

***Meinem Opa***  
***Rudolf Tschöke***

**Untersuchungen zum stromalen Laminin–Matrix–  
*Remodelling* in der Invasionsfront  
humaner oraler Karzinome**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich – Schiller – Universität Jena**

**von Anke Wolheim  
geboren am 06.02.1985 in Sondershausen**

**Gutachter:**

1. apl. Prof. Dr. Alexander Berndt , Institut für Pathologie, Jena
2. Prof. Dr. Sven Ksciely ~~Ä~~ Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Jena
3. Prof. Dr. Hartwig ~~K~~smehl, Institut für Pathologie , HEIO – ~~K~~linikum ~~E~~urt

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. April 2010**

## Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
$\alpha$ SMA	<i>alpha – smooth muscle actin</i>
BM	Basalmembran
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
CAF	<i>cancer associated fibroblasts</i>
CMDA1	<i>congenital muscular dystrophy A1</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i> ; extrazelluläre Matrix
EGF	<i>epidermal growth factor</i> ; Epidermaler Wachstumsfaktor
EHS – Tumor	Engelbreth–Holm–Swarm–Tumor (EHS–Sarkom)
HBSS	<i>Hank’s buffered salt solution</i>
HE	Hämalaun – Eosin
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton

## Abkürzungsverzeichnis

---

LM	Laminin
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
MSH	Mundschleimhaut
MT – MMP	Membrantyp – Matrixmetalloproteinase
OSCC	<i>oral squamous cell carcinoma</i>
pECM	provisorische extrazelluläre Matrix
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT–PCR	Reverse Transkriptase Polymerase- Kettenreaktion
SDF–1	<i>stromal derived growth factor 1</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i> ; Tris – gepufferte Kochsalzlösung
TGF– $\beta$ 1	<i>tissue growth factor – <math>\beta</math>1</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of MMP</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>6</b>
	<b>2.1. Das orale Plattenepithelkarzinom (OSCC)</b>	<b>6</b>
	<b>2.2. Die extrazelluläre Matrix (ECM)</b>	<b>8</b>
	2.2.1. Definition und Aufbau	8
	2.2.2 Funktion und Bedeutung	9
	2.2.3. Basalmembran	10
	2.2.4. Tumorinvasion: Tumorzellmobilisierung, Matrixdegradation und Neusynthese einer provisorischen extrazellulären Matrix (pECM)	12
	<b>2.3 Laminine</b>	<b>15</b>
	2.3.1. Isoformen – die Lamininfamilie	15
	2.3.2. Die Lamininketten $\alpha 2$ , $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$	17
	2.3.3. Die Lamininketten $\beta 2$ , $\beta 3$ und $\gamma 2$	20
	2.3.4. Bedeutung der Tumor – Stroma – Interaktion für die Herausbildung des invasiven Tumorzellphänotyps / Metastasierung	23
	<b>2.4. Zielstellung</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b>	<b>28</b>
	<b>3.1. Gewebematerial</b>	<b>28</b>
	3.1.1. Asservierung der Gewebeproben	28
	3.1.2. Konventionelle Histologie am Paraffinmaterial	30
	3.1.3. Kryokonservierung des Gewebematerials	30
	<b>3.2. Immunhistochemie</b>	<b>31</b>
	3.2.1. Immunhistochemischer Nachweis der verschiedenen Lamininketten für die Lichtmikroskopie unter Verwendung der indirekten Streptavidin – Biotin – Methode	31
	3.2.2. Lichtmikroskopische Bewertung der histologischen und immunhistochemischen Präparate	32
	3.2.3. Statistik – semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse	33
	3.2.4. Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen der Lamininketten $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$ und $\gamma 2$ mit dem Endothelzellmarker CD 31	34
	3.2.5. Analyse der Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen mittels konfokaler <i>Laser Scanning</i> – Mikroskopie	35
	3.2.6. Statistik – semiquantitative Auswertung der Ergebnisse der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung	35

---

<b>3.3. RT – PCR</b>	<b>36</b>
3.3.1. Mikrodissektion	36
3.3.2. RNA – Extraktion mittels <i>RNeasy Microkit</i>	36
3.3.3. RT – PCR	37
3.3.4. Agarose–Gel–Elektrophorese	38
<b>3.4. Verzeichnis der verwendeten Puffer und Lösungen</b>	<b>39</b>
3.4.1. Konventionelle Histologie	39
3.4.3. Puffer und Lösungen für das DAKO <i>ChemMate</i> <sup>TM</sup> Detektionskit	39
3.4.4. Puffer und Lösungen für das <i>Animal Research Kit</i> (ARK, Dako)	39
3.4.5. Gele und Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese	40
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>4.1. Immunhistochemische Analyse der stromalen Depositionsmuster der Lamininketten <math>\alpha 2</math>, <math>\alpha 3</math>, <math>\alpha 4</math>, <math>\alpha 5</math>, <math>\beta 2</math>, <math>\beta 3</math> und <math>\gamma 2</math></b>	<b>41</b>
4.1.1. Expressions- und Verteilungsmuster in der normalen Mundschleimhaut	41
4.1.2. Expressions- und Verteilungsmuster in der hyperplastischen Mundschleimhaut	44
4.1.3. Expressions- und Verteilungsmuster im oralen Plattenepithelkarzinom (OSCC) – vergleichende Analyse verschiedener Malignitätsgrade	46
4.1.3.1 Expressions– und Verteilungsmuster in gut differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen (G1)	47
4.1.3.2 Expressions– und Verteilungsmuster in mäßig differenzierten (G2) oralen Plattenepithelkarzinomen	50
4.1.3.3 Expressions– und Verteilungsmuster in schlecht differenzierten (G3) oralen Plattenepithelkarzinomen	53
<b>4.2. Quantitative Analyse der immunhistochemischen Ergebnisse stromaler Depositionen zu neoplastischer Transformation und Tumorprogression sowie <math>\alpha</math>SMA</b>	<b>57</b>
<b>4.3. Quantitative Analyse der Immunfluoreszenz – doppelmarkierung mit CD 31 und den Lamininketten <math>\alpha 3</math>, <math>\alpha 4</math>, <math>\alpha 5</math> und <math>\gamma 2</math></b>	<b>64</b>
<b>4.4. Mikrodissektion und RT – PCR der Lamininketten <math>\alpha 3</math>, <math>\alpha 4</math>, <math>\alpha 5</math> und <math>\gamma 2</math></b>	<b>67</b>
<b>5 Diskussion</b>	<b>68</b>
<b>5.1. Stromale Detektierbarkeit der Laminin–<math>\alpha 2</math>–kette im Rahmen der malignen Transformation oraler Mundschleimhaut ohne Beziehung zu Invasivität und Malignität des OSCC</b>	<b>68</b>
<b>5.2. Deutliche Zunahme der Stromadepositionen der Laminin–<math>\alpha 3</math>–kette in der Invasionsfront des OSCC mit Assoziation zu Invasivität und Malignität</b>	<b>70</b>

---

<b>5.3. Deutliche Zunahme der Stromadepositionen der Laminin-<math>\alpha</math>4-kette in der Invasionsfront des OSCC mit Assoziation zu Invasivität und Malignität</b>	<b>73</b>
<b>5.4. Diskrete stromale Depositionen der Laminin-<math>\alpha</math>5-kette im OSCC mit steigendem Malignitätsgrading</b>	<b>76</b>
<b>5.5. Neuauftreten stromaler Depositionen der Laminin-<math>\beta</math>2-kette im Rahmen der malignen Transformation des oralen Epithels zum OSCC mit klarer Assoziation zu steigender Malignität des Tumors</b>	<b>77</b>
<b>5.6. Stromale Depositionen der Laminin-<math>\beta</math>3-kette sind ein seltenes Phänomen in der Tumorinvasionsfront des OSCC ohne Korrelation zu steigender Malignität</b>	<b>79</b>
<b>5.7. Stromale Depositionen der Laminin-<math>\gamma</math>2-kette als Marker der malignen Transformation des oralen Epithels: deutliche Zunahme mit steigender Malignität</b>	<b>80</b>
<b>5.8. Gefäßpositivität ausgewählter Lamininketten im Stroma der Tumorinvasionszone des OSCC: Quantitative Unterschiede in Abhängigkeit von der Malignität</b>	<b>83</b>
<b>5.9. Eine Synthese der Lamininketten <math>\alpha</math>3, <math>\alpha</math>4, <math>\alpha</math>5 und <math>\gamma</math>2 findet sowohl in Tumor- als auch in Stromaarealen der Invasionsfront statt</b>	<b>87</b>
<b>6 <i>Schlussfolgerungen</i></b>	<b>90</b>
<b>7 <i>Literaturverzeichnis</i></b>	<b>92</b>

---



### 1 Zusammenfassung

Das orale Plattenepithelkarzinom (OSCC) ist der häufigste maligne Tumor der Mundhöhle. Die aktuell zur Verfügung stehenden Therapieoptionen zeigen nur unzureichende Erfolge, so dass die Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen von hohem klinischem Interesse ist. Die im Rahmen der Tumordinvasion stattfindende Reorganisation der extrazellulären Matrix (stromales *Remodelling*) ist mit einer Reexpression onkofetaler Matrixproteinvarianten verbunden. Laminine als bedeutende Gruppe nichtkollagener Glykoproteine der extrazellulären Matrix (ECM) existieren in 16 verschiedenen Isoformen, welche durch alternativen Zusammenbau der unterschiedlichen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  – Ketten entstehen. Im OSCC kommt es zu deutlichen Veränderungen in der Expression der Lamininisoformen verglichen mit normaler Mundschleimhaut insbesondere in epithelialen Tumorzellen und in Basalmembranstrukturen. Hierbei besteht eine klare Assoziation zum malignen Potential des Tumors. Die Bedeutung der Expression und extrazellulären Deposition einzelner Lamininketten für die stromale Reorganisation im Bereich der Tumordinvasionszone und Prozesse der Angiogenese ist aktuell nicht hinreichend verstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb eine detaillierte qualitative und semiquantitative Analyse der Expression und extrazellulären Deposition der funktionell bedeutsamen Lamininketten  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 2$  im Stroma und in der Umgebung neu gebildeter Tumorgefäße der Invasionsfront des OSCC im Vergleich zu normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut. Für die Untersuchungen stand kryokonserviertes Gewebematerial von 41 oralen Plattenepithelkarzinomen unterschiedlichen Malignitätsgrades (9xG1, 24xG2, 8xG3), 2 Präparaten normaler und 11 Präparaten hyperplastischer Mundschleimhaut zur Verfügung. Es erfolgten semiquantitative immunhistochemische Analysen der Lamininketten sowie von  $\alpha$ -glattmuskulärem Aktin ( $\alpha$ SMA). Die Ergebnisse wurden auf ihre Beziehungen zu Malignitätsgrad und Ausmaß der  $\alpha$ SMA-Positivität überprüft. Die Detektion der Gefäßpositivität für die Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  erfolgte durch Immunfluoreszenzdoppelmarkierung mit dem

Endothelzellmarker CD 31. Zur Beleuchtung der Frage nach dem Syntheseort bestimmter Lamininketten wurde eine Mikrodissektion zur Isolierung von Tumor- und Stromaarealen mit anschließender RT-PCR durchgeführt. Im Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen zeigt sich für die Laminin –  $\alpha 2$  – kette eine signifikante Abnahme ihrer stromalen Depositionen mit steigendem Malignitätsgrad. Für die stromalen Depositionen der Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 2$  sowie für die stromale  $\alpha$ SMA-Positivität konnte eine klare Zunahme mit steigendem Malignitätsgrad beobachtet werden. Das Ausmaß der stromalen Depositionen für die Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 2$  zeigt eine deutliche positive Korrelation zur stromalen  $\alpha$ SMA-Positivität. Im Hinblick auf die Gefäßpositivität konnte für die Lamininkette  $\alpha 3$  eine signifikante Abnahme mit steigendem Malignitätsgrad dargestellt werden. Nach RT-PCR für die Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  konnte in den durch Mikrodissektion isolierten Gewebeproben von Tumor- und Stromaarealen innerhalb der Invasionsfront eines repräsentativen OSCC-Präparates (G2) eine mRNA-Expression sowohl im Tumor als auch im Stroma der Invasionsfront demonstriert werden. Die Progression des OSCC ist mit einer Steigerung der stromalen Expression und Deposition verschiedener Lamininketten im Rahmen der Aktivierung des Karzinomstromas und der Myofibroblastenkonversion verbunden. Das Laminin-Matrix-Remodelling leistet möglicherweise einen Beitrag zur Formierung eines migrationsfördernden Tumorstromas. Die stromalen Depositionen der Laminin –  $\alpha 3$  – kette können als Phänomen der frühen Fibroblastenaktivierung interpretiert werden, eine Abnahme dieser Lamininkette in vaskulären Strukturen ist mit einem steigenden Malignitätsgrad assoziiert. Für die Laminin –  $\alpha 4$  – kette zeigt sich eine malignitätsgradabhängige Modifikation der epithelialen Basalmembran und eine stromale Deposition als Ausdruck einer zunehmenden Stromaaktivierung. Darüber hinaus ist diese Lamininkette als dignitätsunabhängiger Marker endothelialer Basalmembranen vorzuschlagen. Die vaskuläre Detektierbarkeit der Laminin –  $\gamma 2$  – kette scheint ein initiales Phänomen der Neoangiogenese im OSCC darzustellen. Auch das Stromakompartiment ist an einer aktiven Synthese der Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  im Bereich der Tumordinvasionsfront des OSCC beteiligt.

## 2 Einleitung

### 2.1. Das orale Plattenepithelkarzinom (OSCC)

Das orale Plattenepithelkarzinom ist der am häufigsten vorkommende bösartige Tumor der Mundhöhle. Das Plattenepithel ist histologisch am eosinophilen Zytoplasma in der Tumordinvasionsfront zu erkennen und zeigt oft eine Verhornung. Hochdifferenzierte Formen bilden zwiebelschalenförmige Hornkugeln. Bezogen auf die Gesamtheit der malignen Tumoren stellt diese Tumorentität mit etwa 5% jedoch nur einen geringen Anteil dar. Dennoch zählen orale Tumoren zu den 20 häufigsten Krebstodesursachen in Deutschland (Jordan and Daley 1997). Männer erkranken deutlich häufiger am OSCC als Frauen, eine besondere Präsenz zeigt sich im 6. und 7. Lebensjahrzehnt. In den letzten Jahren stieg die Inzidenz weiterhin an. Insbesondere bei jüngeren Männern tritt diese Form der tumorösen Erkrankung gehäuft auf (Blot et al. 1994). Es gibt deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Inzidenz des OSCC zwischen den europäischen Industrieländern und den USA auf der einen, und entwicklungsschwächeren Staaten auf der anderen Seite, wo ein signifikant vermehrtes Auftreten der Erkrankung beschrieben ist (Jovanovic et al. 1993; Weir et al. 1987). Am häufigsten kommt das orale Plattenepithelkarzinom im südasiatischen Raum, vor allem in China, Indien und auf der Arabischen Halbinsel vor. Dies wird unter anderem mit dem Kauen der Betelnuss erklärt, welches als einer der Risikofaktoren bekannt ist. Getrocknete Schalen der Nuss, sowie getrocknete und frische Betelnüsse werden in diesen Regionen zum Kauen genutzt, was zusammen mit auffälligen Mundläsionen pathogenetische Veränderungen wie eine orale submuköse Fibrose zur Folge haben kann. Auch der Genuss von Shammah, einem traditionell arabischen Tabak, zeigt eine signifikante Assoziation mit dysplastischen Veränderungen der Mundschleimhaut, welche dosisabhängig zu sein scheint (Kok et al. 2007; Scheifele et al. 2007). Weitere nachgewiesene Risikofaktoren sind der Alkohol- und Tabakkonsum (Miller et al. 1974). Vor allem bei der Kombination beider Faktoren entsteht ein mindestens zweifach höheres Risiko einer malignen Entartung. Sowohl die Menge als auch das Konsumieren mehrerer Tabakarten

potenzieren die Wirkung auf die Schleimhaut der Mundhöhle (Howaldt et al. 2000). Eine genetische Komponente ist nicht ausgeschlossen, aber unvollständig geklärt. Es werden auch virale Infektionen mit Subtypen des humanen Papillomavirus als tumorinduzierender Faktor diskutiert (Tsantoulis et al. 2007). Im Rahmen einer Autoimmunerkrankung mit T – Lymphozytendefekt zeigt sich durch Besiedlung von *Candida albicans* eine chronische Mukositis (Schleimhautentzündung) und weitere Veränderungen bis zum OSCC (Rautemaa et al. 2007). Oft beschrieben sind Zahnfleiscentzündungen, Kariesvorkommen und unzureichende Mund – und Zahnpflege als begünstigende Einflussgrößen für die Entstehung des OSCC. Dabei spielt der Speichel und dessen mikrobiologische Flora eine wichtige Rolle, so entstehen zum Beispiel bei Auftreten von *Streptococcus viridans* und *S. salivarius* durch enzymatischen Abbau vermehrt Acetaldehyde, welche prokanzerogen wirken können (Kurkivuori et al. 2007). Meist ist das orale Plattenepithelkarzinom an der Unterlippe, im Bereich des Zahnfleisches des Unterkiefers oder am Mundboden lokalisiert. Eine vergleichsweise gute Prognose zeigt sich bei jüngeren Betroffenen, die Tumordifferenzierung ist dahingehend von geringerer Bedeutung. Als prognostisch entscheidend konnte das Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose identifiziert werden (Oliver et al. 1996). Momentan liegt die 5– Jahresüberlebensrate bei etwa 50% (Howaldt et al. 2000).

Die Therapie des OSCC besteht aus chirurgischen, radiologischen und chemotherapeutischen Maßnahmen. Anzustreben ist jedoch besonders die vollständige sowohl makroskopisch als auch mikroskopische Resektion des Tumors. Im Bereich der Mundhöhle ist dieses Vorgehen durch Lokalisation und Ausbreitung des Tumors meist nicht möglich. Deswegen werden verschiedene Therapiekonzepte in Kombination angewendet: die neoadjuvante Chemotherapie vor und nach Resektion, Radiotherapie prä –und postoperativ und Immunotherapie (DÖSAK 1995). Ein zufriedenstellendes Therapiekonzept ist bis heute nicht gefunden. Auch die Überlebensraten haben sich in den letzten zwanzig Jahren nur unwesentlich verbessert (Platz 1986).

Als Präkanzerosen des OSCC gelten die Leukoplakie und Erythroplakie, wobei die Erythroplakie weitaus seltener vorkommt. Die Leukoplakie ist mit einem weißen, nicht wegwischbaren Saum der Mundschleimhaut beschrieben.

Histologische Charakteristika sind Hyperkeratosen in Verbindung mit Epithelhyperplasien. Bei der Erythroplakie zeigt sich eine meist hochgradige Dysplasie des Epithels. Weiterhin ist das Risiko der Entartung hier wesentlich höher (Burkhardt 1996; Thorup et al. 1998).

Aufgrund der beschriebenen limitierten Response des OSCC auf die aktuell zur Verfügung stehenden Therapieoptionen, ist die Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen dringend erforderlich. Die im Rahmen der Tumorinvasion stattfindende Reorganisation der extrazellulären Matrix (stromales *Remodelling*, siehe folgende Kapitel) ist mit einer Reexpression onkofetaler Proteinvarianten verbunden. Die genaue Analyse dieser Veränderungen im Tumorgewebe kann grundlegende Erkenntnisse zur Entwicklung innovativer Therapiestrategien, wie z.B. der Antikörper-basierten Medikamentenapplikation, hervorbringen. Aus diesem Grund soll in der folgenden Arbeit über die detaillierte Untersuchung der stromalen Veränderungen von Lamininketten mit funktioneller Bedeutung für die Tumorbio­logie berichtet werden.

## **2.2. Die extrazelluläre Matrix (ECM)**

### **2.2.1. Definition und Aufbau**

Die extrazelluläre Matrix organisiert sich als ein die Zellen umgebendes Netzwerk im Interzellularraum und ist ein bedeutender Teil des Gewebes. Sie bestimmt biophysikalische Eigenschaften und steuert biophysiologische Abläufe. Je nach Eigenschaft und Funktion eines Gewebes unterscheiden sich chemische Zusammensetzung, Struktur und Funktion der ECM. Die Matrix und deren Bestandteile werden von Mesenchymzellen synthetisiert. An der Produktion von Basalmembranbestandteilen sind auch Epithel- und Endothelzellen beteiligt. Die wasserhaltige Grundsubstanz und die Faserproteine sind die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix. Die Grundsubstanz setzt sich unter anderem aus Proteoglykanen, Plasmaproteinen, Hyaluronsäure zusammen. Die Funktion ist ähnlich einer semipermeablen Membran und zeigt Filtereigenschaften auf. Die Grundsubstanz ist von besonderer Bedeutung für den Ablauf von

Diffusionsvorgängen. So ist sie durchlässig für Substanzen wie Nährstoffe, Wachstumsfaktoren oder Abbauprodukte des Zellstoffwechsels, jedoch nicht für Makromoleküle und andere korpuskuläre Bestandteile. Die Faserproteine bestehen aus fibrillären Polypeptiden, die die Grundsubstanz gerüstartig durchziehen. Dazu gehören Elastin und Kollagene als strukturgebende Proteine auf der einen und Adhäsionsmoleküle, wie Laminine, Fibronectin oder die Tenascine auf der anderen Seite. Die Faserproteine sind in Struktureinheiten untergliedert. Fibronectin und Tenascin wurden in den vergangenen Jahren intensiv untersucht und haben eine regulierende Bedeutung für Adhäsion und Migration von Zellen bei physiologischen und pathologischen Gewebsumbauprozessen wie Wundheilung oder Karzinogenese (Borsi et al. 1992; Beaulieu 1997; Carnemola et al. 1999).

### **2.2.2 Funktion und Bedeutung**

Die extrazelluläre Matrix (ECM) reguliert vielseitige biologische Abläufe wie Differenzierung, Organogenese und Regeneration. Genauer benötigen Zellen die ECM als Leitschiene zur Migration und sie dient der Adhärenz in Geweben. Außerdem gilt die extrazelluläre Matrix auch als Stützeinrichtung und beteiligt sich an der Struktur der jeweiligen Zellverbände. Die umfangreichen Aufgaben können durch eine organisierte Struktur gewährleistet werden. Die ECM ist am Informationsfluss zwischen einzelnen Zellen in Bezug zu deren Umgebung beteiligt und hat somit eine Bedeutung für die Regulation der Zellfunktionen (Schwarzbauer and Sechler 1999). Die Matrix ist als Strukturgerüst definiert, aber in dieser Funktion keineswegs als statisch zu verstehen. Sie ist durch verschiedene Abläufe wie Abbau, Neubildung und Umbau variabel gestaltet. In der Embryogenese reguliert die extrazelluläre Matrix über Zell–Zell–Kontakte die wechselseitige Beeinflussung verschiedener Zelltypen. So können die Entwicklung neuer Zellpopulationen und strukturelle Veränderungen, welche eine Voraussetzung für die Reifung von Geweben sind, verwirklicht werden. In diesem Zusammenhang wurde eine Vielzahl regulatorisch aktiver Matrixproteine beschrieben (Kosmehl et al. 1996).

Diese Prozesse finden nicht nur in unreifem Gewebe sondern auch im adulten Organismus statt. Hier zeichnen sich die sogenannten Zell – Matrix –

Interaktionen durch regulierende Beeinflussung von Proliferation (Gewebevermehrung) und Differenzierung (Spezialisierung) aus (Bissell et al. 1982). Die extrazelluläre Matrix gestaltet sich bei vollständig differenzierten Zellen eines reifen Gewebes in einer komplexeren Form (Kosmehl et al. 1996), übernimmt aber auch hier einerseits Schutz- und Stützfunktionen und bildet die Epithelbarriere und stellt andererseits die Grundlage für die Migration von Zellen im Gewebe dar. Die Interaktion zwischen Zellen und ECM erfolgt im Wesentlichen über spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diese sogenannten Integrine sind heterodimere Glykoproteine, welche aus einer  $\alpha$  – und einer  $\beta$  – Untereinheit bestehen. Die Untereinheiten sind nicht-kovalent miteinander verbunden (Ruoslahti 1991). Insgesamt sind 18  $\alpha$  – und 8  $\beta$  – Untereinheiten bekannt, die durch unterschiedliche Zusammensetzung zahlreiche Integrin–Varianten hervorbringen (Sheppard 1998). Die Rezeptoren sind über eine zytoplasmatische Domäne mit Aktin – oder Intermediärfilamente verbunden. Zu den Aufgaben dieser Transmembranrezeptoren zählen die Anbindung des Zytoskeletts an umgebende Zellen und die Verankerung der Zellen. Außerdem besitzen Integrine eine Bindungsfähigkeit für die beschriebenen Adhäsionsproteine, zum Beispiel Kollagene, Fibronektine und Laminine, wodurch Signale der ECM in die Zelle hinein vermittelt werden können (Roskelley et al. 1994).

### **2.2.3. Basalmembran**

Die Basalmembran (BM) besitzt eine besondere Bedeutung als spezialisierte Organisationsform der ECM. Diese dichte, etwa 50–100 nm dicke Struktur erscheint im Lichtmikroskop als Membran und grenzt alle Epithelien, Endothelien und auch Gliazellverbände gegenüber dem bindegewebigen Stroma ab. Auch bei Fett– und Muskelzellen kommt eine Basalmembran vor, die die Zellen nach außen umgibt. Im Allgemeinen besteht die Basalmembran aus verschiedenen Kollagen – Typen, Lamininen, Proteoglykanen und Kalzium – bindenden Proteinen sowie einigen Anheftungsproteinen. Nur im elektronenmikroskopischen Bild können mehrere Schichten unterschieden werden: eine direkt an der Zytoplasmamembran der Basalzellen angrenzende Lamina rara, eine etwas dicker erscheinende Lamina densa und eine äußere

Lamina fibroreticularis, welche an das umgebende Stroma grenzt. Die Lamina fibroreticularis stellt ein Geflecht aus Kollagenfibrillen dar, die als retikuläre Fasern erscheinen. Diese Zone zeigt sich an unterschiedlichen Orten vielgestaltig (Ghadially 1997). Zu Beginn der Embryogenese ist die Basalmembran an Zellphänotypisierung und Ausbildung von Gewebsstrukturen mitwirkend. Als Diffusionsbarriere hat die Basalmembran auch Aufgaben mechanischer Art. Da die Basalmembran aus Proteoglykanen besteht, trägt die Struktur Negativladungen, womit andere negativ geladene Makromoleküle zurückgehalten werden. Außerdem ist sie an komplexen Prozessen wie Wundheilung und Regeneration beteiligt (Engvall 1995; Timpl 1996).

Der Basalmembran gehören zwei wesentliche Strukturen an, die jeweils eine Art dreidimensionales Netz ergeben. Dies sind zum einen das Kollagen Typ IV – Netz, dessen Moleküle untereinander kovalent verbunden sind, zum anderen das Laminin – Netz, welches von Molekül zu Molekül nicht – kovalent verknüpft ist. Der Zusammenhalt beider Netze wird durch Proteine wie Nidogen/Entactin gewährleistet. Das Kollagen Typ IV – Netz ist in seiner Grundstruktur als stabil beschrieben, wobei das Laminin – Netz als eher dynamisch und flexibel gilt. Weitere Bestandteile kommen neben den schon beschriebenen Proteinen in der Basalmembran vor, z.B. Heparansulfatproteoglykane oder Kollagen Typ XVIII (Engvall 1995; Timpl 1996). Die Funktionen der Basalmembran wurden bereits genannt, jedoch soll ihre Aufgabe bei der Verbindung von Basalzellen zur ECM erklärt werden. Diese Verknüpfung wird durch bestimmte Zell – Matrix – Kontakt – Strukturen, die Hemidesmosomen, verwirklicht. Hemidesmosomen sind transmembranös lokalisierte Multiproteinkomplexe der epithelialen Basalzellen, die zusammen mit den Ankerfilamenten der Basalmembran den epithelialen Adhäsionskomplex bilden. Zu den Ankerfilamenten gehört als wichtiges Strukturprotein das Laminin 332 (LM 332, LM 5) (Tosios et al. 1998). Ein bekannter Baustein der Hemidesmosomen ist das Integrin  $\alpha 6 \beta 4$  (Carter et al. 1990; Downer et al. 1993). Das beschriebene Integrin kann LM 332 erkennen und ist somit bedeutend für die Interaktion zwischen Epithelzellen und extrazellulärer Matrix (Baker et al. 1996). Damit findet eine Signalübertragung von der Matrix ins Zellinnere statt, die dem Laminin als funktionellen Glykoprotein zugeschrieben werden kann. Die Basalmembran hat des Weiteren



Einfluss auf das Zellverhalten, indem sie Reparations- und Regenerationsvorgänge moduliert und Anheftung einer Zelle, Migration, Zellneubildung und Differenzierung sowie den Apoptosevorgang bestimmt (Haralson 1993; Hynes 1987; Relan and Schuger 1999).

#### **2.2.4. Tumorinvasion: Tumorzellmobilisierung, Matrixdegradation und Neusynthese einer provisorischen extrazellulären Matrix (pECM)**

Die Tumorinvasion – auch infiltratives Wachstum – ist eine wichtige Voraussetzung für die Fähigkeit eines malignen Tumors, Metastasen zu bilden. In einem ersten Schritt müssen epitheliale Tumorzellen die unter dem Epithel gelegenen Basalmembranstrukturen durchbrechen, um sich dann im darunter liegenden Bindegewebe destruierend auszubreiten. Im Rahmen dieses Vorganges kann es nun zu einem Eindringen in Blut- oder Lymphgefäße kommen, was eine hämatogene und/oder lymphogene Metastasierung zur Folge haben kann. Die Invasionsfront ist der Bereich im Gewebe, an dem invadierende Tumorzellen und extrazelluläre Matrixstrukturen aufeinander treffen und miteinander in Interaktion treten. Dies lässt sich in mehrere Schritte gliedern, wobei die Zerstörung interzellulärer Kontakte und der Abbau der vorbestehenden extrazellulären Matrix sowie Ersatz dieser durch eine sogenannte provisorische Matrix als vorbereitend für die Fähigkeit zur aktiven Tumorzellbewegung anzusehen sind.

Im ersten Schritt der Loslösung von Tumorzellen aus dem Tumorzellverband spielt der Verlust von interzellulären Haftstrukturen eine wichtige Rolle. So kommt es über eine verminderte Expression des interzellulären epithelialen Bindungsproteins E-Cadherin zur Auflösung der Zonulae adhaerentes und auch der Fasciae adherentes. Diese Expressionsverminderung hat ihre Ursache entweder in einem entsprechenden Allelverlust oder einer Mutation. Auch über den Phosphorylierungszustand des E-Cadherin-Moleküls, welcher über Protein-Tyrosin-Kinasen reguliert werden kann, ist eine Beeinflussung dieser Zell-Zell-Kontakte möglich. Nicht nur Interaktionen zwischen Zellen sondern auch sogenannte Zell-Matrix-Adhäsionen werden im Rahmen der Tumorinvasion verändert. Hierbei sind vor allem die sogenannten Integrine von Bedeutung, welche in Karzinomen eine deutliche veränderte Expression

verglichen mit den jeweiligen gesunden Ausgangsgeweben zeigen (Meyer und Hart 1998) und dadurch nicht nur die Zellgestalt modifizieren können sondern auch Prozesse wie Zelladhäsion und –beweglichkeit beeinflussen. Für das orale Plattenepithelkarzinom wurden die Änderungen in der Integrinexpression im Vergleich zur normalen, gesunden Mundschleimhaut im Detail untersucht (Kosmehl et al. 1995; Thomas et al. 1997).

Parallel dazu müssen vorbestehenden extrazelluläre Matrixstrukturen aufgelöst und durch die sogenannte provisorische Matrix ersetzt werden, damit Tumorzellen in das im Bereich der Invasionsfront angrenzende Bindegewebe eindringen können. Das Auflösen von extrazellulären Matrixstrukturen erfolgt durch eine enzymatische Degradation, welche im Wesentlichen durch in Tumor– oder auch Stromazellen gebildete Proteasen realisiert wird (Pyke et al. 1992; Davidson et al. 1999). Als wichtige Vertreter solcher eiweißabbauenden Enzyme sind neben Hyaluronidasen, Proteoglykanasen, Kathepsinen oder der Urokinase vor allem die zink–abhängigen Matrixmetalloproteasen (MMPs) zu nennen. Diese können in sezernierter Form vorliegen oder aber auch als MMPs vom Membrantyp in der Zellmembran verankert sein (MT–MMPs) (Thomas et al. 1999). Als Substrate der MMPs sind – je nach Subtyp der Protease – Komponenten von Basalmembran oder interstitiellem Raum anzuführen. Dies sind z.B. Kollagene (Kollagenasen), Laminine und Fibronektine, aber auch Zell–Zell–Kontakt vermittelnde Moleküle wie Cadherine oder verschiedene Integrine (Kahari and Saarialho-Kere 1997; Ray and Stetler-Stevenson 1995).

Matrixmetalloproteasen existieren initial als inaktive Proenzyme. Die Aktivierung erfolgt durch andere Proteasen, sogenannten Aktivatoren, oder durch autokatalytische Vorgänge. Auch eine Aktivitätsregulation durch Enzymhemmung spielt eine wichtige Rolle. Diese wird insbesondere durch die sogenannten *tissue inhibitors of MMPs* (TIMPs), von denen mehrere Isoformen bekannt sind, realisiert, indem sie in der Lage sind, relativ spezifisch verschiedene MMP–Typen zu hemmen. Auf diese Weise kann enzymatischer Eiweißabbau gehemmt werden, wodurch invasiven/infiltrativen Vorgängen entgegengewirkt werden kann. Aktuell sind 4 TIMP–Typen bekannt, welche entsprechend TIMP–1 bis –4 genannt werden (Powell and Matrisian 1996). MMPs und TIMPs sowie andere Proteasen, welche bei der Tumorerkrankung eine

Rolle spielen, sind sowohl unter pathologischen Bedingungen als auch bei verschiedensten physiologischen Prozessen des Gewebeumbaus von wesentlicher Bedeutung. Hier sind Vorgänge wie Wundheilung oder Entzündung sowie verschiedene Formen degenerativer Erkrankungen beispielhaft zu nennen (Seiki et al. 1999). Die Bedeutung der MMPs für die Tumorentwicklung konnte in zahlreichen Untersuchungen an verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem auch für das orale Plattenepithelkarzinom (OSCC), dadurch belegt werden, dass die Expression verschiedener MMP-Subtypen zum Grad der Metastasierung und auch zum invasiven Potential positiv korreliert (Kleiner and Stetler-Stevenson 1999; Powell et al. 1993; Gilles et al. 1996; Kurahara et al. 1999). Der Beitrag zu Invasivität und Metastasierungspotential im OSCC wird dabei unter anderem durch die Fähigkeit der MMPs zur proteolytischen Degradation von Bestandteilen der epithelialen Basalmembran realisiert. Damit ist es gerechtfertigt, den MMPs eine nicht unerhebliche Bedeutung im Rahmen dieser Prozesse zuzuschreiben (Harada et al. 1994; Kosmehl et al. 1995).

Nach dem oder parallel zum Abbau der extrazellulären Matrix im Rahmen der Tumorentwicklung findet eine Neubildung einer sogenannten provisorischen ECM (pECM) statt. Diese zeigt supportive Eigenschaften bei der Tumorprogression. Ein wichtiges Zielkriterium hierbei ist die Unterstützung der Tumorzellmigration. Die provisorische ECM, welche als spezifisch für einen bestimmten Tumor angesehen werden kann, weist demzufolge eine veränderte molekulare und supramolekulare Struktur und damit andere funktionelle Eigenschaften mit Migrations- und damit Invasionsförderndem biochemischem Informationsgehalt auf. Darüber hinaus ist die pECM bedeutend für Differenzierung und Proliferation von Tumorzellen. In diesem Zusammenhang wurde auch die Bezeichnung der „Leitschiene für die Tumorinvasion“ geprägt. Bezüglich ihrer Zusammensetzung weist die pECM Ähnlichkeiten mit der ECM in embryonalen Geweben sowie Geweben, welche sich in Regeneration oder Wachstum befinden, auf (Nicolo et al. 1990; Siri et al. 1995). Die in ihr befindlichen Proteinvarianten werden deshalb auch als onkofetal bezeichnet. Besonders für die wichtigen Adhäsionsproteine Fibronectin und Tenascin sind solche onkofetalen Isoformen zahlreich beschrieben (Kosmehl et al. 1999; Siri

et al. 1991; Ramos et al. 1997). Ein wesentliches Unterscheidungskriterium zwischen der pECM, an deren Synthese neben Tumorzellen auch Fibro- und Myofibroblasten des Stromas beteiligt sind, und der „physiologischen“ ECM ist die höhere Empfindlichkeit der onkofetalen Proteinisoformen gegenüber dem proteolytischen Abbau durch MMPs (Siri et al. 1995). An der Invasionsfront sind diese zur Degradation fähigen Enzyme hochkonzentriert (Bernstein and Liotta 1994; Ruoslahti and Reed 1994), woraus sich nach Abbau der vorbestehenden Matrix eine besondere Interaktionsfähigkeit zwischen Tumorzelle und Stromazelle sowie der pECM ergibt. Die Charakteristika der pECM lassen sich durch die hohe Anzahl funktionell variabler Matrixproteine erklären. Dazu zählen erstens das Vorkommen von Proteinisoformen in Molekülfamilien wie z.B. bei der Lamininfamilie oder der Fibronektinfamilie (Kosmehl et al. 1996; Mandel et al. 1994), zweitens das alternative Spleißen der prä – RNA von Molekülen wie Fibronektin oder Tenascin (Bell et al. 1999; Borsi et al. 1994) und drittens posttranslationale Modifikationen wie z. B. die Glykosylierung von Lamininen oder Fibronektin (Adams and Watt 1993; Matsuura et al. 1989). Extrazelluläres *Matrixremodelling* findet nun sowohl im Tumor, als auch im Stromakompartiment statt. Während es zum stromalen *Remodelling* der zellulären Adhäsionsproteine Fibronektin und Tenascin-C umfassende Untersuchungen gibt, ist bislang das Laminin-*Remodelling* im Stroma der Invasionszone des OSCC nur ansatzweise untersucht. Wie bereits beschrieben besitzen Laminine eine hohe funktionelle Diversität als strukturgebende Faktoren auf der einen und biologisch aktive Moleküle mit Beteiligung an der Signaltransduktion (*EGF-like domains*) auf der anderen Seite. Deshalb ist die genaue Kenntnis auch des stromalen Laminin-*Remodelling* z.B. aufgrund seiner potentiellen Bedeutung als therapeutisches *target* von hoher Bedeutung.

## **2.3 Laminine**

### **2.3.1. Isoformen – die Lamininfamilie**

Laminine stellen eine Gruppe makromolekularer, nicht – kollagener Glykoproteinen dar, welche an der architektonischen Gestaltung der Basalmembran beteiligt sind. Laminine wurden erstmals 1979 von der

Arbeitsgruppe um Timpl aus einem Maus – EHS – Tumor isoliert. Der Aufbau der Laminine gleicht einem kreuzförmigen Heterotrimer und besteht aus einer schweren  $\alpha$  – Kette, 400 kDa, und zwei leichten Ketten mit jeweils 130 bis 200 kDa, die als  $\beta$ – und  $\gamma$ – Kette bezeichnet werden (Timpl et al. 1979). Timpl und Brown unterschieden 1994 insgesamt 7 verschiedene Lamininisoformen und machten daran die multifunktionale Familie der Makromoleküle fest (Timpl and Brown 1994). Neben Kollagenen sind Laminine die quantitativ bedeutsamen Glykoproteine der extrazellulären Matrix. Sie spielen eine wesentliche Rolle für die Struktur der Basalmembranen und bei der Zell–Matrix–Interaktion durch ihre Ligandenrolle an Integrinrezeptoren. Dies ist von besonderer Bedeutung im Rahmen der Embryonalentwicklung und auch für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase (Timpl and Brown 1994). 1993 erfolgte die erstmalige Bezeichnung der Laminine als Molekülfamilie durch Tryggvason und Mitarbeiter (Tryggvason 1993). Nach derzeitigen Erkenntnisstand existieren 5  $\alpha$ –, 3  $\beta$ – und 3  $\gamma$ – Ketten (Miner and Yurchenco 2004), woraus sich eine Heterogenität ergibt, die durch verschiedene Kombinationen der Einzelketten 16 Isoformen entstehen lässt (Aumailley and Krieg 1996; Engvall and Wewer 1996). In Basallaminae kommen diese ubiquitär vor. Jede einzelne Lamininkette wird durch homologe Gene mit distinktem Expressionsmuster kodiert (Ruegg 1996). Nachdem das erstbeschriebene Laminin individuell EHS – Laminin genannt wurde (Timpl et al. 1979), begannen Burgeson und Mitarbeiter 1994 eine systematische Nomenklatur einzuführen (Burgeson et al. 1994). Die Auflistung der Lamininisoformen erfolgte nach jeweiliger Entdeckung und wurde fortlaufend von Laminin – 1 bis – 15 erweitert (Libby et al. 2000; Relan and Schuger 1999). Die Lamininmoleküle wurden mit den jeweiligen Ketten als arabische Ziffern aufgelistet (Burgeson et al. 1994). Heute entspricht die Bezeichnung der Isoformen der Zusammensetzung der Lamininketten in Form einer dreistelligen arabischen Ziffer (Aumailley et al. 2005). Die nach verkürzter Nomenklatur von Aumalley zum Beispiel bei Laminin 1 – LM 111 lautet und damit aus den Ketten  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1 und  $\gamma$ 1 besteht. Das Lamininmolekül weist innermolekulare Verbindung durch Disulfidbrücken auf und zeigt eine  $\alpha$  helixartige Struktur zwischen der schweren  $\alpha$  – Kette und den beiden leichten  $\beta$

–und  $\gamma$  – Ketten (Ekblom, Lonai and Talts 2003; Miner and Yurchenco 2004). Jede Lamininkette ist aus einem langen und kurzen Arm zusammengesetzt. Dabei sind die Ketten untereinander am helikalen Bereich der langen Arme verknüpft. Die Molekülgröße der Laminine liegt zwischen 400 – 900 kDa. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die aktuell bekannten Lamininisformen einschließlich deren Komposition sowie entsprechender Synonyme (Aumailley et al. 2005).

<b>Laminine – aktuelle Nomenklatur</b>	<b>Ketten</b>	<b>Laminine –bisherige Bezeichnungen</b>
LM 111	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	Laminin – 1, EHS – Laminin
LM 211	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Laminin – 2, Merosin
LM 121	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	Laminin – 3, s – Laminin
LM 221	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	Laminin – 4, s – Merosin
LM 332 (3A32)	$\alpha 3A\beta 3\gamma 2$	Laminin – 5 (5A), Kalinin/Nicein/Epiligrin/Ladsin
LM 332 (3B32)	$\alpha 3B\beta 3\gamma 2$	Laminin – 5 (5B), k – Laminin
LM 311	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$	Laminin – 6, ks – Laminin
LM 321	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$	Laminin – 7
LM 411	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	Laminin – 8
LM 421	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	Laminin – 9
LM 511	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	Laminin – 10
LM 521	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	Laminin – 11
LM 213	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	Laminin – 12
LM 323	$\alpha 3\beta 2\gamma 3$	Laminin – 13
LM 423	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	Laminin – 14
LM 522	$\alpha 5\beta 2\gamma 2$	
LM 523	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	Laminin – 15

**Tabelle 1:** Lamininisformen mit aktueller und bisheriger Nomenklatur (modifiziert nach Aumailley et al. 2005)

### 2.3.2. Die Lamininketten $\alpha 2$ , $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$

Das heterotrimere Glykoprotein Laminin in der extrazellulären Matrix setzt sich aus verschiedenen Kombinationen von  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  – Ketten zusammen. Die Laminin –  $\alpha$  – ketten haben im Vergleich zu den  $\beta$ – und  $\gamma$ –Ketten eine höhere Molekülgröße. Die  $\alpha$ – Ketten setzen sich aus einem langen Arm mit C –

terminalem Ende und einem kurzen Arm mit N – terminalem Ende zusammen. Das C – terminale Ende ist zur Interaktion mit Zellrezeptoren, z.B. Integrinen, fähig. Am kurzen Arm können ebenfalls Verbindungen mit Integrinrezeptoren eingegangen werden, jedoch steht die Polymerisation von Molekülen im Vordergrund. Der kurze Arm der  $\alpha$  – Ketten setzt sich aus EGF – ähnlichen Tandem–Domänen (LEa, LEb, LEc) und globulären Domänen (LN, L4a, L4b) zusammen. Zum langen Arm der Kette gehören die  $\alpha$  helikale Spirale und globuläre Domänen bestehend aus 5 sich wiederholenden Sequenzen (LG 1 – 5) (Patarroyo, Tryggvason and Virtanen 2002).

Die Laminin –  $\alpha 2$  – kette wurde in den Lamininen 211 (LM 2), 221 (LM 4) und 213 (LM 12) nachgewiesen. Hauptsächlich lässt sich diese Kette im neuromuskulären System, in der Basalmembran des Sarkolems in Myofibrillen und an neuromuskulären Kontakten lokalisieren. Als Funktion gilt im Besonderen die Aufrechterhaltung der Integrität der Muskelzellstruktur. Die Lamininmoleküle 211 (LM 2) und 221 (LM 4) werden von Muskelzellen exprimiert (Brandenberger et al. 1996). Bei humanen Erkrankungen wie der kongenitalen Muskeldystrophie A1 (CMDA 1) finden sich Ursachen in Veränderungen des Lamininmoleküls (Helbling-Leclerc et al. 1995). Dagegen wird das Lamininmolekül 213 (LM 12) in Nierenkapillaren und – arteriolen sowie in Leydig–Zellen des Hodens synthetisiert (Iivanainen, Morita and Tryggvason 1999). Bei Analysen zur Expression von Lamininketten im fetalen oralen Gewebe zeigt sich die  $\alpha 2$  – Kette in der Basalmembran, in adultem gesunden Gewebe lässt sich diese Kette nicht nachweisen. Im oralen Plattenepithelkarzinom kommt die  $\alpha 2$  – Kette nur fokal vor (Kosmehl et al. 1999).

Die Laminin –  $\alpha 3$  – kette stellt sich in den Isoformen der Laminine 332 (LM 5A und 5B), 311 (LM 6), 321 (LM 7) und 323 (LM 13) dar. In der Haut (Rousselle et al. 1991) und sowohl in Plazenta als auch in Brustdrüsen (Doliana et al. 1997) lässt sich das Lamininmolekül 3A32 (LM 5A) nachweisen, trägt zur Formierung von Hemidesmosomen bei und unterstützt die zelluläre Migration. Deshalb treten bei Störungen dieser Kette und damit des epithelialen Adhäsionskomplexes subepitheliale blasenbildende Dermatosen auf. Die

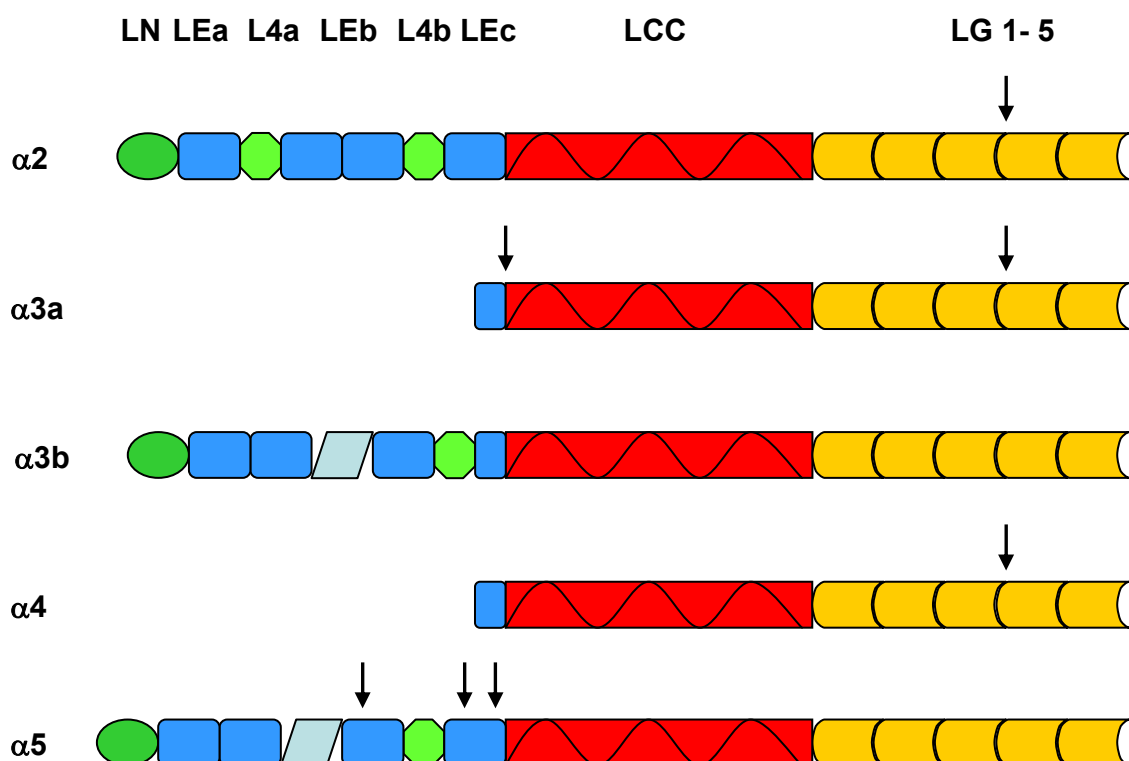
Autoimmunität gegen Bestandteile des Laminin 3A32 (5A) löst das vernarbende Pemphigoid aus. Genetische Veränderungen mit dem Verlust von Laminin 3A32 (5A) verursachen die schon pränatal diagnostizierbare Epidermolysis bullosa Herlitz (Haas et al. 2001). Die Expression des Lamininmoleküls 3B32 (LM 5B) findet in Haut, Uterus und Lunge statt (Doliana et al. 1997). Die funktionelle Bedeutung ist hierfür noch nicht hinreichend geklärt. Laminin 311 (LM 6) und Laminin 321 (LM 7) kommen in Haut und Amnion vor (Marinkovich et al. 1992; Champlaud et al. 1996). Mit Hilfe des Laminin 332 (LM 5) tragen diese Lamininmoleküle zur Assemblierung der extrazellulären Matrix bei. Schließlich hat das Lamininmolekül 323 (LM 13) im Hippocampus die Aufgabe der synaptischen Organisation (Egles et al. 2007). Die  $\alpha 3$  – Kette kann im fetalen und adulten gesunden Gewebe und auch im hyperplastischen Epithel sowie im oralen Plattenepithelkarzinom detektiert werden. Im Tumor zeigen sich fokale Brüche in der Basalmembran und eine Zunahme der Detektierbarkeit im Stroma (Kosmehl et al. 1999).

Die  $\alpha 4$  – Kette kann den Lamininmolekülen 411 (LM 8), 421 (LM 9) und 423 (LM 14) zugeordnet werden. Die beiden erstgenannten können in Gefäßendothelzellen, peripheren Nerven und Muskelfibrillen nachgewiesen werden. Weiterhin spielen sie eine Rolle bei der Entwicklung von Skelettmuskelzellen (Thyboll et al. 2002) und können in weißen Blutzellen (Wondimu et al. 2004) detektiert werden. Die Migration der neutrophilen Granulozyten und die Endothelentwicklung werden durch Laminin 411 (LM 8) funktionell unterstützt. Dagegen zeigt sich das Lamininmolekül 423 (LM 14) in Bereichen der Retina (Libby et al. 2000) und des Hippocampus (Egles et al. 2007). Durch diese Isoform gelingt eine synaptische Organisation.

Die Lamininmoleküle 511 (LM 10), 521 (LM 11) und 523 (LM 15) beeinhaltendie  $\alpha 5$  – Kette. Dabei wird Laminin 511 (LM 10) von epithelialen und vaskulären Geweben exprimiert. Die Laminine 10 und 11 kommen auch in der Plazenta vor (Champlaud et al. 2000). In neuromuskulären Geweben und in renalen Glomeruli wurde das Molekül 521 (LM 11) gefunden (Miner and Patton 1999). Funktionell spielt Laminin 511 (LM 10) eine Rolle bei der Ausbildung von Haaren und in der Embryogenese im Zusammenwirken mit der  $\alpha 1$  – Kette.



Laminin 523 (LM 15) stellt sich in Retina und ZNS dar und hilft bei synaptischer Organisation (Libby et al. 2000). Kosmehl und Mitarbeiter haben die  $\alpha 5$  – Kette in fetaler und adulter Mundschleimhaut nachgewiesen. Auch bei hyperplastischer Veränderung und im oralen Plattenepithelkarzinom lässt sich diese Lamininkette im Bereich der Basalmembran detektieren (Kosmehl et al. 1999). Abbildung 1 zeigt die Molekülstruktur der beschriebenen Laminin –  $\alpha$  – Ketten.



**Abbildung 1: Domänenstrukturen der  $\alpha$  – Ketten** (modifiziert nach Tzu and Marinkovich 2008) – kurze Kette mit stabförmigen EGF – ähnlichen Tandems (LEa, LEb, LEc) und globulären Domänen (LN, L4a, L4b, LF); lange Kette mit  $\alpha$  helikaler Spirale (LCC), globuläre Domänen mit 5 Wiederholungen (LG 1-5) am C – terminalem Ende; Pfeile bezeichnen Stellen des *Processing*

### 2.3.3. Die Lamininketten $\beta 2$ , $\beta 3$ und $\gamma 2$

Zu den kleinen Ketten des Lamininmoleküls gehören die  $\beta$  – Ketten. Diese sind aus charakteristischen Bausteinen wie der  $\beta$  – knob Domäne mit *coiled – coiled* Struktur zusammengesetzt. Bisher sind 3 verschiedene  $\beta$  – Ketten beschrieben

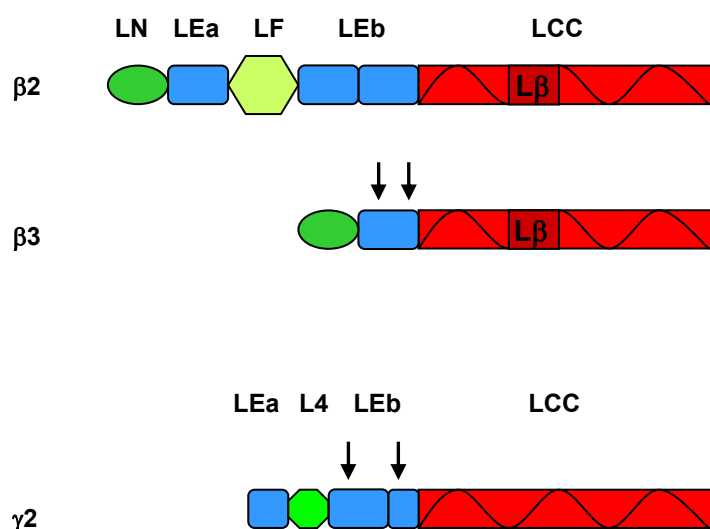
wurden, die sich durch Änderungen in strukturellen Domänen unterscheiden (Patarroyo et al. 2002). Die  $\alpha$  – und  $\beta$  – Ketten sind für das helixartige Aussehen des Lamininmolekül zuständig. Im Jahr 1989 zeigten Hunter und Mitarbeiter erstmals die  $\beta 2$  – Kette als Homologon der Laminin –  $\beta 1$  – kette. Beide  $\beta$  – Ketten weisen auf dem kurzen Arm *EGF – like – tandems* (LEa, LEb) und globuläre Domänen (LN) auf. Eine Expression der  $\beta 2$  – Kette in der Basalmembran im synaptischen Spalt der neuromuskulären Endplatte wurde gezeigt. Bekannt wurde die  $\beta 2$  – Kette im sogenannten s – Laminin und hat ein Molekulargewicht von ca. 190 kDa (Hunter et al. 1989). Nachgewiesen wurde die  $\beta 2$  – Kette im Laminin 121 (LM 3), 221 (LM 4), 321 (LM 7), 421 (LM 9), 521 (LM 11), 323 (LM 13), in beiden Isoformen des Laminin 14 (LM 423 und 522) und in 523 (LM 15). Außerdem konnte diese Kette in der neuromuskulären Endplatte der Skelettmuskulatur, in neuronalen Basallaminae (Perineurium), in Nierenglomeruli und glatten Muskelzellen in Gefäßen gefunden werden (Sanes and Chiu 1983; Hunter et al. 1989). Exprimiert wird die  $\beta 2$  – Kette darüber hinaus in Lungenalveolen, im Amnion und im zentralen Nervensystem auf (Hunter et al. 1992; Wewer et al. 1995; Champlaud et al. 1996; Virtanen et al. 1996). Durch immunhistochemische Methoden zeigte sich eine Expression der  $\beta 2$  – Kette in der embryonalen Basalmembran des Sarkolems und weiter im adulten Skelettmuskelgewebe. Das Auftreten im frühen embryonalen Stadium weist auf die Bedeutung für Differenzierungsprozesse hin (Libby et al. 1996). Außerdem zeigte sich ein entwicklungsbedingter Wechsel durch eine begrenzte Verteilung und dem Verlust der  $\beta 2$  – Kette in Muskelzellen, bei proliferativen Prozessen im adulten Gewebe jedoch die Reexpression der  $\beta 2$  – Kette (Vogel et al. 1991).

Die  $\beta 3$  – Kette unterscheidet sich gegenüber den bereits beschriebenen Ketten der  $\beta$  – Gruppe. Sie ist als bislang kürzeste Bauweise einer Lamininkette bekannt und besteht neben der *coiled – coiled* Struktur ( $L\beta$ ) hauptsächlich aus einer globulären Domäne (LN) (Patarroyo et al. 2002). Auch die Laminin –  $\beta 3$  – kette ist wesentlicher Bestandteil der Isoformen 3A32 und 3B32 (LM 5A und 5B). In anderen Isoformen wird diese  $\beta$  – Untereinheit nicht exprimiert, sodass diese Kette spezifisch für das Lamininmolekül anzusehen ist. Hauptsächlich in

der Haut (Rousselle et al. 1991), in der Placenta und den Brustdrüsen scheint insbesondere die Lamininisoform 3A32 lokalisiert zu sein (Doliana et al. 1997). Das Laminin 3B32 ist vor allem in Haut, Uterus und Lunge nachgewiesen wurden (Doliana et al. 1997). Vermutlich funktioniert die  $\beta 3$  – Untereinheit wie bereits erwähnt zur Formation der Hemidesmosomen und zellulären Migration. Im Bezug auf das orale Plattenepithel kann sowohl im gesunden fetalen als auch im adulten Gewebe die Expression der  $\beta 3$  – Kette festgestellt werden. Bei hyperplastischen Veränderungen und im Karzinom ist dieser Subtyp nachweislich vorhanden, vor allem im Zytoplasma der Tumorzellen mit Betonung der Invasionsfront (Kosmehl et al. 1999).

Die zum Lamininmolekül gehörende  $\gamma$  – Kette zählt zu den leichten Ketten. Funktionell ist diese in Interaktionen mit Molekülen der extrazellulären Matrix involviert (Gersdorff et al. 2005). Nach heutigen Erkenntnissen existieren nachweislich 3 verschiedene Isoformen der  $\gamma$  – Kette. Das Molekül, welches aus einem kurzen und einem langen Arm zusammengesetzt ist, besitzt spezifische Domänen. Der kurze Arm der  $\gamma$  – Kette besteht aus aneinander gefügten Domänen wie *EGF – like tandems* (LEa, LEb) sowie *globular domains* (LN, L4). Der lange Arm umfasst eine  $\alpha$  helikale Spirale (LCC) (Patarroyo et al. 2002). Durch Prozessieren der  $\gamma$  – Kette entsteht ein sogenanntes DIII – Fragment, das die Zellmotilität beeinflusst (Koshikawa et al. 2005; Veitch et al. 2003). Die untersuchte  $\gamma 2$  – Kette ist als Bestandteil von Laminin 3A32 und 3B32 (LM 5A und B) sowie von Laminin 522 bekannt. Wie bereits beschrieben wird das Lamininmolekül hauptsächlich in der Haut exprimiert (Rousselle et al. 1991; Doliana et al. 1997). Die Funktion der  $\gamma 2$  – Kette ergibt sich aus ihrer Fähigkeit zur Bindung an Kollagen VII, Nidogen und Fibulin (Sasaki et al. 2001; Schneider et al. 2007). Der Vorgang des proteolytischen *Processing* bei Lamininketten wurde zahlreich untersucht. Die humane  $\gamma 2$  – Kette (165 kDa) wird unter anderem durch *bone morphogenetic protein 1* (BMP – 1) in eine 105 kDa Lamininkette prozessiert (Veitch et al. 2003). Auch andere Enzyme wie die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind an der strukturellen Modifikation der  $\gamma 2$  – Kette beteiligt. Die membranständige Proteinase MT1 – MMP ist befähigt, 105 kDa und 85 kDa Fragmente der  $\gamma 2$  – Kette zu schaffen (Koshikawa et al. 2005).

In verschiedenen humanen epithelialen Tumoren der Lunge, des Kolons und der Schleimhäute zeigt sich eine vermehrte Expression der Laminin –  $\gamma 2$  – kette (Kainulainen et al. 1997; Maatta et al. 1999; Ono et al. 1999; Pyke et al. 1995; Yamamoto et al. 2001). Die Expression der Kette korreliert mit Invasivität und Prognose des Tumors (Noel et al. 2005). Im oralen Plattenepithelkarzinom zeigt sich eine Detektierbarkeit um die Tumorzellnester im Bereich der Basalmembran. Sowohl im gesunden als auch im hyperplastischen oralen Gewebe lässt sich die  $\gamma 2$  – Kette nachweisen (Kosmehl et al. 1999). Abbildung 2 zeigt die Molekülstruktur der Laminin – $\beta$ – und – $\gamma$ – ketten.



**Abbildung 2: Domänenstrukturen der  $\beta$  und  $\gamma$  – Ketten** (modifiziert nach Tzu and Marinkovich 2008) – kurze Kette mit stabförmigen EGF – ähnlichen Tandems (LEa, LEB) und globulären Domänen (LN, L4, LF); lange Kette mit  $\alpha$  helikaler Spirale (LCC) bei  $\beta$  – Ketten charakteristisch mit *coiled – coiled* Struktur, auch  $\beta$  – *knob* Domäne am C – terminalem Ende; Pfeile bezeichnen Stellen des *Processing*

### 2.3.4. Bedeutung der Tumor – Stroma – Interaktion für die Herausbildung des invasiven Tumorzellphänotyps / Metastasierung

Im Rahmen der Tumorentwicklung kommt unter anderem der Reorganisation der extrazellulären Matrix, dem sogenannten stromalen *Remodelling*, eine besondere Bedeutung zu. Dieser Prozess ist Voraussetzung für wichtige

malignitätstypische Tumoreigenschaften wie Invasivität und Metastasierung des OSCC (Hwang et al. 2008). Zum stromalen *Remodelling* gehört insbesondere die Aktivierung von Fibroblasten bzw. Myofibroblasten zu sogenannten „*cancer associated fibroblasts*“ (CAF). Diese zeigen deutlich veränderte zellbiologische Eigenschaften gegenüber normalen Fibroblasten auf (Casey et al. 2008) und sind in der Lage mit Tumorzellen über bestimmte Zytokine wie HGF (*hepatocyte growth factor*) oder SDF-1 (*stromal derived growth factor 1*) in Wechselwirkung zu treten. Durch den Einfluss von CAF wird das Invasivitätspotential von Tumorzellen unterstützt (Daly et al. 2008). Ein weiterer wichtiger Wachstumsfaktor in diesem Zusammenhang ist TGF- $\beta$ 1. In Mammakarzinomzellen konnte nachgewiesen werden, dass TGF- $\beta$ 1 die Entwicklung von CAFs induziert und die Invasionsrate in den entsprechenden Zellkulturen erhöht. Begleitet davon war eine deutlich gesteigerte Expression wichtiger migrationsfördernder extrazellulärer Matrixproteine wie z.B. Fibronectin oder Laminin (Casey et al. 2008). Aktivierte Fibroblasten beteiligen sich ebenfalls am Aufbau einer tumorassoziierten onkofetalen extrazellulären Matrix. Sie sind sowohl in der Lage matrixdegradierende Proteasen, sogenannte MMPs (Matrixmetalloproteasen), zu synthetisieren, die den Abbau vorbestehender Matrixstrukturen verwirklichen. Charakteristisch für diese onkofetalen Matrices ist die Reexpression onkofetaler Isoformen von zellulären Adhäsionsproteinen wie Fibronectin, z.B. dem IIIIS-de-novo-glykosylierten Fibrinektin oder dem ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin, oder auch von Tenascin-C, wie z.B. den großen, ungespleißten Isoformen (Tn-C<sub>L</sub>) (Kosmehl et al. 1996; Kosmehl et al. 1999; Franz et al. 2006; Richter et al. 2008). Fibroblasten sind neben der Synthese solcher onkofetalen Proteinisofomen, vorallem auch eine entscheidende Voraussetzung für deren extrazelluläre Strukturorganisation (Sottile and Hocking 2002; Schwarzbauer and Sechler 1999).

Nach Aktivierung von Fibroblasten und der Generierung von CAFs spielt auch die Neubildung von Tumorgefäßen zur Versorgung des Tumorgewebes mit entsprechenden Nährstoffen eine maßgebende Rolle für den Invasionsprozess (Harada et al. 2007). Für das Ösophaguskarzinom konnte in diesem Zusammenhang TGF- $\beta$ 1 – aktivierten Fibroblasten eine wesentliche Bedeutung

für die Tumorangiogenese zugeschrieben werden (Noma et al. 2008). Folgend nach Fibroblastenaktivierung und Gefäßneubildung ist ein dritter Prozess mit Bedeutung für die Tumorentwicklung zu nennen: die sogenannte Epithelial – Mesenchymale Transition (EMT). Die EMT spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Embryonalentwicklung des Menschen und tritt in der Adoleszenz bei verschiedenen pathologischen Zuständen wie der Fibrose oder Karzinogenese erneut in Erscheinung (Iwano et al. 2002; Kang et al. 2004). Die drei aufgeführten Mechanismen stehen in engem Wechselspiel und unterstützen dadurch die Tumorinvasion und –progression. Die extrazelluläre Matrix (ECM), welche die an der Tumorinvasion beteiligten Zellen umgibt, unterscheidet sich, wie bereits beschrieben, deutlich von der normalen ECM adulter Gewebe. Neben Kollagenen, Fibronectin oder Tenascin sind vor allem die am Aufbau der Basalmembran beteiligten Laminine von großer Bedeutung (Miner et al. 2008). Vorkommen und grundsätzliche Bedeutung der verschiedenen Isoformen wurde bereits in den vorangehenden Kapiteln erläutert. Kosmehl und Mitarbeiter präsentierten eine detaillierte Analyse der Verteilung bestimmter wichtiger Lamininketten im OSCC im Vergleich zu normaler und fetaler oraler Mukosa: In der Basalmembran des fetalen Epithels können die Lamininketten  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 1$  und  $\gamma 2$  detektiert werden. Im Gegensatz dazu finden sich die Ketten  $\alpha 2$  und  $\beta 2$  nicht in der Basalmembran adulter Mundschleimhaut. Im Falle von hyperplastischer oder dysplastischer Mundschleimhaut als auch im OSCC kommt es dann aber zu einer deutlichen Reexpression dieser beiden Ketten (Kosmehl et al. 1999). Für die Lamininisoform LM 332 konnte ein zum Malignitätsgrad korrelierender Verlust in Basalmembranstrukturen gezeigt werden (Haas et al. 2001). Dieses Molekül ist wichtiger Bestandteil der Ankerfilamente, welche die Basalmembran mit den Hemidesmosomen der Zelle verbinden (Rousselle et al. 1991; Masunaga et al. 1996). Bei Prozessen des Gewebsumbaus wie z.B. Wundheilung oder Karzinogenese kommt es zu einer Änderung des Funktionszustandes von einem adhäsionsfördernden hin zu einem migrationsfördernden Molekül (Tani et al. 1997). In Bereichen der Invasionsfront epithelialer Tumore konnte für verschiedene Karzinome eine vermehrte Expression des LM 332 nachgewiesen werden. Insbesondere

dessen  $\gamma 2$  – Kette wurde eine migrationsfördernde Rolle zugeschrieben. Neben dem Verlust des Moleküls aus der Basalmembran und einer vermehrten Expression in invadierenden Tumorzellen konnte vor allem für dessen  $\alpha 3$  und  $\gamma 2$  – Ketten eine vermehrte extrazelluläre Deposition im Stroma der Invasionszone beobachtet werden (Kosmehl et al. 1999; Franz et al. 2006). Das Ausmaß dieser Depositionen korreliert zu morphologischen Kriterien der Invasionsfront und zum Malignitätsgrad. Deswegen wurde die Hypothese auf einer LM 332 – Matrix basierenden Zellinvasion aufgestellt (Kosmehl et al. 1999). Demgegenüber gibt es zur Mehrheit der bekannten, im OSCC als bedeutend beschriebenen, Lamininketten bis heute keine ausführlichen Daten zur qualitativen und quantitativen Verteilung im Stroma der Invasionsfront. Außerdem ist ihre Bedeutung für die tumorassoziierte Gefäßneubildung im OSCC aktuell nicht hinreichend untersucht.

## **2.4. Zielstellung**

Die Tumor-Stroma-Interaktion und das stromaassoziierte Matrixremodelling haben entscheidenden Einfluss auf migratorische Eigenschaften der Tumorzellen. Aus diesem Grund kommt einer Analyse der Komposition der onkofetalen ECM im Bereich der Tumordinvasionsfront eine besondere klinisch-praktische Bedeutung zu. Neben der Tumordiagnostik könnte auch ein prädiktiver Beitrag zur Abschätzung der Individualprognose geleistet werden. Bislang existieren nur wenige Daten zur Reorganisation der stromalen und endothelialen Lamininmatrix im OSCC.

Deshalb ist das Ziel der vorliegenden Arbeit eine umfassende qualitative und semiquantitative immunhistochemische Analyse der Verteilung der Lamininketten  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 2$  im Stroma und in der Umgebung neu gebildeter Tumorgefäße der OSCC – Invasionsfront im Vergleich zu normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut.

Um die Rolle der stromalen Lamininketten–Deposition für das tumorbiologische Verhalten und für den Invasionsprozess zu beleuchten, erfolgt eine Korrelation des semiquantitativ bewerteten Ausmaßes der Depositionen im Stroma und um Gefäßstrukturen zum Malignitätsgrad des Tumors.

Mittels Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen für CD31 und die Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  soll eine Bewertung der Tumorgefäßheterogenität bezüglich des Einbaues von unterschiedlichen Lamininen in die vaskuläre Basalmembran herausgearbeitet werden.

In Abhängigkeit von den immunhistochemischen Resultaten soll eine Mikrodissektion zur Isolierung von Tumor- und Stromaarealen mit nachfolgender mRNA-Expressionsanalyse durch RT-PCR für einzelne Lamininketten durchgeführt werden, um den Syntheseort stromaler Laminindepositionen zu definieren.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1. Gewebematerial

##### 3.1.1. Asservierung der Gewebeproben

Es standen für die immunhistochemischen Färbungen humane Gewebeproben von normaler, hyperplastischer Mundschleimhaut sowie von oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) unterschiedlicher Malignität (Gradingstufen G1, G2 und G3 nach WHO – Tumorklassifikation, Barnes et al. 2005) und Lokalisation zur Verfügung. Diese wurden aus diagnostischer bzw. therapeutischer Indikation operativ entfernt und aus dem Eingangsgut des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Friedrich – Schiller – Universität liegt vor. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Präparate (Tabelle 2).

Fallnr.	Diagnose	Lokalisation	Grading
1	MSH	MSH	normal / submuköse Fibrose
2	MSH	MSH	normal
3	MSH	MSH	Hyperplasie
4	MSH	MSH	Hyperplasie
5	MSH	MSH	Hyperplasie
6	MSH	MSH	Hyperplasie
7	MSH	MSH	Hyperplasie
8	MSH	MSH	Hyperplasie
9	MSH	Zunge	Hyperplasie
10	MSH	MSH	Hyperplasie
11	MSH	MSH	Hyperplasie
12	MSH	Mundwinkel	Hyperplasie
13	MSH	MSH	Hyperplasie / SIN
14	OSCC	Zunge	1
15	OSCC	Zunge	1
16	OSCC	Mundboden	1
17	OSCC	Mundboden	1

18	OSCC	Mundboden	1
19	OSCC	Lippe	1
20	OSCC	Backe	1
21	OSCC	Zunge	1
22	OSCC	Lippe	1
23	OSCC	Mundboden	2
24	OSCC	Mundboden	2
25	OSCC	Mundboden	2
26	OSCC	Mundboden	2
27	OSCC	Mundwinkel	2
28	OSCC	Processus alveolaris / Mandibula	2
29	OSCC	Mundboden	2
30	OSCC	Processus alveolaris / Mandibula	2
31	OSCC	MSH	2
32	OSCC	Backenzahnfleisch	2
33	OSCC	Zunge	2
34	OSCC	Backe	2
35	OSCC	Processus alveolaris / Mandibula	2
36	OSCC	Mundboden	2
37	OSCC	Processus alveolaris / Mandibula	2
38	OSCC	Zunge	2
39	OSCC	Mundboden	2
40	OSCC	Lippe	2
41	OSCC	Mundboden	2
42	OSCC	Mundboden	2
43	OSCC	Mundboden	2
44	OSCC	Processus alveolaris / Mandibula	2
45	OSCC	MSH	2
46	OSCC	MSH	2
47	OSCC	Zunge	3
48	OSCC	Zunge	3
49	OSCC	MSH	3
50	OSCC	Mundboden	3
51	OSCC	MSH	3
52	OSCC	MSH	3
53	OSCC	Mundboden	3
54	OSCC	Zunge	3

**Tabelle 2:** Fallaufstellung der untersuchten Präparate der normalen sowie hyperplastischen Mundschleimhaut (MSH) und orales Plattenepithelkarzinom (OSCC)

### **3.1.2. Konventionelle Histologie am Paraffinmaterial**

Operativ gewonnenes Gewebematerial wurde in einer 5%igen gepufferten Formaldehydlösung für 24 Stunden fixiert und danach in Paraffin eingebettet (Histosec–Pastillen 56-58C, Merck, Deutschland, Einbettautomat Hypercentre, Shandon, Deutschland). Zur Erstellung der histologischen Diagnose wurde eine HE – Färbung (Hämalaun-Eosin-Färbung) zur Kern – Plasma – Differenzierung an 4 µm dicken Paraffinschnitten (Rotationsmikrotom RM2045, Leica, Deutschland) durchgeführt. Die Entparaffinierung erfolgte in mehreren Schritten: Xylol 3x15 Minuten, Aceton 4x2 Minuten, Aceton/Aqua dest. (2:1) 2 Minuten, Aqua dest./Aceton (2:1) 2 Minuten und Spülen in Aqua dest.. Anschließend wurde die Kernfärbung in Hämalaun nach Meyer für 20 Minuten durchgeführt, nach Spülen in Aqua dest. erfolgte das Bläuen der Zellkerne unter Leitungswasser (fließend) für 10 Minuten. Danach wurden die Schnitte in alkoholischer Eosin–Y–Lösung (Sigma–Aldrich, Deutschland) für 3 Minuten gefärbt. Es schloss sich eine Spülung der Schnitte in 70%igem Ethanol für 2 x 1–5 Minuten an. Über eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte in Xylol überführt und in Neutralbalsam (Dr. Hollborn&Söhne, Deutschland) eingebettet. Die Diagnosestellung erfolgte durch lichtmikroskopische Bewertung der konventionellen Histologie der Präparate durch einen Pathologen.

### **3.1.3. Kryokonservierung des Gewebematerials**

Nach der operativen Entfernung des Gewebes wurde dieses umgehend in sterile Hanks' – Salzlösung mit einer Temperatur von 4°C überführt. Unmittelbar danach erfolgte die Teilung der Operationspräparate in 5x5x5 mm große Proben und anschließend die Vorbehandlung in Tissue – Tek (Sakura, Niederlande), um eine gefrierbedingte Gewebeschrumpfung zu verhindern. Danach wurden die Proben in stickstoffgekühltem flüssigem Propan schockgefroren. Die Lagerung unter sterilen Bedingungen erfolgte bei einer Temperatur von –70°C (Tiefkühltruhe UF85-460T, Colora Messtechnik, Deutschland).

## 3.2. Immunhistochemie

### 3.2.1. Immunhistochemischer Nachweis der verschiedenen Lamininketten für die Lichtmikroskopie unter Verwendung der indirekten Streptavidin – Biotin – Methode

Die Gefrierschnitte der oralen Plattenepithelkarzinome mit unterschiedlichen Malignitätsgraden sowie normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut wurden mit Aceton bei Raumtemperatur für 8 Minuten fixiert. Die Schnitte wurden nach kurzem Lufttrocknen mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) gespült. Die einzelnen monoklonalen Primärantikörper gegen die verschiedenen Lamininketten (siehe Tabelle 3) wurden mit deren jeweiligen Antikörper – Verdünnungslösungen entsprechend der Tabelle verdünnt. Zur Inhibierung der unspezifischen Interaktion des Detektionssystem mit endogenem Biotin wurden die Schnitte mit dem DAKO® *Biotin Blocking System* (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers vorbehandelt. Pro Schnitt wurden 100 µl Antikörperlösung pipettiert. In der Feuchtkammer inkubierten die Schnitte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Danach folgte die Spülung mit TBS. Für die Detektion des Primärantikörpers kam das DakoReal™– *Detektionskit* (Alkaline Phosphatase/RED, *Rabbit/Mouse*) zur Anwendung. Zunächst wurde pro Schnitt ein Tropfen Lösung aus *Bottle A* (*ChemMate™Link / Biotinylated Secondary Antibodies*) zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang mit TBS folgte die Inkubation mit einem Tropfen aus *Bottle B* (*ChemMate™Streptavidin Alkaline Phosphatase*) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Entwicklungslösung (*ChemMate™Chromogen RED*) bestehend aus Entwicklungspuffer (*Bottle F*), einem Tropfen Levamisol, zur Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase (*Bottle G*), sowie den Chromogenen (*Bottle C, D und E*) wurde auf die Schnitte gegeben. Es folgte die Inkubation für 7 Minuten in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden danach mit Leitungswasser und Aqua dest. gespült. Weiterhin wurden die Schnitte für 1 Minute mit Hämatoxylin – Färbelösung versetzt. Zum Bläuen der Zellkerne wurden die Schnitte unter laufendem Leitungswasser

gespült. Nach Spülen mit Aqua dest. erfolgte das Eindecken der Präparate mit Glycerin/Gelatine. In Tabelle 3 findet sich eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper einschließlich der entsprechenden Verdünnungen (Tabelle 3).

Antigen	Subtyp	Klon	Verdünnung		Referenz
			IHC	IF	
LM – $\alpha$ 2	IgG1	5H2	1: 50000	–	Engvall et al. 1990
LM – $\alpha$ 3	IgG1	BM165	1: 3000	1: 3000	Rousselle et al. 1991
LM – $\alpha$ 4	IgG1	FC10	1: 500	1: 300	Petäjaniemi et al. 2002
LM – $\alpha$ 5	IgG1	4C7	1: 750	1: 150	Tiger et al. 1997
LM – $\beta$ 2	IgG1	C4	1: 200	–	Sanes and Chiu 1983
LM – $\beta$ 3	IgG1	6F12	1: 400	–	Marinkovich et al. 1992
LM – $\gamma$ 2	IgG1	D4B5	1: 3000	1: 100	Mizushima et al. 1998
$\alpha$ SMA	IgG2a	1A4	1: 750	–	Skalli et al. 1986
CD 31	IgG1	JC70A	1: 200	1: 20	Parums et al.1990

**Tabelle 3:** Primärantikörper gegen die untersuchten Lamininketten  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 und  $\gamma$ 2 sowie  $\alpha$ SMA und CD31; (IHC = Immunhistochemie; IF = Immunfluoreszenz)

### 3.2.2. Lichtmikroskopische Bewertung der histologischen und immunhistochemischen Präparate

Die Analyse der immunhistochemischen Präparate erfolgte lichtmikroskopisch unter Verwendung des Mikroskops Axiophot der Firma Carl Zeiss (Deutschland)

mit verschiedenen Objektvergrößerungen (5x, 10x, 20x, 40x). Die Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe desselben Mikroskops unter Verwendung der Software Axiovision Release 3.6.2.. Bewertet wurden für die verschiedenen immunhistochemisch markierten Lamininketten (detektiert mit den Antikörpern der Tabelle 3) in normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut sowie oralen Plattenepithelkarzinomen unterschiedlicher Malignität die Markierung der Basalmembran, die zytoplasmatische Positivität in den Tumorzellen der Invasionsfront, die extrazellulären Depositionen im Stroma der Invasionszone und die Detektierbarkeit in Gefäßstrukturen und deren Umgebung.

Die semiquantitative Bewertung der stromalen Markierungen für die verschiedenen Lamininketten sowie der stromalen  $\alpha$ SMA – Positivität erfolgte entsprechend der in Tabelle 4 dargestellten Scoring – Systeme (Tabelle 4).

Score	0	1	2	3
<b>Lamininketten</b>	keine stromale Markierung	wenige stromale Markierungen	einige Areale ausgeprägter stromaler Markierungen	Stroma überwiegend markiert
<b><math>\alpha</math>SMA</b>	keine $\alpha$ SMA Markierung	wenige $\alpha$ SMA pos. Areale	partiell ausgeprägte Markierung	überwiegend $\alpha$ SMA positiv

**Tabelle 4:** Semiquantitative Bewertungskriterien zur Auswertung der stromalen Depositionen für die verschiedenen Lamininketten sowie der  $\alpha$ SMA – Positivität im Stroma

### 3.2.3. Statistik – semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse

Eine Korrelation der Ergebnisse der semiquantitativen Bewertung der stromalen Lamininkettendepositionen sowie des Ausmaßes  $\alpha$ SMA–positiver Zellen im Stroma der Invasionsfront (siehe oben beschriebenes Scoring – System, Tabelle 4) erfolgte zum Malignitätsgrad und zur  $\alpha$ SMA – Expression. Innerhalb der jeweils zu vergleichenden Gruppen wurde der Mittelwert aus den semiquantitativen Einzelbewertungen der Präparate gebildet und mit der entsprechenden Standardabweichung graphisch dargestellt. Die statistische

Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels Kruskal – Wallis – Test (nichtparametrischer Test zum Vergleich von mehr als zwei Stichproben) unter Verwendung der Software SPSS 13 (Microsoft) überprüft.

#### **3.2.4. Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen der Lamininketten $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$ und $\gamma 2$ mit dem Endothelzellmarker CD 31**

Um das Verhältnis der für die verschiedenen Lamininketten positiven Gefäße zur Gesamtanzahl der vorhandenen Tumorgefäße zu untersuchen, erfolgte die Etablierung eines Immunfluoreszenzdoppelmarkierungsprotokolls für die Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  in Kombination mit dem Endothelzellmarker CD31 an ausgewählten Fällen von normaler (Fallnr. 1, 2) und hyperplastischer (Fallnr. 6, 8) Mundschleimhaut, gut differenzierten (G1) (Fallnr. 14, 18, 20), mäßig differenzierten (G2) (Fallnr. 23, 29, 43) sowie schlecht differenzierten (G3) (Fallnr. 48, 52, 54) oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC). Bevor die verwendeten Gewebeschnitte mit den jeweiligen Maus – Primärantikörpern (siehe Tabelle 3) inkubiert wurden, erfolgte ein Waschen mit Tris/Tween für 10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit Tris/Tween konnte am folgenden Tag Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 zugegeben werden. Dieser entspricht einem Cy3 – konjugierten Ziege – anti – Maus – Immunglobulin (Dianova, Hamburg, Germany). Die Inkubationszeit dieses Sekundärantikörpers betrug 45 Minuten. Nach einem weiteren Waschvorgang mit Tris/Tween wurde der biotinylierte Primärantikörper gegen CD 31 in der Verdünnung 1:20 zugegeben und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Biotinylierung dieses Antikörpers erfolgte unter Verwendung des *Animal Research Kit* (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) entsprechend der Anweisungen des Herstellers. Die Detektion dieses Antikörpers wurde durch eine Inkubation mit FITC – konjugiertem Streptavidin für 45 Minuten bei Raumtemperatur unter Verdunklung möglich (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany).

### **3.2.5. Analyse der Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen mittels konfokaler *Laser Scanning* – Mikroskopie**

Die Auswertung der Immunfluoreszenzmarkierungen erfolgte mittels konfokaler *Laser Scanning* – Mikroskopie unter Einsatz des *Laser Scanning* Mikroskops LSM 510 der Firma Carl Zeiss (Zeiss, Jena, Deutschland). Durch Verwendung spezieller Laser/Filter – Kombinationen wurden Mehrkanalbilder aufgenommen und überlagert. Ein Argon(488nm) – und ein HeNe(543nm) – Laser wurden mit den Lichtfiltern BP 505-530 und LP 560 kombiniert. Die Fluoreszenzemissionen wurden simultan detektiert und ein 2 – Kanal – Bild generiert. Hierbei stellt Kanal 1 die rote Fluoreszenz des Fluorochroms Cy3 und Kanal 2 die grüne Fluoreszenz des Fluorochroms FITC dar (Manders et al. 1992). Die entsprechenden Pixelinformationen der beiden Kanäle können kombiniert werden und so ist die Detektion überlappender Signale möglich (gelbe Mischfarbe). Ein möglicherweise auftretendes Signalübersprechen („*crosstalk*“) wurde durch Verwendung des sogenannten *Multitracking* – Verfahrens minimiert, wobei die Definition von Beleuchtungsparametern und Detektionseinstellungen für einen Farbstoff als sogenannte Tracks erfolgt. Mehrere dieser Tracks werden gespeichert und können dann bei der Generierung von Multifluoreszenzbildern automatisch nacheinander ausgeführt werden, wodurch die Farbstoffe selektiv angeregt und detektiert werden.

### **3.2.6. Statistik – semiquantitative Auswertung der Ergebnisse der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung**

Die Immunfluoreszenzdoppelmarkierung der Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  in Kombination mit CD31 an den 13 ausgewählten Fällen (siehe 3.2.4.) wurde unter Nutzung des *Laser Scanning* Mikroskops LSM 510 (Zeiss, Jena, Deutschland) anhand dreier repräsentativer Gesichtsfelder im Bereich der Invasionsfront im Präparat analysiert. Dabei wurde der Anteil der für die jeweilige Lamininkette positiven Gefäße an der Gesamtheit der detektierbaren Gefäßstrukturen bestimmt und ein entsprechender Mittelwert für jeden Fall und jede zu vergleichende Gruppe berechnet. Die Überprüfung auf statistische Signifikanz der Unterschiede in der Gefäßpositivität erfolgte mittels Kruskal – Wallis – Test unter Verwendung der Software SPSS Version 13 (Microsoft).



### **3.3. RT – PCR**

#### **3.3.1. Mikrodissektion**

Das Gewebematerial für die zur Mikrodissektion bereitgestellten Tumor – und Stromazellen stammen aus einem G2 – OSCC–Präparat (Fallnummer 26). Mithilfe des Mikrotom – Kryostaten HM 560 (Firma Micron, Deutschland) wurden 6 Schnitte des Tumorpräparates hergestellt und auf UV – sterilisierte, membranbeschichtete Objektträger überführt. Diese wurden für 1 Minute in absolutem Ethanol fixiert. Die anschließende Rehydrierung erfolgte durch Schwenken in einer absteigenden Ethanol – DEPC – Wasser – Reihe (95% – 70% – 50% – Ethanol – DEPC – Wasser). Für 15 Sekunden wurde mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt und durch 30 Sekunden Spülen mit Leitungswasser die Zellkerne gebläut. Nach der Färbung mit Eosin schließt sich eine Dehydrierung mit aufsteigender Ethanolreihe (50% – 70% – 95%) an. Der Färbeprozess endet mit dem Schwenken in Xylol für 1 Minute. Dem Herausschneiden der jeweils 5000 Stroma – und Tumorzellen durch das Laser – Mikrodissektionsgerät (Firma P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH, Deutschland) geht eine Lufttrocknung für 10 Minuten voraus.

#### **3.3.2. RNA – Extraktion mittels *RNeasy Microkit***

Die mikrodissezierten Schnittareale wurden in 350 µl RLT-Puffer/ $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen. Es folgte dann die RNA – Extraktion aus den gewonnenen Zellen mittels *RNeasy Microkit* entsprechend dem Protokoll des Herstellers (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). Dazu wurden die Proben mit 5 µl einer *carrier* RNA Lösung (4 ng/ $\mu$ l) versetzt. Die Herstellung der *carrier* RNA Arbeitslösung erfolgte durch Zugabe von 5 µl *stock solution* (310 ng/ $\mu$ l) auf 34 µl RLT – Puffer. Daraus wurden 6 µl entnommen und zu 54 µl RLT – Puffer gegeben. Zum Lysat wurden dann 350 µl 70%iges Ethanol hinzugegeben und dies durch Pipettieren vermischt. Die Probe wurde auf einen *RNeasy MinElute Spin Column* gegeben, welche in ein 2 ml *tube* überführt wurde. Anschließend folgte die Zentrifugation bei 10000 rpm für 30 Sekunden. Hierdurch bindet die vorhandene RNA an die *RNeasy* – Säulenmatrix, die danach mit 350 µl RW1 – Puffer gewaschen wurde. Ein Zwischenschritt beinhaltete die Vorbereitung der

DNase. Hierzu wurden 70  $\mu$ l RDD – Puffer und 10  $\mu$ l DNase je Ansatz hergestellt. Von dieser DNase kommen 80  $\mu$ l auf die Säulenmatrix, die für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 350  $\mu$ l RW1 – Puffer und die Zentrifugation mit 10000 rpm für 15 Sekunden. Nach Verwerfen des Zentrifugates erfolgte die Gabe von 500  $\mu$ l RPE – Puffer auf die Säule und eine Zentrifugation mit 10000 rpm für 2 Minuten. Das entstandene Zentrifugat wurde verworfen und nochmals für 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Elution der gebundenen RNA erfolgte mit 14  $\mu$ l RNase freiem Wasser (1 Minute Inkubation auf der Säulenmatrix, dann Zentrifugation bei 10000 rpm). Die Proben wurden bei –80°C eingefroren. Vor Weiterverwendung der RNA – Proben erfolgte eine Überprüfung der RNA – Qualität mittels *Agilent Bioanalyzer* 2100. Hier wurde unter Verwendung des *Agilent RNA 6000 Pico Assays* (Agilent Technologies, Deutschland) auf dem RNA 6000 Pico Chip eine miniaturisierte Elektrophorese mit Fluoreszenzdetektion durchgeführt, die eine qualifizierte Beurteilung der RNA – Qualität ermöglicht.

### 3.3.3. RT – PCR

Mit der *single tube* RT – PCR (QIAGEN *OneStep* RT–PCR Kit) wurde die mRNA für die Lamininketten  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5 und  $\gamma$ 2 sowie  $\beta$ -Aktin als *House – Keeping* – Gen nachgewiesen. Tabelle 5 gibt Auskunft über die verwendeten Primer (Tabelle 5).

Primer	Sequenz	Annealing– Temperatur	Referenz
$\alpha$ 3 / F $\alpha$ 3 / R	5'-CCC GGT CAA AGT CAA CTG CA-3' 5'-GGC GTT GCC ATA GTA GCC CT-3'	58 °C	Akutsu et al. 2005
$\alpha$ 4 / F $\alpha$ 4 / R	5'-AAG TCC GTC CCA GAA GCA-3' 5'-CCA AGC GTG GTG TCA GTA G-3'	57 °C	Häger et al. 2005
$\alpha$ 5 / F $\alpha$ 5 / R	5'-CAG CTC CTG AGG ACT GAA GTG-3' 5'-CCA CTG AAG TTG TAA ATG GTG C-3'	57 °C	Häger et al. 2005
$\gamma$ 2 / F $\gamma$ 2 / R	5'-AAA GCC ACG TTG AGT CAG CC-3' 5'-TCT TCC ACC TGA AAG GAC TG-3'	57 °C	Giannelli et al. 2005
$\beta$ -Aktin F (1) $\beta$ -Aktin R (2)	5'-CCT TCC TTC CTG GGC ATG-3' 5'-GAG CAA TGA TCT TGA TCT TC-3'	54 °C	QIAGEN, Germany

**Tabelle 5:** In der RT – PCR verwendete Primer für die Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  sowie für  $\beta$ -Aktin

Für die RT – PCR wurden für jeden Ansatz 48  $\mu$ l Mastermix (Tabelle 6) und 2  $\mu$ l der entsprechenden RNA bzw. 2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O für die Wasser–Negativkontrolle pipettiert. Unter Verwendung des PCR – Automaten Advanced Primus 25 (Peqlab) erfolgte die PCR–Analyse.

Komponente	Volumen je 50 $\mu$ l Ansatz	Endkonzentration	
RNase–freies H <sub>2</sub> O	31 $\mu$ l	variabel	
5xPuffer	10 $\mu$ l	1 x	
dNTP's	2,0 $\mu$ l	400 $\mu$ M für jedes dNTP	
Primer	Primer F	1,5 $\mu$ l	0,6 $\mu$ M
	Primer R	1,5 $\mu$ l	0,6 $\mu$ M
Enzym	2,0 $\mu$ l	–	

PCR – Programm:

1 Zyklus	50 °C	30 min	
	95 °C	15 min	
40 Zyklen	94 °C	1 min	
jew. <i>Annealing</i> –Temp.		1 min	(siehe Tab. 5)
	72 °C	1 min	
1 Zyklus	72 °C	10 min	

**Tabelle 6:** RT–PCR–Mastermix und PCR–Bedingungen für den Nachweis der mRNA für die Lamininketten

### 3.3.4. Agarose–Gel–Elektrophorese

Die PCR–Fragmente wurden durch Elektrophorese in 2%igem Agarosegel in TAE–Puffer (3.5.5) bei 80 V unter Sichtkontrolle aufgetrennt. Es wurden 2  $\mu$ l 6x–Puffer mit 10  $\mu$ l PCR–Ansatz versetzt und in die Geltaschen überführt. Eine 100 bp–DNA–Leiter (Advanced Biotechnologies Ltd., Großbritannien) wurde als Standard mitgeführt.

### **3.4. Verzeichnis der verwendeten Puffer und Lösungen**

#### **3.4.1. Konventionelle Histologie**

Hämalaun nach Mayer

- 0,5 g Hämatoxylin
- 0,1 g Natriumjodat
- 25 g Aluminiumkaliumsulfat–Dodecahydrat
- 25 g Chloralhydrat
- 0,5 g Zitronensäure
- auf 500 ml Aqua dest. 14 Tage reifen lassen

Eosin

Eosin Fertiglösung der Firma SIGMA

#### **3.4.3. Puffer und Lösungen für das DAKO ChemMate™ Detektionskit**

primärer Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 3)

sekundärer biotinylierter Antikörper

Chromogensubstrat (Neufuchsin) „CHROM“ bestehend aus:

- AP-Substrat (Streptavidin + alkalische Phosphatase)
- Chromogen Red 1
- Chromogen Red 2
- Chromogen Red 3
- Levamisol (zur Blockierung endogener alkalischer Phosphatasen)

#### **3.4.4. Puffer und Lösungen für das *Animal Research Kit* (ARK, Dako)**

Primärer Antikörper: siehe Tabelle 3

Peroxidase – Block:

Biotinylierungsreagenz: modifiziertes biotinyliertes anti-Maus-Ig

Blockierungslösung: normales Mausserum

Streptavidin – FITC: FITC (Chromogen) – markiertes Streptavidin

Verwendung der Substanzen entsprechend Protokoll des Herstellers

### 3.4.5. Gele und Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer

2 M TRIS Base

0,1 M EDTA

1 M Essigsäure

2% Agarose-Gel

5 g Agarose

250 ml 1 x TAE-Puffer

TBS-Puffer 0,05M

6,05g Tris/Base

8,76 g NaCl

800 ml Aqua dest.

pH 7,5 adjustieren, dann auf 1l Aqua dest. auffüllen

TBS-Tween 0,1%

0,1% Tween20 in TBS (0,05M) lösen

---

## 4 Ergebnisse

### 4.1. Immunhistochemische Analyse der stromalen

#### Depositionsmuster der Lamininketten $\alpha 2$ , $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$ , $\beta 2$ , $\beta 3$ und $\gamma 2$

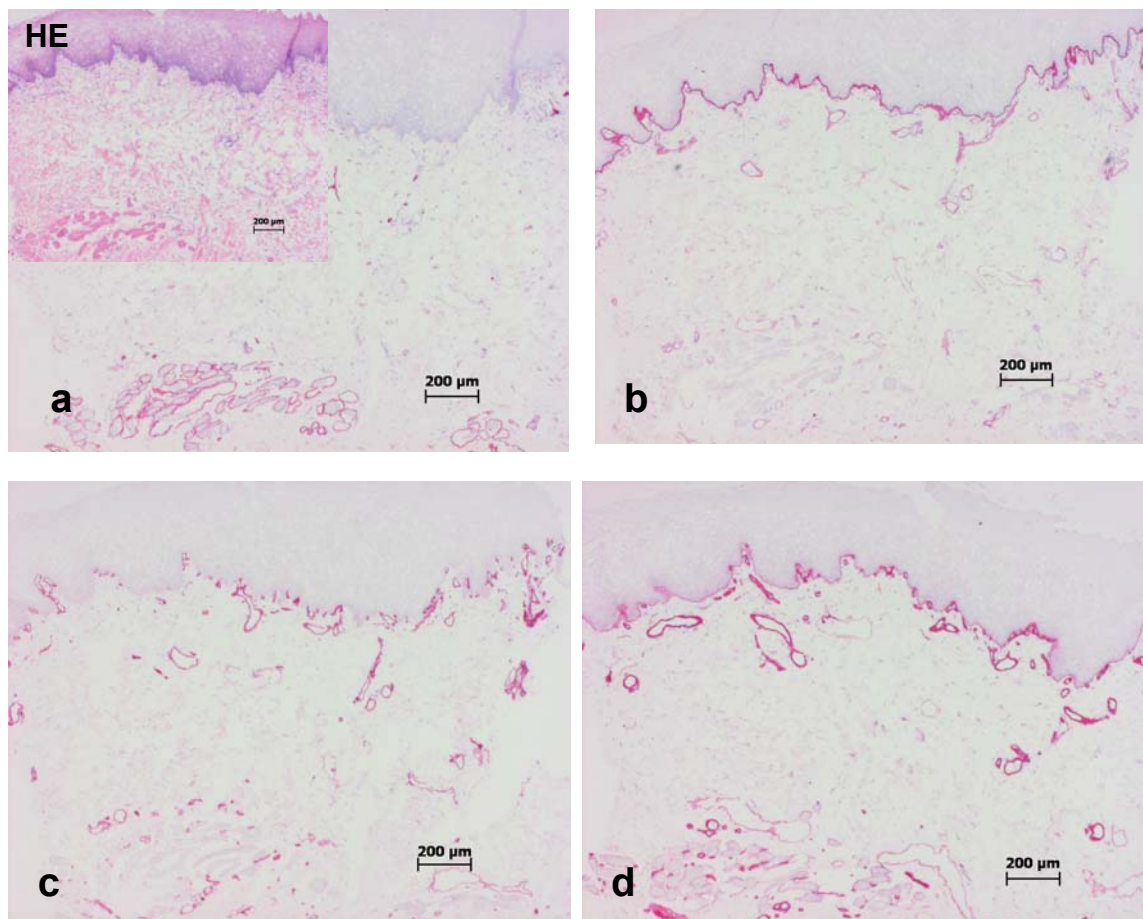
Die immunhistochemische Analyse der stromalen Depositionsmuster der verschiedenen Lamininketten erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 3 genannten Antikörper nach oben beschriebenem Protokoll. Um die histomorphologischen Unterschiede der stromalen Lamininketten-Deposition in der Tumorinvasionsfront des oralen Plattenepithelkarzinoms zu untersuchen, wurden Karzinome verschiedenen Malignitätsgrades im Vergleich zu normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut in die Analyse einbezogen. Es wurden im Einzelnen die Basalmembranmarkierung, die stromale Deposition und die Markierung tumorassoziierter Gefäßstrukturen der Tumorinvasionsfront qualitativ (und partiell semiquantitativ) bewertet.

##### 4.1.1. Expressions- und Verteilungsmuster in der normalen Mundschleimhaut

Im histologischen Präparat der gesunden Mundschleimhaut zeigt die Laminin- $\alpha 2$ -kette eine deutliche räumliche Assoziation zu Nerven- und Muskelstrukturen. Im Bereich der Basalmembran lässt sich die  $\alpha 2$ -Kette hingegen nicht detektieren (Abb. 3 a). In der submukösen Fibrose, die als Präkanzerose gilt, sind eine diskontinuierliche Anfärbung der Basalmembran und eine schwache Deposition um Gefäßstrukturen zu beobachten.

Der Antikörper gegen die Laminin- $\alpha 3$ -kette zeigt eine deutliche, kontinuierliche Markierung der Basalmembranregion sowie eine scharf umschriebene Dekoration von Gefäßstrukturen in der gesunden Mundschleimhaut (Abb. 3 b). Demgegenüber lässt sich die Laminin- $\alpha 4$ -kette in der Basalmembran nicht nachweisen, markiert aber insbesondere muskelassoziiert auftretende Mikrogefäßstrukturen (Abb.3 c). Für die Laminin- $\alpha 5$ -kette kann eine deutliche Detektierbarkeit sowohl in der Basalmembranregion, als auch in

Gefäßstrukturen beobachtet werden (Abb. 3 d). Für alle untersuchten Laminin- $\alpha$ -ketten zeigen sich keine extrazellulären Depositionen im subepithelialen Stroma (Abb.3 a–d).



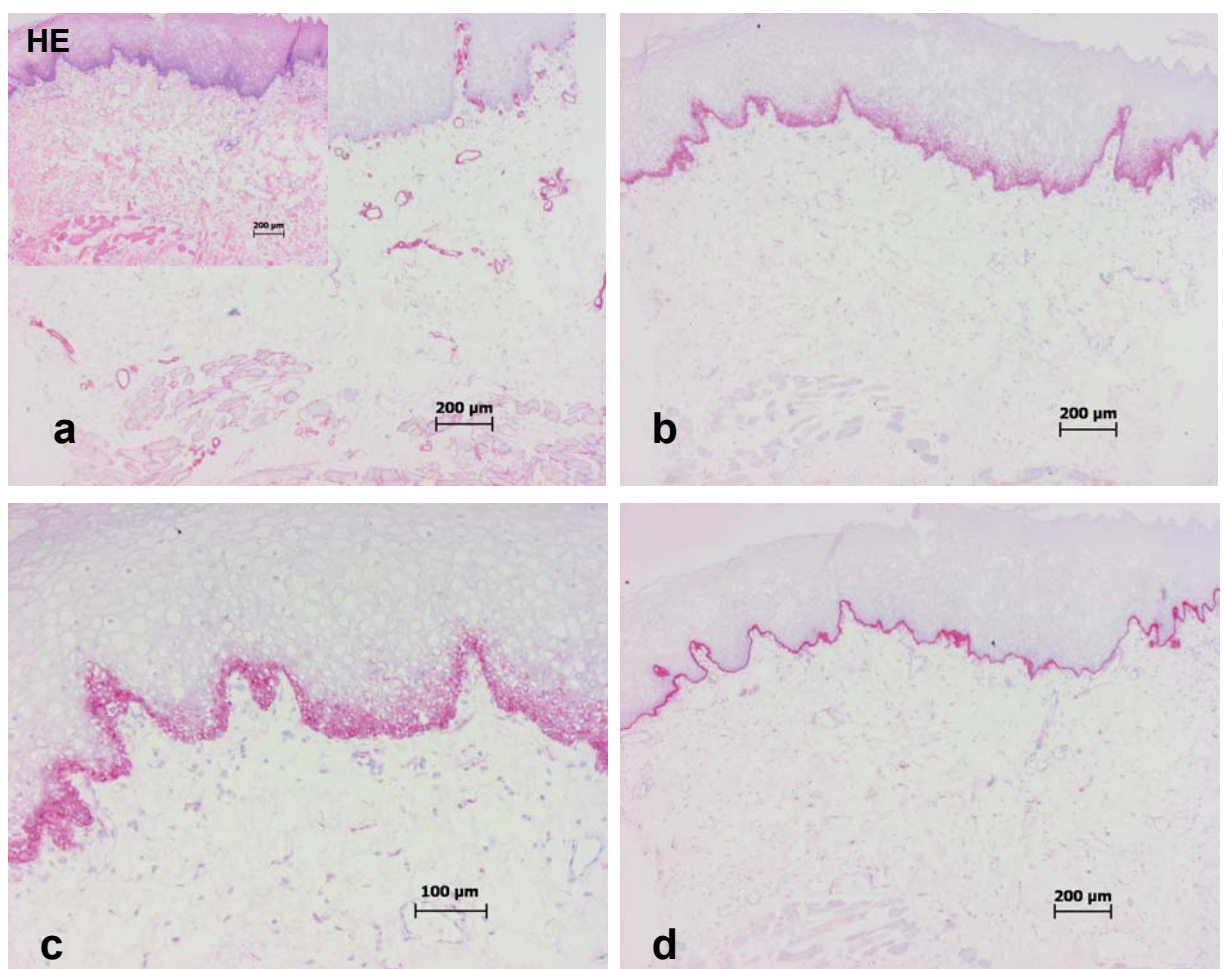
**Abbildung 3:**

**Immunhistochemische Verteilung der Laminin -  $\alpha$  - ketten in der normalen Mundschleimhaut**

Vergleichende Analyse der Verteilung der Lamininketten  $\alpha$ 2 (a),  $\alpha$ 3 (b),  $\alpha$ 4 (c) und  $\alpha$ 5 (d) in der Basalmembran, im Bereich von Gefäßstrukturen und im subepithelialen Bindegewebe (Maßstab balken = 200  $\mu$ m)

Die Laminin- $\beta$ 2-Kette zeigt eine Anfärbbarkeit im Bereich von Gefäßstrukturen, die Basalmembran und das subepitheliale Bindegewebe dagegen sind nicht markiert. Eine Ausnahme stellt das Präparat einer fibrösen Präkanzerose mit einer deutlichen Markierung der Basalmembran dar (Abb.4 a). Different hierzu

lässt sich für die Laminin- $\beta$ 3-kette eine Markierung basal gelegener Keratinozyten beobachten, eine kontinuierliche Basalmembranmarkierung oder eine extrazelluläre Deposition im Stroma besteht nicht (Abb.4 b und c). Klare Verteilungsmuster kommen unter Verwendung des Antikörpers gegen die Laminin- $\gamma$ 2-kette zur Darstellung. Die Basalmembran ist kontinuierlich und deutlich angefärbt, Stroma oder Gefäßstrukturen bleiben in der gesunden Mundschleimhaut negativ. Vereinzelt kommen subepitheliale Zellen mit einer zytoplasmatischen Positivität für diese Lamininkette vor (Abb. 4 d).



**Abbildung 4:**

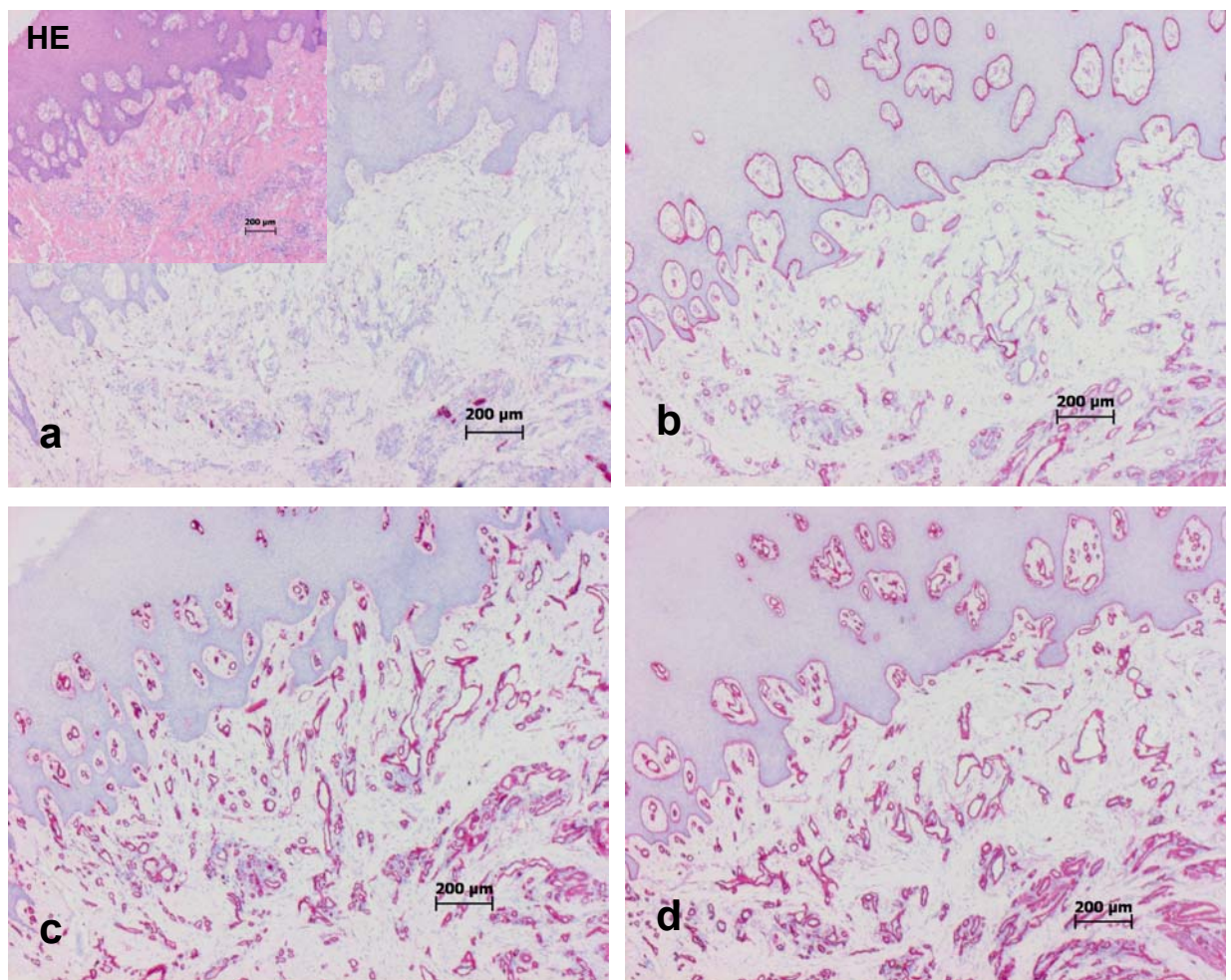
**Immunhistochemische Verteilung der Lamininketten  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 und  $\gamma$ 2 in der normalen Mundschleimhaut**

Vergleichende Analyse der Verteilung der Lamininketten  $\beta$ 2 (a),  $\beta$ 3 (b),  $\beta$ 3 (c, x 100) und  $\gamma$ 2 (d) in der Basalmembran, im Bereich von Gefäßstrukturen und im subepithelialen Bindegewebe (Maßstab balken = 200  $\mu$ m)



#### **4.1.2. Expressions- und Verteilungsmuster in der hyperplastischen Mundschleimhaut**

Im Gegensatz zur normalen Mundschleimhaut zeigt sich in der hyperplastischen Mundschleimhaut immunhistochemisch eine diskontinuierliche Anfärbarkeit der Basalmembran für die Laminin- $\alpha$ 2-Kette sowie eine gelegentliche zarte Stromapositivität. Im Bereich von Nerven- und Muskelstrukturen stellen sich für diese Kette ähnliche Expressions- und Depositionsmuster wie in der normalen Mundschleimhaut dar (Abb. 5a). Die Laminin- $\alpha$ 3-Kette lässt sich in der Basalmembran und im Bereich von Gefäßstrukturen, insbesondere in größeren und muskelassoziierten Gefäßen, detektieren (Abb. 5b). Auch die Laminin- $\alpha$ 4-Kette kann in Gefäßstrukturen angefärbt werden. Es heben sich aber bei der Detektion der  $\alpha$ 4-Kette im Gegensatz zur  $\alpha$ 3-Kette vornehmlich kleinere Gefäße strukturell hervor. Die Markierung der  $\alpha$ 4-Kette in der Basalmembran stellt sich nur punktuell oder in Regionen des Übergangs von hyperplastischer zu dysplastischer Mundschleimhaut dar (Abb. 5c). Die Lamininkette  $\alpha$ 5 ist in der Hyperplasie sowohl in Basalmembran- als auch in Gefäßstrukturen vertreten. Eine stromale Deposition ist hier nicht erkennbar (Abb. 5d).



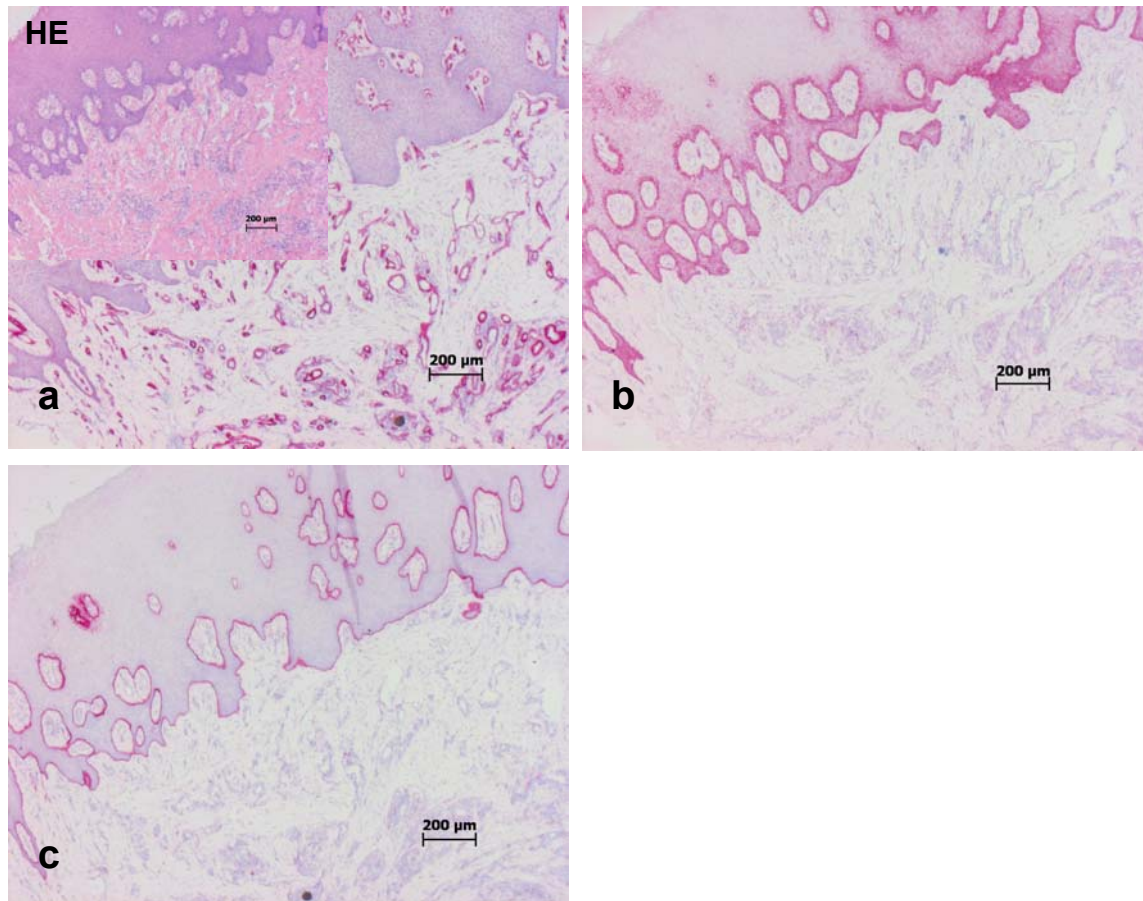
**Abbildung 5:**

**Immunhistochemische Verteilung der Laminin –  $\alpha$  – ketten in der hyperplastischen Mundschleimhaut**

Vergleichende Analyse der Verteilung der Lamininketten  $\alpha 2$  (a),  $\alpha 3$  (b),  $\alpha 4$  (c) und  $\alpha 5$  (d) in der Basalmembran, im Bereich von Gefäßstrukturen und im subepithelialen Bindegewebe (Maßstab balken = 200  $\mu\text{m}$ )

Für die Laminin- $\beta 2$ -kette nimmt die immunhistochemische Detektierbarkeit grundsätzlich mit dem Grad der Hyperplasie zu und es zeigen sich diskontinuierliche Markierungen der Basalmembranen. Im Besonderen stellen sich epithelnahe Gefäßstrukturen dar (Abb. 6a). Bezüglich der Laminin- $\beta 3$ -kette ergibt die vergleichende Analyse der immunhistochemischen Detektierbarkeit keine signifikanten Unterschiede zwischen normaler Mundschleimhaut und Hyperplasie: die  $\beta 3$ -Kette lässt sich in basalen und mittelständigen Keratinozyten darstellen (Abb. 6b). Auch die Laminin- $\gamma 2$ -kette

ist, wie bereits für die normale Mundschleimhaut beschrieben, in der Basalmembran zu detektieren, in Gefäßstrukturen oder im Stroma finden sich keine Markierungen (Abb. 6c).



**Abbildung 6:**

**Immunhistochemische Verteilung der Lamininketten  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 2$  in der hyperplastischen Mundschleimhaut**

Vergleichende Analyse der Verteilung der Lamininketten  $\beta 2$  (a),  $\beta 3$  (b) und  $\gamma 2$  (c) in der Basalmembran, im Bereich von Gefäßstrukturen und im subepithelialen Bindegewebe (Maßstab Balken = 200  $\mu\text{m}$ )

**4.1.3. Expressions- und Verteilungsmuster im oralen Plattenepithelkarzinom (OSCC) – vergleichende Analyse verschiedener Malignitätsgrade**

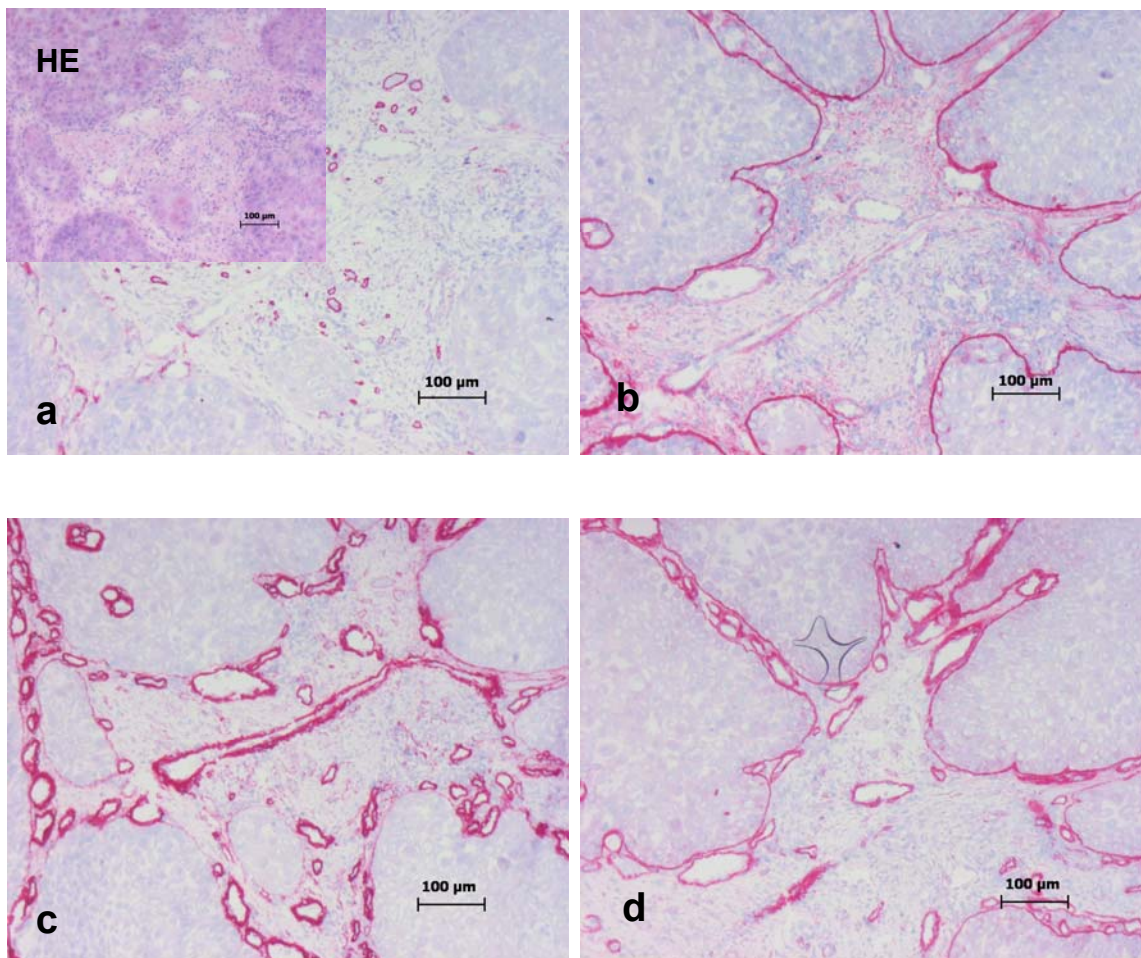
Entsprechend dem Malignitätsgrading für orale Plattenepithelkarzinome nach Bryne wurden die in dieser Arbeit untersuchten Tumorpräparate den

---

Gradingstufen G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert) und G3 (schlecht differenziert) zugeordnet. Es erfolgte dann die vergleichende immunhistochemische Analyse der Expressions- und Depositionsmuster der verschiedenen Lamininketten.

#### *4.1.3.1 Expressions- und Verteilungsmuster in gut differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen (G1)*

In oralen Plattenepithelkarzinomen einer guten Differenzierung zeigt sich für die Laminin- $\alpha$ 2-Kette wiederum eine charakteristische Deposition in Assoziation zu Nerven- und Muskelstrukturen sowie eine partielle Reexpression im Bereich der Basalmembran, wie sie bereits in der Hyperplasie / Dysplasie in geringerer Intensität zu beobachten war (Abb. 7a). In einigen der bewerteten Präparate lässt sich eine räumliche Assoziation dieser Basalmembranmarkierungen zu Anhäufungen von Entzündungszellen detektieren. Die Laminin- $\alpha$ 3-Kette färbt wiederum Basalmembran- und Gefäßstrukturen an. Die Basalmembranmarkierungen in G1-Tumoren sind überwiegend kontinuierlich. Es fällt weiterhin auf, dass in Arealen mit geringem infiltrativen Wachstum eine gering vorhandene stromale Deposition der  $\alpha$ 3-Kette vorliegt. Mit Zunahme des infiltrativen Wachstums lässt sich auch eine deutlich vermehrte vor allem partielle Stromadeposition dieser Kette detektieren (Abb. 7b). Die Laminin- $\alpha$ 4-Kette markiert sehr intensiv vaskuläre Strukturen und ist somit ein deutlicher Gefäßmarker in gut differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen. Es zeigt sich darüber hinaus eine beginnende partielle Reexpression in Basalmembranstrukturen und stromalen Arealen (Abb. 7c). Die Laminin- $\alpha$ 5-Kette markiert ohne wesentliche Unterschiede zur normalen und hyperplastischen / dysplastischen Mundschleimhaut auch im Karzinom Basalmembran- und Gefäßstrukturen. Gelegentlich ist eine schwache stromale Deposition zu erkennen, welches teilweise entzündungsassoziiert in Erscheinung tritt (Abb. 7d).



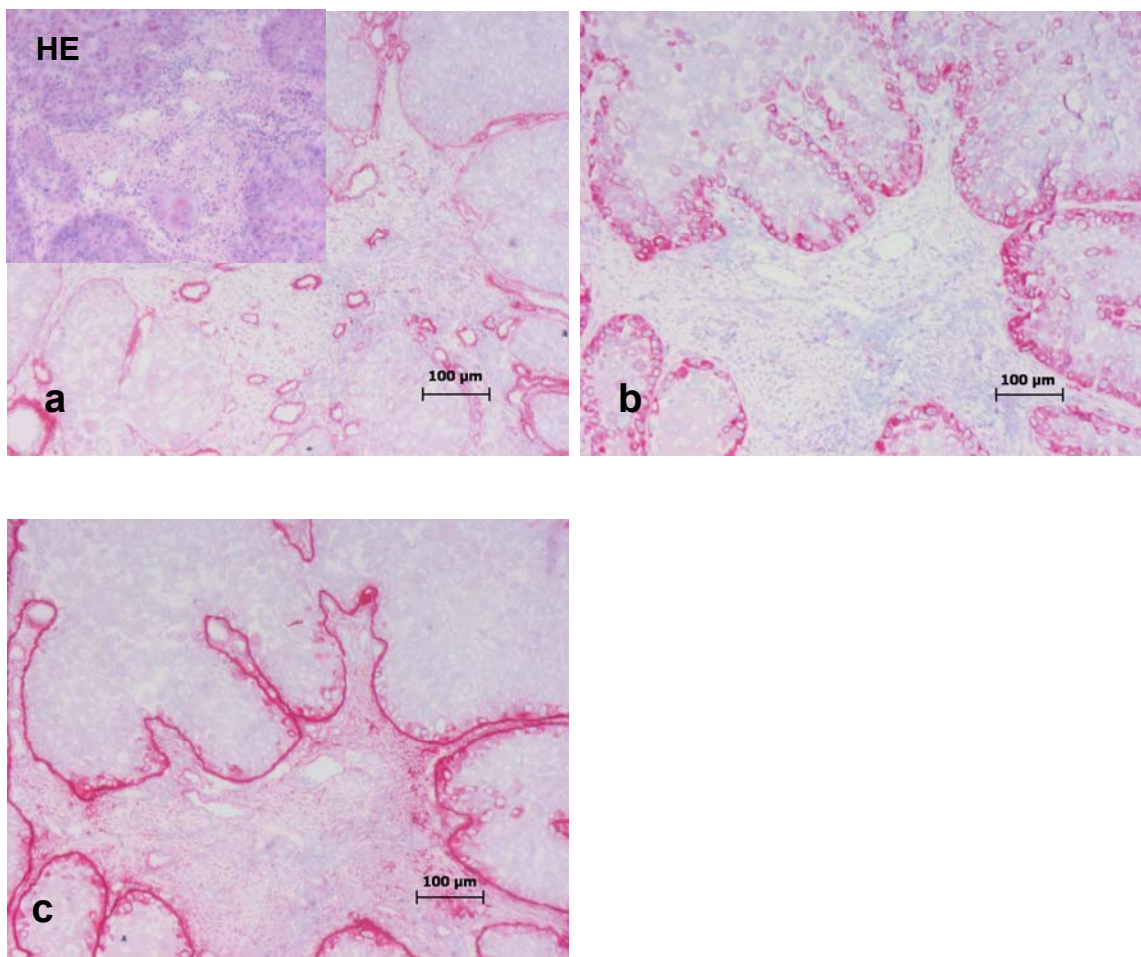
**Abbildung 7:**

**Immunhistochemische Verteilung der Laminin- $\alpha$ -ketten in gut differenzierten (G1) oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC)**

Vergleichende Analyse der Verteilung der Lamininketten  $\alpha 2$  (a),  $\alpha 3$  (b),  $\alpha 4$  (c) und  $\alpha 5$  (d) in der Basalmembran, im Bereich von Gefäßstrukturen und im subepithelialen Bindegewebe (Maßstab Balken = 100  $\mu\text{m}$ )

In Tumorgewebe mit hohem Differenzierungsgrad (G1) sind bei Betrachtung der Markierungen für die Laminin- $\beta 2$ -kette erste Veränderungen im Vergleich zu normaler bzw. hyperplastischer Mundschleimhaut zu beobachten. Neben den beschriebenen Gefäßmarkierungen zeigt sich im G1-Tumor eine stromale Deposition, welche wiederum in räumlicher Assoziation zu Entzündungszellen zu detektieren ist. Weiterhin lässt sich gelegentliche eine diskontinuierliche Anfärbbarkeit der Basalmembran beobachten (Abb. 8a). Die Laminin- $\beta 3$ -kette färbt sich sehr deutlich im Zytoplasma der Tumorzellen an, wohingegen für

diese Kette keine stromale Deposition zu sehen ist. Wie bereits für normale und hyperplastische Mundschleimhaut beschrieben, lässt sich die  $\beta 3$ -Kette in gleicher Weise besonders in basalen Keratinozyten darstellen, eine Basalmembranmarkierung findet sich nicht (Abb. 8b). Der Antikörper gegen die Laminin- $\gamma 2$ -kette bringt eine intensive kontinuierliche Basalmembranmarkierung zur Darstellung. Weiterhin fällt eine deutliche stromale Deposition mit besonderer Ausprägung in perivaskulären Arealen auf, wodurch die tumorassoziiert neu gebildeten Gefäßstrukturen hervorgehoben werden. Die Anzahl der vorhandenen tumorassoziierten Gefäße scheint mit dem Ausmaß der Stromadeposition der  $\gamma 2$ -Kette in Beziehung zu stehen (Abb. 8c).



**Abbildung 8:**

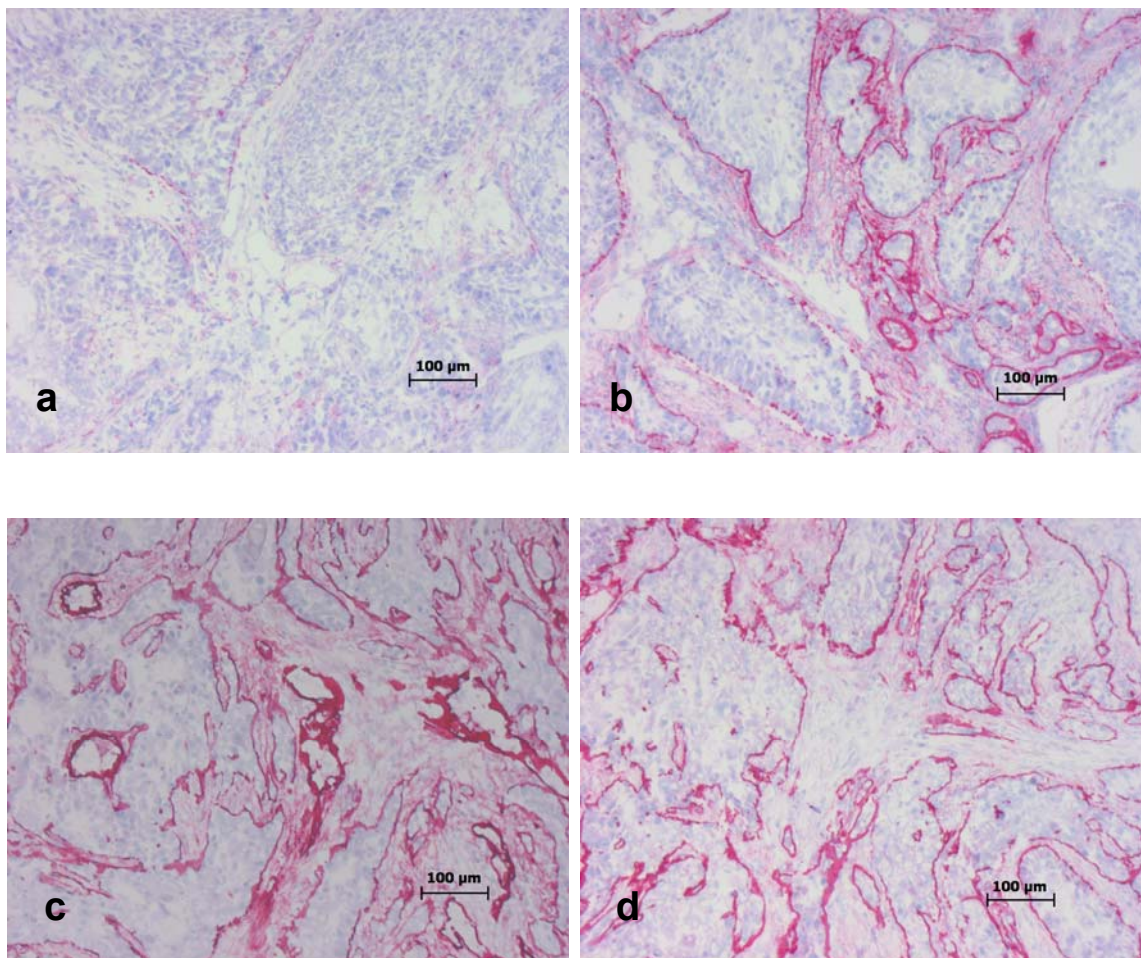
**Immunhistochemische Verteilung der Lamininketten  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 2$  in gut differenzierten (G1) oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC)**

---

Vergleichende Analyse der Verteilung der Lamininketten  $\beta 2$  (a),  $\beta 3$  (b) und  $\gamma 2$  (c) in der Basalmembran, im Bereich von Gefäßstrukturen und im subepithelialen Bindegewebe (Maßstab balken = 100  $\mu\text{m}$ )

#### *4.1.3.2 Expressions- und Verteilungsmuster in mäßig differenzierten (G2) oralen Plattenepithelkarzinomen*

Auch in mäßig differenzierten (G2) oralen Plattenepithelkarzinomen zeigen sich bei Betrachtung der Markierungen für die Laminin- $\alpha 2$ -kette die bereits beschriebenen Nerven- und Muskelstrukturen. Darüber hinaus werden, wenn vorhanden, Speicheldrüsen markiert. Die Basalmembran ist nicht grundsätzlich erkennbar, nur selten lassen sich diskontinuierlich Basalmembranstrukturen abgrenzen. Auch eine geringfügige stromale Deposition ist eher selten zu detektieren (Abb. 9a). Die Laminin- $\alpha 3$ -kette kann in G2-Tumoren meist kontinuierlich in der Basalmembran nachgewiesen werden. Außerdem findet sich regelmäßig eine stromale Deposition, welche sich jedoch in ihrem Ausmaß erheblich unterscheidet (Abb. 9b). Im Vergleich zu G1-Tumoren zeigt sich in G2-Tumoren eine deutliche Zunahme der Basalmembranmarkierungen bei Detektion der Laminin- $\alpha 4$ -kette, welche sowohl kontinuierlich als auch diskontinuierlich zur Darstellung kommen. Auch die stromale Deposition der  $\alpha 4$ -Kette ist hier deutlich stärker ausgeprägt als in G1-Tumoren. Unverändert ist eine starke Markierung von Gefäßstrukturen zu erkennen (Abb. 9c). Die Laminin- $\alpha 5$ -kette ist in G2-Tumoren sehr deutlich in räumlicher Assoziation zu Gefäßstrukturen zu detektieren. Es findet sich weiterhin eher eine geringfügig ausgeprägte stromale Deposition. Im G2-Karzinom, besonders in der Tumorinvasionsfront sind erste fokale Verluste oder diskontinuierliche Anfärbungen der Basalmembran zu beobachten. (Abb. 9d).



**Abbildung 9:**

**Immunhistochemische Verteilung der Laminin –  $\alpha$  – ketten in mäßig differenzierten (G2) oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC)**

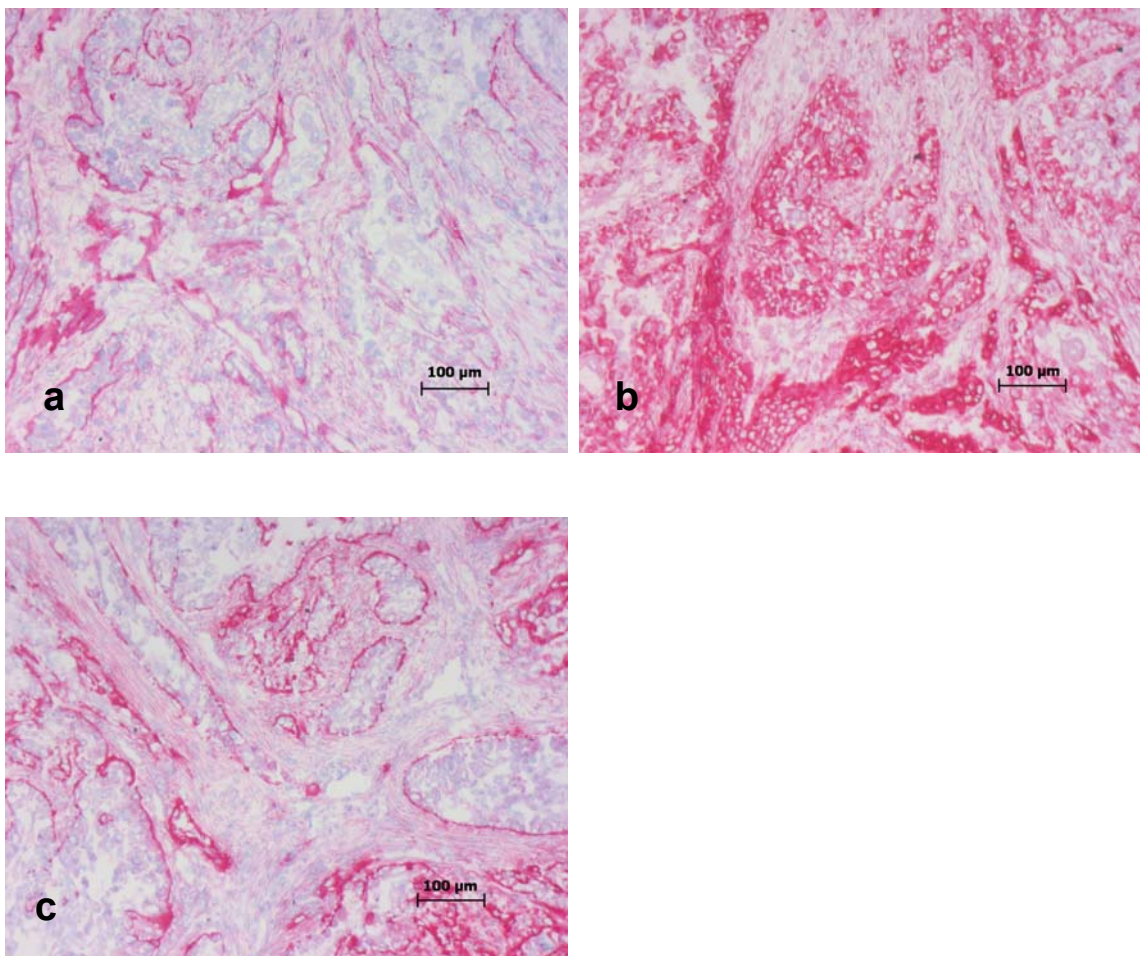
Vergleichende Analyse der Verteilung der Lamininketten  $\alpha 2$  (a),  $\alpha 3$  (b),  $\alpha 4$  (c) und  $\alpha 5$  (d) in der Basalmembran, im Bereich von Gefäßstrukturen und im subepithelialen Bindegewebe (Maßstab balken = 100  $\mu\text{m}$ )

Unter Verwendung des Antikörpers gegen die Laminin- $\beta 2$ -kette zeigt sich in G2-Tumoren eine nur minimale Anfärbbarkeit der Basalmembran. In tumorösen Arealen nimmt die Anfärbbarkeit der Basalmembran ab, außerdem sind vermehrt diskontinuierliche Abschnitte zu finden. Eine zarte stromale Deposition ist festzustellen. Verglichen mit G1-Tumoren stellen sich eine Abnahme der Basalmembranmarkierungen im Tumor und eine geringfügig vermehrte Stromadeposition dar. Für die  $\beta 2$ -Kette fallen aber Unterschiede bezüglich der



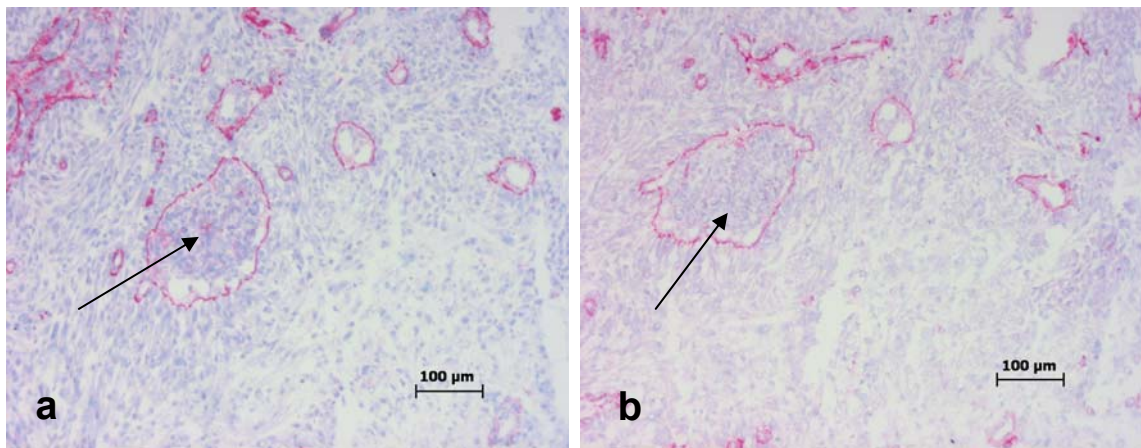
Darstellung von Gefäßstrukturen zwischen den unterschiedlich differenzierten Tumoren auf (Abb. 10a).

Bei Markierung der  $\beta 3$ -Kette lässt sich wiederholt eine zytoplasmatische Positivität basaler Keratinozyten erkennen. Gelegentlich ist eine stromale Deposition vorhanden, die weder charakteristisch Entzündungs- noch Invasionsfront-assoziiert erscheint. Es sind keine Markierungen der Basalmembran und der Gefäße zu verzeichnen (Abb. 10b). Die Laminin- $\gamma 2$ -kette ist in G2-Tumoren verglichen mit normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut bzw. mit G1-Tumoren erstmals im Zytoplasma der Tumorzellen zu detektieren. Weiterhin findet sich eine deutliche stromale Deposition und Basalmembranmarkierung mit quantitativer Zunahme verglichen mit G1-Tumoren, eine distinkte Gefäßmarkierung kann nicht beobachtet werden (Abb. 10c).



**Abbildung 10:****Immunhistochemische Verteilung der Lamininketten  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 2$  in mäßig differenzierten (G2) oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC)**

Vergleichende Analyse der Verteilung der Lamininketten  $\beta 2$  (a),  $\beta 3$  (b) und  $\gamma 2$  (c) in der Basalmembran, im Bereich von Gefäßstrukturen und im subepithelialen Bindegewebe (Maßstab balken = 100  $\mu\text{m}$ )

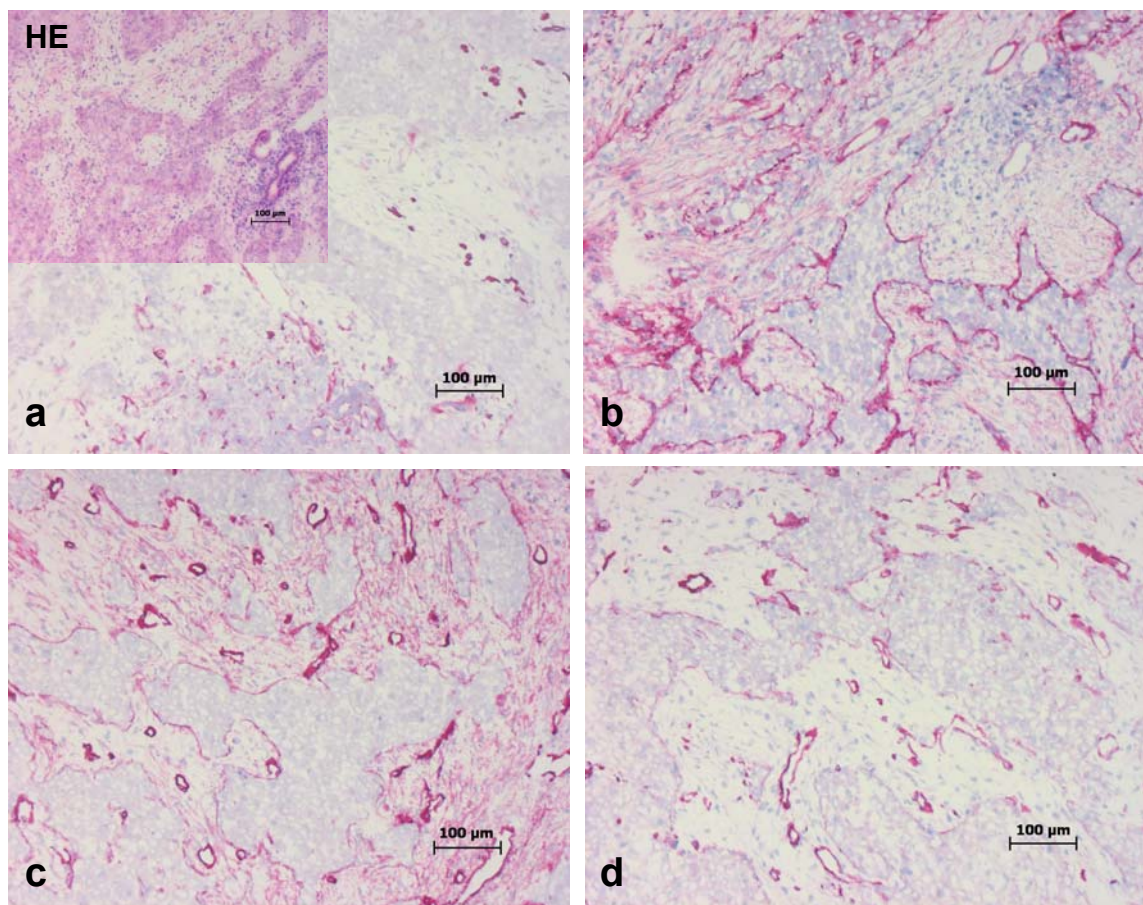
**Abbildung 11:**

Gefäßpositivität für (a) die Laminin –  $\alpha 3$  – kette und (b) die Laminin –  $\gamma 2$  – kette in der Invasionsfront eines oralen Plattenepithelkarzinoms G2 mit hämangischer Karzinose (Pfeil) (Maßstab balken = 100  $\mu\text{m}$ )

#### 4.1.3.3 Expressions- und Verteilungsmuster in schlecht differenzierten (G3) oralen Plattenepithelkarzinomen

Bei Detektion der Laminin –  $\alpha 2$  – kette in G3-Tumoren fällt eine Markierung von muskulären und neuralen Strukturen auf. Im Vergleich mit anderen Gradingstufen ist keine stromale Deposition festzustellen sowie keine Dekoration der Basalmembran nachzuweisen. (Abb. 12a). Der Antikörper gegen die Laminin –  $\alpha 3$  – kette zeigt eine oft diskontinuierliche Darstellung der Basalmembranregion und eine reichliche Markierung des subepithelialen Stromas. Außerdem ist eine schwache und unscharfe Verdichtung um vaskuläre Strukturen zu bemerken. Mit zunehmender Malignität des Tumors zeigt sich eine zunehmende Diskontinuität der Basalmembranmarkierung (Abb. 12b). Bei der Analyse der Laminin –  $\alpha 4$  – kette fällt auf, dass insbesondere große

Gefäßstrukturen im Tumor in räumlicher Assoziation zur Invasionsfront markiert sind. Im Stroma und den tumorassoziierten Basalmembranstrukturen zeigt sich eine deutliche Positivität für die  $\alpha 4$ -Kette mit Intensitätszunahme im Vergleich zu Tumoren eines niedrigeren Malignitätsgrades und insbesondere zur normalen und hyperplastischen Mundschleimhaut (Abb. 12c). Die Laminin- $\alpha 5$ -kette zeigt eine diskrete und unregelmäßige stromale Deposition. Es lassen sich darüber hinaus mit dem Antikörper gegen die  $\alpha 5$ -Kette vereinzelt Gefäßstrukturen anfärben. Besonders bei dissiminiertem Wachstum zeigen sich weiterhin Basalmembranverluste. In undifferenzierten Tumoren fehlt eine Basalmembranstruktur völlig oder stellt sich allenfalls noch diskontinuierlich dar (Abb. 12d).



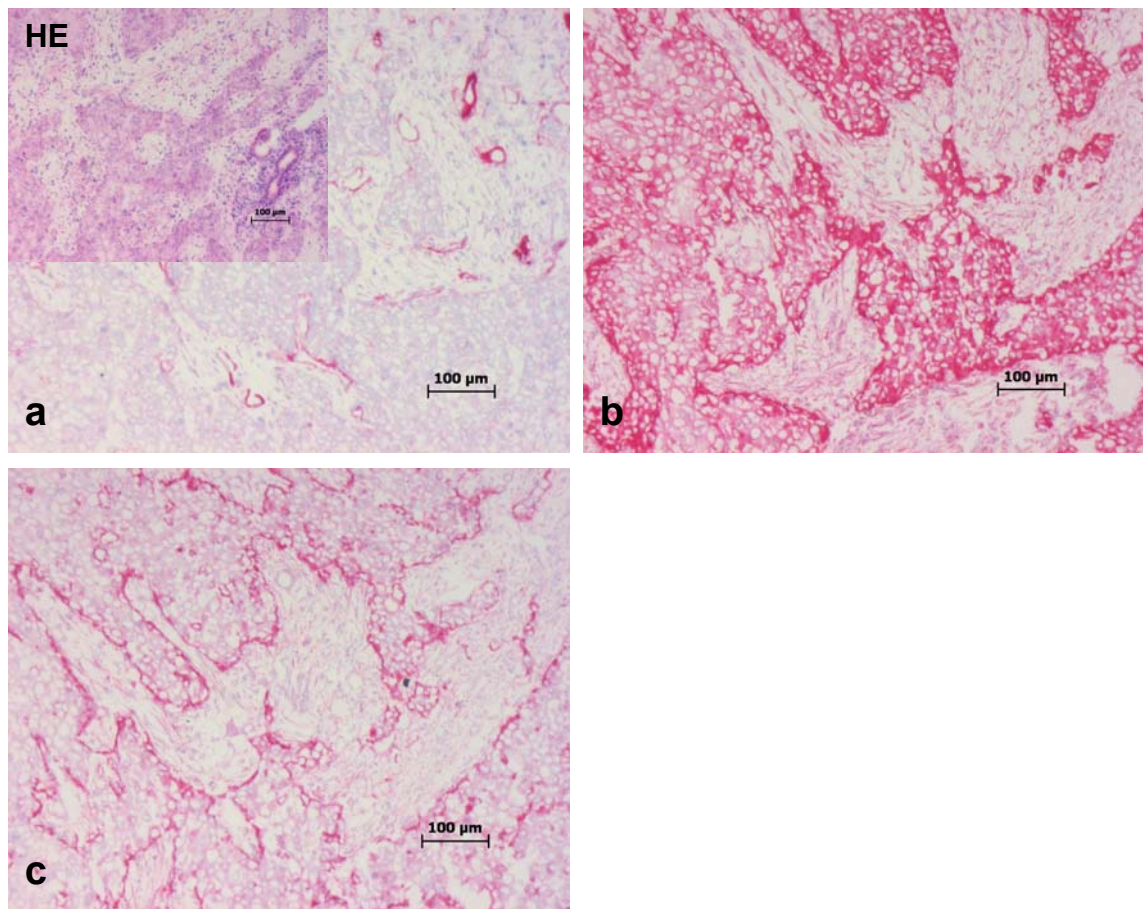
**Abbildung 12:**

**Immunhistochemische Verteilung der Laminin -  $\alpha$  - ketten in schlecht differenzierten (G3) oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC)**

---

Vergleichende Analyse der Verteilung der Lamininketten  $\alpha 2$  (a),  $\alpha 3$  (b),  $\alpha 4$  (c) und  $\alpha 5$  (d) in der Basalmembran, im Bereich von Gefäßstrukturen und im subepithelialen Bindegewebe (Maßstab Balken = 100  $\mu\text{m}$ )

Die Markierungen der Laminin- $\beta 2$ -kette zeigen kein einheitliches Bild bezogen auf Basalmembran- und stromale Strukturen. Meist fehlt die vollständige Anfärbung der Basalmembran um die Tumorzellen, ansonsten stellen sich diskontinuierliche Basalmembranregionen dar. Somit zeigt sich eine negative Tendenz bezüglich des Ausmaßes der Basalmembranmarkierungen vom gut differenzierten zum undifferenzierten Tumor. Weiterhin ist eine Zunahme der stromalen Depositionen zu beobachten. An wenigen Gefäßstrukturen ist eine intensive Anfärbbarkeit der  $\beta 2$ -Kette zu erkennen. Eine Zunahme der Markierungsintensität für diese Kette zwischen den Gradingstufen ist somit nicht zu beobachten (Abb. 13a). Die Laminin- $\beta 3$ -kette lässt sich im Zytoplasma der Tumorzellen und besonders wiederum in den basalen Keratinozyten detektieren, was als typisch für diese Lamininkette zu betrachten ist. Gefäßstrukturen, das subepitheliale Stroma und Basalmembranregionen lassen sich hingegen nicht oder allenfalls sporadisch anfärben (Abb. 13b). Die Laminin- $\gamma 2$ -kette kann sehr deutlich in Basalmembranstrukturen beobachtet werden, auch Depositionen im Stroma zeigen sich in mittlerer bis starker Intensität. Eine deutliche Gefäßmarkierung findet sich nicht, nur gelegentlich fallen Depositionen in Assoziation zu Gefäßstrukturen ohne klare Abgrenzbarkeit auf. Besonders in der Tumorinvasionszone kann diese Kette im Zytoplasma der Tumorzellen detektiert werden. Insgesamt zeigen sich somit für die Laminin- $\gamma 2$ -kette ähnliche Strukturmuster bezogen auf stromale Depositionen in oralen Plattenepithelkarzinomen ohne deutliche qualitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Malignitätsgraden, die sich aber dennoch deutlich von normaler Mundschleimhaut und Hyperplasie abgrenzbar zeigen (Abb. 13c).



**Abbildung 13:**

**Immunhistochemische Verteilung der Lamininketten  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 2$  in schlecht differenzierten (G3) oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC)**

Vergleichende Analyse der Verteilung der Lamininketten  $\beta 2$  (a),  $\beta 3$  (b) und  $\gamma 2$  (c) in der Basalmembran, im Bereich von Gefäßstrukturen und im subepithelialen Bindegewebe (Maßstabbalken = 100  $\mu\text{m}$ )

## **4.2. Quantitative Analyse der immunhistochemischen Ergebnisse stromaler Depositionen zu neoplastischer Transformation und Tumorprogression sowie $\alpha$ SMA**

Die folgenden Auswertungen, die mithilfe der im Kapitel 3 (3.3.2.) genannten statistischen Methode erfolgten, zeigen die stromalen Depositionen der jeweiligen Lamininketten in unterschiedlichen Gewebeproben im Vergleich von normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut und stark bis wenig differenzierten (G1 bis G3) oralen Plattenepithelkarzinomen auf.

Die Markierungen des Stromas bei der Laminin –  $\alpha$ 2 – kette sind sowohl bei normaler als auch bei hyperplastischer Mundschleimhaut teilweise vorhanden. Jedoch nimmt mit zunehmender Malignität des OSCC (G1 bis G3) die Stromamarkierung ab (Abb. 14a). Dabei sind die Veränderungen der Expression der Laminin –  $\alpha$ 2 – kette im Bezug auf neoplastische Transformation und Tumorprogression mit einem p – Wert von 0,004 statistisch signifikant. Bei Betrachtung der Stromamarkierung der Laminin –  $\alpha$ 3 – kette zeigen die quantitativen Ausprägungen zu maligner Transformation und Tumorprogression ebenfalls eine statistische Signifikanz (p – Wert von  $\leq$  0,001). Hier ist eine steigende Tendenz der stromalen Depositionen zum Malignitätsgrad des Tumors auffällig (Abb. 14b). Das Ausmaß der Stromadeposition gegenüber neoplastischer Transformation und Tumorprogression ist besonders bei Markierung der Lamininkette  $\alpha$ 4 deutlich (Abb. 14c). Der p – Wert von  $\leq$  0,001 bestätigt die statistische Signifikanz. Für die quantitativen Veränderungen der Expression der Lamininkette  $\alpha$ 5 kann eine weitere Signifikanz (p – Wert von 0,001) festgestellt werden. Je maligner der Tumor umso ausgeprägter stellt sich die stromale Deposition dar (Abb. 14d).

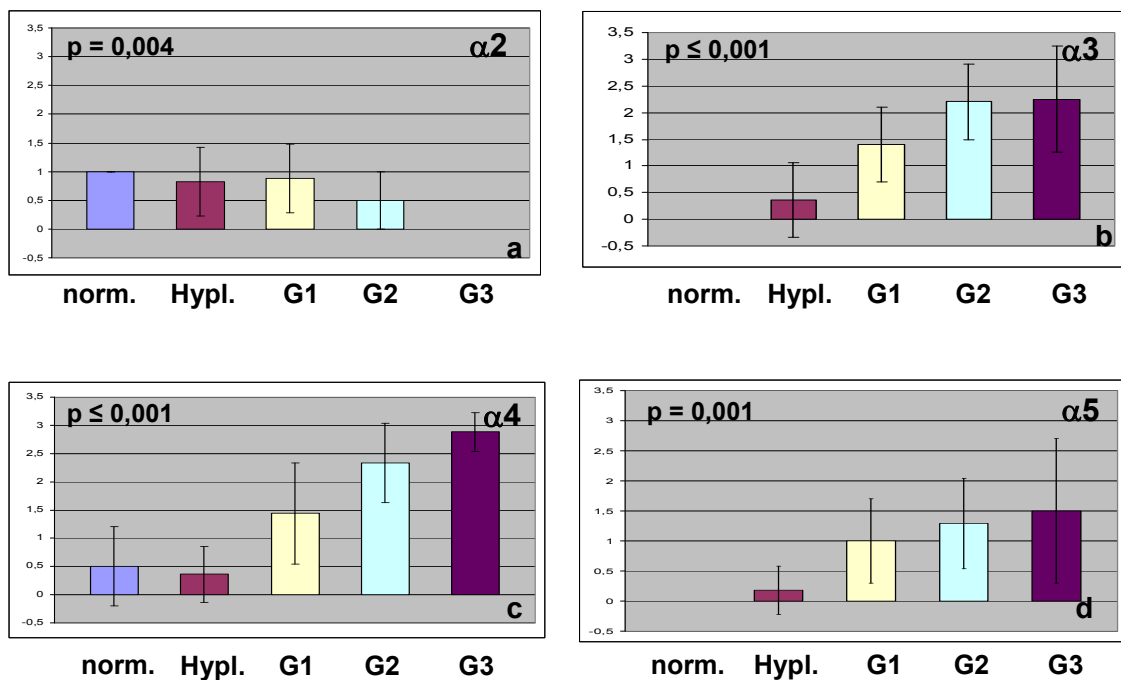


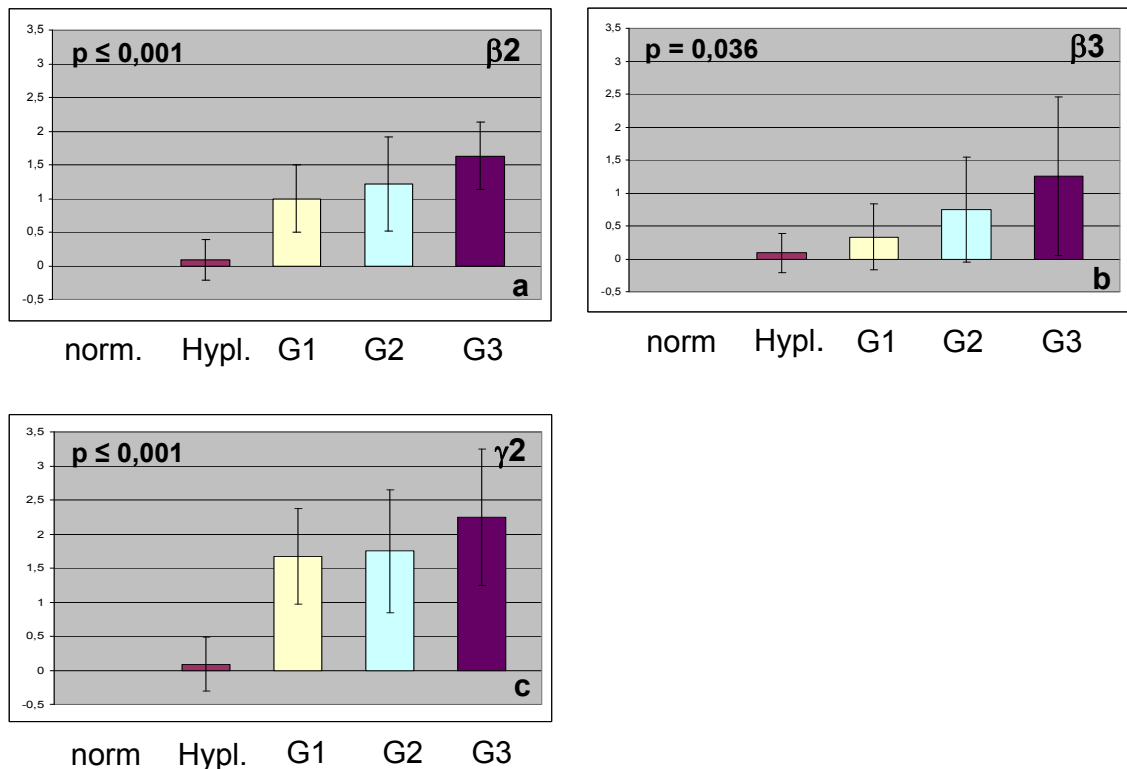
Abbildung 14:

**Quantifizierung der stromalen Lamininketten-Depositionen für neoplastische Transformation und Tumorprogression: Vergleich von normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut sowie unterschiedlich differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC)**

(a)  $\alpha 2$ , (b)  $\alpha 3$ , (c)  $\alpha 4$  und (d)  $\alpha 5$

Außerdem wurden in die semiquantitative Auswertung folgende Lamininketten mit einbezogen. Eine stromale Darstellung der  $\beta 2$  – Kette kommt in normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut nicht bzw. kaum vor. Bei Ausbildung eines Tumors und Zunahme des Gratings zeigen sich ansteigende Stromamarkierungen. Mit einem p – Wert von  $\leq 0,001$  korreliert das Auftreten der Lamininkette  $\beta 2$  mit neoplastischer Transformation und Tumorprogression und ist damit statistisch signifikant (Abb. 15a). Eine statistische Signifikanz ist ebenfalls bei den stromalen Depositionen der Laminin –  $\beta 3$  – kette aufzuführen (p – Wert von 0,036). Jedoch steigen die Ausprägungen im Tumor mit dem Grading geringfügiger an als bei der eben genannten (Abb. 15b). Auch der deutliche Anstieg der stromalen Depositionen der Laminin –  $\gamma 2$  – kette im Tumorgewebe, gegenüber gesunden Proben, ist statistisch signifikant (p – Wert von  $\leq 0,001$ ). Darüber hinaus nimmt die Stromamarkierung innerhalb des

Gradings und insbesondere zwischen G2 – und G3 – Tumoren (Score 2 und 3 siehe Tabelle 4) zu (Abb. 15c).



**Abbildung 15:**

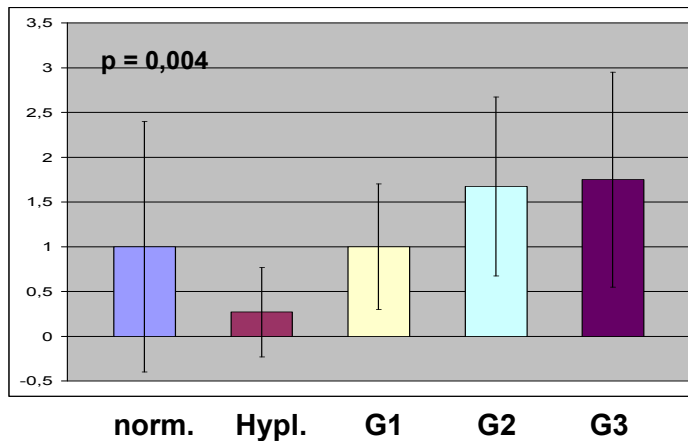
**Quantifizierung der stromalen Lamininketten-Depositionen für neoplastische Transformation und Tumorprogression: Vergleich von normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut sowie unterschiedlich differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC)**

(a)  $\beta 2$ , (b)  $\beta 3$  und (c)  $\gamma 2$

Für eine nachfolgende Untersuchung der stromalen Lamininkettenexpression in Beziehung zur Stromaaktivierung erfolgte eine semiquantitative Bewertung der Expression von  $\alpha$  – glattmuskulärem Aktin ( $\alpha$ SMA) in den Präparaten. Die Kriterien der Scores zur Bewertung von  $\alpha$ SMA sind im Kapitel Material und Methoden (siehe Tabelle 4) ersichtlich (Score 0 bis 3). Es fällt auf, dass die Markierungen von  $\alpha$ SMA im hyperplastischen Gewebe selten auftreten und im Tumor zunehmen. Die vorhandenen Ausprägungen in der normalen Mundschleimhaut sind möglicherweise auf die in einem Präparat vorkommende



fibröse Präkanzerose zurückzuführen (Abb. 16). Trotzdem ist eine statistische Signifikanz mit einem p – Wert von 0,004 gegeben.



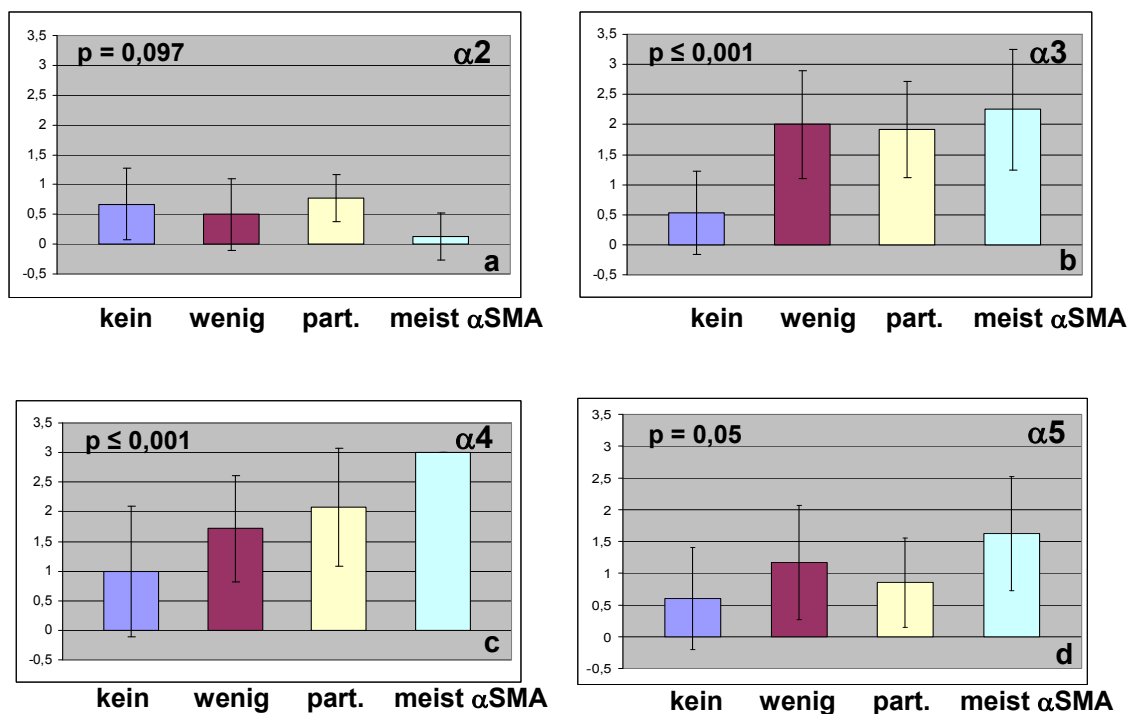
**Abbildung 16:**

**Quantifizierung der stromalen Deposition von  $\alpha$ SMA für neoplastische Transformation und Tumorprogression: Vergleich von normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut sowie unterschiedlich differenzierten oralen Plattenepitelkarzinomen (OSCC)**

Nach Aufteilung der in der Tabelle 2 aufgeführten Fälle in die Scoregruppen für  $\alpha$ SMA ergaben sich folgende Ergebnisse. Es konnten 15 Präparate unterschieden werden, die keine Markierungen von  $\alpha$ SMA zeigten, 17 mit wenigen stromalen Markierungen, 14 mit einigen Arealen ausgeprägter stromaler Markierungen und 8 Proben, die eine überwiegende  $\alpha$ SMA-Markierung des Stromas aufwiesen. In dieser Einteilung wurden die jeweiligen Lamininketten bezüglich ihres Auftretens mit  $\alpha$ SMA zusammenhängend betrachtet.

Die quantitativen Ausprägungen der Laminin –  $\alpha$ 2 – kette differenzierten sich im Bezug auf  $\alpha$ SMA untereinander kaum. Es ist keine statistische Signifikanz (p – Wert von 0,097) vorhanden (Abb. 17a). Eine Signifikanz mit einem p – Wert von  $\leq 0,001$  kann bei der Gegenüberstellung von  $\alpha$ SMA – Markierungen und dem Vorkommen von Lamininkette  $\alpha$ 3 gezeigt werden. Je intensiver  $\alpha$ SMA – Markierungen auftreten umso gehäufiger konnte die Kette  $\alpha$ 3 im Stroma detektiert werden (Abb. 17b). Auch zwischen den stromalen Markierungen der

Laminin –  $\alpha 4$  – kette und den  $\alpha$ SMA – Markierungen konnten Zusammenhänge hergestellt werden. Eine deutlich ansteigende Tendenz ist mit Zunahme der Expression von  $\alpha$ SMA zu verzeichnen und ist mit dem p – Wert  $\leq 0,001$  statistisch signifikant (Abb. 17c). Markierungen der Laminin –  $\alpha 5$  – kette ließen sich in Bezug auf  $\alpha$ SMA besonders im Bewertungsscore 0 (siehe Tabelle 4) eher selten nachweisen. Danach nahmen sowohl stromale Depositionen der Lamininkette  $\alpha 5$  als auch die Expression von  $\alpha$ SMA zu. Eine Prüfung auf statistische Signifikanz ergab einen p – Wert von 0,05 (Abb. 17d).



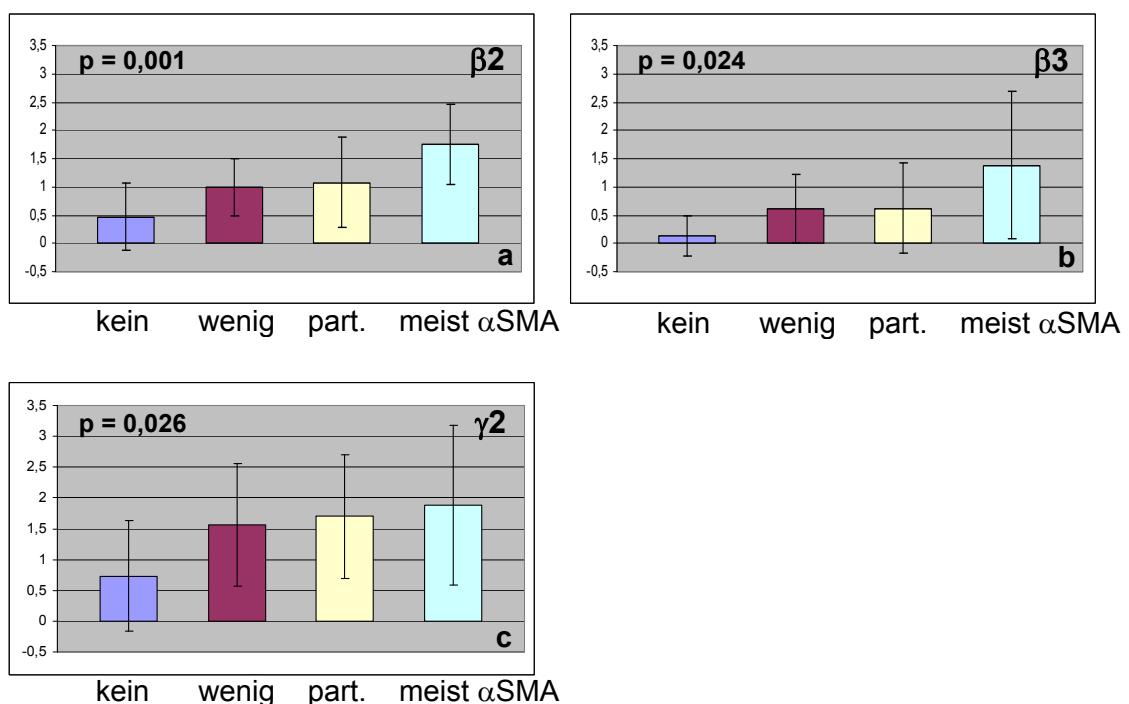
**Abbildung 17:**

**Quantifizierung der stromalen Deposition durch Gegenüberstellung der jeweilig beteiligten Lamininketten und  $\alpha$ SMA**

(a)  $\alpha 2$ , (b)  $\alpha 3$ , (c)  $\alpha 4$  und (d)  $\alpha 5$

Neben den ausgewählten Laminin –  $\alpha$  – ketten wurden zuletzt die  $\beta 2$  – ,  $\beta 3$  – und  $\gamma 2$  – Kette auf den Zusammenhang zu  $\alpha$ SMA überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Gewebeschnitte ohne  $\alpha$ SMA positive Areale auch nur selten stromale Expressionen der Laminin –  $\beta 2$  – kette darstellten. Mit zunehmender Markierung von  $\alpha$ SMA konnten vermehrt Stromamarkierungen der  $\beta 2$  – Kette

nachgewiesen werden. Hier besteht eine statistische Signifikanz mit dem p – Wert 0,001 (Abb. 18a). Zudem konnte bei der Expression der  $\beta 3$  – Kette wie bei der Markierung von  $\alpha$ SMA ein tendenzieller Anstieg verzeichnet werden. Demnach wurden in  $\alpha$ SMA negativen Schnitten fast keine stromalen Depositionen der  $\beta 3$  – Kette dargestellt. Erst bei ausgeprägter Markierung von  $\alpha$ SMA (Score 2 bis 3) nahm auch die Stromaexpression der Laminin –  $\beta 3$  – kette zu. Diese Gegenüberstellung ist mit einem p – Wert von 0,024 signifikant (Abb. 18b). Ebenso bei der Betrachtung der  $\gamma 2$  – Kette fällt auf, dass bei Präparaten ohne jeglichen Nachweis von  $\alpha$ SMA kaum stromale Depositionen der Kette vorkommen. Dann steigt die Markierung von  $\alpha$ SMA positiven Arealen genauso an wie die stromalen Depositionen der Lamininkette  $\gamma 2$  (Abb. 18c), wobei eine statistische Signifikanz vorliegt (p – Wert von 0,026).



**Abbildung 18:**

**Quantifizierung der stromalen Deposition durch Gegenüberstellung der jeweilig beteiligten Lamininketten und  $\alpha$ SMA**

(a)  $\beta 2$ , (b)  $\beta 3$  und (c)  $\gamma 2$

<b>Lamininkette / neoplastische Transformation und Tumorprogression</b>	<b>p – Wert / Signifikanz</b>
$\alpha 2$	0,004
$\alpha 3$	$\leq 0,001$
$\alpha 4$	$\leq 0,001$
$\alpha 5$	0,001
$\beta 2$	$\leq 0,001$
$\gamma 2$	$\leq 0,001$
$\beta 3$	0,036
<b><math>\alpha</math>SMA / neoplastische Transformation und Tumorprogression</b>	0,004
<b>Lamininkette / <math>\alpha</math>SMA</b>	
$\alpha 2$	0,097
$\alpha 3$	$\leq 0,001$
$\alpha 4$	$\leq 0,001$
$\alpha 5$	0,05
$\beta 2$	0,001
$\gamma 2$	0,026
$\beta 3$	0,024

**Tabelle 5: Überblick über die semiquantitativen Auswertungen**

Gegenüberstellung des Vorkommens der jeweiligen Lamininketten bezogen auf neoplastische Transformation und Tumorprogression, des Vorkommens von  $\alpha$ SMA bezogen auf neoplastische Transformation und Tumorprogression sowie der Markierungen der Lamininketten zum Ausmaß der  $\alpha$ SMA – Positivität mit entsprechender Aufführung der p – Werte (Signifikanz)

### **4.3. Quantitative Analyse der Immunfluoreszenz – doppelmarkierung mit CD 31 und den Lamininketten $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$ und $\gamma 2$**

Anhand ausgesuchter Fälle von normaler (Fallnr. 1, 2) und hyperplastischer (Fallnr. 6, 8) Mundschleimhaut, gut differenzierten (G1) (Fallnr. 14, 18, 20), mäßig differenzierten (G2) (Fallnr. 23, 29, 43) sowie schlecht differenzierten (G3) (Fallnr. 48, 52, 54) oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) wurde eine Immunfluoreszenzdoppelmarkierung nach beschriebenem Protokoll durchgeführt. Dazu sollten die Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  mit CD 31 als gefäßspezifischen Antikörper vergleichend betrachtet werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Tumorgefäßen allgemein und Gefäßen mit Positivität für die aufgeführten Laminine zu untersuchen. Zur Auswertung wurden jeweils drei Gesichtsfelder der erfolgten Immunfluoreszenzdoppelmarkierung ausgewählt und nach der Darstellung sowohl der Tumorgefäße als auch Lamininketten – positiver Gefäße quantifiziert. Daraus ergaben sich nachfolgende Ergebnisse.

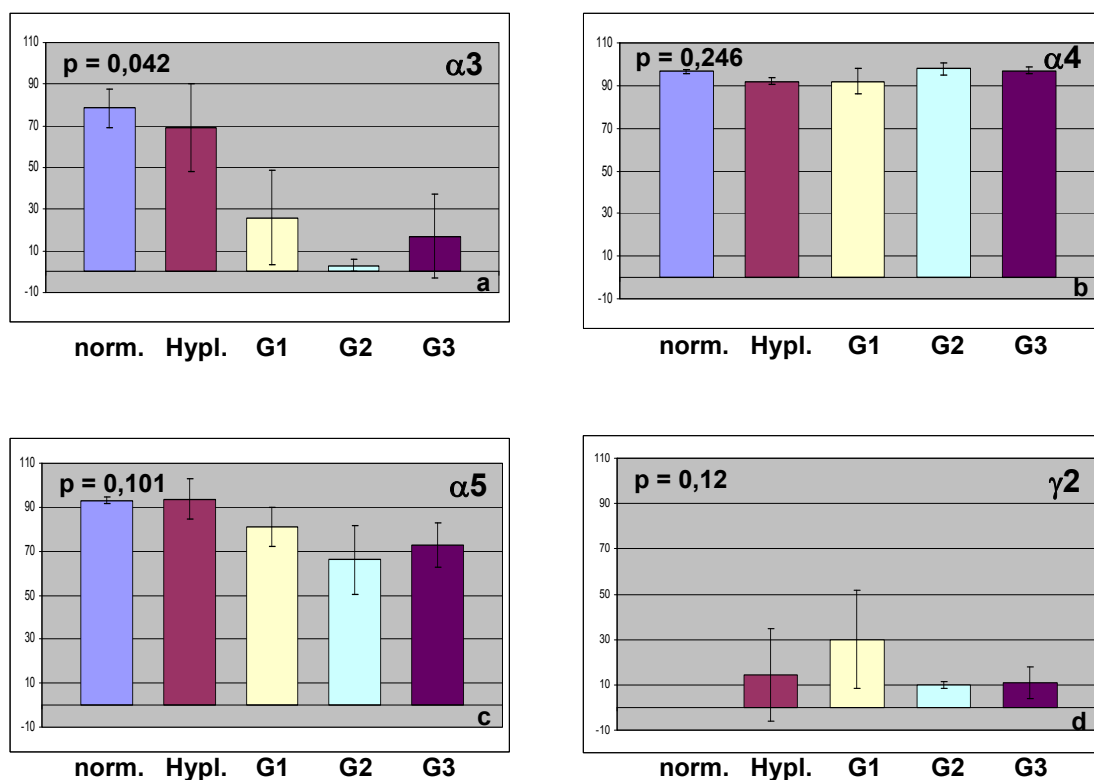
Bei Betrachtung der Gefäßpositivität der Laminin –  $\alpha 3$  – Kette kann eine abnehmende Tendenz mit zunehmendem Malignitätsgrad festgestellt werden (Abb. 19a). Es konnte insbesondere in normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut die  $\alpha 3$  – Kette in Gefäßen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20 Bild a). Dagegen verringerten sich die Gefäßmarkierungen im Tumorgewebe (siehe Abb. 20 Bild b und c). Bei dieser Betrachtung fällt mit einem p – Wert von 0,042 eine statistische Signifikanz auf.

Die Ausprägungen der  $\alpha 4$  – Kette in Tumorgefäßen erscheint unabhängig vom Malignitätsgrad der Gewebeproben ungefähr gleich (siehe Abb. 20 Bild d bis f). Es kann keine statistische Signifikanz festgestellt werden (p – Wert von 0,246) (Abb. 19b).

Differenziertere Bemerkungen sind bei Auswertung der Gefäßpositivität der Laminin –  $\alpha 5$  – Kette notwendig (Abb. 19c). Zu Beginn ergab sich eine intensive Markierung der  $\alpha 5$  – Kette in den Gefäßen in normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut (siehe Abb. 20 Bild g). Weiterhin konnte die Lamininkette  $\alpha 5$

in G1 – Tumoren dargestellt werden (siehe Abb. 20 Bild h), diese nahm jedoch quantitativ gegenüber dem gesunden Gewebe ab. Die Tendenz führte in den G2 – Tumoren fort. Bei schlecht differenzierten Tumoren (G3) konnte ein Anstieg der Gefäßmarkierungen gezeigt werden (siehe Abb. 20 Bild i). Es ist auch bei statistischer Auswertung der  $\alpha 5$  – Kette keine Signifikanz nachweisbar ( $p$  – Wert von 0,101).

Zur Gefäßpositivität der Laminin –  $\gamma 2$  – kette fällt auf, dass kein Nachweis in normaler Mundschleimhaut möglich war (siehe Abb. 20 Bild j). Jedoch stieg die Gefäßmarkierung im hyperplastischen Gewebe und im noch stark differenzierten Tumorgewebe (G1) an (siehe Abb. 20 Bild k). Im mäßig bzw. schlecht differenzierten Tumorgewebe (G2 und G3) des OSCC nahmen die Expressionen der Lamininkette  $\gamma 2$  im Gefäß wieder ab (siehe Abb. 20 Bild l). Mit einem  $p$  – Wert von 0,12 stellt sich keine statistische Signifikanz heraus (Abb. 19d).



**Abbildung 19:**

**Anteile Lamininketten – positiver Gefäße an der Gesamtheit aller Gefäße im Tumor**

(a) CD31/α3, (b) CD 31/α4, (c) CD 31/α5 und (d) CD 31/γ2

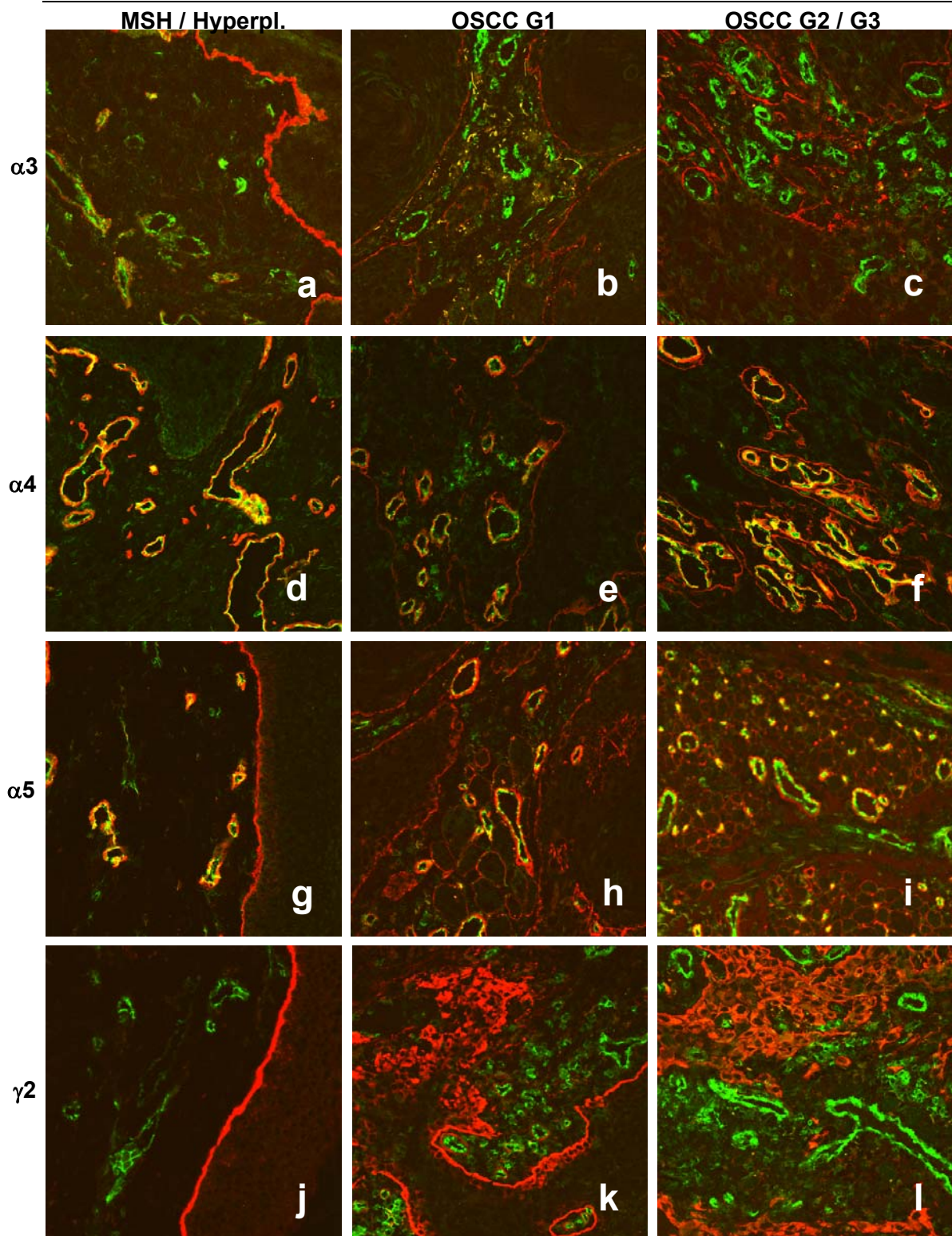


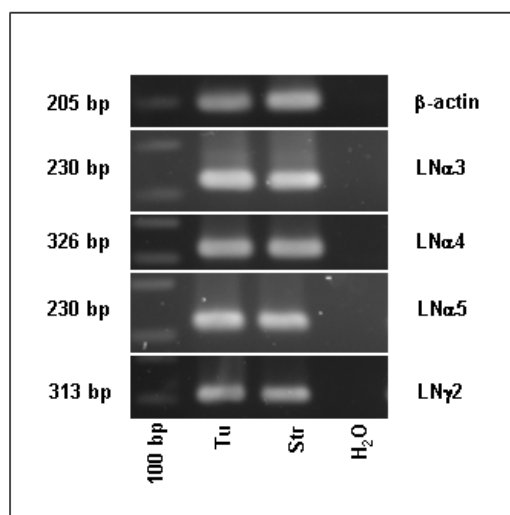
Abbildung 20:

Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen für CD 31 und den Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  in normaler / hyperplastischer Mundschleimhaut und im OSCC unterschiedlichen Malignitätsgrades:

a =  $\alpha 3$  – Kette in normaler MSH, b =  $\alpha 3$  – Kette im G1 – Tumor, c =  $\alpha 3$  – Kette im G3 – Tumor ;  
 d =  $\alpha 4$  – Kette in normaler MSH, e =  $\alpha 4$  – Kette im G1 – Tumor, f =  $\alpha 4$  – Kette im G3 – Tumor;  
 g =  $\alpha 5$  – Kette in normaler MSH, h =  $\alpha 5$  – Kette im G1 – Tumor, i =  $\alpha 5$  – Kette im G3 – Tumor;  
 j =  $\gamma 2$  – Kette in normaler MSH, k =  $\gamma 2$  – Kette im G1 – Tumor, l =  $\gamma 2$  – Kette im G3 – Tumor

#### 4.4. Mikrodissektion und RT – PCR der Lamininketten $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$ und $\gamma 2$

Abgeleitet aus den immunhistochemischen Untersuchungen lässt sich eine besondere tumorbiologische Bedeutung der Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  für Invasion und Progression des OSCC vermuten. Nach Analyse der entsprechenden stromalen Depositionsmuster ergibt sich die Frage nach dem Syntheseort dieser Lamininketten. Zur weiteren Bearbeitung dieser Fragestellung führten wir an einem repräsentativen Fall (OSCC G2, Fallnr. 26) eine Mikrodissektion zur Isolierung von Tumor- und Stromaarealen in Bereich der Invasionsfront durch. Nach RNA – Extraktion aus dem so gewonnenen Gewebematerial wurde mittels RT-PCR die mRNA – Expression für die Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  in Tumor – versus Stromaregionen untersucht. Es zeigt sich, dass für alle Ketten sowohl im Tumor als auch im Stroma eine deutliche mRNA – Expression nachzuweisen ist (Abb. 21).



**Abbildung 21:**

Nachweis der mRNA – Expression der Lamininketten  $\alpha 3$  (LN  $\alpha 3$ ),  $\alpha 4$  (LN  $\alpha 4$ ),  $\alpha 5$  (LN  $\alpha 5$ ) und  $\gamma 2$  (LN  $\gamma 2$ ) sowie des *House – keeping* – Gens  $\beta$ -Aktin durch RT-PCR an Gewebematerial von durch Mikrodissektion isolierten Tumor- und Stromaarealen der OSCC - Invasionsfront



## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der Stromalen Depositionen ausgewählter Lamininketten im oralen Plattenepithelkarzinom unterschiedlicher Malignität im Vergleich zu normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut. In bisherigen Analysen gab es diese differenzierte Fokussierung auf das Stromakompartiment der Invasionszone oraler Karzinome nicht. Hingegen stehen hinreichend Daten zur zytoplasmatischen Akkumulation sowie zur Basalmembranpositivität im Bereich der OSCC–Invasionsfront zur Verfügung (Kosmehl et al. 1999, Haas et al. 2001, Franz et al. 2007).

### **5.1. Stromale Detektierbarkeit der Laminin- $\alpha$ 2-Kette im Rahmen der malignen Transformation oraler Mundschleimhaut ohne Beziehung zu Invasivität und Malignität des OSCC**

Die Laminin –  $\alpha$ 2 – Kette ist Bestandteil der Isoformen 211 (LM 2), 221 (LM 4) und 213 (LM 12) und kann vornehmlich in neuromuskulären Strukturen nachgewiesen werden mit der Hauptfunktion der Aufrechterhaltung der strukturellen Muskelzellintegrität (Brandenberger et al. 1996). Die funktionelle Bedeutung in der gesunden Mundschleimhaut sowie in oralen Karzinomen ist bislang nicht hinreichend geklärt. Nachdem die Laminin –  $\alpha$ 2 – Kette in fetalen oralen Gewebsstrukturen exprimiert wird und in der gesunden adulten Mundschleimhaut nicht detektiert werden kann, kommt es im Rahmen der Karzinogenese des OSCC zu einer Re-Expression in der Basalmembranregion (Kosmehl et al. 1999). Daten zum Verhalten Stromaler Depositionen dieser Kette lagen bislang nicht vor. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die qualitative Betrachtung der immunhistochemischen Verteilung der Lamininkette  $\alpha$ 2 im Stroma der Invasionsfront des OSCC im Vergleich zu gesunden Gewebeproben. Es zeigt sich keine Markierung im Stroma der normalen Mundschleimhaut. Dagegen erscheint eine gelegentliche zarte Markierung im Stroma der veränderten hyperplastischen Mundschleimhaut. Im tumorösen Gewebe, insbesondere in G2 – Tumoren (mäßig differenzierten Tumoren), lassen sich nur selten Stromale Depositionen detektieren, welche sich zu entzündlicher Infiltration assoziiert zeigen und somit auf einen

---

inflammatorischen Hintergrund schließen lassen. Keine stromalen Markierungen können in G3-Karzinomen dargestellt werden. In der quantitativen stromalen Auswertung fällt im normalen Gewebe eine Detektierbarkeit auf. Die Ursache kann in der vorliegenden fibrösen Präkanzerose, welche in einem Präparat vorliegt, begründet sein. Das stromale Vorkommen wurde in hyperplastischen Proben und gut differenzierten Karzinomen hauptsächlich als „teilweise markiert“ (Score 1 siehe Tabelle 4) beschrieben. Aufgrund dieses Erscheinungsbildes kann die stromale Laminin –  $\alpha 2$  – kette als ein Marker für neoplastische Veränderungen diskutiert werden. Dann nimmt die Markierung im mäßig und schlecht differenzierten Tumor (G2) ab, in G3-Tumoren ist ein Nachweis nicht mehr möglich. Demgegenüber konnten Vitolo und Mitarbeiter in supraglottischen Tumoren eine Expression der Laminin –  $\alpha 2$  – kette in Assoziation zu stromalen und parenchymalen Gefäßen detektieren. Laminin –  $\alpha 2$  – ketten – positive Gefäße wurden nur im Stroma beobachtet (Vitolo et al. 2001). Tumoren können die Eigenschaft der Invasivität entwickeln. Die durch die Tumorzellen produzierten Wachstumsfaktoren (hauptsächlich TGF –  $\beta 1$ ) sind in der Lage, die Umwandlung stromaler Fibroblasten zu  $\alpha$ SMA – positiven Fibroblasten hervorzurufen. Deswegen gilt die  $\alpha$ SMA – Positivität als ein Maß für stromale Aktivierung im Tumor. Dieser Prozess wird auch als desmoplastische Stromareaktion bezeichnet.  $\alpha$ SMA – positive Fibroblasten können onkofetale Matrixproteine und somit ein tumorsupportives Stroma synthetisieren. Aufgrund dieser Zusammenhänge wurden in dieser Arbeit auf immunhistochemischer Basis qualitative Auswertungen bezüglich des Gratings oraler Plattenepithelkarzinomfälle und deren  $\alpha$ SMA – Positivität vorgenommen. Hinsichtlich des Entdifferenzierungsgrades und damit der zunehmenden Malignität des OSCC steigt der Nachweis der  $\alpha$ SMA – Positivität signifikant an. Allerdings zeigen sich selten stromale Markierungen der Laminin –  $\alpha 2$  – kette und damit keine Korrelation zur  $\alpha$ SMA – Expression im OSCC. Schon in fibrös veränderten Läsionen wie der nodulären Palmarfibromatose (Mb. Dupuytren) konnten Berndt und Mitarbeiter  $\alpha$ SMA – positive Zellen nachweisen. Hierbei handelte es

sich um aktive Knoten der Palmarfibromatose. Die  $\alpha$ SMA – positiven Zellen konnten weiterhin als Myofibroblasten identifiziert werden (Berndt et al. 1994). Die noduläre Palmarfibromatose ist eine tumoröse Proliferation von Fibroblasten. Zu Beginn der Krankheit tritt die Proliferation durch Myofibroblasten in den Vordergrund. Dann verliert sich die proliferative Phase durch ein Absinken der Myofibroblastentätigkeit und es entstehen aponeurotische Narben mit einer irreversiblen Kontraktur. Die proliferativen Knoten zeigen Depositionen von Fibronectin. Die extrazelluläre Matrix um die Aponeurose setzt sich aus Komponenten wie Fibronectin, Laminin –  $\beta$ 1 – kette und Laminin –  $\gamma$ 1 – kette, Tenascin und Kollagen IV zusammen. In einigen Zellen konnten die  $\alpha$ 2 – und  $\alpha$ 5 – Ketten nachgewiesen werden. Die  $\beta$ 2 – Lamininkette wurde in einer Mehrzahl von aponeurotischen Fibroblasten gefunden (Kosmehl et al. 1995). Somit ist die Reexpression der  $\alpha$ 2 – Kette sowohl in der nodulären Palmarfibromatose als auch im OSCC nicht als auffälliges Strukturphänomen zu identifizieren.

## **5.2. Deutliche Zunahme der Stromadepositionen der Laminin- $\alpha$ 3-kette in der Invasionsfront des OSCC mit Assoziation zu Invasivität und Malignität**

Bisher konnte die Laminin –  $\alpha$ 3 – kette in den Isoformen 332 (LM 5A und 5B), 311 (LM 6), 321 (LM 7) und 323 (LM 13) gezeigt werden. Dabei können den Isoformen des Laminin 5, LM 5A und 5B, unterschiedliche Organe bzw. Gewebe zugeordnet werden. In Brustdrüsen und in der Plazenta kann LM 5A gezeigt werden und funktioniert als Bestandteil der Hemidesmosomen und bildet eine Leitschiene für die zelluläre Migration (Rousselle et al. 1991; Doliana et al. 1997). Die Variante des LM 5B stellt sich in Uterus und Lunge dar, wobei keine funktionelle Bedeutung geklärt ist (Doliana et al. 1997). Alle Isoformen der Lamininkette  $\alpha$ 3 sind in der Haut detektiert worden (Rousselle et al. 1991; Doliana et al. 1997; Marinkovich et al. 1992; Champliaud et al. 1996). In dieser Arbeit konnte die Laminin –  $\alpha$ 3 – kette im Stroma der normalen und hyperplastischen Mundschleimhaut nicht bzw. selten sporadisch sowohl qualitativ mittels Immunhistochemie als auch semiquantitativ durch

---

Immunfluoreszenz detektiert werden. In G1 – Tumoren treten stromale Depositionen vor allem in Arealen mit infiltrativen Wachstum auf. Unterschiedlich stark zeigen sich die stromalen Markierungen noch in G2 – Tumoren, aber bei Proben von G3 – Tumoren sind kontinuierlich intensive Markierungen im Stroma vorhanden. Diese Tendenz konnte mit quantitativer Methode bestätigt werden. Hier kann das Vorhandensein als auch die Stärke der Ausprägung auf ein neoplastisches Geschehen hindeuten. Eine Korrelation der stromalen  $\alpha 3$  – Ketten – Expression zum Ausmaß der  $\alpha$ SMA – Positivität konnte von uns nicht gezeigt werden. Sowohl in Fällen geringer Ausprägung der  $\alpha$ SMA Positivität als auch in solchen mit hoher Ausprägung zeigt sich ein nahezu konstant hohes Detektionsniveau für die  $\alpha 3$ -Kette. Dies spricht dafür, dass es mit dem Beginn der Stromaaktivierung zu einer gesteigerten Expression und stromalen Deposition dieser Kette kommt, welche dann aber mit zunehmendem Aktivitätsgrad nicht weiter zunimmt. Aus diesem Grund wird hier ein Phänomen der frühen Fibroblastenaktivierung postuliert. Im fetalen und adulten gesunden oralen Gewebe sowie im hyperplastischen Gewebe konnten Kosmehl und Mitarbeiter die  $\alpha 3$  – Kette in der Basalmembran anfärben. Im OSCC verhält sich die Lamininkette  $\alpha 3$  ähnlich wie im gesunden und hyperplastischen Gewebe. Mit Zunahme der Invasivität und damit Malignität wiesen Kosmehl und Mitarbeiter bereits vermehrt fokale Brüche in der Basalmembran, eine Zunahme der Anfärbarkeit des Zytoplasmas der Tumorzellen und stromale Markierungen nach und postulierten einen Beitrag zum Prozess der Tumordinvasion (Kosmehl et al. 1999). Die Invasion im OSCC orientiert sich laut Kosmehl und Mitarbeitern an der Matrix des Laminin 332 (LM 5).

Das stromale Kompartiment zeigt eine deutliche Expression des onkofetalen Fibronektins. Nielsen und Mitarbeiter konnten die steigende Expression des glykosilierten onkofetalen Fibronektins in invasiven oralen Tumoren darstellen. Weiterhin reflektiert die Konzentration von Kollagen die Invasivität oraler Tumore. Außerdem lassen sich an dem vorherrschenden stromalen Umfeld Aussagen zur Progression der oralen Tumoren treffen. Verschiedene auf das Tumorstroma bezogene Ereignisse wie die Gefäßneubildung, die

---

Fibroblastenaktivierung, die Differenzierung der Myofibroblasten und das Auftreten spezifischer Stromaproteine z.B. Fibronectin und Laminin 332 (LM 5) stellen bekannte stromale Veränderungen im Tumor dar (Nielsen et al. 2008). Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Sinne einer klaren Zunahme stromaler  $\alpha 3$  – Positivität mit steigendem Malignitätsgrading unterstützt. Hierzu passend wiesen Tani und Mitarbeiter eine Zellmigration durch die Präsenz von HGF (*hepatocyte growth factor*) nach, wodurch sich die migratorische Aktivität im Tumor verstärkte. Durch die Behandlung mit Herbimycin A und Antikörpern gegen Integrin  $\alpha 3/\beta 1$  und Laminin –  $\alpha 3$  – kette konnte die Zellmigration im Pankreastumor blockiert werden. In humanen Pankreastumoren zeigte sich eine Expression von Laminin 111 (LM 1) und Laminin 332 (LM 5). Außerdem wurde innerhalb der Studie eine stromale Reaktivierung des LM 332 (LM 5) in humanen Tumorzellen des Pankreas dargestellt (Tani et al. 1997).

Akashi und Mitarbeitern wiesen auf die Expression der Laminin –  $\alpha 3$  – kette im nicht – kleinzelligem Bronchialkarzinom hin. Fragmentierung und völlige Abwesenheit der  $\alpha 3$  – Kette im nicht – kleinzelligen Bronchialkarzinom sind deutlicher zu beobachten als bei der Lamininkette  $\alpha 5$ . Die reduzierte Expression dieser  $\alpha$  – Ketten im Bronchialkarzinom trägt zur Fragmentierung der Basalmembran bei und erleichtert die Proliferation der Stromaanteile, die eine wesentliche Rolle bei der malignen Zellinvasion spielen (Akashi et al. 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Zunahme der stromalen Depositionen der Laminin –  $\alpha 3$  – kette mit steigendem Malignitätsgrad und zunehmender  $\alpha$ SMA–Positivität des Stromas ist auch vor dem Hintergrund der tumorbiologischen Bedeutung der Prozessierung dieser Kette mit daraus folgenden funktionell unterschiedlichen prozessierten Varianten zu betrachten.

Es ist bekannt, dass die Protease BMP–1 (*bone morphogenetic protein 1*) an der Prozessierung der  $\alpha 3$  – Kette wesentlich beteiligt ist (Amano et al. 2000). Die unprozessierte Kette mit einer Molekülgröße von 190 kd wirkt migrationsfördernd, der prozessierten Form mit einer Größe von 160 kd wurde eine zelladhäsionsfördernde Funktion zugeschrieben (Goldfinger et al. 1998;

Hirosaki et al. 2000). Vor diesem Hintergrund scheint die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebene stromale Deposition mit den entsprechenden Korrelationen tumorbiologisch bedeutend für den Invasionsprozess zu sein. Für die Laminin –  $\gamma 2$  – Kette, ebenso wie die  $\alpha 3$  – Kette ein Bestandteil des Laminin 332, wurden im Stroma der Invasionszone des OSCC räumliche Assoziationen zu BMP-1 und MT1-MMP (*membrane type matrix metalloproteinase 1*) nachgewiesen, was für eine Beteiligung dieser beiden Proteasen auch an der Prozessierung der  $\alpha 3$  – Kette mit den daraus folgenden Funktionsänderungen spricht (Franz et al. 2007).

### **5.3. Deutliche Zunahme der Stromadepositionen der Laminin- $\alpha 4$ -kette in der Invasionsfront des OSCC mit Assoziation zu Invasivität und Malignität**

Zurzeit sind folgende Lamininisoformen mit der  $\alpha 4$  – Kette als Bestandteil bekannt: 411 (LM 8), 421 (LM 9) und 423 (LM 14). Diese kommen vor allem in Muskelzellen, peripheren Nervenzellen und in Endothelzellen vor (Thyboll et al. 2002) und tragen zur Endothelentwicklung bei (Libby et al. 2000). Außerdem treten die Isoformen weiterhin in Leukozyten (Wondimu et al. 2004), in der Retina (Libby et al. 2000) und im Hippocampus des Gehirns auf und sorgen hier für eine synaptische Organisation (Egles et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich für die Laminin –  $\alpha 4$  – kette eine zunehmende Tendenz stromaler Positivität mit maligner Transformation des oralen Epithels. Mit zunehmender Malignität des OSCC wurden vermehrt stromale Markierungen detektiert. Besonders stark ausgeprägt erscheint die Stromamarkierung der  $\alpha 4$  – Kette in G3 – Tumoren. Damit könnte auch die immunhistochemische Intensität der Laminin –  $\alpha 4$  – kette auf ein Tumorgeschehen hinweisen bzw. mit dessen Fortschreiten zunehmen. Interessanterweise ist in der semiquantitativen Bewertung eine statistisch signifikante positive Assoziation der  $\alpha 4$  – Ketten – Positivität im Stroma des OSCC mit zunehmendem Aktivitätsgrad, also vermehrter Detektierbarkeit  $\alpha$ SMA – positiver Zellen im Stroma, zu beobachten. Dies spricht für eine Synthese dieser Lamininkette durch fibroblastäre Zellen mit Zunahme im Rahmen einer vermehrten Myofibroblastenaktivierung im Bereich

---

der Tumor–Stroma–Interaktionszone und es kann von einem Phänomen der Myofibroblastenkonversion gesprochen werden. Einhergehend mit diesen Ergebnissen wurde bereits in Lungentumoren eine Synthese dieser Kette durch fibroblastäre Zellen nachgewiesen (Pierce et al. 1998). Weiterhin konnte in den immunhistochemischen Darstellungen eine Reexpression der Basalmembranstrukturen im OSCC gezeigt werden. In normaler Mundschleimhaut konnten keine positiv markierten Basalmembranen ausgemacht werden, erst bei hyperplastischen Veränderungen im Gewebe wurden punktuelle Anfärbungen in der Basalmembran dargestellt. Je undifferenzierter der Tumor umso stärker fiel die Expression der Laminin –  $\alpha 4$  – kette in der Basalmembran auf. Durch Pierce und Mitarbeiter konnten Endothelzellen, Adipozyten und alveoläre Fibroblasten als Syntheseort der Laminin –  $\alpha 4$  – kette ausgemacht werden (Pierce et al. 1998). In nachfolgenden Studien wurde festgestellt, dass in Lymphozyten, Monozyten und aus humanen Blutzellen abstammende neoplastische Zellen die Lamininisoform 411 (LM 8) produziert wird (Pedraza et al. 2000). Bestätigungen dieser Erkenntnisse lieferten die Beobachtungen von Petäjaniemi sowie Pierce und Mitarbeitern, die in mesenchymalen Zellen wie Endothelzellen, Blutzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten eine Synthese der Laminin –  $\alpha 4$  – kette nachweisen konnten (Pierce et al. 1998; Petäjaniemi et al. 2002). Es konnte weiterhin eine Expression der  $\alpha 4$  – Kette durch Zytokine und angiogenetisch wirkenden Steroiden festgestellt werden (*cytokine – activated endothelia*) (Frieser et al. 1997; Sixt et al. 2001). Durch die Überexpression der Laminin –  $\alpha 4$  – kette zeigte sich eine unterstützende Funktion in der Angiogenese und eine Korrelation zu Malignität sowie Invasivität in humanen Gliomen (Ljubimova et al. 2001; Li et al. 2006).

Die immunhistochemische Detektion zeigt vielgestaltige Verteilungsmuster der  $\alpha 4$  – Kette. So kommt sie in mesodermalem Gewebe im Bereich der Basalmembranen des Endothels und auch im Bereich epithelialer Basalmembranstrukturen von Epidermis und drüsenhaltigen Geweben im Verdauungstrakt vor. Weitere Ergebnisse zeigten in der frühen fetalen Entwicklungsphase eine mögliche Detektion der  $\alpha 4$  – Kette in der

---

Basalmembran der Skelettmuskulatur, die zum Ende der fetalen Periode nur noch schwach nachgewiesen werden konnten. Es stellten sich im fetalen Skelettmuskel Kollokationen mit der Laminin –  $\alpha 2$  – Kette heraus. Außerdem konnte in muskulären Arterien, Arteriolen und Venen in fetaler als auch adulter Niere die Laminin –  $\alpha 4$  – Kette ausgemacht werden. Die Produktion der Laminin –  $\alpha 4$  – Kette wurde in humanen Endothelzellen nachgewiesen (Petäjämäki et al. 2002). Nachgewiesen wurden Funktionen im Zusammenhang mit der „Formation“ des Endothels und bei der Invasion von Tumorzellen. Weiter konnte diese Kette immunhistochemisch in vaskulären Strukturen und im Stroma renaler Tumoren beobachtet werden. An Tumorzellen des Nierenzellkarzinoms wurde eine migrationsfördernde Leistung durch die Laminin –  $\alpha 4$  – Kette festgestellt. Eine de – adhäsive Funktion der  $\alpha 4$  – Kette spielt eine Rolle bei Abtrennung und Invasion renaler Karzinomzellen. Zellen des Nierenzellkarzinoms stellen ein Produktionsort der  $\alpha 4$  – Kette dar und ihre migrations– und invasionsfördernde Wirkung konnte am Modell dieser Tumorentität nachgewiesen werden (Vainionpää et al. 2007).

Durch Regulierung von Genen, die sowohl EGF – Rezeptoren als auch die  $\alpha 4$  – Kette des Laminins codieren, zeigt sich eine Überexpression der Laminin –  $\alpha 4$  – Kette im Glioblastom und Astrozytom. Die Veränderungen in der Expression lassen keine Assoziationen zum Malignitätsgrad der Tumoren zu. Jedoch kann die Überexpression der Laminin –  $\alpha 4$  – Kette als bedeutend für die im Gliom auftretende Vaskularisierung und damit für die Tumorentwicklung angesehen werden (Ljubimova et al. 2001). Takkunen und Mitarbeiter stellten die Hypothese auf, dass die Expression der Laminine in der Basalmembran durch die Epithelial – Mesenchymale – Transition (EMT) reguliert wird. Der Vorgang der EMT soll außerdem durch den Transkriptionsfaktor Snail bestimmt sein. Für das OSCC konnte im Zellkulturmodell gezeigt werden, dass in Snail – transfizierten Zellen als Modell einer vollständigen EMT ein Expressionsverlust von Laminin 511 und die Neoexpression der mRNA der Laminin –  $\alpha 4$  – Kette einhergehend mit der Synthese des Laminin 411 zu beobachten ist. Snail – transfizierte Zellen adherieren stark an Laminin 511 und Fibronectin, jedoch nur minimal an Laminin 411. Im Gegensatz dazu inhibiert Laminin 411 die



Zelladhäsion an andere extrazelluläre Matrixproteine. Darauf basierend ließ sich schlussfolgern, dass die EMT einen Expressions – *switch* von Laminin 511 zu Laminin 411 induziert, welcher möglicherweise direkt über Snail reguliert wird und dass Laminin 411 potentiell zum invasiven Verhalten von Tumorzellen beitragen kann (Takkunen et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich nach Diskussion der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Laminin –  $\alpha$ 4 – kette mit den Daten aus der Literatur eine Bedeutung der stromalen Depositionen sowie der zunehmenden Positivität in Basalmembranstrukturtypen mit steigender Malignität eine besondere tumorbiologische Bedeutung für den Invasionsprozess des OSCC postulieren.

#### **5.4. Diskrete stromale Depositionen der Laminin- $\alpha$ 5-kette im OSCC mit steigendem Malignitätsgrading**

Die Lamininkette  $\alpha$ 5 konnte in den Isoformen 511 (LM 10), 521 (LM 11) und 523 (LM 15) nachgewiesen werden. In den unterschiedlichsten Geweben wurde die  $\alpha$ 5 – Kette beobachtet, u.a. in vaskulären Strukturen, in der Plazenta (Champlaud et al. 2000), in neuromuskulären Geweben, in Nierenglomeruli (Miner and Patton 1999) sowie in den Haaren (Libby et al. 2000). Die Arbeitsgruppe um Libby detektierten die Lamininisoform 523 (LM 15) auch in Retina und Arealen des ZNS, dabei tragen die Lamininmoleküle zur synaptischen Organisation bei (Libby et al. 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit lässt sich im normalen oralen Gewebe und in hyperplastischer Mundschleimhaut die Laminin –  $\alpha$ 5 – kette im Stroma nicht detektieren. Auch im G1 – Tumor können nur geringfügig stromale Markierungen gezeigt werden. Diskret und unregelmäßig auftretenden Depositionen im Stroma stellen sich im G3 – Tumor dar. Trotz geringerer Intensität der stromalen Deposition der  $\alpha$ 5 – Kette nimmt der Nachweis im Tumor mit größerer Malignität zu. Die quantitative Beleuchtung der  $\alpha$ 5 – Kette unterstützt die beschriebenen Charakteristika der Reexpression im gesunden und tumorösen Gewebe. Da die Ausprägungen der Lamininkette  $\alpha$ 5 im

---

Tumorstroma eher zart gegenüber anderen Lamininketten auftreten, sollte dieser Marker bezüglich seiner tumorbiologischen Bedeutung nicht isoliert sondern nur im Verein mit Expressions- bzw. Depositionsmustern anderer Laminine bewertet werden. Eine signifikante Korrelation der stromalen Depositionen zum Ausmaß der  $\alpha$ SMA – Positivität im OSCC zeigt sich in der vorliegenden Arbeit nicht, so dass diese Lamininkette nicht als repräsentativ für das stromale Aktivitätsniveau im Rahmen der OSCC – Invasion betrachtet werden kann. Kosmehl und Mitarbeiter fanden für die  $\alpha$ 5 – Kette heraus, dass diese in fetalem und adultem oralen Gewebe in der Basalmembran detektiert werden konnte. Bei verändertem hyperplastischen Gewebe und maligner Transformation zum OSCC erschien die Basalmembran positiv für die  $\alpha$ 5 – Kette (Kosmehl et al. 1999). Weitere Einzelheiten zum Verhalten der Laminin –  $\alpha$ 5 – kette im Tumorstroma sind bislang nicht bekannt. Untersuchungen von Akashi und Mitarbeitern befassten sich mit der Expression von weiteren Laminin –  $\alpha$  – ketten im nicht – kleinzelligem Bronchialkarzinom. Im Allgemeinen kann die  $\alpha$ 5 – Kette in der Peripherie wesentlich, aber in Arealen der alveolaren Schädigung diskontinuierlich bzw. bei Fibroblastenproliferation in Adenokarzinomen gar nicht gezeigt werden (Akashi et al. 2001).

#### **5.5. Neuauftreten stromaler Depositionen der Laminin- $\beta$ 2-kette im Rahmen der malignen Transformation des oralen Epithels zum OSCC mit klarer Assoziation zu steigender Malignität des Tumors**

Die  $\beta$ 2 – Kette, auch bekannt als s – Laminin, konnte als ein Homologon der  $\beta$ 1 – Kette beschrieben werden. Die Laminin –  $\beta$ 2 – kette kommt in den Isoformen Laminin 121 (LM 3), 221 (LM 4), 321 (LM 7), 421 (LM 9), 521 (LM 11), 323 (LM 13), in beiden Isoformen des Laminin 14 (LM 423 und 522) und in 523 (LM 15) vor. Zuerst wurde diese Lamininkette in der Basalmembran im synaptischen Spalt der neuromuskulären Endplatte beobachtet (Hunter et al. 1989). Ebenfalls dargestellt wurde die  $\beta$ 2 – Kette im Skelettmuskel, im Perineurium, in Nierenglomeruli und in Gefäßmuskelzellen (Sanes and Chiu 1983; Hunter et al. 1989). Weitere Nachweise erfolgten auch in Lungenalveolen, im Amnion und

im ZNS (Hunter et al. 1992; Wewer et al. 1995; Champliand et al. 1996; Virtanen et al. 1996).

Eine immunhistochemische Detektierbarkeit der Laminin –  $\beta 2$  – kette ist im Stroma der normalen und hyperplastischen Mundschleimhaut nicht möglich. Deutliche Veränderungen dazu sind beginnende stromale Markierungen im gut differenzierten Tumor (G1) mit häufiger räumlicher Assoziation zu Entzündungszellen. In Gewebeproben von G2 – Tumoren finden sich vermehrt eine stromale Positivität gegenüber G1 – Tumoren. Bei hohem Malignitätsgrad (G3) steigt die Markierung im Stroma weiterhin an. Ein doch nennenswerter Anstieg von hyperplastischem oralem Gewebe gegenüber Gewebe aus G1 – Tumoren stellt sich bei quantitativer Auswertung dar. Weiter verhält sich die Quantitätszunahme zum G2 – Tumor geringer ausgeprägt als jene zu G3 – Tumoren hin. Bezüglich der Beziehung der stromalen Deposition der  $\beta 2$  – Kette zur  $\alpha$ SMA–Positivität des Stromas konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante positive Assoziation nachgewiesen werden, was für eine vermehrte Synthese und extrazelluläre Matrixorganisation mit steigendem Ausmaß der stromalen Aktivierung spricht. Untersuchungen zur stromalen Beteiligung im oralen Plattenepithelkarzinom liegen zur  $\beta 2$  – Kette bislang nicht vor. In fetalem oralem Gewebe konnte die  $\beta 2$  – Kette in der Basalmembran gezeigt werden. Auch in Basalmembranen hyperplastisch veränderten Geweben wurde die Laminin –  $\beta 2$  – kette dargestellt sowie in den Basalmembranstrukturen des OSCC (Kosmehl et al. 1999). Bei fehlender Nachweisbarkeit im Stroma der gesunden Mundschleimhaut und der bekannten Bedeutung der Lamininkette  $\beta 2$  im embryonalen Stadium und damit im Rahmen von Differenzierungsprozessen (Libby et al. 1996) scheint die stromale Reexpression einen Teilprozess der tumorassoziierten Reorganisation einer onkofetalen Matrix darzustellen. Ähnliche Befunde wurden von Vogel und Mitarbeitern an einem Modell des Rhabdomyosarkoms beschrieben (Vogel et al. 1991).

Da die Lamininkette  $\beta 2$  als ein häufiger Bestandteil vieler Lamininisoformen gilt und somit ein weites organ– und entitätsübergreifendes Verteilungsspektrum aufweist, sind qualitative und quantitative Unterschiede bzgl. ihrer spezifischen Aussagekraft für die Tumorbilogie des OSCC jedoch kritisch zu betrachten.

Unterschiedliche Vorkommen deuten auf die Vielfältigkeit des Auftretens der Lamininkette  $\beta 2$  hin. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die in jedem Fall deutliche, zu Grading und stromaler Aktivierung korrelierende, stromale Positivität dieser Lamininkette im Zusammenhang mit anderen Markermolekülen als ein tumorinvasionsassoziiertes Phänomen im OSCC betrachtet werden kann.

#### **5.6. Stromale Depositionen der Laminin- $\beta 3$ -kette sind ein seltenes Phänomen in der Tumorinvasionsfront des OSCC ohne Korrelation zu steigender Malignität**

Die Laminin –  $\beta 3$  – kette besitzt den nach heutigem Kenntnisstand kürzesten Aufbau einer Lamininkette (Patarroyo et al. 2002). Sie stellt einen Baustein der Lamininisoformen 3A32 und 3B32 (LM 5A und 5B) dar. Deswegen gilt aktuell die  $\beta 3$  – Kette als spezifisch für die genannte Isoform. In der Haut, in der Plazenta und im Brustdrüsengewebe wurde die Isoform LM 5A nachgewiesen (Rousselle et al. 1991; Doliana et al. 1997). Die Isoform LM 5B ist in Haut, Lunge sowie Uterus lokalisierbar (Doliana et al. 1997). Funktionell übernimmt diese Untereinheit des Laminins hauptsächlich die Formation der Hemidesmosomen und ist beteiligt an der Regulation von Zellmigration (Rousselle et al. 1991; Doliana et al. 1997).

Für die Lamininkette  $\beta 3$  konnte keine stromale Deposition im normalen oralen Gewebe gezeigt werden. Auch in der hyperplastischen Mundschleimhaut fehlt der Nachweis für Stromamarkierungen. In G1 – Tumoren tauchen stromale Markierungen eher sporadisch, in G2 – Tumoren gelegentlich auf. Tumoren mit hohem Malignitätsgrad, also G3, zeigen ebenfalls kaum positiv detektiertes Stroma. Quantitativ unterscheiden sich manche Proben untereinander sehr. Die Stromaanfärbung erscheint jedoch weder entzündungsassoziiert noch in Assoziation mit der Invasionsfront. Deswegen sollte das Vorkommen der  $\beta 3$  – Kette als unspezifisch trotz tendenziellem Anstieg gewertet werden. Nur in wenigen Gewebeproben stellten sich teilweise bis punktuell ausgeprägte Markierungen im Stroma (Score 1 siehe Tabelle 4) dar. Für die  $\beta 3$  – Kette ist

wie beschrieben die Lamininisoform 332 (LM 5) spezifisch. In anderen Lamininen wird diese  $\beta$  – Untereinheit nicht exprimiert, sodass auch hier die Aussagen für die Isoform LM 332 (LM 5) sprechen. Immunhistochemisch konnte in dieser Arbeit keine direkte Detektierung der Basalmembran in normalem und hyperplastischem oralen Gewebe sowie in allen Differenzierungsgraden eines OSCC gezeigt werden. Hier stellten sich insbesondere basale Keratinozyten dar. Zum Tumorstroma liegen keine Aussagen vor. Wie auch für die  $\beta 2$  – Kette beschrieben, konnten in der vorliegenden Arbeit eine vermehrte stromale Reexpression mit zunehmendem Ausmaß der  $\alpha$ SMA–Positivität nachgewiesen werden.

Untersuchungen zum oralen Plattenepithel und dessen maligner Entartung zeigen eine konstante Markierung im Bereich der Basalmembran ohne Veränderungen in normaler versus neoplastischer Mukosa sowie ohne Veränderungen mit steigendem Malignitätsgrad (Kosmehl et al. 1999). Untersuchungen zum stromalen Vorkommen dieser Kette in der normalen Mundschleimhaut sowie im OSCC liegen nicht vor. Die von uns nachgewiesene stromale Positivität mit Assoziation zu steigendem Malignitätsgrading wurde bisher nicht untersucht. Aus diesem Grunde können wir aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der stromalen Deposition dieser Kette im Bereich der Tumorinvasionsfront des OSCC als zusätzlichen Marker der Tumorinvasivität vorschlagen. Die Basalmembranmarkierungen hingegen tragen hierzu aufgrund der Kenntnis fehlender Veränderungen nicht bei (Kosmehl et al. 1999).

### **5.7. Stromale Depositionen der Laminin- $\gamma 2$ -kette als Marker der malignen Transformation des oralen Epithels: deutliche Zunahme mit steigender Malignität**

Die Laminin –  $\gamma 2$  – kette gehört zu den leichten Ketten und ist eine der drei bisher bekannten Isoformen der  $\gamma$  – Kette (Gersdorff et al. 2005). Momentan ist die Laminin –  $\gamma 2$  – kette in den Lamininisoformen 332 (LM 5A und LM 5B) und 522 enthalten und ist wie bereits beschrieben funktionell für die Bindung an

---

Kollagen VII, Nidogen und Fibulin verantwortlich (Sasaki et al. 2001; Schneider et al. 2007). Nachweise dieser Kette wurden hauptsächlich in der Haut geführt (Rousselle et al. 1991; Doliana et al. 1997). Durch das proteolytische *Processing* existieren verschiedene große Laminin- $\gamma$ -ketten, z.B. eine 105 kDa schwere  $\gamma$ 2-Kette, die durch das Prozessieren durch BMP-1 entsteht (Veitch et al. 2003). Andere Enzyme wie die Matrixmetalloproteinasen können an den Strukturveränderungen beteiligt sein. Das unter dem Begriff MT1-MMP deklarierte Enzym schafft zwei Fragmente der  $\gamma$ 2-Kette (Koshikawa et al. 2005). Sowohl in humanen epithelialen Tumoren der Lunge, des Kolons als auch der Schleimhäute konnte eine gesteigerte Expression der  $\gamma$ 2-Kette dargestellt werden. Außerdem wurde herausgefunden, dass die Invasivität des Tumors mit der Expression der  $\gamma$ 2-Kette korreliert (Kainulainen et al. 1997; Maatta et al. 1999; Ono et al. 1999; Pyke et al. 1995; Yamamoto et al. 2001; Noel et al. 2005).

Eine Detektion der Laminin- $\gamma$ 2-Kette im Stroma normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut ist nicht möglich. Das Erscheinungsbild ändert sich rapide mit dem Auftreten eines neoplastischen Geschehens. Deutliche stromale Depositionen finden sich bereits im stark differenzierten Tumor (G1), die Depositionen zeigen dabei eine Betonung der Stromaregionen um tumorassoziierte Gefäße. Die Intensität der stromalen Markierungen nimmt in G2-Tumoren weiter zu. Hauptsächlich in G3-Tumoren zeigen sich die Markierungen im Stroma von mittlerer bis starker Ausprägung (Score 2 und 3 siehe Tabelle 4). In der quantitativen Auswertung lassen sich die genannten Kriterien verdeutlichen. Hier wird, sobald Tumorgewebe vorliegt, ein enormer Anstieg der Expression der stromalen Deposition der  $\gamma$ 2-Kette ersichtlich. Zwischen der Intensität der stromalen Markierung von G1-Tumoren zu G2-Tumoren zeigen sich kaum Unterschiede. Eine erhebliche Zunahme der Stromamarkierungen lässt sich bei den G3-Tumoren beobachten. Daher reflektiert das Ausmaß der stromalen Detektierbarkeit der Laminin- $\gamma$ 2-Kette im OSCC den Grad der Malignität und damit Invasivität. Deswegen können wir die Laminin- $\gamma$ 2-Ketten-Deposition im Stroma als Marker der Invasivität beschreiben. Dies bestätigt Vorarbeiten zur Bedeutung der Laminin- $\gamma$ 2-Kette im

OSCC, welche ihr eine wichtige Rolle im Rahmen der Tumorzellinvasion, als sogenannte Leitschiene der Invasion, zugeschrieben, siehe auch Beschreibungen der Laminin –  $\alpha 3$  – Kette (Kosmehl et al. 1996; Kosmehl et al. 1999, Franz et al. 2006, Franz et al. 2007). Kosmehl und Mitarbeiter betrachteten die Expression der  $\gamma 2$  – Kette im fetalen und adulten gesunden oralen Gewebe mit dem OSCC. Im adultem Gewebe kommt die  $\gamma 2$  – Kette nur im Bereich von Basalmembranstrukturen, nicht im Stroma, vor. Erst in hyperplastischen Geweben beginnt eine stromale Reexpression dieser Kette (Kosmehl et al. 1999). Diese Erkenntnisse konnten auch in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. Von Franz und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass die  $\gamma 2$  – Kette des Laminins 332 (LM 5) bandförmige Lokalisationen mit Tenascin C (L) in Basalmembranstrukturen um Tumorzellcluster fern von der Invasionsfront in gut differenzierten Tumorarealen des OSCC detektiert werden konnten. Unterhalb der rupturierten Basalmembran der Invasionszone zeigten sich eher selten Lokalisationen beider Moleküle, sondern nur punktförmige Ko – Depositionen. Somit konnte die Protein – Protein – Interaktion der Laminin –  $\gamma 2$  – Kette mit großem ungespleißten Tenascin-C als tumorbiologisch bedeutendem Adhäsionsmolekül in verschiedenen Stadien des Invasionsprozesses nachgewiesen werden (Franz et al. 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Beziehungen der stromalen Detektierbarkeit der  $\gamma 2$  – Kette zur  $\alpha$ SMA-Positivität zeigt deutlich stromale Depositionen in Bereichen stromaler Aktivierung von Fibroblasten. Für die Synthese von Laminin 332 wurden bisher ausschließlich epitheliale Zellen verantwortlich gemacht (Ono et al. 1999; Kagesato et al. 2001). Einhergehend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden spotförmige stromale Depositionen des LM 332 in von der Basalmembran entfernten Regionen nachgewiesen. Diese Depositionen zeigten sich insbesondere in der Umgebung von mesenchymalen Zellen und Gefäßstrukturen der Invasionsfront. Nicht nur in Tumorzellen sondern auch in mesenchymalen Zellen konnte eine Expression der  $\gamma 2$  – Kette beobachtet werden. Der Ursprung dieser Zellen ist aktuell noch unklar, es kann sich zum einen um aktivierte Fibroblasten (CAFs) handeln oder aber um ursprünglich epitheliale Zellen, welchen den Vorgang der EMT

durchlaufen haben. Eine räumliche Assoziation zu TGF –  $\beta$ 1 sowie MT1 – MMP mit stromalen Laminin 332 (LM5) konnte bestätigt werden (Franz et al. 2007). In gut differenzierten Adenokarzinomen der Lunge detektierten Kagesato und Mitarbeiter die  $\gamma$ 2 – Kette des LM 332 (LM5) entlang der kontinuierlich erscheinenden Basalmembran. Diese Basalmembranstrukturen waren ebenfalls positiv für die  $\alpha$ 3 – und  $\beta$ 3 – Kette des LM 332 (LM 5). Unabhängig von der Differenzierung des Adenokarzinoms färbte sich bei Betrachtung der  $\gamma$ 2 – Kette das Zytoplasma der Tumorzellen nur teilweise an ohne jeglichen Beweis der Koexpression von der  $\alpha$ 3 – und  $\beta$ 3 – Kette. Die  $\gamma$ 2 – Kette erscheint in invadierenden Tumorzellen innerhalb des Stromas prominent. Damit könnte die  $\gamma$ 2 – Kette ein wichtiger Hinweis zur Progression von Adenokarzinomen der Lunge sein (Kagesato et al. 2001)

#### **5.8. Gefäßpositivität ausgewählter Lamininketten im Stroma der Tumorinvasionszone des OSCC: Quantitative Unterschiede in Abhängigkeit von der Malignität**

Bezüglich der stromalen Deposition der Lamininketten zeigten sich in den qualitativen und semiquantitativen Analysen von normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut im Vergleich zu oralen Plattenepithelkarzinomen unterschiedlicher Malignität deutliche Differenzen. Eine positive korrelative Beziehung konnte hierbei mit besonderer Deutlichkeit für die Lamininketten  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5 und  $\gamma$ 2 mit häufiger räumlicher Assoziation zu Tumorgefäßen gezeigt werden. Aus diesem Grunde erfolgte die semiquantitative Analyse der Gefäßpositivität für diese Ketten an ausgewählten Fällen mittels Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen nach dem oben beschriebenen Protokoll (siehe 3.2.4.).

Die tumorbiologische Relevanz dieser Untersuchungen wird durch bekannte Daten zur Bedeutung bestimmter Lamininketten für Angiogeneseprozesse unterstützt. So konnte generell für eine spezifische Peptidsequenz (SIKVAV) innerhalb der Laminin –  $\alpha$  – ketten eine bedeutende Rolle für die Induktion der Angiogenese sowohl in vitro als auch in vivo über eine Interaktion mit



---

Endothelzellen nachgewiesen werden. Somit lässt sich auf eine Bedeutung für die im Rahmen von Gewebeumbauprozessen induzierte Neoangiogenese ableiten. Dies gilt sowohl für physiologische (Gewebeverletzung) als auch für pathologische (Tumorwachstum) Gewebsumbauprozesse (Grant et al. 1992).

In einer Untersuchung von Vitolo und Mitarbeitern wurde die Laminin –  $\alpha 2$  – Kette und Vorgänge der Angiogenese im Zusammenhang beleuchtet. Hierzu wurden unterschiedliche Karzinompräparate, u.a. aus supraglottischen Tumoren sowie Lungen – und Brustkarzinome analysiert. Unabhängig vom Tumortyp und der neu ausgebildeten Vaskularisierung konnte eine Expression der Lamininkette  $\alpha 2$  in der Basalmembran nur weniger Gefäße beobachtet werden. In Zellkulturen wiesen Vitolo und Mitarbeiter in jungen Endothelzellen die  $\alpha 2$  – Kette nach. Somit kann diese Kette als Marker der frühen Angiogenese diskutiert werden (Vitolo et al. 2001). In den Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation zeigte die Laminin –  $\alpha 2$  – Kette keine klar erkennbare räumliche Assoziationen zu Gefäßstrukturen und auch keine Assoziation bezüglich des Ausmaßes stromaler Depositionen zu Malignitätsgrad oder stromaler Aktivierung ( $\alpha$ SMA – Positivität). Aus diesem Grunde und aufgrund der beschriebenen Daten aus der Literatur führten wir für diese Lamininkette im OSCC keine detaillierten Untersuchungen zur Quantifizierung der Gefäßpositivität durch.

In der semiquantitativen Bewertung zeigen sich in normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut nahezu alle CD31–positiven Strukturen auch positiv für die  $\alpha 3$  – Kette. Hier sind insbesondere große und muskelassoziierte Gefäße angefärbt. Der Anteil  $\alpha 3$ –positiver Strukturen an der Gesamtheit der über CD31 detektierbaren Gefäße nimmt in G1 – Tumoren verglichen mit normaler/hyperplastischer Mundschleimhaut deutlich ab. Mittels *Laser scanning* Mikroskop lässt sich nur geringe vaskuläre Positivität erfassen. In G2 – Tumoren sind dann nahezu keine  $\alpha 3$ –positiven Gefäße mehr zu beobachten, bei G3 – Tumoren nimmt die Anzahl dann wieder unwesentlich zu. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass immunhistochemische Analysen durch Kariya und Mitarbeiter eine Kolo-kalisation der beiden Varianten des Laminin 332 enthaltenden  $\alpha 3$  – Kette (LM 5A = 3A32 und LM 5B = 3B32) in

---

der epithelialen Basalmembran von Haut, Ösophagus, Brustdrüsen und Lunge zeigen konnten. In der Basalmembran aller Gefäße färbte sich die  $\alpha 3B$  – Kette positiv, aber für die  $\alpha 3A$  – Kette blieben diese Areale negativ. Die  $\alpha 3B$  – Kette konnte jedoch kaum in Gefäßen von Hauttumoren detektiert werden. Somit scheint die Expression der  $\alpha 3B$  – Kette auf vaskuläre Basalmembranen in normalem Gewebe fokussiert zu sein (Kariya et al. 2008). Dies ist übereinstimmend mit unseren Ergebnissen einer Detektierbarkeit der  $\alpha 3$  – Kette in der normalen oralen Mukosa mit einem Verlust im OSCC mit steigender Malignität. Eine Unterscheidung bezüglich der oben beschriebenen Isoformen der  $\alpha 3$  – Kette erfolgte im Rahmen unserer Untersuchungen nicht.

Die Laminin –  $\alpha 4$  – kette stellte sich in den Analysen im Rahmen der vorliegenden Dissertation immunhistochemisch in normaler und hyperplastischer Mundschleimhaut scharf umschrieben in Gefäßstrukturen dar. Außerdem färbt sich die  $\alpha 4$  – Kette in allen Differenzierungsgraden des OSCC in vaskulären Strukturen in nahezu gleicher Intensität unabhängig von der Gradingstufe an. In Assoziation zur Invasionsfront sind hauptsächlich große Gefäße markiert. Daher ist die  $\alpha 4$  – Kette nicht als tumorspezifisch anzusehen. Analysen mithilfe der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung bestätigen diese Erkenntnisse. Aktuelle Daten schreiben der  $\alpha 4$  – Kette eine regulatorische Funktion für das biologische Verhalten von Endothelzellen in vitro und Angiogeneseprozesse in vivo über eine Rezeptorligandinteraktion mit spezifischen Integrinsubtypen zu (Gonzalez et al. 2002). Im Tumor wurde ein Einfluss der Laminin –  $\alpha 4$  – kette auf Vaskularisierungsprozesse aufgrund ihres Vorkommens in Gefäßstrukturen postuliert. So konnte immunhistochemisch der Nachweis von vaskulären Strukturen im Nierenzellkarzinom erbracht werden (Vainionpää et al. 2007). Zuvor hatten bereits Petäjaniemi und Mitarbeiter in muskulären Arterien sowie Arteriolen und in venösen Gefäßabschnitten der fetalen (unreifen) und adulten (reifen) Niere die  $\alpha 4$  – Kette nachgewiesen. Außerdem zeigten sich humane Endothelzellen als Syntheseort der Laminin –  $\alpha 4$  – kette (Petäjaniemi et al. 2002). Schon Pierce und Mitarbeiter stellten Endothelzellen als Syntheseort dieses Moleküls fest (Pierce et al. 1998). Zwar konnten in Geweben von Gliomen keine Veränderungen in der Expression der

---

Laminin –  $\alpha 4$  – kette bezüglich der Malignität gezeigt werden, jedoch besteht ein Zusammenhang zwischen der neu ausgebildeten Vaskularisierung und einer Überexpression der  $\alpha 4$  – Kette. Dies ist für die Tumorentwicklung bedeutend (Ljubimova et al. 2001). Aus den von uns erhobenen Daten lässt sich vor dem Hintergrund der aktuell vorliegenden Literaturdaten schlussfolgern, dass es sich bei der Laminin –  $\alpha 4$  – kette um einen charakteristischen Bestandteil der Gefäßbasalmembran sowohl in normaler oraler Mukosa als auch im OSCC zu handeln scheint. Damit kann eine funktionelle Bedeutung für Angiogeneseprozesse im Allgemeinen ohne spezifische Assoziation zu neoplastischen Prozessen postuliert werden, d.h. auch im Rahmen physiologischer, mit Gefäßbildung einhergehender Prozesse schein dieses Molekül von Bedeutung zu sein. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Positivität der  $\alpha 4$  – Kette in der vaskulären Basalmembran scheint diese als entsprechendes Markermolekül geeignet zu sein.

Eine deutliche immunhistochemische Detektierbarkeit der Laminin –  $\alpha 5$  – kette zeigte sich in Gefäßstrukturen der normalen und hyperplastischen Mundschleimhaut, dies konnte durch Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen bestätigt werden. Wesentliche Unterschiede innerhalb der verschiedenen Differenzierungsgrade des OSCC fallen in der immunhistochemischen Auswertung nicht auf. Bei semiquantitativer Auswertung zeigt in höher differenzierten oralen Tumoren eine abnehmende vaskuläre Positivität verglichen mit normaler Mundschleimhaut. Jedoch nehmen Doppelmarkierungen in Gefäßstrukturen im G3 – Tumor wieder zu. Daten zur Gefäßpositivität der Laminin –  $\alpha 5$  – kette in Karzinomen liegen aktuell nicht vor, so dass aufgrund der in der vorliegenden Dissertation erhobenen Beobachtungen eine relative Konstanz der Gefäßmarkierungen zwischen normaler und neoplastischer Mundschleimhaut festzustellen ist und die  $\alpha 5$  – Kette somit auch als Gefäßmarker diskutiert werden kann. Die Schwankungen bezüglich der Anzahl positiv markierter Gefäße zwischen verschiedenen Tumormalignitätsgraden (siehe oben) weist dieses Molekül allerdings im

---

Vergleich zur  $\alpha 4$  – Kette als weniger geeignet zur generellen Gefäßdetektion im OSCC aus.

Negativ zeigen sich Gefäßstrukturen bei Detektion der Laminin –  $\gamma 2$  – kette in normaler Mundschleimhaut. Auch in der hyperplastischen Mundschleimhaut können kaum vaskuläre Strukturen immunhistochemisch beobachtet werden. Im G1 – Tumor lassen sich tumorassoziierte Gefäße darstellen, wobei stromale Depositionen um die Gefäße auffallen und die Gefäßstrukturen hervorheben. Durch Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen können die vaskulären Markierungen im niedrig malignen OSCC auch quantitativ hervorgehoben werden. Nur noch wenige der CD31–positiven Gefäßstrukturen zeigen eine Positivität für die Laminin –  $\gamma 2$  – kette in Gewebeproben von G2 – und G3 – Tumoren des OSCC. Die Gefäßpositivität der Laminin –  $\gamma 2$  – kette scheint somit im Gegensatz zu den Ketten  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  kein Phänomen der Basalmembranmarkierung sondern eher Resultat einer perivaskulären stromalen Akkumulation des Moleküls zu sein. Diese Depositionsmuster stellen sich spotförmig dar. Ähnliche Phänomene wurden bereits von Franz und Mitarbeitern im Sinne einer basalmembranfernen spotförmigen Deposition der  $\gamma 2$  – Kette des Laminin – 332 um vaskuläre Strukturen beschrieben (Franz et al. 2007). Aufgrund der vermehrten Gefäßpositivität dieser Lamininkette in G1– Tumoren und Abnahme mit steigendem Malignitätsgrad kann eine initiale Rolle für die Induktion von Neoangiogenese bei der neoplastischen Transformation diskutiert werden. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen insbesondere zur funktionellen Bedeutung der perivaskulären Stromadepositionen dieses Moleküls im OSCC und anderen Karzinomentitäten.

### **5.9. Eine Synthese der Lamininketten $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$ und $\gamma 2$ findet sowohl in Tumor– als auch in Stromaarealen der Invasionsfront statt**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen für die Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  deutliche Veränderungen bezüglich Qualität und Quantität ihrer stromalen Depositionen sowie ihrer Gefäßmarkierungen mit steigendem Malignitätsgrad im OSCC. Dies lässt, wie bereits erörtert, auf eine biologische

---

Bedeutung für Invasivität und Progression des Tumors sowie für Angiogeneseprozesse vermuten. Durch Mikrodissektion zur Isolierung von Tumor – und Stromaarealen konnten wir durch RT–PCR Analyse eine mRNA – Expression sowohl im Tumor als auch im Stroma nachweisen.

Für die Lamininkette  $\alpha 4$  wurde eine Synthese sowohl durch Epithelzellen als auch Fibroblasten nachgewiesen (Pierce et al. 1998; Petäjaniemi et al. 2002). Dies steht im Einklang mit unseren Daten einer Synthese im Tumor und im Stroma. Zum zellulären Ursprung der  $\alpha 5$  – Kette gibt es aktuell keine umfangreichen Untersuchungen. Auch wenn eine Synthese in Fibroblasten möglich zu sein scheint, sind epitheliale Tumorzellen z.B. im Falle des Lungenkarzinoms als hauptsächlicher Syntheseort nachzuweisen (Pierce et al. 1998). Von besonderem Interesse scheint die Frage nach dem Syntheseort für die Lamininketten  $\alpha 3$  und  $\gamma 2$  als Bestandteile von LM 332 (LM 5) zu sein. Dieses wichtige Matrixmolekül, zum einen als Bestandteil der Basalmembran, zum anderen als präinvasives stromales Strukturphänomen in der Invasionsfront im OSCC, wurde über lange Zeit als Produkt ausschließlich epithelialer Zellen verstanden (Katayama and Sekiguchi 2004). Im Jahre 2004 wiesen Elkhail und Mitarbeiter eine Rolle von Fibroblasten, nicht für die Synthese, aber zumindest für die stromale Deposition mit der daraus resultierenden tumorbiologischen Bedeutung nach (Elkhail et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte eine mRNA – Expression für die Lamininketten  $\alpha 3$  und  $\gamma 2$  sowohl in Tumor – als auch in Stromaarealen (isoliert durch Mikrodissektion im Bereich der OSCC – Invasionsfront) gezeigt werden. Die per Mikrodissektion isolierten Stromaareale können einzelne Tumorzellen (Konzept der Tumorzelleinzelinvasion) als Quelle der entsprechenden mRNA enthalten. Es gibt aber durchaus Hinweise auf eine Synthese durch Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp / fibroblastäre Zellen (immunhistochemische Positivität für Vimentin) im Bereich der OSCC – Invasionsfront. So konnten Franz und Mitarbeiter durch In – Situ – Hybridisierung in solchen Zellen eine mRNA – Expression der Laminin –  $\gamma 2$  – kette nachweisen (Franz et al. 2007). Bezüglich des Ursprungs dieser Zellen lassen sich zwei Hypothesen diskutieren. Zum einen kann es sich hierbei um aktivierte Fibro – /

Myofibroblasten, zum anderen aber auch um durch epithelial – mesenchymale Transition (EMT) umgewandelte Tumorzellen handeln (Franz et al. 2009). Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass der zelluläre Ursprungsort der untersuchten Lamininketten aktuell nicht eindeutig zu definieren ist. Dennoch kann von einer bedeutenden Rolle des Stromakompartiments im Rahmen des invasionsassoziierten Laminin – ECM – *Remodelling* in der OSCC – Invasionsfront ausgegangen werden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich der zelluläre Ursprung der von uns untersuchten Lamininketten sowohl im Tumor als auch im Stroma befindet. Somit kann ein aktiver Beitrag des aktivierten Stromas an der Formierung einer Migrations– und Vaskularisierungsfördernden Lamininmatrix postuliert werden.

## 6 Schlussfolgerungen

Der Prozess der Tumorinvasion im OSCC ist neben einer Remodellierung der Basalmembranregion mit einem deutlichen Laminin–Matrix–*Remodelling* im Karzinomstroma verbunden.

Dieses *Remodelling* ist insbesondere gekennzeichnet durch eine Zunahme der stromalen Depositionen der Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 2$  mit zunehmendem Malignitätsgrad.

Dabei zeigt sich für das stromale *Remodelling* der Laminin –  $\alpha 4$  – kette eine malignitätsgradabhängige Modifikation der epithelialen Basalmembran. Dies kann auf eventuelle Phänomene einer Epithelial – Mesenchymalen Transition basaler Keratinozyten hinweisen.

Die stromalen Depositionen der Laminin –  $\alpha 3$  – kette zeigen einen deutlichen quantitativen Anstieg im Rahmen der neoplastischen Transformation oraler Mukosa. Im OSCC findet sich keine weitere Zunahme mit steigender stromaler Aktivierung, so dass es sich hierbei um ein Phänomen der frühen Fibroblastenaktivierung unabhängig von deren Phänotypkonversion handeln kann.

Die stromalen Depositionen der Laminin –  $\alpha 4$  – kette zeigen einen quantitativen Anstieg mit zunehmender stromaler Aktivierung im OSCC. Somit kann dieses Phänomen als Ausdruck der Myofibroblastenkonversion interpretiert werden.

Bezüglich der vaskulären Basalmembran ist eine Abnahme der Detektierbarkeit der Laminin –  $\alpha 3$  – kette als karzinomassoziiertes Phänomen zu beobachten.

Die Laminin –  $\alpha 4$  – kette kann als Marker der endothelialen Basalmembran unabhängig von der Dignität des Gewebes (Mundschleimhaut / OSCC) vorgeschlagen werden. Unabhängig vom Malignitätsgrad sind alle CD31 –

positiven Gefäßstrukturen durch eine Laminin –  $\alpha 4$  – positive Basalmembran gekennzeichnet.

Die vaskuläre Detektierbarkeit der Laminin –  $\gamma 2$  – kette in hyperplastischer Mundschleimhaut und gut differenzierten Tumoren mit Abnahme mit steigendem Malignitätsgrad lässt sie als initiales Phänomen der Neoangiogenese im OSCC erscheinen.

Synthese und stromale Depositionen der Lamininketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\gamma 2$  sind eine aktive Leistung der stromaler Zellen im Bereich der Tumorinvasionsfront des OSCC.



## 7 Literaturverzeichnis

Adam JC, Watt FM (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117:1183-1198

Akashi T, Ito E, Eishi Y, Koike M, Nakamura K, Burgeson RE (2001) Reduced expression of laminin alpha 3 and alpha 5 chains in non-small cell lung cancers. *Jpn J Cancer Res* 92(3):293-301

Akutsu N, Amano S, Nishiyama T (2005) Quantitative analysis of laminin 5 gene expression in human keratinocytes. *Exp Dermatol* 14:329-35

Amano S, Scott IC, Takahara K, Koch M, Champlaud MF, Gerecke DR, Keene DR, Hudson DL, Nishiyama T, Lee S, Greenspan DS, Burgeson RE (2000) Bone morphogenetic protein 1 is an extracellular processing enzyme of the laminin 5 gamma 2 chain. *J Biol Chem* 275:22728-35

Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD (2005) A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24:326-332

Aumailley M, Krieg T (1996) Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *J Invest Dermatol* 106:209-214

Baker SE, Hopkinson SB, Fitchmun M, Andreason GL, Frasier F, Plopper G, Quaranta V, Jones JC (1996) Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J Cell Sci* 109 (Pt 10):2509-2520

Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D (2005) Pathology and genetics of head and neck tumours (World Health Organization Classification of Tumours). IARC Press 2005, Lyon.

Beaulieu JF (1997) Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem* 31:1-78

Bell SC, Pringle JH, Taylor DJ, Malak TM (1999) Alternatively spliced tenascin-C mRNA isoforms in human fetal membranes. *Mol Hum Reprod* 5:1066-1076

Berndt A, Kosmehl H, Katenkamp D, Tauchmann V (1994) Appearance of the myofibroblastic phenotype in Dupuytren's Disease is associated with a Fibronectin, Laminin, Collagen Type IV and Tenascin extracellular Matrix. *Pathobiology*:55-58

Bernstein LR, Liotta LA (1994) Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. *Curr Opin Oncol* 6:106-113

Bissell MJ, Hall HG, Parry G (1982) How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* 99:31-68

Blot WJ, Devesa SS, McLaughlin JK, Fraumeni JF Jr (1994) Oral and pharyngeal cancers. *Cancer Surv* 19-20:23-42 Review

Borsi L, Carnemolla B, Nicolo G, Spina B, Tanara G, Zardi L (1992) Expression of different tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer* 52:688-692

Borsi L, Balza E, Castellani P, Carnemolla B, Ponassi M, Querze G, Zardi L (1994) Cell-cycle dependent alternative splicing of the tenascin primary transcript. *Cell Adhes Commun* 1:307-317

Brandenberger R, Kammerer RA, Engel J, Chiquet M (1996) Native chick laminin-4 containing the beta 2 chain (s-laminin) promotes motor axon growth. *J Cell Biol* 135:1583-1592

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E (1989) New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 18:432-437

Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J, et al. (1994) A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol* 14:209-211

Burkhardt A (1996) Oncogenes and growth factor receptors as diagnostic and prognostic markers in precancers and cancers of the oral mucosa. *Curr Top Pathol.* 90:223-39. Review

Carnemolla B, Castellani P, Ponassi M, Borsi L, Urbini S, Nicolo G, Dorcaratto A, Viale G, Winter G, Neri D, Zardi L (1999) Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody. *Am J Pathol* 154:1345-1352

Carter WG, Kaur P, Gil SG, Gahr PJ, Wayner EA (1990) Distinct functions for integrins alpha 3 beta 1 in focal adhesions and alpha 6 beta 4/bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes. *J Cell Biol* 111:3141-3154

Casey TM, Eneman J, Crocker A, White J, Tessitore J, Stanley M, Harlow S, Bunn JY, Weaver D, Muss H, Plaut K (2008) Cancer associated fibroblasts

stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF-beta 1) increase invasion rate of tumor cells: a population study. *Breast Cancer Res Treat* 110:39-49

Champlaud MF, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T, Keene DR, Burgeson RE (1996) Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol* 132:1189-1198

Champlaud MF, Virtanen I, Tiger CF, Korhonen M, Burgeson R, Gullberg D (2000) Posttranslational modifications and beta/gamma chain associations of human laminin alpha1 and laminin alpha5 chains: purification of laminin-3 from placenta. *Exp Cell Res* 259:326-335

Daly AJ, McIlreavey L, Irwin CR (2008) Regulation of HGF and SDF-1 expression by oral fibroblasts-implications for invasion of oral cancer. *Oral Oncol* 44:646-651

Davidson B, Goldberg I, Gottlieb WH, Kopolovic J, Ben-Baruch G, Nesland JM, Berner A, Bryne M, Reich R (1999) High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 17:799-808

Doliana R, Bellina I, Bucciotti F, Mongiat M, Perris R, Colombatti A (1997) The human alpha3b is a 'full-sized' laminin chain variant with a more widespread tissue expression than the truncated alpha3a. *FEBS Lett* 417:65-70

DÖSAK (Pitz H, Howaldt HP, Frenz M) (1995) 6.Projektbericht (Zentralregister des Deutsch Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreises für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich mit speziellen Teil für Klinik 14 (Jena) n=10

Downer CS, Watt FM, Speight PM (1993) Loss of alpha 6 and beta 4 integrin subunits coincides with loss of basement membrane components in oral squamous cell carcinomas. *J Pathol* 171:183-190

Egles C, Claudepierre T, Manglapus MK, Champlaud MF, Brunken WJ, Hunter DD (2007) Laminins containing the beta2 chain modulate the precise organization of CNS synapses. *Mol Cell Neurosci* 34:288-298

Ekblom P, Lonai P, Talts JF (2003) Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol* 22:35-47

Elkhal A, Tunggal L, Aumailley M (2004) Fibroblasts contribute to the deposition of laminin 5 in the extracellular matrix. *Exp Cell Res* 296(2):223-30

Engvall E, Earwicker D, Haaparanta T, Ruoslahti E, Sanes JR (1990) Distribution and isolation of four laminin variants; tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell Regul* 1:731-740

Engvall E (1995) Structure and function of basement membranes. *Int J Dev Biol* 39:781-787

Engvall E, Wewer UM (1996) Domains of laminin. *J Cell Biochem* 61:493-501

Franz M, Hansen T, Richter P, Borsi L, Bohmer FD, Hyckel P, Schleier P, Katenkamp D, Zardi L, Kosmehl H, Berndt A (2006) Complex formation of the laminin-5 gamma2 chain and large unspliced tenascin-C in oral squamous cell carcinoma in vitro and in situ: implications for sequential modulation of extracellular matrix in the invasive tumor front. *Histochem Cell Biol* 126:125-131

Franz M, Richter P, Geyer C, Hansen T, Acuna LD, Hyckel P, Bohmer FD, Kosmehl H, Berndt A (2007) Mesenchymal cells contribute to the synthesis and deposition of the laminin-5 gamma2 chain in the invasive front of oral squamous cell carcinoma. *J Mol Histol* 38:183-190

Franz M, Hansen T, Borsi L, Geier C, Hyckel P, Schleier P, Richter P, Altendorf-Hofmann A, Kosmehl H, Berndt A (2007) A quantitative co-localization analysis of large unspliced tenascin-C(L) and laminin-5/gamma2-chain in basement membranes of oral squamous cell carcinoma by confocal laser scanning microscopy. *J Oral Pathol Med* 36(1):6-11

Franz M, Spiegel K, Umbreit C, Richter P, Codina-Canet C, Berndt A, Altendorf-Hofmann A, Koscielny S, Hyckel P, Kosmehl H, Virtanen I, Berndt A (2009) Expression of Snail is associated with myofibroblasts phenotype development in oral squamous cell carcinoma. *Histochem Cell Biol* 131:651-60

Frieser M, Nöckel H, Pausch F, Röder C, Hahn A, Deutzmann R, Sorokin LM (1997) Cloning of the mouse laminin  $\alpha$ 4 cDNA. Expression in a subset of endothelium. *Eur J Biochem* 246:727-735

Gersdorff N, Kohfeldt E, Sasaki T, Timpl R, Miosge N (2005) Laminin gamma3 chain binds to nidogen and is located in murine basement membranes. *J Biol Chem* 280:22146-22153

Ghadially FN (1997) As you like it. *Ultrastruct Pathol* 21:211-226

Giannelli G, Bergamini C, Fransvea E, Sgarra C, Antonaci S (2005) Laminin – 5 with transforming growth factor – beta 1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 129:1375-83

Gilles C, Polette M, Piette J, Munaut C, Thompson EW, Birembaut P, Foidart JM (1996) High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells. *Int J Cancer* 65:209-213

Goldfinger LE, Jiang L, Hopkinson SB, Stack MS, Jones JC (2000) Spatial regulation and activity modulation of plasmin by high affinity binding to the G domain of the alpha 3 subunit of laminin – 5. *J Biol Chem* 275:34887-93

Gonzalez AM, Gonzales M, Herron GS, Nagavarapu U, Hopkinson SB, Tsuruta D, Jones JC (2002) Complex interactions between the laminin alpha 4 subunit and integrins regulate endothelial cell behavior in vitro and angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(25):16075-80

Grant DS, Kinsella JL, Fridman R, Auerbach R, Piasecki BA, Yamada Y, Zain M, Kleinman HK (1992) Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo. *J Cell Physiol* 153(3):614-25

Haas KM, Berndt A, Stiller KJ, Hyckel P, Kosmehl H (2001) A comparative quantitative analysis of laminin-5 in the basement membrane of normal, hyperplastic, and malignant oral mucosa by confocal immunofluorescence imaging. *J Histochem Cytochem* 49:1261-1268

Harada T, Shinohara M, Nakamura S, Oka M (1994) An immunohistochemical study of the extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma and its association with invasive and metastatic potential. *Virchows Arch* 424:257-266

Harada K, Supriatno, Kawashima Y, Yoshida H, Sato M (2007) S-1 inhibits tumorigenicity and angiogenesis of human oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of phosphorylated Akt, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2. *Int J Oncol* 30(2):365-74

Haralson MA (1993) Extracellular matrix and growth factors: an integrated interplay controlling tissue repair and progression to disease. *Lab Invest* 69:369-372

Häger M, Gawlik K, Nyström A, Sasaki T, Durbeej M (2005) Laminin (alpha) 1 chain corrects male infertility caused by absence of laminin (alpha) 2 chain. *Am J Pathol* 167:823-33

Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tome FM, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K, et al. (1995) Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet* 11:216-218

Hirosaki T, Mizushima H, Tsubota Y, Moriyama K, Miyazaki K (2000) Structural requirement of carboxyl-terminal globular domains of laminin alpha 3 chain for promotion of rapid cell adhesion and migration by laminin-5. *J Biol Chem* 275:22495-502

Howaldt HP, Vorast H, Blecher JC, Reicherts M, Kainz M (2000) Results of the DOSAK tumor register. *Mund Kiefer Gesichtschir. Suppl* 1:S216-25

Hunter DD, Porter BE, Bullock JW, Adams SP, Merlie JP, Sanes JR (1989a) Primary sequence of a motor neuron-selective adhesive site in the synaptic basal lamina protein S-laminin. *Cell* 59:905-913

Hunter DD, Shah V, Merlie JP, Sanes JR (1989b) A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature* 338:229-234

Hunter DD, Llinas R, Ard M, Merlie JP, Sanes JR (1992) Expression of s-laminin and laminin in the developing rat central nervous system. *J Comp Neurol* 323:238-251

Hwang JH, Smith CA, Salhia B, Rutka JT (2008) The role of fascin in the migration and invasiveness of malignant glioma cells. *Neoplasia* 10:149-159

Hynes RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554

Iivanainen A, Morita T, Tryggvason K (1999) Molecular cloning and tissue-specific expression of a novel murine laminin gamma3 chain. *J Biol Chem* 274:14107-14111

Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110:341-350

Jordan RC, Daley T (1997) Oral squamous cell carcinoma: new insights. *J Can Dent Assoc* 63:517-518, 521-515

Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I (1993) Squamous cell carcinoma of the lip and oral cavity in The Netherlands; an epidemiological study of 740 patients. *J Craniomaxillofac Surg* 21:149-152

Kagesato Y, Mizushima H, Koshikawa N, Kitamura H, Hayashi H, Ogawa N, Tsukuda M, Miyazaki K (2001) Sole expression of laminin gamma 2 chain in invading tumor cells and its association with stromal fibrosis in lung adenocarcinomas. *Jpn J Cancer Res* 92:184-192

Katayama M, Sekiguchi K (2004) Laminin – 5 in epithelial tumor invasion. *J Mol Histol* 35:277-86

Kahari VM, Saarialho-Kere U (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 6:199-213

Kainulainen T, Autio-Harmainen H, Oikarinen A, Salo S, Tryggvason K, Salo T (1997) Altered distribution and synthesis of laminin-5 (kalinin) in oral lichen planus, epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Br J Dermatol* 136:331-336

Kang Y, Massagué J (2004) Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118(3):277-9 Review.

- Kariya Y, Mori T, Yasuda C, Watanabe N, Kaneko Y, Nakashima Y, Ogawa T, Miyazaki K (2008) Localization of laminin alpha3B chain in vascular and epithelial basement membranes of normal human tissues and its down-regulation in skin cancers. *J Mol Histol* 39(4):435-46
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 43 Suppl:S 42-51
- Kok SH, Hong CY, Lin SK, Lee JJ, Chiang CP, Kuo MY (2007) Establishment and characterization of a tumorigenic cell line from areca quid and tobacco smoke-associated buccal carcinoma. *Oral Oncol* 43:639-647
- Koshikawa N, Minegishi T, Sharabi A, Quaranta V, Seiki M (2005) Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin gamma 2 chain. *J Biol Chem* 280:88-93
- Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D, Mandel U, Bohle R, Gabler U, Celeda D (1995) Differential Expression of Fibronectin Splice Variants, oncofetal glycosylated Fibronectin and laminin isoforms in Nodular Palmar Fibromatosis. *Path Res Pract* 191:1105-1113
- Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D, Hyckel P, Stiller KJ, Gabler U, Langbein L, Reh T (1995) Integrin receptors and their relationship to cellular proliferation and differentiation of oral squamous cell carcinoma. A quantitative immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 24:343-348
- Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D (1996) Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch* 429:311-322
- Kosmehl H, Berndt A, Strassburger S, Borsi L, Rousselle P, Mandel U, Hyckel P, Zardi L, Katenkamp D (1999) Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 81:1071-1079
- Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, Takeuchi H, Shirasuna K (1999) Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 21:627-638
- Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Gronroos L, Meurman JH, Salaspuro M (2007) Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol* 43:181-186
- Li J, Zhou L, Tran HT (2006) Overexpression of laminin-8 in human dermal microvascular endothelial cells promotes angiogenesis-related functions. *J Invest Dermatol* 126:432-440

Libby RT, Hunter DD, Brunken WJ (1996) Developmental expression of laminin beta 2 in rat retina. Further support for a role in rod morphogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(8):1651-61

Libby RT, Champlaud MF, Claudepierre T, Xu Y, Gibbons EP, Koch M, Burgeson RE, Hunter DD, Brunken WJ (2000) Laminin expression in adult and developing retinae: evidence of two novel CNS laminins. *J Neurosci* 20:6517-6528

Ljubimova JY, Lakhter AJ, Loksh A, Yong WH, Riedinger MS, Miner JH, Sorokin LM, Ljubimov AV, Black KL (2001) Overexpression of alpha4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. *Cancer Res* 61:5601-5610

Maatta M, Soini Y, Paakko P, Salo S, Tryggvason K, Autio-Harminen H (1999) Expression of the laminin gamma2 chain in different histological types of lung carcinoma. A study by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Pathol* 188:361-368

Mandel U, Gaggero B, Reibel J, Therkildsen MH, Dabelsteen E, Clausen H (1994) Oncofetal fibronectins in oral carcinomas: correlation of two different types. *Apmis* 102:695-702

Manders EM, Stap J, Brakenhoff GJ, van Driel R, Aten JA (1992) Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci* 103: 857-62

Marinkovich MP, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE (1992) The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J Cell Biol* 119:695-703

Masunaga T, Shimizu H, Ishiko A, Tomita Y, Aberdam D, Ortonne JP, Nishikawa T (1996) Localization of laminin-5 in the epidermal basement membrane. *J Histochem Cytochem* 44:1223-1230

Matsuura H, Greene T, Hakomori S (1989) An alpha-N-acetylgalactosaminylation at the threonine residue of a defined peptide sequence creates the oncofetal peptide epitope in human fibronectin. *J Biol Chem* 264:10472-10476

Meyer T, Hart IR (1998) Mechanisms of tumour metastasis. *Eur J Cancer* 34:214-221

Miller AB (1974) The epidemiology of oral cancer. *Dent J* 40:211-217

Miner JH, Patton BL (1999) Laminin-11. *Int J Biochem Cell Biol* 31:811-816

Miner JH, Yurchenco PD (2004) Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:255-284



- Miner JH (2008) Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech* 71(5):349-56. Review
- Mizushima H, Koshikawa N, Moriyama K, Takamura H, Nagashima Y, Hirahara F, Miyazaki K (1998) Wide distribution of laminin – 5 gamma 2 chain in basement membranes of various human tissues. *Horm Res* 2:7-14
- Nicolo G, Salvi S, Oliveri G, Borsi L, Castellani P, Zardi L (1990) Expression of tenascin and of the ED-B containing oncofetal fibronectin isoform in human cancer. *Cell Differ Dev* 32:401-408
- Nielsen JD, Moeslund M, Wandall HH, Dabelsteen S (2008) Influences of tumor stroma on the malignant phenotyp. *Oral Pathol Med* 37(7):412-406
- Noel JC, Fernandez-Aguilar S, Fayt I, Buxant F, Ansion MH, Simon P, Anaf V (2005) Laminin-5 gamma 2 chain expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84:1119-1123
- Noma K, Smalley KS, Lioni M, Naomoto Y, Tanaka N, El-Deiry W, King AJ, Nakagawa H, Herlyn M (2008) The Essential Role of Fibroblasts in Esophageal Squamous Cell Carcinoma-induced Angiogenesis. *Gastroenterology* 134(7):1981-93
- Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D (1996) Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 54:949-954; discussion 955
- Ono Y, Nakanishi Y, Ino Y, Niki T, Yamada T, Yoshimura K, Saikawa M, Nakajima T, Hirohashi S (1999) Clinocopathologic significance of laminin-5 gamma2 chain expression in squamous cell carcinoma of the tongue: immunohistochemical analysis of 67 lesions. *Cancer* 85:2315-2321
- Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I (2002) Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol* 12:197-207
- Pedraza C, Geberhiwot T, Ingerpuu S, Assefa D, Wondimu Z, Kortessmaa J, Tryggvason K (2000) Monocytic cells synthesize, adhere to, and migrate on laminin-8( $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ ). *J Immunol* 165:5831-5838
- Petäjämäki N, Korhonen M, Kortessmaa J, Tryggvason K, Sekiguchi K, Fujiwara H, Sorokin L, Thornell LE, Wondimu Z, Assefa D, Patarroyo M, Virtanen I (2002) Localization of laminin alpha4-chain in developing and adult human tissues. *J Histochem Cytochem* 50(8):1113-30
- Pierce RA, Griffin GL, Mudd MS, Moxley MA, Longmore WJ, Sanes JR, Miner JH (1998) Expression of laminin  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  and  $\alpha 5$  chains by alveolar epithelial cells and fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:237-244

Platz H (1986) Advances in the specialty of oncology of the oral and maxillofacial region (1975-1985). *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 10:325-336

Powell WC, Knox JD, Navre M, Grogan TM, Kittelson J, Nagle RB, Bowden GT (1993) Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU-145 cells increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 53:417-422

Powell WC, Matrisian LM (1996) Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Curr Top Microbiol Immunol* 213 (Pt 1):1-21

Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K (1992) Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res* 52:1336-1341

Pyke C, Salo S, Ralfkiaer E, Romer J, Dano K, Tryggvason K (1995) Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 55:4132-4139

Ramos DM, Chen BL, Boylen K, Stern M, Kramer RH, Sheppard D, Nishimura SL, Greenspan D, Zardi L, Pytela R (1997) Stromal fibroblasts influence oral squamous cell carcinoma cell interactions with tenascin-C. *Int J Cancer* 72:369-376

Rautemaa R, Richardson M, Pfaller M, Koukila-Kahkola P, Perheentupa J, Saxen H (2007) Decreased susceptibility of *Candida albicans* to azole antifungals: a complication of long-term treatment in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) patients. *J Antimicrob Chemother* 60:889-892

Ray JM, Stetler-Stevenson WG (1995) Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading. *Embo J* 14:908-917

Relan NK, Schuger L (1999) Basement membranes in development. *Pediatr Dev Pathol* 2:103-118

Richter P, Junker K, Franz M, Berndt A, Geyer C, Gajda M, Kosmehl H, Berndt A, Wunderlich H (2008) IIICS de novo glycosylated fibronectin as a marker for invasiveness in urothelial carcinoma of the urinary bladder (UBC). *J Cancer Res Clin Oncol* 134:1059-1065

Roskelley CD, Desprez PY, Bissell MJ (1994) Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12378-12382

- Rousselle P, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE (1991) Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol* 114:567-576
- Ruegg MA (1996) Agrin, laminin beta 2 (s-laminin) and ARIA: their role in neuromuscular development. *Curr Opin Neurobiol* 6:97-103
- Ruoslahti E (1991) Integrins. *J Clin Invest* 87:1-5
- Ruoslahti E, Reed JC (1994) Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 77:477-478
- Sanes JR, Chiu AY (1983) The basal lamina of the neuromuscular junction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 2:667-678
- Sasaki T, Gohring W, Mann K, Brakebusch C, Yamada Y, Fassler R, Timpl R (2001) Short arm region of laminin-5 gamma2 chain: structure, mechanism of processing and binding to heparin and proteins. *J Mol Biol* 314:751-763
- Scheifele C, Nassar A, Reichart PA (2007) Prevalence of oral cancer and potentially malignant lesions among shammah users in Yemen. *Oral Oncol* 43:42-50
- Schneider H, Muhle C, Pacho F (2007) Biological function of laminin-5 and pathogenic impact of its deficiency. *Eur J Cell Biol* 86:701-717
- Schwarzbauer JE, Sechler JL (1999) Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr Opin Cell Biol* 11:622-627
- Seiki M (1999) Membrane-type matrix metalloproteinases. *Apmis* 107:137-143
- Sheppard D (1998) Airway epithelial integrins: why so many? *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:349-351
- Siri A, Carnemolla B, Saginati M, Leprini A, Casari G, Baralle F, Zardi L (1991) Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitopes recognized by two monoclonal antibodies. *Nucleic Acids Res* 19:525-531
- Siri A, Knauper V, Veirana N, Caocci F, Murphy G, Zardi L (1995) Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 270:8650-8654
- Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM (2001) Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol* 153:933-945

Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillesen D, Gabbiani G (1986) A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103:2787-96

Sottile J, Hocking DC (2002) Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 13:3546-3559

Takkunen M, Ainola M, Vainionpää N, Grenman R, Patarroyo M, Garcia de Herreros A, Konttinen YT, Virtanen I (2008) Epithelial-mesenchymal transition downregulates laminin alpha5 chain and upregulates laminin alpha4 chain in oral squamous carcinoma cells. *Histochem Cell Biol* 130(3):509-25

Tani T, Lumme A, Linnala A, Kivilaakso E, Kiviluoto T, Burgeson RE, Kangas L, Leivo I, Virtanen I (1997) Pancreatic carcinomas deposit laminin-5, preferably adhere to laminin-5, and migrate on the newly deposited basement membrane. *Am J Pathol* 151:1289-1302

Thomas GJ, Jones J, Speight PM (1997) Integrins and oral cancer. *Oral Oncol* 33:381-388

Thomas GT, Lewis MP, Speight PM (1999) Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol* 35:227-233

Thorup AK, Reibel J, Schiodt M, Stenersen TC, Therkildsen MH, Carter WG, Dabelsteen E (1998) Can alterations in integrin and laminin-5 expression be used as markers of malignancy? *Apmis* 106:1170-1180

Thyboll J, Kortesmaa J, Cao R, Soininen R, Wang L, Iivanainen A, Sorokin L, Risling M, Cao Y, Tryggvason K (2002) Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol Cell Biol* 22:1194-1202

Tiger CF, Champlaud MF, Pedrosa-Domellöf F, Thornell LE, Ekblom P, Gullberg D (1997) Presence of laminin  $\alpha$ 5 chain and lack of laminin  $\alpha$ 1 chain during human muscle development and in muscular dystrophies. *J Biol Chem* 272:28590-28595

Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR (1979) Laminin- $\alpha$  glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254:9933-9937

Timpl R, Brown JC (1994) The laminins. *Matrix Biol* 14:275-281

Timpl R (1996) Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 8:618-624

Tosios KI, Kapranos N, Papanicolaou SI (1998) Loss of basement membrane components laminin and type IV collagen parallels the progression of oral epithelial neoplasia. *Histopathology* 33:261-268

- Tryggvason K (1993) The laminin family. *Curr Opin Cell Biol* 5:877-882
- Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG (2007) Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol* 43:523-534
- Tzu and Marinkovich MP (2008) Bridging structure with function: structural, regulatory and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 40:199-214
- Vainionpää N, Lehto VP, Tryggvason K, Virtanen I (2007) Alpha 4 chain laminins are widely expressed in renal cell carcinomas and have a de-adhesive function. *Lab Invest* 87(8):780-91
- Veitch DP, Nokelainen P, McGowan KA, Nguyen TT, Nguyen NE, Stephenson R, Pappano WN, Keene DR, Spong SM, Greenspan DS, Findell PR, Marinkovich MP (2003) Mammalian tolloid metalloproteinase, and not matrix metalloprotease 2 or membrane type 1 metalloproteinase, processes laminin-5 in keratinocytes and skin. *J Biol Chem* 278:15661-15668
- Virtanen I, Laitinen A, Tani T, Paakko P, Laitinen LA, Burgeson RE, Lehto VP (1996) Differential expression of laminins and their integrin receptors in developing and adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:184-196
- Vitolo D, Ciocci L, Cicerone E, Rossi C, Tiboni F, Ferrauti P, Gallo A, Baroni CD (2001) Laminin alpha2 chain (merosin M chain) distribution and VEGF, FGF(2), and TGFbeta1 gene expression in angiogenesis of supraglottic, lung, and breast carcinomas. *J Pathol* 195(2):197-208
- Vogel W, Kosmehl H, Katenkamp D, Langbein L (1991) Differentiation dependent matrix formation (fibronectin and laminin) in an experimental murine rhabdomyosarcoma model. *Acta Histochem* 90(2):181-8
- Weir JC, Davenport WD, Skinner RL (1987) A diagnostic and epidemiologic survey of 15,783 oral lesions. *J Am Dent Assoc* 115:439-442
- Wewer UM, Durkin ME, Zhang X, Laursen H, Nielsen NH, Towfighi J, Engvall E, Albrechtsen R (1995) Laminin beta 2 chain and adhalin deficiency in the skeletal muscle of Walker-Warburg syndrome (cerebro-ocular dysplasia-muscular dystrophy). *Neurology* 45:2099-2101
- Wondimu Z, Geberhiwot T, Ingerpuu S, Juronen E, Xie X, Lindbom L, Doi M, Kortesmaa J, Thyboll J, Tryggvason K, Fadeel B, Patarroyo M (2004) An endothelial laminin isoform, laminin 8 (alpha4beta1gamma1), is secreted by blood neutrophils, promotes neutrophil migration and extravasation, and protects neutrophils from apoptosis. *Blood* 104:1859-1866

Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Hosokawa M, Imai K (2001) Expression of the gamma(2) chain of laminin-5 at the invasive front is associated with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 7:896-900

## **Ehrenörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich – Schiller – Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. A. Berndt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 15.06.2011

Anke Wolheim

## **Danksagung**

Ich danke insbesondere meinem akademischen Lehrer Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Alexander Berndt für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für seine stetige engagierte Hilfe bei der Erstellung dieser Dissertation. Danke für die fachliche Unterstützung, die Anleitung bei mikroskopischen Arbeiten sowie deren Auswertung und für die hilfreichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Iver Petersen (Direktor des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Jena) möchte ich für die Möglichkeit danken, am Institut für Pathologie in Jena meine Dissertation absolvieren und die bereitgestellten Laborräume für die notwendigen experimentellen Arbeiten nutzen zu können.

Herrn Prof. Dr. Hartwig Kosmehl (Institut für Pathologie des HELIOS Klinikums Erfurt GmbH) danke ich für die Unterstützung bei der Bewertung der Tumorpräparate, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Hyckel (Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie / Plastische Operationen) für die anregenden Diskussionen im Rahmen der Interpretation der Ergebnisse.

Für die Bereitstellung der Antikörper für immunhistochemische Arbeiten danke ich Herrn Prof. Dr. Ismo Virtanen (Institut für Biochemie/Anatomie der Universität Helsinki, Finnland).

Ich danke Frau Dr. Petra Richter (wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena) nicht nur für die Einführung in das statistische Programm SPSS, sondern darüber hinaus für die nette und hilfsbereite Zusammenarbeit im Rahmen meiner Promotionsarbeit.

Außerdem möchte ich einen Dank an Frau Christiane Geier (Medizinisch – Technische Assistentin am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena) für die große Unterstützung bei der Durchführung meiner experimentellen Arbeiten danken.



Durch Frau Dr. Evgine Dahse (Institut für Pathologie des HEIS Klinikums Eurt  
GmbH) war es mir möglich, Mikrodissektionsuntersuchungen in diese Arbeit  
einfließen zu lassen.

Unterstützt wurde ich im Rahmen meiner Dissertationsarbeiten durch das E –  
Projekt ADAMANT.

Mein besonderer und ganz persönlicher Dank gilt Herrn Dr. Marcus Franz (Klinik für  
Innere Medizin I des Universitätsklinikums Jena) für seinen unermüdlichen Zuspruch  
und die Kraft, die er mir in allen Situationen gegeben hat. Vielen Dank auch für die  
Hilfe beim Erlernen der immunhistochemischen Methoden, für die Vermittlung von  
Wissen über die Technik der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung und für die  
vielen lehrreichen Erklärungen zu Hintergründen des Promotionsthemas. Ich möchte  
ihm auch für seine kritischen aber effektiven Hilfestellungen, die zum Gelingen dieser  
Arbeit beigetragen haben, danken.

Jena, den 27.05.2009

Anke Wolheim