARA H, OKA H, MIYATA M, KOBAYASHI K, TAMURA S, IIHARA K, DOKI Y, HIRANO S, TAKEICHI M. *Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers.* Am J Path 1991. 139:17-23
- 70 SMITH MEF, PIGNATELLI M. *The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/catenin complex.* Histopathology 1997; 31: 107-111
- 71 SPIESSL B ET AL., ed., *UICC, Union Internationale Contre le Cancer, TNM-Atlas.* Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 1985
- 72 TAKEICHI M. *Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator.* Science 1991; 251: 1451-1455
- 73 TANAHASHI H, TABIRA T. *Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, a LIM-domain protein.* Hum Mol Genet 2000; 9: 2281-2289
- 74 UMBAS R, ISAACS WB, BRINGUIR P, XUE Y, DEBRUYNE FM, SCHALKEN JA. *Decreased E-cad expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer.* Cancer Res 1994; 54: 3929-3933
- 75 WILLIAM HK, SANDERS DS, JANKOWSKI JA, LANDINI G, BROWN AM. *Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma.* J Oral Pathol Med 1998; 27: 308-317
- 76 WIXLER V, GEERTS D, LAPLANTINE E, WESTHOFF D, SMYTH N, AUMAILLEY M, SONNENBERG A, PAULSSON M. *The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several alpha- and beta-integrin chains and is recruited to adhesion complexes.* J Biol Chem 2000; 275: 33669–33678
- 77 YAN J, ZHU J, ZHONG H, LU Q, HUANG C, YE Q. *BRCA1 interacts with FHL2 and enhances FHL2 transactivation function.* FEBS Lett 2003; 553: 183-189
- 78 YAN JH, YE QN, FANG Y, ZHU JH, HUNAG CF. *Mapping of FHL2 Transcription activation Domain.* Acta Biochim Biophys Sin 2003; 35: 643-648

9 Danksagung

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. med. R. Büttner für die Fragestellung und die Betreuung meiner Arbeit. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Esch und Frau Paggen für ihre Hilfestellungen bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, Frau Reddemann für Hilfe bei der Literaturrecherche, Herrn Dr. med. Friedrichs für seine Hilfe bei der Anfertigung der Fotos meiner Schnitte sowie Frau Dr. rer. nat. Nicolay und Herrn Dr. rer. nat. Fimmers für ihre Beratung bei der statistischen Auswertung.

Besonderer Dank gilt meinem Ehemann, Herrn Dr. med. Thomas Henke, für kontinuierliche Unterstützung, Geduld und Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit.