

**Genomischer Zugewinn der PIK3CA und gesteigerte p110alpha-
Proteinexpression in Dysplasien und invasiven
Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Eva Maria Werner
aus Freiburg im Breisgau

Giessen 2004

Aus dem Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. A. Schulz
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. H. Pralle

Tag der Disputation: 19.04.2004

Abkürzungsverzeichnis

CGH	comparative genomic hybridization
CIS	Carcinoma in situ
DOP-PCR	degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
LAB	labelled avidin-biotin technique
LOH	loss of heterozygosity
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol 3-Kinase p110alpha – Gen
PKB = Akt	Proteinkinase B
YAC	yeast artificial chromosome

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	3
2	Literaturübersicht.....	5
2.1	Dysplasien und Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes.....	5
2.1.1	Epidemiologie.....	5
2.1.2	Definition.....	6
2.1.3	Risikofaktoren.....	9
2.1.4	Familiarität und genetische Suszeptibilität.....	10
2.1.5	Karzinogenese der Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes.....	11
2.2	PIK3CA.....	12
2.3	Phosphatidylinositol 3 – Kinase.....	12
2.3.1	Klassifizierung und Aufbau.....	12
2.3.2	Funktion.....	12
3	Eigene Untersuchungen.....	15
3.1	Material und Methoden.....	15
3.1.1	Untersuchungsmaterial.....	15
3.1.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	17
3.1.3	Immunhistochemie.....	31
3.2	Ergebnisse.....	35
3.2.1	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	35
3.2.2	Immunhistochemie.....	40
4	Diskussion.....	43
4.1	Genetische Alterationen in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes.....	43
4.2	Auf dem chromosomalen Abschnitt 3q26-qter lokalisierte potentielle Onkogene.....	48

5	Literaturverzeichnis.....	53
6	Anhang.....	60
6.1	Verwendete Geräte.....	60
6.2	Ansätze der Gebrauchslösungen.....	60
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	62
6.4	Tabellenverzeichnis.....	62
7	Zusammenfassung.....	63
8	Danksagung.....	65
9	Lebenslauf.....	66

1 Einleitung und Zielsetzung

Es ist seit langem bekannt, dass genetische Veränderungen eine wesentliche Rolle in der Entstehung von zahlreichen Malignomen spielen. Genetische Mutationen können in Zellen zu Störungen von wichtigen Wachstumsmechanismen führen, unter anderem der Kontrolle des Zellzyklus, die elementar für die Aufrechterhaltung der Homöostase in der Zelle sind. Durch diese Defekte kann es zu einer unkontrollierten Zellproliferation kommen, was die Entstehung eines Tumors ermöglicht.

In den letzten Jahren wurde es durch molekulargenetische Methoden, wie Comparative genomische Hybridisierung (CGH), Allelotypisierungsstudien (LOH) und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), zunehmend möglich, diese Anomalien zu identifizieren und zu lokalisieren. In Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes konnte eine große Anzahl genomischer Aberrationen, wie Genamplifikation, -mutation und -verlust, nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die genetischen Veränderungen in der histologisch-klinischen Entwicklung von normalem Epithel über Dysplasien steigenden Schweregrades bis zum invasiven Karzinom zunehmen. Mit der Identifizierung der für die Progression von Dysplasien zu invasiven Karzinomen ursächlichen genetischen Veränderung wäre ein molekularer Marker gefunden, der in der Lage wäre, das maligne Potential von prämaligen Läsionen des Kopf-Hals-Bereiches vorherzusagen.

Auf der Suche nach der für die Karzinomentwicklung entscheidenden Alteration fielen das Chromosom 3 und speziell die Sequenz 3q26.3 besonders auf. Mögliches Ziel dieser chromosomalen Veränderungen ist das auf dieser Sequenz lokalisierte *PIK3CA*-Gen. In verschiedenen Studien wurde eine onkogenetische Relevanz des *PIK3CA*-Genes und seines Genproduktes, der katalytischen Untereinheit p110 α des Enzyms Phosphatidylinositol 3-Kinase, dargestellt. In Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes konnten genetische Aberrationen im Sinne eines Zugewinnes von *PIK3CA* nachgewiesen werden. Bisher liegen jedoch kaum Kenntnisse über die genetische Expression des Gens in Dysplasien und Carcinomata *in situ* des Plattenepithels vor. Nach wie vor ist die Rolle von *PIK3CA* in der Karzinogenese des invasiven Plattenepithelkarzinoms aus prämaligen Läsionen nicht ganz geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wird daher mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung die genetische Expression des *PIK3CA*- Gens sowohl in invasiven Plattenepithelkarzinomen des oberen Respirations- und Verdauungstraktes als auch in präkanzerösen Läsionen untersucht. Desweiteren werden diese Daten mit dem durch Immunhistochemie gewonnenen Expressionsmuster auf Proteinebene verglichen.

Dabei soll der Frage nachgegangen werden, ob und in welchem Maße sich in den verschiedenen Stadien der malignen Entartung genetische Aberrationen des *PIK3CA*-Gens finden, und inwieweit diese mit der Proteinexpression von p110 α korrelieren. Insbesondere soll überprüft werden, ob sich daraus Hinweise auf ihre Signifikanz in der Karzinogenese ergeben.

2 Literaturübersicht

2.1 Dysplasien und Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes

2.1.1 Epidemiologie

Die Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes machen etwa 8% aller bösartigen Neubildungen aus. Davon sind, um einige Häufigkeitsbeispiele zu nennen, 11,3% in der Mundhöhle, 1,8% im Oropharynx, 3,7% im Nasopharynx und 6,6% im Hypopharynx lokalisiert. Das Plattenepithelkarzinom des Larynx ist mit 27,7% der häufigste bösartige Tumor der Kopf-Hals-Region [18].

In den letzten Jahren konnte eine Zunahme von Inzidenz und Mortalität sowohl in Deutschland als auch in den USA, Großbritannien und der Schweiz beobachtet werden. Nach Schätzungen des Robert Koch Institutes liegt die Anzahl der neuen Fälle an Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens in Deutschland bei 7800 pro Jahr für Männer und bei 3000 pro Jahr für Frauen. An Plattenepithelkarzinomen des Kehlkopfes erkranken jährlich etwa 2500 Männer und 400 Frauen in Deutschland. Die geschätzte Inzidenz für bösartige Tumoren des Mund- und Rachenraumes pro 100.000 Einwohner beträgt in Deutschland für Männer 19,6 und für Frauen 6,6. Für Karzinome des Larynx beträgt sie 6,4 bei Männern und 1,1 bei Frauen [4]. 1999 ergab sich eine Mortalitätsrate für bösartige Tumoren des Kehlkopfes von 2,05 bei Männern und 0,22 bei Frauen in Gesamtdeutschland, wohingegen die Mortalitätsrate der Karzinome des Rachens und der Mundhöhle mit 6,02 bei Männern und 1,44 bei Frauen deutlich höher liegt [6].

Trotz verbesserter Operationstechniken und Entwicklung neuer Therapiemaßnahmen, wie adjuvante Bestrahlung und Chemotherapie, konnte die Prognose in den letzten Jahren nicht entscheidend verbessert werden. Dies liegt zum einen daran, dass die Erkrankung aufgrund ihrer spät auftretenden Symptome häufig erst in den fortgeschrittenen Tumorstadien diagnostiziert wird, zum anderen an der hohen lokoregionären Tumorrezidivrate und dem Auftreten von Zweittumoren [18,55]. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese hohe Rezidivrate basiert auf der Theorie der Feldkanzerisierung. Man geht davon aus, dass durch die

Einwirkung von Karzinogenen auf den gesamten Aerodigestivtrakt in mehreren Arealen unabhängig voneinander präneoplastische Epithelveränderungen entstehen, die zu einer syn- oder metachronen Karzinomentstehung führen können [55].

2.1.2 Definition

Die malignen Neoplasien des Nasen-Rachen-Raumes stellen hinsichtlich ihrer histologischen Klassifikation eine heterogene Gruppe von Tumoren dar. Man unterscheidet u.a. epitheliale Tumoren, mesenchymale Tumoren, Tumoren des Knochen- und Knorpelgewebes und maligne Lymphome. Die häufigste Erscheinungsform dieser Tumoren ist mit über 90% das Plattenepithelkarzinom. Man unterteilt die Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes nach ihrer Lokalisation in Tumoren des Larynx, Oropharynx, Hypopharynx und der Mundhöhle. Sie entwickeln sich vorwiegend über eine Reihe klinisch und histopathologisch definierter Stadien, von normalen Epithel zu Dysplasien unterschiedlichen Schweregrades über das Carcinoma in situ zum invasiven Karzinom. Eine maligne Transformation kann jedoch auch in nicht dysplastischem Epithel stattfinden, ebenso entsteht nicht aus jeder Dysplasie zwangsläufig ein invasives Karzinom [18].

Definition der Dysplasien nach WHO:

Eine Plattenepitheldysplasie ist eine präkanzeröse Läsion des Plattenepithels, die durch Zellatypien und den Verlust der normalen Zellreifung und Schichtung gekennzeichnet ist, aber noch nicht einem Carcinoma in situ entspricht. Nach dem Grad der Kernanomalien und dem Verhältnis der Architekturstörung bezogen auf die betroffenen Epithelschichten, unterscheidet man drei Schweregrade plattenepithelialer Dysplasien [46].

Bei der leichtgradigen Dysplasie bestehen nur leichtgradige Kernanomalien, die sich vor allem in einer Verbreiterung der Basalzellschicht ausdrücken. Mittlere und obere Zellschichten sind erhalten. Es kommen keine atypischen Mitosen vor. Für gewöhnlich sind Keratosen der Epitheloberfläche und Zeichen der chronischen Entzündung vorhanden (**Abb.1A**) [46].

Mittelgradige Dysplasie: Hier stellen sich die Kernanomalien ausgeprägter dar als in leichtgradigen Dysplasien und die Nucleoli sind häufiger prominent. Die Veränderungen sind hauptsächlich in den beiden unteren Zelllagen lokalisiert. Die oberen Schichten zeigen noch

Zellreifung und Schichtung. In den parabasalen und mittleren Zellschichten sind Mitosen vorhanden. Es finden sich keine atypischen Mitosen (**Abb.1B**) [46].

Schwere Dysplasie: Hier zeigt das Epithel ausgeprägte Kernanomalien und den Verlust der Zellreifung in mehr als zwei Drittel der gesamten Epithelschicht. Zellkernpleomorphismen sind üblich. In einigen Regionen finden sich prominente Nucleoli, in anderen sind die Kerne hyperchromatisch. Mitosen kommen bis in die oberen Schichten vor, es können auch atypische Mitosen auftreten. Die Zellen sind für gewöhnlich nicht so dicht gedrängt wie bei einem Carcinoma in situ und zeigen eine höhere Differenzierung mit Interzellulärbrücken (**Abb.1C**). Das Vorhandensein einer gewissen Ausreifung und Schichtung unterscheidet die schwere Dysplasie vom Carcinoma in situ. Da schwere Epitheldysplasien annähernd das gleiche Risiko für die Transformation in ein invasives Karzinom aufweisen wie Carcinomata in situ, werden sie klinisch in einer Gruppe zusammengefasst [46].

Definition des Carcinoma in situ nach WHO:

Das Carcinoma in situ (intraepitheliales Karzinom) ist eine Läsion, in der sämtliche Schichten des Plattenepithels die Kriterien eines Karzinoms erfüllen, ohne jedoch das Stroma zu infiltrieren.

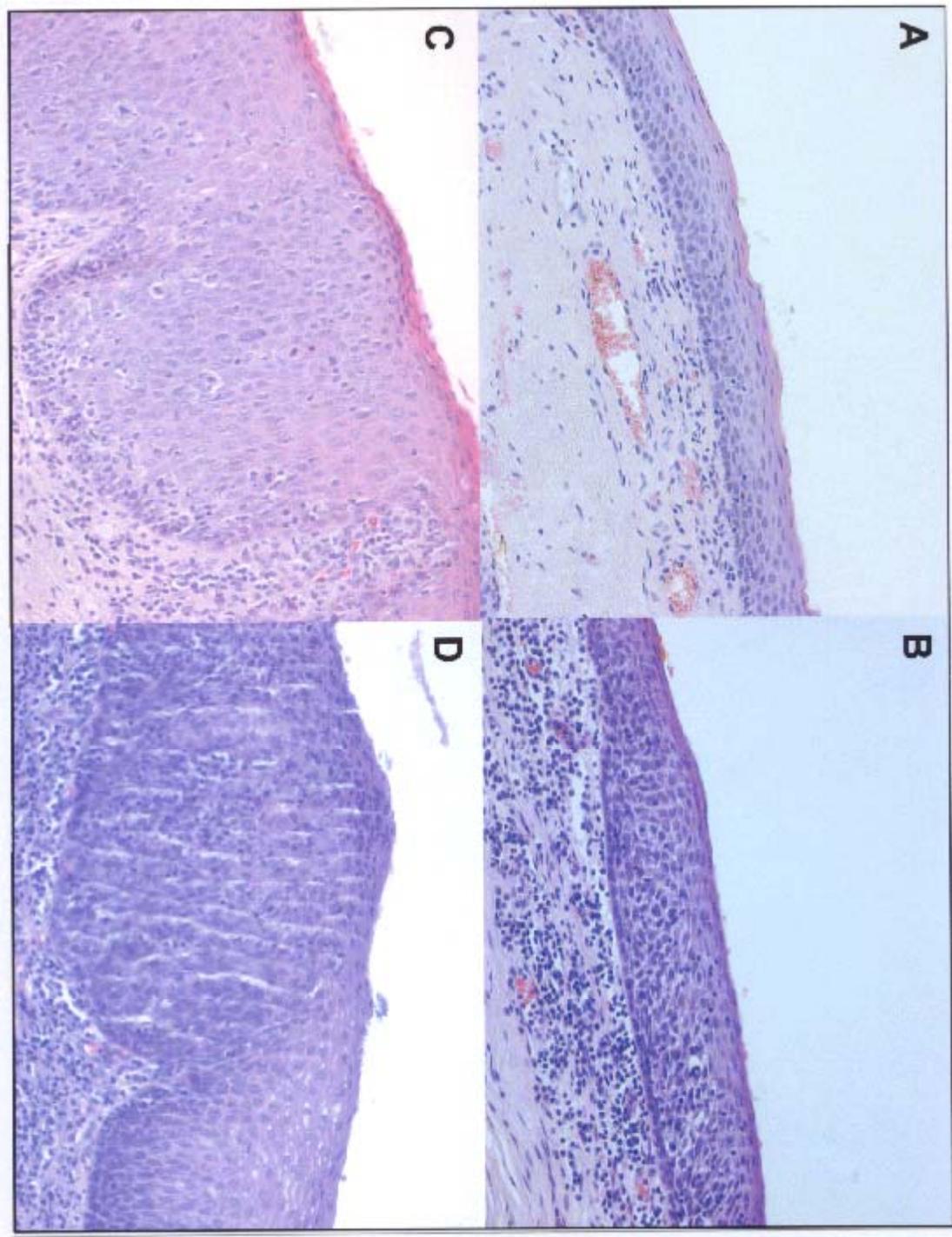
Die Epithelzellen zeigen ausgeprägte atypische hyperchromatische Kerne. Mitosen sind bis in die oberen Zellschichten sichtbar und atypische Mitosen kommen vor. Die Läsion kann sich in die Ausführungsgänge der angrenzenden seromukösen Drüsen ausbreiten, die Basalmembran ist jedoch über ihre gesamte Ausdehnung stets intakt (**Abb.1D**) [46].

Definition des invasiven Karzinoms nach WHO:

Das invasive Plattenepithelkarzinom ist ein maligner epithelialer Tumor mit squamöser Differenzierung, der durch Bildung von Keratin und/oder dem Vorhandensein von interzellulären Brücken gekennzeichnet ist [46].

Die Tumoren werden nach dem Grad der Differenzierung, der zellulären Pleomorphie und der mitotischen Aktivität eingeteilt. Hochdifferenzierte Karzinome haben eine Ähnlichkeit mit normalem Plattenepithel und weisen unterschiedliche Verhältnisse von Basalzellen und squamösen Zellen mit interzellulären Brücken und einer zentralen Verhornung auf. Mitosen

Abbildung 1: Histologie der Dysplasien und des Carcinoma in situ



A: leichte Plattenepitheldysplasie

B: mittelgradige Plattenepitheldysplasie

C: schwere Plattenepitheldysplasie

D: Carcinoma in situ, mit Bezug zu weitgehend regelrechtem Plattenepithel (rechte Bildhälfte)

A,B,C und D wurden mit einem x20 Objektiv fotografiert

sind seltener anzutreffen. Mittelgradig differenzierte Karzinome zeigen eine reduzierte Verhornung und eine gesteigerte zelluläre Pleomorphie. Es treten häufiger Mitosen einschließlich atypischer Mitosen auf. In niedrig differenzierten Karzinomen sind Verhornungen und interzelluläre Brücken minimal und kaum erkennbar [46].

Die Schweregradeinteilung besitzt prognostischen Wert. Die Bestimmung des Differenzierungsgrades ist aber von Variationen innerhalb eines Präparates abhängig und wird von subjektiven Einschätzungen des Pathologen beeinflusst, so dass keine hohe Reproduzierbarkeit gegeben ist [59].

2.1.3 Risikofaktoren

Die Entstehung von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes wird durch eine Reihe von Risikofaktoren ausgelöst oder begünstigt. Dabei scheint das relative Risiko, tatsächlich einen Tumor zu entwickeln, von einer genetischen Suszeptibilität beeinflusst zu werden.

Von besonderer Bedeutung in der Karzinogenese sind Tabak- und Alkoholkonsum. Als ebenfalls beteiligte Faktoren werden Stäube sowie Noxen aus dem beruflichen Bereich, Viren und Ernährungsfaktoren diskutiert [6,18,34].

2.1.3.1 Tabak und Alkohol

Bereits in den 50iger Jahren konnte der Zusammenhang zwischen Alkohol- und Tabakkonsum und dem Auftreten von Karzinomen der Mundhöhle belegt werden. Auch das Plattenepithelkarzinom des Kehlkopfes wurde mit diesen beiden Noxen vom Internationalen Krebsforschungszentrum in einen Kausalzusammenhang gestellt. Dabei scheinen sich bei kombiniertem Alkohol- und Tabakkonsum die Risiken nicht nur zu summieren, es zeigt sich vielmehr ein multiplikativer Effekt ihrer karzinogenen Wirkung [6,18,34].

So erhöht sich das Risiko, an einem Plattenepithelkarzinom des Kehlkopfes zu erkranken, bei einem alleinigen starken Zigarettenkonsum um den Faktor 11,5, bei alleinigem hohem Alkoholkonsum um den Faktor 4, bei sowohl hohem Zigaretten- als auch Alkoholkonsum hingegen um den Faktor 40 gegenüber Personen, die weder Rauchen noch Trinken [6].

Für Karzinome der Mundhöhle steigt das Risiko bei starken Rauchern bis auf das achtfache im Vergleich zu Nichtrauchern und bei hohem Alkoholverbrauch auf das fünffache [6].

2.1.3.2 Ernährung

Für die verschiedenen Lokalisationen der Malignome des oberen Aerodigestivtraktes konnte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bei vermindertem Konsum von Früchten und frischem Gemüse um den Faktor 2 nachgewiesen werden. Umgekehrt zeigte sich ein tumorprotektiver Effekt bei hohem Konsum dieser Nahrungsmittel. Als mögliche Inhaltsstoffe, die diese Wirkung erzielen, werden die Vitamine A, C und Retinoide, insbesondere das Beta-Karotin, gesehen [6,9,18].

2.1.3.3 Berufliche Expositionen

Es liegen Hinweise für eine Risikoerhöhung für Tumoren der Mundhöhle durch Farben, Lacke und Pech vor, sowie für Tumoren des Oro- und Hypopharynx durch berufliche Exposition mit Asbest, Zementstäuben, Steinkohle- und Teerprodukten und Kühlschmierstoffen. Das Vorkommen von Larynxkarzinomen ist offensichtlich assoziiert mit der Exposition von Asbest, Zement, Holzstaub, Steinkohlen- bzw. Teerprodukten sowie Farben und Lacken [6]. Diese Faktoren sind jedoch bisher wenig untersucht.

2.1.3.4 Viren

Man geht davon aus, dass eine ätiologische Beteiligung von Epstein-Barr-Viren sowie Herpes simplex- und Papillomviren an Tumoren des Oro- und Hypopharynx besteht [6]. Ihre genaue Rolle in der Karzinogenese dieser Tumoren ist jedoch noch nicht geklärt.

2.1.4 Familiarität und genetische Suszeptibilität

Seit langem sind Tabak- und Alkoholkonsum als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches anerkannt. Wenig Beachtung fanden zunächst familiäre Faktoren. In einigen Studien konnte jedoch ein signifikant erhöhtes relatives Risiko für die Entwicklung eines malignen Tumors festgestellt werden, wenn bereits Fälle unter erstgradigen Verwandten vorkamen [17,19].

Eine wichtige Rolle scheinen familiäre Faktoren bezüglich der sogenannten genetischen Suszeptibilität zu spielen. Hierunter versteht man die individuelle, genetisch determinierte Prädisposition, eine bestimmte Form von Krebs zu entwickeln. Sie wird unter anderem durch die Empfindlichkeit des Organismus beeinflusst, mit der er auf Karzinogene reagiert. Die Exposition mit verschiedenen Risikofaktoren und die körpereigene Suszeptibilität interagieren

also miteinander und können das individuelle Krebsrisiko gemeinsam beeinflussen [16,19,45].

2.1.5 Karzinogenese der Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes

Nach dem heutigen Erkenntnisstand geht man davon aus, dass die Karzinogenese ein in mehreren Schritten ablaufender Prozess ist, der aus der irreversiblen Schädigung des Genoms einer Zelle (**Initiation**), der Vermehrung (**Promotion**) und der zunehmenden Malignität der initiierten Zellen (**Progression**) besteht. Die Schädigung des Genoms wird durch die Effekte der oben genannten Karzinogene und Risikofaktoren induziert. Die individuellen Unterschiede in der Suzeptibilität auf diese Noxen sind offensichtlich genetisch determiniert [45].

Innerhalb der einzelnen Phasen der Kanzerogenese der Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes durchlaufen die Zellen typischerweise die verschiedenen histopathologischen Stadien vom normalen Epithel über zunehmende Dysplasien und Carcinomata in situ zum invasiven Karzinom. Diese Entwicklung ist begleitet von zunehmenden, unterschiedlichen genetischen Alterationen [14,23]. Verschiedene Tumorstadien weisen dabei offensichtlich spezifische Muster dieser genetischen Veränderungen auf. Diese Tatsache eröffnet die Möglichkeit, neue molekulare Marker zu finden, die ein malignes Potential einer präkanzerösen Läsion vorhersagen können [23,44]. Die Identifizierung der für die Progression von prämaligen Läsionen in invasive Karzinome verantwortlichen genetischen Aberration in einem frühen Stadium der Tumorentwicklung wäre demnach von großer diagnostischer und prognostischer Bedeutung.

Bei der Suche nach der oder den entscheidenden genetischen Alterationen in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes zeigte sich in vielen Studien als immer wiederkehrende chromosomale Aberration ein Zugewinn im Bereich des langen Arms von Chromosom 3 (3q26-qter) [10,11,13,32,42,53,60,62]. Die Häufigkeit und Übereinstimmung dieses Ereignisses und der Vergleich mit den Veränderungen präkanzeröser Läsionen ließen darauf schließen, dass ein Zugewinn des Chromosoms 3, speziell der Region 3q26, eine bedeutende genetische Aberration in der frühen Tumorentwicklung von

Plattenepithelkarzinomen repräsentiert [11,12,13,20,22,42,48,53]. Als mögliches Onkogen, das in dieser Region lokalisiert ist, wurde das *PIK3CA*-Gen identifiziert [27,42,48].

2.2 PIK3CA

Das Phosphatidylinositol 3-Kinase p110 α Gen (*PIK3CA*) kodiert für die katalytische Untereinheit p110 α der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K). Die chromosomale Lokalisation des Gens konnte mittels *in situ* -Hybridisierung auf dem chromosomalen Abschnitt 3q26.3 kartiert werden [58].

2.3 Phosphatidylinositol 3-Kinase

2.3.1 Klassifizierung und Aufbau

Die PI 3-Kinasen sind eine Gruppe von Enzymen, die zur Unterfamilie der Lipidkinasen gehören [40]. Es konnten multiple Isoformen dieser Familie isoliert werden, die nach ihrem jeweilig bevorzugten Substrat in 3 Klassen eingeteilt werden [40,57]. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Klasse IA der PI 3-Kinasen.

Die Klasse IA besteht aus heterodimeren Enzymen, die aus einer 110 kD katalytischen Untereinheit (p110) und einer 85 kD regulatorischen Untereinheit aufgebaut sind. Die katalytische Untereinheit p110 existiert in den drei Isoformen p110 α , β und δ [57].

2.3.2 Funktion

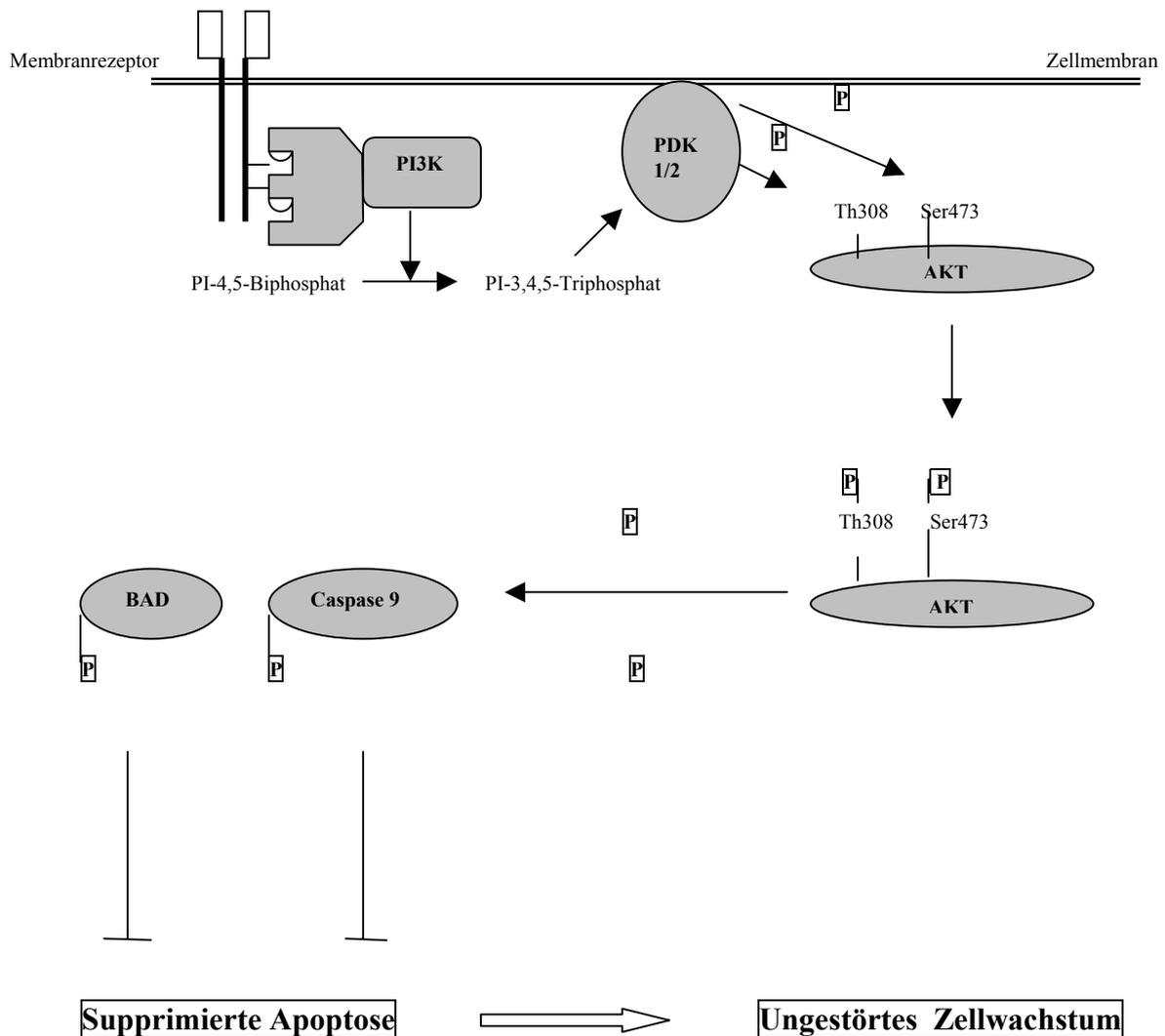
Die Phosphatidylinositol 3-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung des Inositolringes von Phosphatidylinositol (PI) an der Position D3. Phosphatidylinositol ist ein Phospholipid, das aus einer Phosphatidsäure und einem angekoppelten Inositolring besteht. Die OH-Gruppen des Inositolringes können bis auf die in der 2'-und 6'-Position alle phosphoryliert werden,

wobei die Konstellation der Phosphatgruppen einen grossen Einfluss auf die speziellen Funktionen der so entstehenden, verschiedenen Phosphinositide hat [57].

Als Produkte der PI 3-Kinasen entstehen, je nach phosphoryliertem Substrat, vier verschiedene Lipide: PI-3-Phosphat, PI-3,4-Phosphat, PI-3,5-Phosphat und PI-3,4,5-Phosphat. Über diese Lipidprodukte werden die vielen unterschiedlichen physiologischen Zellfunktionen der PI 3-Kinasen, wie Protein- und Glykogensynthese, Glykolyse, Vesikeltransport, Zelladhäsion und –invasion, vermittelt [2,40,57].

Die Klasse IA der PI 3-Kinasen phosphoryliert hauptsächlich PI-4,5-Diphosphat zu PI-3,4,5-Triphosphat. Dieses Produkt ist ein Second messenger und aktiviert die Proteinkinase B (PKB), auch AKT genannt. AKT ist eine Seronin/ Threonin-Kinase, die eine bedeutende Rolle in der Kontrolle des Zellwachstums einnimmt. Die Aktivierung von AKT ist verbunden mit der Phosphorylierung von Thr308 und Ser473 durch die Enzyme PDK1 und PDK2. Dies wird gefördert durch PI-3,4,5-Triphosphat, indem es die Konformation von AKT so verändert, dass es für PDK 1 und 2 leichter zugänglich wird, und indem es AKT aus dem Cytosol zur Zellmembran führt, wo die Phosphorylierung stattfindet. Die aktivierte AKT phosphoryliert wiederum selbst eine Reihe von Proteinen, unter anderem BAD und Caspase 9, die in dephosphorylierter Form die Zellapoptose begünstigen [2,40,57].

Aus diesen Erkenntnissen wurde geschlossen, dass die Aktivierung von PI 3-K und AKT eine antiapoptotische Wirkung besitzt [15,29]. Die Apoptose (programmierter Zelltod) nimmt eine zentrale Rolle in der Karzinogenese ein. Dieser Überwachungsmechanismus unterdrückt die Tumorbildung, indem er zur Eliminierung von potentiell tumorauslösenden Zellen führt [31]. Ein genetischer Zugewinn von *PIK3CA* und eine damit verbundene erhöhte Aktivität der PI3-K können zu einer Suppression der Apoptose führen. Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und vermindertem Absterben von Zellen. Eine Tumorenstehung wird begünstigt.

Abb.2: PI3-K/AKT-Signalweg:

PI3-K katalysiert die Bildung von PI-3,4,5-Triphosphat. PI-3,4,5-Triphosphat aktiviert PDK 1/2, was zur Phosphorylierung von AKT führt. Die auf diese Weise aktivierte AKT phosphoryliert ihrerseits wiederum BAD und Caspase 9, die in dieser Form nicht mehr zur Auslösung der Apoptose beitragen, es kommt zum ungestörten Zellwachstum.

Die Lokalisation der *PIK3CA* auf dem chromosomalen Abschnitt 3q26.3, welcher in Studien an Plattenepithelkarzinomen einen Zugewinn aufweist, und ihre mögliche Rolle bei der Regulation des PI3-Kinase/Akt- Signalweges lassen vermuten, dass *PIK3CA* ein Onkogen in Plattenepithelkarzinomen ist. Dieser Verdacht wurde in zahlreichen Studien an Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes, der Cervix uteri und an Ovarial- und Kolonkarzinomen postuliert [3,7,33,42,47].

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Für die Studie wurden elf Fälle von invasiven Plattenepithelkarzinomen und fünfzehn Fälle präkanzeröser Läsionen aus dem Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Gießen ausgewählt. Es handelte sich dabei um Gewebe der Mundhöhle, des Larynx und des Hypopharynx, welches innerhalb der Jahre 1996-2000 in der HNO-Klinik des Klinikums der Universität Gießen entnommen und nach Formalinfixierung in Paraffin eingebettet wurde (**Tab.1**). Die histologische Diagnosestellung erfolgte am Institut für Pathologie der Universität Gießen an Hämatoxylin und Eosin (HE) – gefärbten Präparaten, der WHO-Klassifikation entsprechend [46]. Die Einteilung der Tumorstadien wurde nach der TNM-Klassifikation der Union International Contre le Cancer (UICC) [50] durchgeführt.

Die untersuchten präkanzerösen Läsionen umfassten sechs Fälle leicht- bis mittelgradiger Dysplasien, sowie neun Fälle schwerer Dysplasien bzw. Carcinomata in situ (**Tab.1**). Das Durchschnittsalter der Patienten dieser Fallgruppe lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei 60,7 Jahren (30-77 Jahre), bei keinem dieser Patienten gab es Anzeichen für das Vorliegen eines invasiven Karzinoms.

Das Kollektiv der Patienten mit invasiven Karzinomen bestand aus vier Tumoren im Stadium pT1, drei im Stadium pT2, zwei Tumoren im Stadium pT3 und einem im Stadium pT4. Desweiteren wurde eine Biopsie mit dem Tumorgrading G3 untersucht (**Tab.1**). In dieser Gruppe waren die Patienten 40 bis 84 Jahre alt (m=59,8 Jahre).

Als Kontrolle der spezifischen Bindung der YAC-Sonde (siehe unten) dienten Lymphozyten von fünf verschiedenen gesunden Personen. Das in Paraffin eingebettete Epithel von fünf Tonsillen wurde als Kontrollgruppe für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) in der gleichen Weise wie die oben genannten 26 Fälle bearbeitet.

Parallel zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde an dreizehn dieser Fälle im anatomischen Institut für Veterinärmedizin der Universität Giessen mRNA *in situ* Hybridisierungen vorgenommen.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Patientendaten

Fall Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	Tumorstadium
1	30 Jahre	M	D I	
2	51 Jahre	M	D I	
3	65 Jahre	W	D II	
4	40 Jahre	W	D II	
5	58 Jahre	M	D II	
6	62 Jahre	M	D II	
7	77 Jahre	M	D III	
8	72 Jahre	W	D III	
9	70 Jahre	M	D III	
10	65 Jahre	M	D III	
11	58 Jahre	M	D III	
12	55 Jahre	M	D III	
13	77 Jahre	M	D III	
14	60 Jahre	M	D III	
15	71 Jahre	M	D III	
16	67 Jahre	M	HNSCC	pT1, pN0, G2
17	50 Jahre	M	HNSCC	pT1, pN0, G2
18	84 Jahre	M	HNSCC	pT1, pN0, G2
19	53 Jahre	M	HNSCC	pT1, pN2, G2
20	40 Jahre	M	HNSCC	pT2, pN0, G2
21	50 Jahre	M	HNSCC	pT2, pN0, G2
22	65 Jahre	M	HNSCC	pT2, pN1, G3
23	61 Jahre	M	HNSCC	pT3, pN0, G2
24	84 Jahre	M	HNSCC	pT4, pN2, G3
25	53 Jahre	M	HNSCC	Biopsie, G3
26	51 Jahre	M	HNSCC	pT3, pN1, G3

M = männlich

W = weiblich

D I = leichtgradige Dysplasie

D II = mittelgradige Dysplasie

D III = schwere Dysplasie / Carcinoma in situ

HNSCC = invasives Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region

G1 = gut differenziertes Karzinom

G2 = mittelgradig differenziertes Karzinom

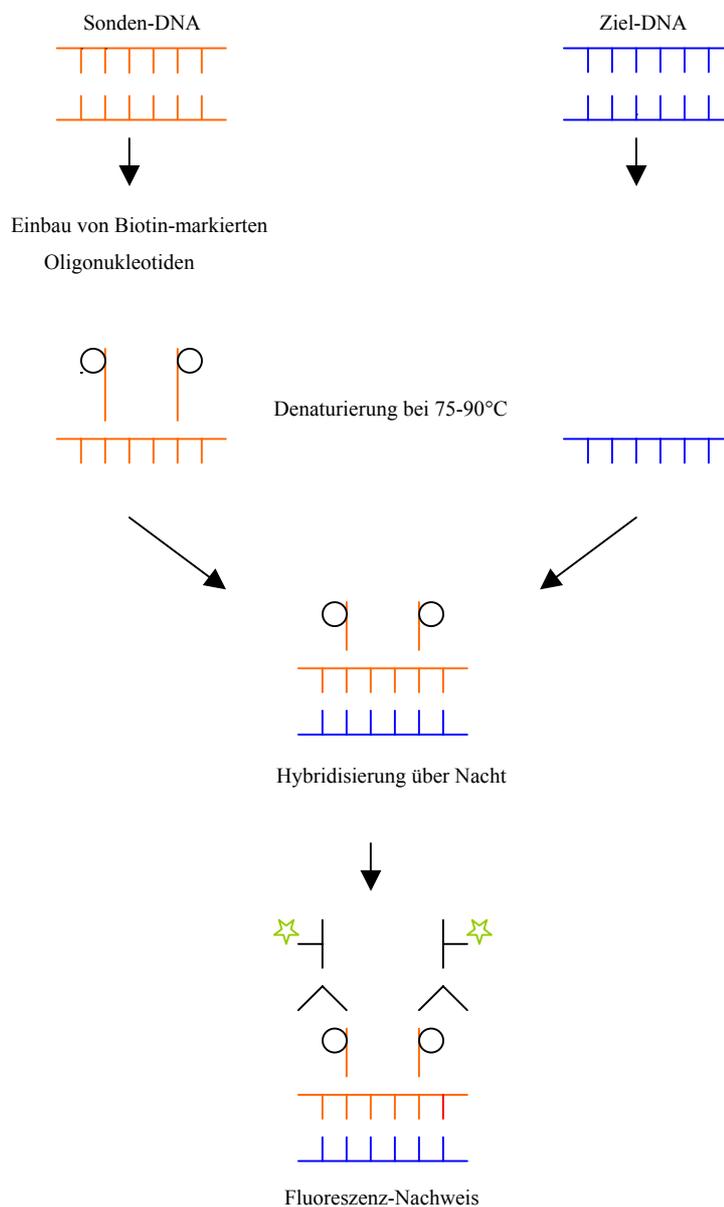
G3 = wenig differenziertes Karzinom

3.1.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

3.1.2.1 Überblick

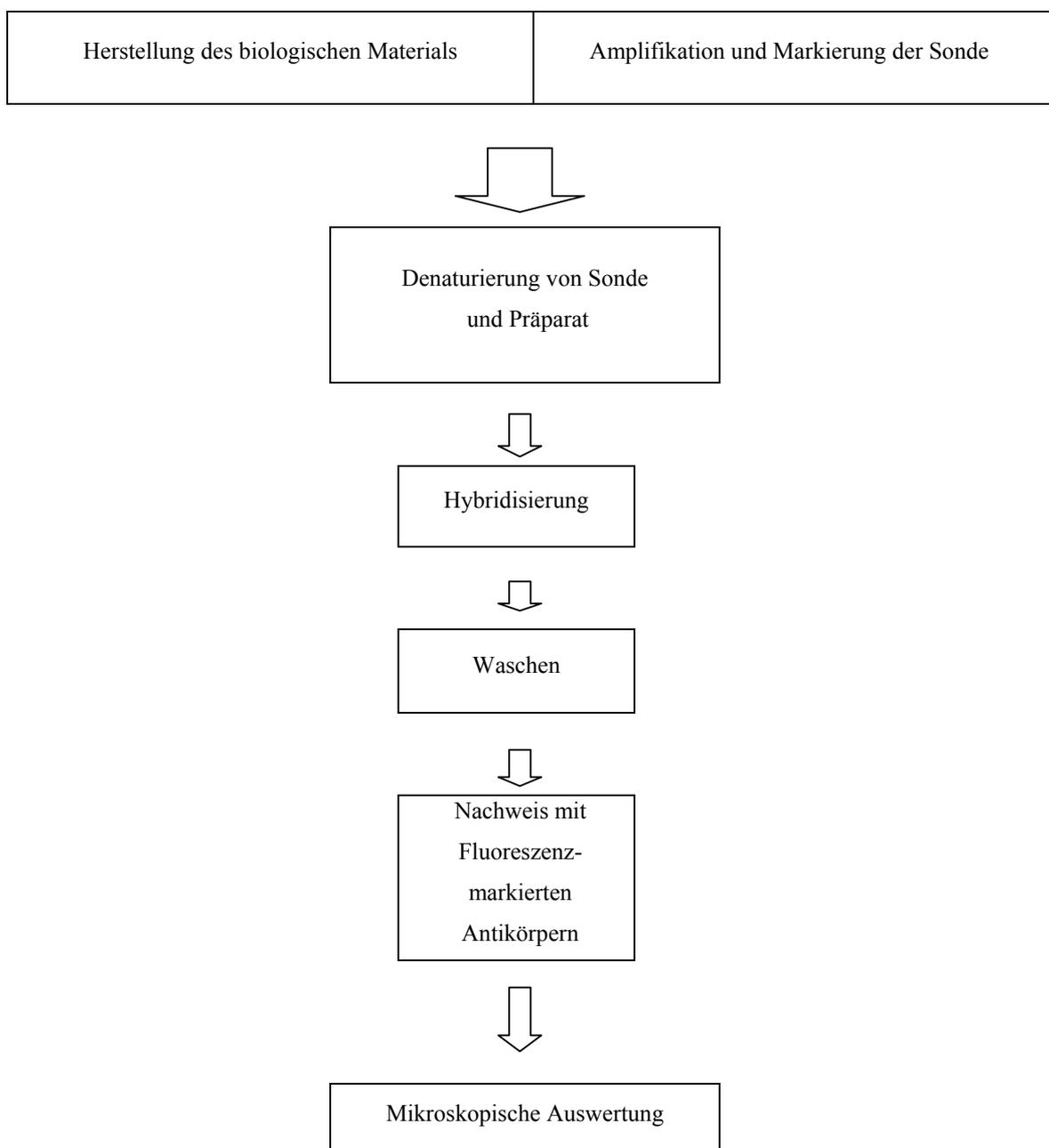
Die *in situ*-Hybridisierung dient dem Nachweis von DNA- und RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen. Die Methode basiert auf der spezifischen Hybridisierung einer markierten Nukleinsäure-Sonde mit der komplementären zellulären DNA bzw. RNA auf einem Gewebeschnitt (**Abb.3**) [30].

Abbildung 3: Prinzip der FISH



Das entstehende Hybridisierungssignal wird hierbei direkt im biologischen Präparat sichtbar, wodurch sich ein genomischer Abschnitt gewissermaßen *in vivo* lokalisieren lässt. Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung lassen sich unter anderem physikalische Karten von Chromosomen erstellen, Chromosomenstrukturen und deren Abweichungen analysieren und Onkogene lokalisieren [30]. Ein Überblick über die wichtigsten Arbeitsschritte gibt die folgende Abbildung.

Abbildung 4: Schematischer Überblick über den Ablauf der FISH (in Anlehnung an A.R. Leitch, *In situ*-Hybridisierung, Spektrum Verlag, 1994)



3.1.2.2 Herstellung des biologischen Präparates

Zellisolation:

Es wurden aus Paraffinblöcken des jeweiligen Untersuchungsmaterials 30-40µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Da die Kerne der Zellen sich teilweise überlagerten, wurden die Zellen aus dem Zellverband gelöst, um die sichere Auswertbarkeit der *in situ*-Hybridisierungs-Signale zu gewährleisten.

Hierzu wurden die Paraffinschnitte dreimal 10 min bei 37°C in Xylol entparaffinisiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (bestehend aus 96%igem, 85%igem, 70%igem und 50%igem Alkohol) rehydriert. Die Gewebeschnitte wurden 2min in Hämalaun (Ansatz siehe Anhang) gefärbt und unter lichtmikroskopischer Kontrolle mikrodiseziert. Anschließend wurden das Tumorgewebe bzw. das normale Epithel in 0,5 ml Phosphatpuffer (PBS, Ansatz siehe Anhang) in ein Eppendorf-Tube überführt. Nun erfolgte der enzymatische Verdau durch Zugabe von 60µl 0,1%iger Kollagenase-Lösung und eine Inkubation bei 37°C über Nacht, gefolgt von dreimaliger 30min bis 2h dauernder Inkubation bei 37°C in 0,01-0,1%iger Protease-Lösung in einem Falcon-Röhrchen am nächsten Tag. Die benötigte Konzentration der Lösung sowie Dauer der Inkubation waren abhängig von der Fixierung des Gewebes. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die gelösten Zellen durch Filtern der Gewebelösung mittels eines Zellsiebes gewonnen und das restliche Gewebe wurde erneut in Protease-Lösung zur weiteren Inkubation gegeben. Die gefilterte Zellsuspension wurde 5min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 0,1ml PBS. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurden alle gewonnenen Zellen in 10µl PBS mit BSA pro erwünschtem Objektträger gelöst, die Zellkernlösung auf beschichtete Objektträger gegeben und luftgetrocknet. Um eine exakte Auswertung zu gewährleisten, wurde die Qualität der Zellkernpräparate mikroskopisch überprüft. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte eine Aufbewahrung der Präparate bei -80°C.

Kollagenase-Lösung: 1ml PBS
 10 mg Kollagenase (Sigma, Deisenhofen)

Protease-Stammlösung: 9ml dH₂O
 1ml EDTA
 100mg Protease (Sigma, Deisenhofen)

Protease-Lösung: 9ml PBS
 1ml Protease-Stammlösung

Lösung für Zellsuspension: 10ml PBS
 0,5g BSA = Albumin Fraktion V von Rinderserum
 (Boehringer, Mannheim)

Vorbehandlung des Trägermaterials:

Die Beschichtung der Objektträger erfolgte mit APTEX. Sie diente der besseren Haftung der Zellen und verringerte das Risiko unspezifischer Signale durch Fett oder Verunreinigungen des Objektträgers. Dazu wurden Glasobjektträger in Aqua bidest und Aceton gespült und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger 5min in 2% APTEX in Aceton, dann 2min in frisches Leitungswasser gestellt, 2min unter fließendem Wasser gespült und zuletzt 2min in Aqua bidest getaucht, bevor sie erneut lufttrockneten.

2% APTEX: 4ml 3-Aminopropyltriethoxysilan (Sigma A-3648, Deisenhofen)
 196ml Aceton

Vorbehandlung der Zellen:

Zytoplasmareste und andere Zellbestandteile können durch eine unspezifische Bindung der Sonde zu einem starken Hintergrund führen. Um dies zu vermeiden und um das Eindringen von Sonde und Nachweisreagenzien zu erleichtern (Permeabilisierung), erfolgte unmittelbar vor der *in situ*-Hybridisierung eine Inkubation mit einem proteinabbauenden Enzym (Proteinase K). Diese Prozedur ist bei Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Präparaten notwendig, da Formaldehyd und Glutaraldehyd zu einer Quervernetzung von Proteinen führen [30].

Für diesen Arbeitsschritt wurden die gefrorenen Objektträger aufgetaut und 10min in frisches Aceton gegeben. Danach wurde 0,05-0,3%ige Proteinase K-Lösung aufgetragen und 10-30min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Verdau musste so eingestellt werden, dass die folgenden Reagenzien in die Zellkerne eindringen konnten und andererseits ihre Morphologie erhalten blieb. Der Verdau wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach Lufttrocknen der Präparate konnte die Hybridisierung erfolgen.

Proteinase K-Lösung: 30-50 µl 1%ige Proteinase K (Sigma, Deisenhofen) pro verwendetem Objektträger
auf 100µl pro OT mit PBS auffüllen

3.1.2.3 Amplifikation und Markierung der Sonde

Sonden:

Der Nachweis von DNA-Sequenzen in einem Präparat erfolgt mit markierten DNA-Sonden. Als Sonde lässt sich prinzipiell jede spezifische DNA-Sequenz verwenden, die dafür in einen Vektor eingebaut und in einer geeigneten Wirtszelle geklont wird. Als Vektoren dienen unter anderem künstliche Hefechromosomen (YACs= *yeast artificial chromosomes*) [30].

Die verwendete YAC-Sonde (914e08, **Tab.2**) wurde von der Human mega YAC (CEPH) library des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung in Berlin bezogen. Die Sonde enthielt das *PIK3CA*-Gen (lokalisiert auf Chromosom 3q26.3). Dies wurde mittels PCR mit den *PIK3CA*-spezifischen Primern (NCBI Accession No. NM-006218) 5'-CACATCATGGTG-GCTGGACAAC - 3' (bp 3149-3171) als Vorwärts-Primer und 5'-TGTGCAATTCCTATGC-AATCGG - 3' (bp 3292-3313) als Reverse-Primer überprüft.

Tabelle 2: YAC-Sonde

BAND	FLpter	PROBE	cMpter
3q26.3	0.89-0.95	914e08	198

BAND= bezieht sich auf Giemsa-gefärbte Chromosome, mit denen die Lokalisation der Probe bestimmt wurde

FLpter= beschreibt die fraktionierte Länge des Chromosoms ab dem Telomer des kurzen Chromosomenarmes

cMpter= Centimorgans sind Rekombinations-Untereinheiten, die die tatsächliche Anordnung des YAC's darstellen

Für die Ko-Hybridisierung kam die zentromerspezifische DNA-Sonde D3Z1 des Chromosomes 3 (Alpha-satellite Digoxigenin-markiert, Appligene Oncor, Strassburg, Frankreich) zum Einsatz. Bei der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop war somit

eine Beurteilung der YAC-Sonden-Signale in Relation zur Anzahl des Chromosomes 3 pro Zelle möglich.

Amplifikation mittels DOP-PCR:

Die DOP-PCR erlaubt die exponentielle Zufalls-Amplifikation der YAC-Sonden-DNA mittels degenerierter Oligonukleotid-Primer. Hierdurch wurde eine für die *in situ*-Hybridisierung ausreichende YAC-DNA-Konzentration erzielt. Bei der DOP-PCR werden die Doppelstränge von YAC- und Primer-DNA zunächst bei 94°C denaturiert. In den nachfolgenden ersten Zyklen bindet der Primer bei niedriger Temperatur mit seinem 3'-Ende an die YAC-Matrize. Durch die hierbei bestehende niedrige Stringenz bindet der Primer nicht in seiner kompletten Länge. Es entstehen PCR-Stränge, die am 5'-Ende den kompletten Primer enthalten. Die zweiten Zyklen erfolgen bei erhöhter Temperatur. Durch die so erzielte höhere Stringenz kommt es nun zu einer spezifischen Amplifikation des nach den ersten Zyklen vorliegenden Materials.

Die PCR wurde mit dem DOP-PCR Master Kit (Roche, Mannheim) durchgeführt. Hierzu wurden 5µl der YAC-DNA-Probe mit 25µl DOP PCR Mastermix, 2,5µl DOP PCR Primer und 17,5µl sterilem Aqua bidest zu einem Reaktionsansatz mit 50µl Gesamtvolumen in ein 200µl PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Zusätzlich wurde bei jeder PCR ein Gefäß ohne YAC-DNA zur Kontrolle angesetzt. Bei diesem Ansatz wurden 22,5µl Aqua bidest zugefügt, um ebenfalls auf ein Gesamtvolumen von 50µl zu kommen. Anschliessend wurde der Ansatz gründlich gemischt und die Reaktion in einer PCR-Maschine (Biometra Personal Cycler, Biotron, Göttingen) mit den folgenden Zyklen durchgeführt:

1. 5 min 95°C
2. 5 Zyklen:
 - 0,5 min 94°C
 - 0,5 min 30°C
 - 0,5 min 30°C → 72°C
 - 1,5 min 72°C
3. 35 Zyklen:
 - 0,5 min 94°C
 - 0,5 min 62°C
 - 1,5 min 72°C
4. 7 min 72°C

DOP PCR Mastermix:	25 U Taq DNA polymerase in 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 3 mM MgCl ₂ , Brij 35, 0,01% (v/v), dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 0,4 mM), bei einem pH von 8,3
DOP PCR Primer:	40µM Oligonucleotid-Primer (22mer, 5'-OH CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTGG OH-3', N = A, C, G, T in gleichen Anteilen) mit sterilem Wasser auf Volumen von 150µl

Die so amplifizierte YAC-Sonde wurde bis zu ihrem weiteren Gebrauch bei 7°C aufbewahrt. Die DOP-PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Agarose-Gelelektrophorese:

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurde ein Gel durch 3minütiges Erhitzen von 50ml 0,5 TE-Puffer mit 750mg Agarose in der Mikrowelle und Zugabe von 1 µl Ethidium-Bromid hergestellt. Anschließend wurden jeweils 5µl Ladder, amplifizierte YAC-DNA (bzw. die Negativ-Kontrolle ohne YAC-DNA) und zwei Mengenstandards (200 und 500 bp) mit 1µl Gelladepuffer in eine Gelkammer gegeben und die Elektrophorese gestartet. Nach 10min Laufzeit wurde das erste Kontrollfoto gemacht und nach weiteren 45min das zweite. Es sollte ein Schmier von DNA-Fragmenten von ca. 300-3000 bp sichtbar werden. Die Negativ-Kontrolle darf keine Schmier von DNA-Fragmenten erzeugen.

0,5 TE-Puffer:	900ml dH ₂ O
	100ml 5x TE

Enzymatische Markierung:

Um die YAC-Sonde im Präparat unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, müssen bestimmte Markermoleküle (z.B. Biotin, Digoxigenin, Fluoreszenzfarbstoff) in Form von modifizierten Nucleotiden enzymatisch in ihre DNA eingebaut werden [30].

Die Markierung der YAC-Sonde mit Biotin wurde in Form der Oligomarkierung (*random-primed labelling*) durchgeführt. Bei dieser Methode hybridisieren nach Denaturierung der Doppelstrang-DNA synthetische Oligonucleotide mit den Einzelsträngen. Diese Oligonucleotide dienen als Primer für ein Klenow-Fragment, welches mit Polymeraseaktivität

einen neuen DNA-Strang synthetisiert, in den es markierte und unmarkierte Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP) aus dem Reaktionsgemisch einbaut .

Hierzu wurde das BioPrime DNA Labelling System (Gibco BRL, Eggenstein) verwendet. Es wurden 5 µl der durch DOP-PCR amplifzierten YAC-DNA in 5µl Lösung mit 5µl TE-Puffer und 20µl Random Primers Solution für 5min in einem kochendem Wasserbad denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Auf Eis zugegeben wurden 5µl dNTP-Mischung, 14µl destilliertes Wasser und 1µl Klenow-Fragment. Es folgte eine 4-5-stündige Inkubation bei 37°C, nach der die Reaktion mit 5µl Stop-Puffer beendet wurde. Die biotinmarkierte Sonde wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5X Random Primers Solution: 125mM Tris-HCl (pH 6,8), 12,5 mM MgCl₂, 25 mM 2-mercaptoethanol, 750 µg/ml oligodeoxyribonucleotide primers

10X dNTP Mixture: 1 mM biotin-14-dCTP, 1mM dCTP, 2mM dATP, 2mM dGTP, 2mM dTTP in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1mM Na₂EDTA

Klenow-Fragment: 40 U/µl Klenow Fragment (Large Fragment of DNA Polymerase I) in 50 mM Potassium Phosphate (pH 7,0), 100 mM KCl, 1mM DTT, 50% Glycerol

Stop-Puffer: 0,5 M Na₂EDTA pH 8,0

Der erfolgreiche Einbau der biotinmarkierten Nucleotide wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und Filterttest zur Bestimmung der Einbaueffizienz nachgewiesen.

Agarose-Gelelektrophorese:

Die Gelelektrophorese erfolgte analog der oben beschriebenen Anleitung mit der nun enzymmarkierten YAC-Sonde. Die Länge der Sonde sollte zwischen 100-300 Basen liegen, da kürzere Sonden bei der Hybridisierung instabilere Nucleinsäurepaare bilden und längere schlechter in das Gewebe eindringen [30].

wurden 20-30µl Human Cot-1 DNA (Gibco BRL, Eggenstein), 5µl Salmon Testes (Sigma, Deisenhofen) pro Hybridisierung und die insgesamt dreifache Menge absoluten Alkohols gegeben. Cot-DNA und Salmon Testes-DNA sind unmarkierte Blockade-DNA und müssen im Überschuß vorliegen. Sie verhindern die Hybridisierung der Sonde mit unspezifischen Sequenzen oder Molekülen im Zytoplasma und Kernplasma, indem sie an diese binden. Dadurch sind sie für die Sonde unzugänglich. Dies führt zu einer erheblichen Reduktion von unspezifischen Signalen [30]. Zur Fällung wurde nun das Sondengemisch 30min bei -80°C eingefroren, dann 30min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Lösungsüberstand abpipetiert.

Denaturierung und Hybridisierung:

Das verbliebene Pellet wurde 10min getrocknet und in 6µl Formamid pro Hybridisierung ca. 30min bei 37°C vollständig gelöst. Formamid sorgt dafür, dass die Gewebestruktur bei den für die Denaturierung erforderlichen Temperaturen nicht geschädigt wird und beeinflusst positiv die Stringenz, d.h. den Prozentsatz korrekt gepaarter Nucleotide im Doppelstrang aus Sonde und Zielsequenz [30]. Zu der nun gelösten Sonde wurden 6µl Hybridmix und 0,5µl der Centromer-Sonde des Chromosoms 3 zugefügt. Das Hybridisierungsgemisch wurde auf die Objektträger mit den isolierten Zellen aufgetragen, mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt und mit Fixogum luftdicht abgeschlossen. Nach 30min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Denaturierung bei 75-90°C für 10 min auf einer Heizplatte. Die Denaturierung ist notwendig, um sowohl die Sonde als auch die Zielsequenz in für die Hybridisierung erforderliche Einzelstränge zu überführen [30]. Die Hybridisierung wurde in einer feuchten Kammer bei 37°C über Nacht durchgeführt.

Hybridmix: 4xSSC
 20% Dextransulfat

3.1.2.5 Waschen nach der Hybridisierung

Die Deckgläschen wurden in 2xSSC gelöst und die Objektträger 3x5min in 0,25xSSC bei 55°C gewaschen. Dieser Schritt dient dem Entfernen von nicht spezifisch gebundenen Sonden, so dass nur komplementär gepaarte Hybridmoleküle übrig bleiben [30].

3.1.2.6 Nachweis der Hybridisierungsstellen

Im Anschluss wurden die jeweiligen Zielregionen im Präparat nachgewiesen, an die die spezifischen Sonden hybridisiert haben. Dazu wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Avidin-FITC und Anti-Digoxigenin-Rhodamin (Appligene Oncor, Strassburg, Frankreich) 3min bei 13000 rpm zentrifugiert, im Verhältnis 1:100 in Waschpuffer mit BSA verdünnt und 30min bei Raumtemperatur auf die Objektträger gegeben. Die Farbstoffe sind an Antikörper gekoppelt, die spezifisch an die verwendeten Markermoleküle binden. Das an Avidin gekoppelte grün fluoreszierende FITC reagiert mit Biotin (Markierung der YAC-Sonde) und das rot fluoreszierende Rhodamin mit Digoxigenin (Markierung der Centromer-Sonde). Anschließend folgte eine 3x5minütige Waschung in Waschpuffer bei 45°C. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt, die Schnitte anschließend getrocknet und zuletzt mit dem Antibleichmittel Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) eingedeckt. Die Präparate wurden anschliessend bei +4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Waschpuffer:	200ml 20xSSC
(4xSSC mit Triton)	800ml dH ₂ O
	0,5ml Triton
Waschpuffer mit BSA:	10ml Waschpuffer
	0,5g BSA
DAPI:	1mg DAPI (4,6-Diamidin-2Phenylindoldihydrochlorid, Sigma, Deisenhofen)
	pro ml dH ₂ O

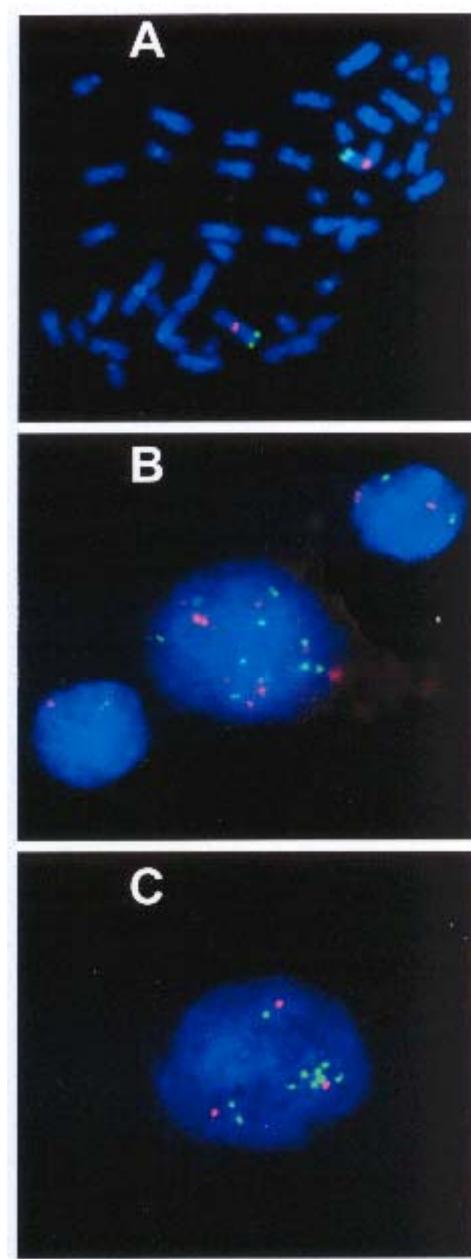
3.1.2.7 Auswertung der Hybridisierungssignale

Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit verschiedenen Filtern (Pinstel filter set 83000 Chroma) zur Anregung von FITC und Rhodamin. Dokumentiert wurden die Ergebnisse mit dem Mac Probe System (PSI, Chester, England).

Bei der Fluoreszenzmikroskopie regt Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungslicht) Elektronen im Fluoreszenzfarbstoff an. Da dieser angeregte Zustand instabil ist, kehren die Elektronen wieder in ihren Grundzustand zurück. Die dabei verloren gehende Energie wird in Form von Licht (Fluoreszenz) wieder abgegeben. Die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe werden durch unterschiedliche Wellenlängen angeregt, die im Mikroskop durch die entsprechenden Anregungsfilter (**Tab.3**) erzeugt werden [30]. Dadurch erscheinen die DAPI-gefärbten Zellkerne unter dem Mikroskop blau, die FITC-gefärbte Sonde grün und die Rhodamin-gefärbte Centromer-Sonde rot. Auf diese Weise konnten die unterschiedlichen Signale voneinander abgegrenzt und ausgezählt werden (**Abb.5**).

Tabelle 3: Filter für die Darstellung von Fluoreszenzfarbstoffen im Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (in Anlehnung an A.R.Leitch, *In situ*-Hybridisierung, Spektrum Verlag, 1994)

Fluoreszenzfarbstoff	Farbe des Anregungslichtes	Anregungsfilter	Sperrfilter	Farbe der Fluoreszenz
DAPI	ultraviolett	BP340-380	LP420	blau
FITC	blau/ violett	BP450-490	LP520	grün
Rhodamin	grün	BP536-556	LP590	rot

Abbildung 5: Hybridisierungssignale

A: Hybridisierung der Yac-DNA-Probe (914e08) sowie der Zentromerregion (D3Z1) auf Zellspreitungen normaler Lymphozyten: Spezifische Bindung der YAC-DNA-Probe. Die grünen Signale zeigen den chromosomalen Abschnitt 3q26 und die roten Signale die Zentromerregion D3Z1.

B: Hybridisierung isolierter Tumorzellkerne der Interphase aus Paraffin-eingebettetem Gewebe eines invasiven Plattenepithelkarzinomes: Die YAC-DNA-Probe und die Zentromerregion zeigen zwei diploide Tumorzellen sowie eine polysome Tumorzelle mit einem Zugewinn der YAC-DNA-Probe. Die Zellen zeigen 7 rote, aber 9 grüne Signale für die Region 3q26.

C: Eine polysome Tumorzelle mit Amplifikation der YAC-DNA-Probe vom intrachromosomalen Typ

A, B und C wurden mit einem x100 Objektiv fotografiert.

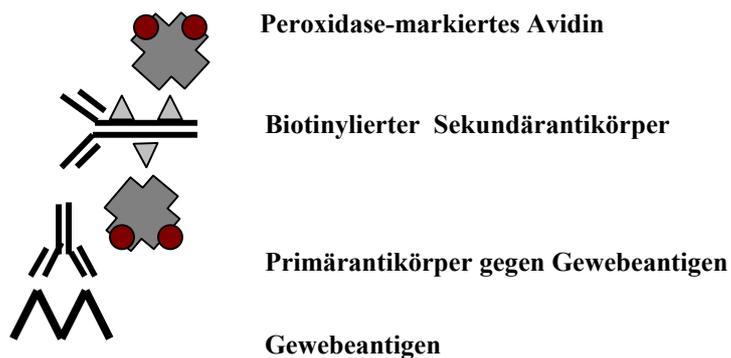
3.1.3 Immunhistochemie

3.1.3.1 Überblick

Den immunhistochemischen Färbemethoden liegen die Reaktionen von spezifischen Antikörpern gegen ein bestimmtes Gewebeanigen zugrunde. Sie sind damit in der Lage, jegliche Strukturen, u.a. Proteine, nachzuweisen, gegen die Antikörper gebildet werden können. Hierfür wird ein speziell dazu hergestellter Primärantikörper eingesetzt, der an das jeweilig zu untersuchende Gewebsantigen bindet. In der Folge wird durch Bindung eines enzym- oder farbstoffgekoppelten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper der Ort der primären Antikörperbindung sichtbar gemacht [36] (**Abb.6**).

In dieser Arbeit kam die markierte Avidin-Biotin-Technik (LAB-Methode) zur Anwendung. Sie macht sich die starke Affinität von Avidin für Biotin zunutze. Es werden biotinylierte Sekundärantikörper verwendet, die mit einem speziellen Detektionssystem aus Peroxidase-markiertem Avidin sichtbar gemacht werden. Dabei reagieren freie Bindungsstellen des Avidins mit dem Biotin des Sekundärantikörpers [36].

Abbildung 6: Prinzip der Immunhistochemie nach der LAB-Methode (in Anlehnung an Handbuch II immunochemischer Färbemethoden, S.25, DAKO)



3.1.3.2 Vorbehandlung der Schnittpräparate

Mit Ausnahme der Fälle 11 und 17, für die kein weiteres Gewebe mehr zur Verfügung stand, wurden alle Fälle zusätzlich immunhistochemisch untersucht.

Für die immunhistochemische Färbung wurden von dem Untersuchungsmaterial jeweils 2-4 µm dicke Paraffinschnitte auf Superfrost-Objektträgern (Menzel, Braunschweig) angefertigt. Diese wurden zunächst 10 min in Xylol entparaffinisiert und anschliessend jeweils 10 min in Aceton, Acetonpuffer und Tris-Waschpuffer (Ansatz siehe Anhang) inkubiert.

Das Antigen-Retrieval wurde mittels Mikrowellenbehandlung durchgeführt, die der partiellen Renaturierung des Antigens nach Formalinfixierung dient. Das Antigen wird besser zugänglich für die verwendeten Antikörper, was eine deutlich verbesserte Immunreaktivität zur Folge hat [36]. Es wurden jeweils 5 Objektträger in Kunststoff-Küvetten gegeben. Die Küvetten wurden mit Citratpuffer (Ansatz siehe Anhang) gefüllt und jeweils drei im Kreis auf dem Drehteller einer Mikrowelle aufgestellt. Es ist wichtig, immer die gleiche Anzahl Objektträger und Küvetten in den Mikrowellenofen zu geben, da nur so eine standardisierte Behandlung des Gewebes gewährleistet wird [36]. Nun folgte eine 5 mal 5-minütige Bestrahlung bei 600 Watt. Zwischen den einzelnen Bestrahlungsphasen wurden die Küvetten jeweils wieder mit Citratpuffer aufgefüllt, so dass das Gewebe immer vollständig mit Flüssigkeit bedeckt war.

Nach 20 min. Abkühlen der Schnitte auf Raumtemperatur wurden sie in Tris-Waschpuffer gespült und danach 10 min mit 3% Wasserstoffperoxid in Methanol bedeckt, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren. Die Blockade der endogenen Peroxidase dient der Vermeidung eines unspezifischen Hintergrundes [36]. Anschließend wurden sie erneut in Aqua dest. und 3 min in Waschpuffer gespült.

Acetonpuffer	50% Aceton 50% TBS 1:8
Wasserstoffperoxid-Methanol-Mischung	10µl 30%iges H ₂ O ₂ 90µl Methanol

3.1.3.3 Inkubation der Antikörper

Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler (Klon c-17) Ziegen-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, USA) gegen p110α eingesetzt. Der Primärantikörper wurde in einer speziellen Verdünnungs-Lösung (DAKO, Hamburg) 1:100 verdünnt. Nach Abtrocknen des Objektträgers rings um das Gewebe, wurden jeweils 50-400 µl der Antikörperlösung auf das

Gewebe gegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Im Anschluss wurden die Objektträger 3 mal 2 Minuten in Tris-Waschpuffer gewaschen

Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Als Sekundärantikörper diente ein 1:200 verdünnter „Multi link“ Schwein-Antikörper (DAKO, Hamburg), der als Verbindung zwischen dem Primärantikörper und dem Detektionssystem fungiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut 3 mal 2 Minuten in Tris-Waschpuffer gewaschen.

Zuletzt erfolgte die Inkubation mit dem als Detektionssystem dienenden Peroxidase-markiertem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (DAKO, Hamburg) über 30 Minuten bei Raumtemperatur. Hierauf folgte ein dreimaliges Spülen in Tris-Waschpuffer.

3.1.3.4 Entwicklung, Gegenfärbung und Eindecken der Schnittpräparate

Für die Entwicklung der Färbung wurden 50-400µl DAB-Entwicklerlösung auf das Gewebe gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger einmal kurz und einmal 4 Minuten in Tris-Waschpuffer gespült.

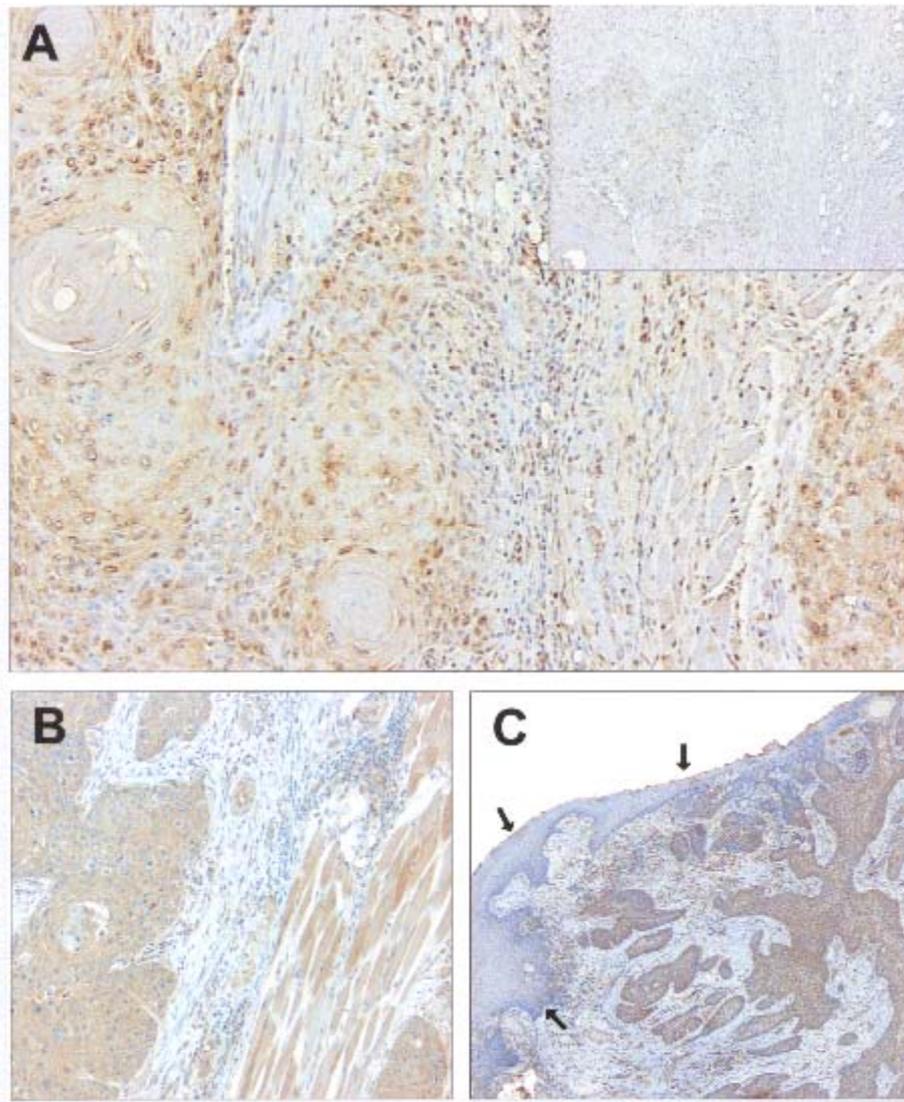
Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch Eintauchen der Schnitte in Hämalaun-Lösung (Ansatz siehe Anhang) über 45 Sekunden. Danach wurden die Objektträger viermal in Leitungswasser gespült.

Anschliessend wurde auf das noch feuchte Gewebe ein Tropfen Glyceringelatine (Glycergel, DAKO, Hamburg) gegeben und die Schnitte mit einem passenden Deckgläschen luftblasenfrei eingedeckt.

DAB-Entwicklerlösung	750µl HRP Substratpuffer (DAKO, Hamburg)
	15µl Diaminobenzidin-Lösung (DAKO, Hamburg)

3.1.3.5 Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der immunhistologischen Färbung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Dabei wurde die Immunreaktivität als negativ (-), gering (+), mäßig (+ +) oder ausgeprägt (+ + +) beurteilt und der prozentuale Anteil immunreaktiver Zellen und die Farbtintensität berücksichtigt (**Abb.7**).

Abbildung 7: mRNA *in situ* Hybridisierung und Immunhistologie

A: mRNA *in situ* Hybridisierung durchgeführt am Institut für Veterinäranatomie und Embryologie der JLU unter der Leitung von Herrn PD Dr. K. Steger. Histologische Verteilung der p110 α mRNA-Signale in einem Plattenepithelkarzinom. Detektiert mit Hilfe einer Digoxigenin-markierten Antisense-Probe. Die Signale finden sich in Tumorzellen des invasiven Plattenepithelkarzinoms und angrenzenden Lymphozyten. Bildeinschub (rechts oben) zeigt die Negativkontrolle der Digoxigenin-markierten Sense-Probe.

B und C: Histologische Verteilung des p110 α -Proteins in invasiven Plattenepithelkarzinomen. Zusätzlich zeigen Lymphozyten, Fibroblasten und Muskelzellen eine immunhistologisch positive Farbreaktion. Negative Reaktion für normales Plattenepithel (Abb.C, Pfeile).

A wurde mit einem x20, der Bildeinschub und B mit einem x10 und C mit einem x5 Objektiv fotografiert.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung

3.2.1.1 Definitionen

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden für jeden verwendeten Fall jeweils die Signale von 150 bis 300 Zellkernen (Mittelwert $m=200$ Zellen) ausgezählt. Waren bei einem Hybridisierungs-Durchgang weniger als 200 auswertbare Zellen entstanden, wurde ein weiterer Paraffin-Schnitt des gleichen Falles auf die beschriebene Weise bearbeitet. Gesplittete Signale wurden als ein Signal gewertet.

Befanden sich in einem Kern zwei homologe Chromosomen 3 mit jeweils einem *PIK3CA*-Gen, so resultierten bei der durchgeführten FISH zwei rote Signale für die markierte Zentromerregion und zwei grüne Signale für die Region 3q26. Die Anzahl der Signale veränderte sich gleichsinnig mit der Anzahl von Chromosomen bzw. von Kopien des chromosomalen Abschnittes 3q26.

Jeder Fall wurde von einem zweiten unabhängigen Untersucher erneut ausgezählt, ohne dass es zu signifikanten Unterschieden in den Ergebnissen kam.

Für jeden Fall wurde der Mittelwert der Anzahl YAC-Signale mit dem Mittelwert der Anzahl Zentromer-Signale verglichen (YAC-/ Zentromer-Signal-Ratio). Die durchschnittliche Anzahl der Kopien des Abschnittes 3q26 pro Zelle und Fall wurde berechnet, indem die Gesamtzahl der YAC-Signale durch die Anzahl der ausgewerteten Zellen pro Fall dividiert wurde. Als Amplifikation wurde eine Grössenzunahme der YAC-/ Zentromer-Signal-Ratio innerhalb einer Zelle über den Wert 2 definiert.

3.2.1.2 Kontrollgruppen

In den als Kontrolle verwendeten Lymphozyten des peripheren Blutes sowie in den normalen Epithelzellen des Tonsillargewebes fanden sich die zu erwartende Anzahl von Signalen, sowohl für die verwendete YAC-Sonde, als auch für die Zentromer-Sonde D3Z1. Die Zellen zeigten in 87% bis 94% ($m=90%$) zwei Zentromer- und zwei YAC-Signale pro Zelle, sie

waren also diploid. Nur ein Centromer-Signal pro Zelle (Monosomie) wiesen 4-7% der Zellen pro Fall vor. Trisomie, das heißt jeweils drei Signale pro Sonde und/oder ein Zugewinn mit drei bis vier YAC-Signalen entsprechend der Sequenz 3q26, trat in 6-10% der Fälle auf. In keiner der als Kontrolle dienenden Zellgruppen konnte eine Zunahme über vier Signale für YAC- oder Zentromer-Sonde pro Zelle im Sinne einer Polysomie nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Anzahl Kopien von 3q26 lag in jedem der Fälle unter 2,1.

Die erhaltenen Ergebnisse der Untersuchungen an Normalgewebe wurden als Variationen innerhalb einer Zellpopulation gewertet, die durch die normale Zellproliferation entstehen. Um diese normalen Abweichungen vom pathologischen Zugewinn der Kopienanzahl von 3q26 abzugrenzen, wurden sogenannte „Cut off level“ (Schwellenwerte) nach der Formel „Mittelwert + 2x Standardabweichung“ bestimmt. Daraus ergaben sich Schwellenwerte für pathologischen Zugewinn des chromosomalen Abschnittes 3q26 von 20% der Zellen und für Amplifikationen von 10% der Zellen. Das bedeutet, erst wenn mehr als 20% der Zellen eines untersuchten Falles einen Zugewinn zeigten, wurde das Ergebnis als Zugewinn des gesamten Falles gewertet. Entsprechend wurde mit den Werten für Amplifikationen verfahren.

3.2.1.3 Präkanzeröse Läsionen

Leicht- bis mittelgradige Dysplasien:

In der Gruppe der leicht- bis mittelgradigen Dysplasien lag die Anzahl der YAC-Signale zwischen einem und fünf Signalen pro Zellkern. Im Durchschnitt zeigten die Kerne 2,0-2,3 ($m=2,1$, Standardabweichung $s=\pm 0,12$) YAC-Signale, was der durchschnittlichen Anzahl des chromosomalen Abschnittes 3q26 pro Zelle und Fall entsprach. Einen Zugewinn des chromosomalen Abschnittes 3q26 mit drei oder mehr YAC-Signalen in einem Kern zeigten zwischen 1 und 24% ($m=10\%$, Standardabweichung $s=\pm 8,7\%$) der Fälle. In diesem Kollektiv zeigten sich keine Amplifikationen .

Sämtliche Werte der leicht- bis mittelgradigen Dysplasien lagen unterhalb der festgelegten Schwellenwerte mit Ausnahme einer mittelgradigen Dysplasie, die einen Zugewinn in 24 % der Zellen aufwies (**Abb.8, Abb.9**).

Schwere Dysplasien und Carcinomata in situ:

Die Anzahl der YAC-Signale pro Zelle schwankte zwischen 1 und 7, die durchschnittliche Anzahl lag bei 2,1 bis 4 ($m=2,5$, Standardabweichung $s=\pm 0,57$) pro Zelle. In 9-37% ($m=27,7\%$, Standardabweichung $s=\pm 9,6\%$) der Zellen traten drei oder mehr YAC-Signale pro Kern, also ein Zugewinn von 3q26, auf.

Sieben von neun Fällen (78%) schwerer Dysplasien bzw. Carcinomata in situ zeigten einen Zugewinn des chromosomalen Abschnittes 3q26 oberhalb des Schwellenwertes von 20%. Fünf der Fälle wiesen Amplifikationen in 3-17% ($m=6,8\%$) ihrer Zellen auf, wobei insgesamt in 0-17% ($m=4,6\%$, Standardabweichung $s=\pm 5,27\%$) der Zellen dieses Kollektives Amplifikationen vorkamen. Der Fall Nummer 10 lag mit 17% amplifizierten Zellen oberhalb des Schwellenwertes für Amplifikationen (**Abb.8, Abb.9**).

3.2.1.4 Invasive Karzinome

Die Anzahl der YAC-Signale in diesem Kollektiv variierte zwischen 1 und 13, wobei im Durchschnitt 2,5 bis 5,0 Signale ($m=3,5$, Standardabweichung $s=\pm 0,69$) in einem Zellkern bei den verschiedenen Fällen zu finden waren. Ein Zugewinn des chromosomalen Abschnittes 3q26 mit drei oder mehr Signalen zeigte sich in 20-88% ($m=63,6\%$, Standardabweichung $s=\pm 20,5\%$) der Zellen.

In allen invasiven Karzinomen zeigte sich ein Zugewinn des Abschnittes 3q26 oberhalb des Schwellenwertes von 20%, in sieben davon lag der Zugewinn in mehr als 50% der Zellen vor. In sechs von elf Fällen (55%) lag die Prozentzahl der amplifizierten Zellen mit 12-58% ($m=26,6\%$) über dem Schwellenwert von 10%, wobei in allen malignen Tumoren Amplifikationen in 2-58% ($m=17,3\%$) der Zellkerne beobachtet wurden. Die vorliegenden Amplifikationen sowohl in der Gruppe der schweren Dysplasien, wie auch bei den invasiven Karzinomen waren vorwiegend vom intrachromosomalen Typ (**Abb.5C, Abb.8, Abb.9**).

Die Ergebnisse der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Abbildung 8: Prozentualer Zugewinn bzw. Amplifikationen innerhalb der jeweiligen Gruppen

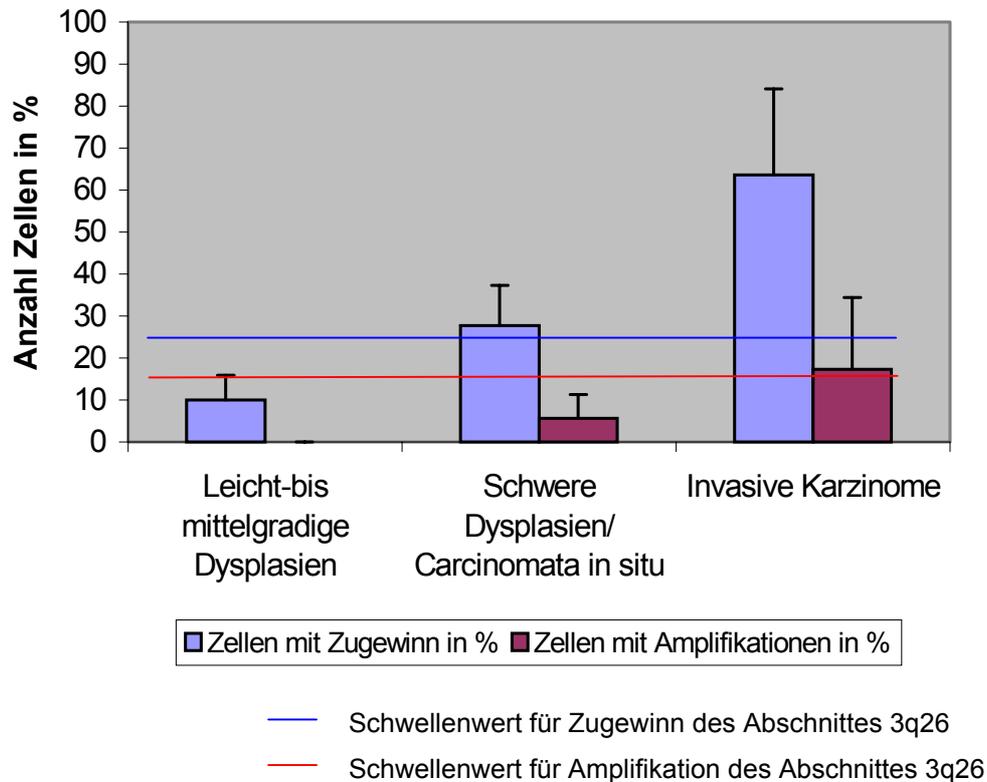


Abbildung 9: Prozentualer Anteil der Fälle mit Zugewinn bzw. Amplifikation über den jeweiligen Schwellenwerten

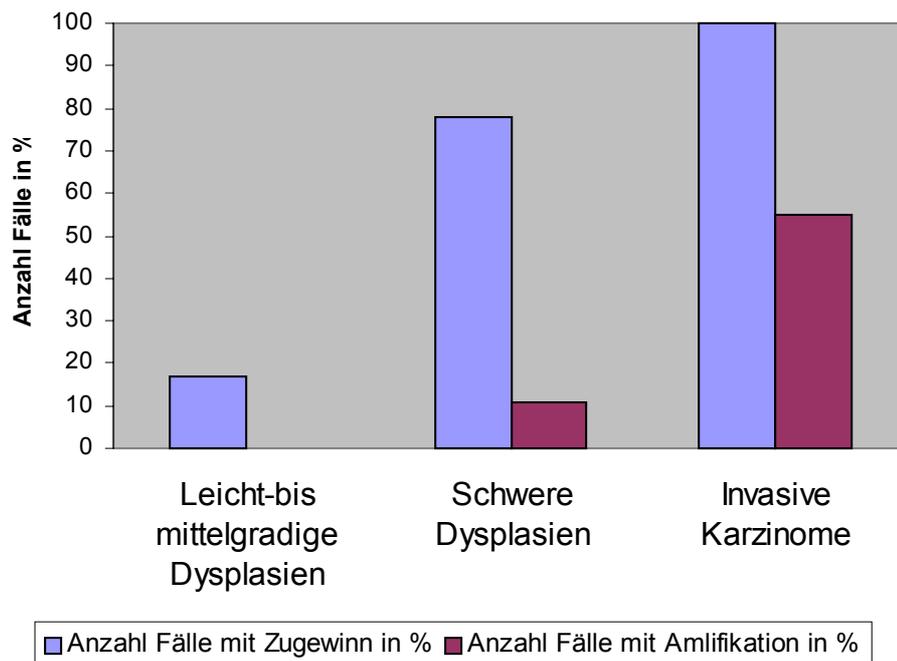


Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse

Fall Nr.	Wertung bezgl. Zugewinn / Amplifikation	Zellen mit Zugewinn von 3q26 in %	Zellen mit Amplifikation in %	Ø Anzahl YAC-Signale/ Zelle	Immunhisto- Chemisches Profil p110α
1	0 / 0	5	-	2,0	-
2	0 / 0	1	-	2,1	+
3	0 / 0	13	-	2,2	+
4	0 / 0	3	-	2,0	-
5	0 / 0	14	-	2,2	-
6	Z / 0	24	-	2,3	-
7	0 / 0	9	-	2,1	+
8	Z / 0	35	6	2,2	-
9	Z / 0	22	-	2,3	-
10	Z / A	37	17	4,0	++
11	Z / 0	37	9	2,5	nd
12	Z / 0	32	3	2,4	+
13	Z / 0	28	-	2,3	+
14	0 / 0	18	-	2,3	+++
15	Z / 0	32	6	2,4	+
16	Z / 0	48	9	3,3	+
17	Z / 0	20	7	2,5	nd
18	Z 50+ / 0	84	7	4,4	++
19	Z 50+ / A	66	14	3,2	++
20	Z / A	48	12	3,5	+++
21	Z 50+ / 0	76	2	3,2	++
22	Z 50+ / A 30+	78	41	3,7	+++
23	Z 50+ / A	88	20	3,6	+++
24	Z 50+ / A	66	15	3,5	++
25	Z / 0	48	5	2,8	+++
26	Z 50+ / A 30+	78	58	5,0	++

0 = kein Zugewinn/ Amplifikation des chromosomalen Abschnittes 3q26

Z = Zugewinn des chromosomalen Abschnittes 3q26 in mehr als 20% der Zellkerne

Z 50+ = Zugewinn des chromosomalen Abschnittes 3q26 in mehr als 50 % der Zellkerne

A = Amplifikation des chromosomalen Abschnittes 3q26 in mehr als 10% der Zellkerne

A 30+ = Amplifikation des chromosomalen Abschnittes 3q26 in mehr als 30% der Zellkerne

+ = geringe immunhistochemische Reaktion

++ = mässige immunhistochemische Reaktion

+++ = ausgeprägte immunhistochemische Reaktion

nd = Immunhistochemie nicht durchgeführt

3.2.2 Immunhistochemie

3.2.2.1 Kontrollgruppen

In dem als Kontrolle verwendeten Gewebe von Tonsillen und nicht-dysplastischem Epithel, welches an prämaligene oder maligne Läsionen grenzte, zeigten sieben der zehn Fälle keinerlei immunhistologische Reaktion auf p110 α . In drei Fällen zeigte sich eine geringe Färbung, wobei die Zellen des Stratum basale stärker reagierten, als die des Stratum spinosum.

3.2.2.2 Präkanzeröse Läsionen

Leicht- bis mittelgradige Dysplasien:

Von den immunhistochemisch untersuchten Fällen der leicht- bis mittelgradigen Dysplasien zeigten vier (67%) keine und zwei (33%) eine geringe immunologische Reaktion für die p110 α -Expression (**Abb.10**).

Schwere Dysplasien und Carcinomata in situ:

In diesem Kollektiv wiesen zwei Fälle (25%) keine und vier (50%) nur eine geringe immunhistochemische Färbung der Zellen auf. Es konnte hier bereits ein Fall (12,5%) mit mässiger und ein Fall (12,5%) mit ausgeprägter p110 α -Expression nachgewiesen werden (**Abb.10**). Der Fall mit mässiger p110 α -Expression zeigte im Vergleich mit der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung einen Zugewinn für 3q26 in 37% seiner Zellen und 3q26-Amplifikationen in 17% seiner Zellen. Demgegenüber wies der Fall mit ausgeprägter immunhistochemischer Reaktion in nur 18% seiner Zellen einen Zugewinn und keine Amplifikationen auf.

Zusammengenommen konnte im Kollektiv der präkanzerösen Läsionen in 86% der untersuchten Fälle entweder keine oder nur eine geringe immunhistochemische Farbreaktion festgestellt werden. Vergleichend zeigten sechs dieser Fälle mit unbedeutender immunologischer Reaktion einen Zugewinn für 3q26 in mehr als 20% ihrer Zellen, wohingegen keiner davon Amplifikationen in mehr als 10% ihrer Zellen aufwies. Es konnte kein Zusammenhang zwischen den schwachen immunhistologischen Signalen für p110 α und der 3q26-Kopienzahl in diesem Kollektiv gefunden werden (**Abb.11**).

3.2.2.3 Invasive Karzinome

Die invasiven Karzinome wiesen alle eine Expression von p110 α auf. Ein Fall (10%) zeigte eine geringe, fünf Fälle (50%) eine mässige und vier (40%) eine ausgeprägte Immunreaktion (**Abb.10**). Insgesamt zeigten also 90% der invasiven Karzinome eine mässige oder ausgeprägte p110 α -Expression, wobei alle dieser Fälle einen signifikanten Zugewinn von 3q26 und sechs davon Amplifikationen aufwiesen. Der Fall mit einer geringen Färbungsreaktion zeigte in 48% einen 3q26-Zugewinn und keine Amplifikation.

Zusammenfassend zeigten zwei hochgradige Dysplasien (25%) und neun invasive Karzinome (90%) eine mässige oder ausgeprägte p110 α -Expression, wobei neun dieser elf Fälle (82%) ebenfalls einen signifikanten Zugewinn der 3q26-Kopienzahl in mehr als 50 % ihrer Zellen und/oder Amplifikationen in mehr als 10% der Zellen aufwiesen (**Abb.11**).

Die Ergebnisse der Immunhistochemie sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Abbildung 10: Prozentualer Anteil der Fälle ohne bzw. mit immunhistochemischer Reaktion

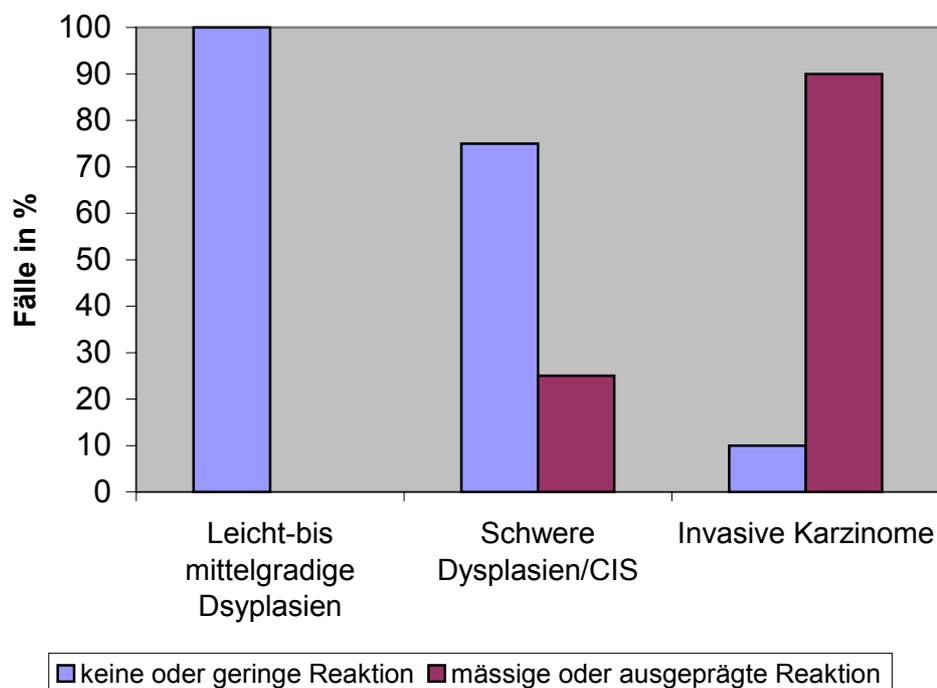
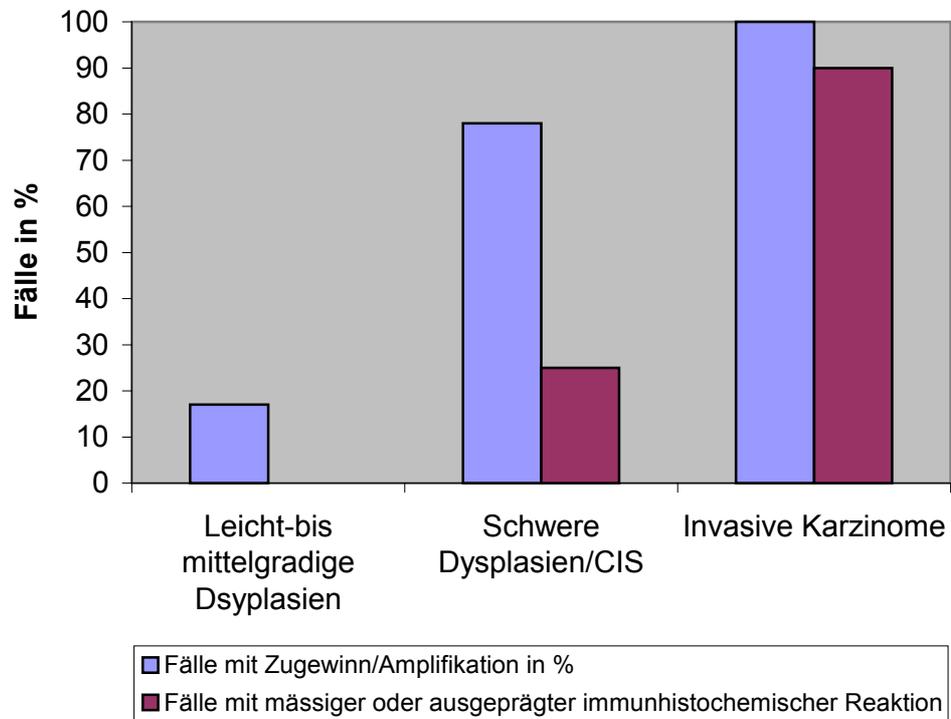


Abbildung 11: Vergleich der prozentualen Anteile der Fälle mit Zugewinn/Amplifikation und immunohistochemischer Reaktion



4 Diskussion

4.1 Genetische Alterationen in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes

Es ist umstritten, inwieweit präkanzeröse Läsionen (Plattenepitheldysplasien) des oberen Aerodigestivtraktes ein Potential besitzen, in invasive Plattenepithelkarzinome überzugehen. Es bestehen Unterschiede in der Transformationsrate, d.h. nicht aus jeder Vorläuferläsion entsteht tatsächlich ein invasives Karzinom. Es wäre daher von großer prognostischer und auch therapeutischer Bedeutung, unter den prämaligen Befunden diejenigen zu identifizieren, die ein hohes Risiko für eine maligne Transformation aufweisen. Die traditionellen Methoden der Pathologie, wie z.B. das histologische Grading von Dysplasien, können nicht genau vorhersagen, welche Läsion mit der Zeit tatsächlich maligne entarten wird. Hinzu kommt, dass es sich hierbei um subjektive Methoden handelt, bei denen schlechte Reproduzierbarkeit und mangelhafte Übereinstimmungen in der Einschätzung von Befunden zwischen unterschiedlichen Untersuchern festgestellt werden konnten. Bisher existiert kein objektiver Marker, der Hochrisiko-Läsionen zuverlässig identifizieren kann. Die Entwicklung solcher Marker könnte zu einer Verbesserung der Prognose für den Patienten beitragen, indem sie die Diagnose der Erkrankung in einem weit früheren Stadium ermöglicht, als es bisher der Fall war. Ein möglicher molekularer Marker mit prognostischem Wert für die Karzinomentstehung könnte der genomische Status sein. Es mehren sich Hinweise, dass Alterationen der DNA-Ploidität und nukleärem DNA-Gehalt frühe Indikatoren der Karzinogenese darstellen [54,59]. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die Mehrstufenentwicklung der Plattenepithelkarzinome von normalem Epithel zum invasiven Karzinom mit einer zunehmenden genetischen Instabilität korreliert. Diese wird auch durch die Anzahl chromosomaler Aberrationen bestimmt, die während der Tumorgenese auftreten. Weiterhin wurde festgestellt, dass diese Aberrationen spezifische Muster für einzelne Tumoren und Tumorstadien aufweisen und offensichtlich obligatorische Ereignisse während der Karzinogenese darstellen. Mit der Charakterisierung der genetischen Alterationen könnte also ein zuverlässiger molekularer Marker entwickelt werden, der das maligne Potential von prämaligen Läsionen vorhersagen könnte [12,23,44,52]. Die Entwicklung der Tumorzytogenetik, insbesondere der CGH-Technik und Allelotypisierung, ermöglichte es, die

genetischen Veränderungen, die während der Karzinogenese in den malignen Neoplasien entstehen, zu identifizieren [62].

Die auf diese Weise gefundenen Karyotypen in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes gehören zu den komplexesten unter den soliden Tumoren mit durchschnittlich 16 Veränderungen pro Fall, wohingegen z.B. beim Kolonkarzinom nur 5,6 Veränderungen im Durchschnitt vorkommen. Dies erschwert die Identifizierung früher genetischer Ereignisse, die ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt sein könnten [42,48]. Die auftretenden genetischen Alterationen zeigen sich vorwiegend in Form von Genamplifikationen, Mutationen, genomischen Zugewinnen oder Deletionen spezifischer chromosomaler Regionen [35]. Die in malignen Tumoren der Kopf-Hals-Region am häufigsten auftretenden DNA-Zugewinne chromosomaler Segmente liegen auf den Abschnitten 1p, 3q, 5p, 8q, 9q, 10q, 11q, 15q, 17q, 19q und 20 q. Es kommen aber auch Hypersomien ganzer Chromosomen (z.B. 17 und 19) oder Chromosomenarme (z.B. 20q) vor. Verluste genetischen Materials konnten hauptsächlich auf den Segmenten 3p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 11q, 13q, 16q und 18q identifiziert werden. Insgesamt ist das Auftreten von DNA-Zugewinnen signifikant häufiger, als der Verlust chromosomaler Abschnitte [11,12,48,49,53,60,62]. Das Vorkommen genetischer Aberrationen nimmt mit zunehmendem Malignitätsgrad zu. In Dysplasien / Carcinomata in situ, sowie in gut differenzierten niedrigmalignen Tumoren liegt die Anzahl der Zugewinne bzw. Verluste deutlich unter derjenigen in fortgeschrittenen Karzinomen. Heselmeyer et al. [21,22] und andere Arbeitsgruppen [11,42,62] beschreiben, dass die Tumorprogression durch spezifische zunehmende chromosomale Aberrationen gekennzeichnet ist.

Bei der Suche nach den chromosomalen Regionen, deren genetische Veränderungen am wahrscheinlichsten an der Progression von prämaligen Läsionen in invasive Karzinome beteiligt sind, verlangen die Alterationen auf den Chromosomen 3, 8, 9 und 11 besondere Aufmerksamkeit. Califano et al. [14] entwickelten ein genetisches Progressionsmodell für Kopf-Hals-Tumoren, in dem DNA-Verluste auf 3p, 9p und 17p als früheste nachweisbare Ereignisse in prämaligen Läsionen auftreten.

Deletionen des kurzen Armes des Chromosoms 3 sind ein häufiges, sehr frühes Ereignis in der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region, aber auch der Lunge und der Cervix uteri. Die Regionen 3p13-p21.1, 3p21.3-p25 und 3p25 konnten als häufig involvierte Abschnitte definiert werden, und einige auf diesen Sequenzen lokalisierte Onkogene, wie z.B. *FHIT* und *RASSF1*, wurden identifiziert. Bisher ist ihre Rolle für die

Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes noch nicht geklärt [42]. Bockmühl et al. [10] beobachteten jedoch, dass das Vorhandensein von 3p-Verlusten weder eine höhere Rezidivrate, noch eine schlechtere Überlebensrate zur Folge hat. Dies spricht dafür, dass es sich um eine sehr frühe Alteration handelt, die nicht mit dem Übergang von Dysplasien in invasive Karzinome assoziiert ist.

Auf der Sequenz 9p21 ist das Tumorsuppressorgen p16 lokalisiert und die Region 17p13 beherbergt das Tumorsuppressorgen p53. Die Inaktivierung dieser beiden Gene durch die häufig beobachtbaren Deletionen dieser Lokalisationen scheint in die frühen Stadien der Tumorentwicklung involviert zu sein, ihr diagnostischer und prognostischer Wert ist jedoch noch unklar [35,42].

In der weiteren Entwicklung zu invasiven Karzinomen kommt es zu zusätzlichen genetischen Veränderungen. Bockmühl et al. [11] kamen durch CGH-Studien an gut differenzierten G1-Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes zu der Erkenntnis, dass Deletionen der Regionen 3p und 9p in Verbindung mit Überrepräsentationen der Region 3q mit der frühen Tumorentwicklung assoziiert sind. Unterstützt wird diese These durch die Daten von Redon et al. [42], die ebenfalls häufigen 3q-Zugewinn und/oder 3p-Verlust (in 73% der Fälle) in pT1-2 Tumoren beobachteten. Zusätzlich zu den gemeinsamen Alterationen definierten sie 8q-Zugewinn (47%) und 11q13-Zugewinn (27%) als frühe Ereignisse in der Pathogenese.

Ein mögliches Ziel der Überrepräsentationen auf 8q ist das dort lokalisierte Onkogen *c-myc* [42]. In der Literatur wird die Häufigkeit von *c-myc*- Amplifikation oder -Überrepräsentation in einem Rahmen von 9-48% angegeben. Patienten mit einem hohen Gehalt von *c-myc* zeigen offensichtlich verkürzte Überlebensraten [35]. Da letztendlich Amplifikationen eher selten in Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches sind, ist eine ursächliche Beteiligung an der Tumorentstehung unwahrscheinlich [42].

Die Amplifikation der Region 11q13 wird häufig in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes beobachtet. Auch in einigen weiteren Tumoren, wie z.B. Mamma- und Oesophaguskarzinomen, ist diese Alteration nachweisbar [1]. Zugewinne des chromosomalen Abschnittes 11q13 konnten mehrfach mit einer schlechten Prognose für Patienten mit Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches in Verbindung gebracht werden [1,10]. Auf dieser Region sind einige potentielle Onkogene lokalisiert, wie z.B. *bcl-1*, *int-2*, *hst-1* und cyclin D1/*PRAD-1* [35]. Der Hauptkandidat dieser auffälligen Sequenz scheint das cyclin D1/*PRAD-1*-Gen zu sein [10,35]. Amplifikationen dieses Genes sind offensichtlich mit einem

aggressiven Tumorwachstum und einer schlechten Prognose assoziiert [1,10]. Das durch cyclin D1/*PRAD-1* kodierte Protein cyclin D 1 greift regulierend in den Zellzyklus ein, indem es die Zelle von G1 in die S-Phase befördert [10]. Eine Überexpression auf Proteinebene konnte ebenfalls mit schlechteren Überlebensraten und dem Auftreten von Rezidiven in Verbindung gebracht werden. Bisherige Untersuchungen von 11q13 und cyclin D1, sowohl auf zytogenetischer, als auch Proteinebene, sprechen dafür, dass diese eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen einnehmen. Es müssen aber zusätzliche genetische Mechanismen in die Fehlregulation eingreifen, da die Überexpression von cyclin D1 nicht strikt mit dem Auftreten von Genamplifikation korreliert. Ebenso wird deutlich, dass weitere Gene auf 11q13 existieren müssen, die ebenfalls in die Karzinomentstehung involviert sind [1].

Die jedoch in vielen CGH-Studien an Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes immer wieder beobachtete auffälligste und häufigste Alteration ist ein signifikanter Zugewinn der Region 3q. Es zeigten sich Überrepräsentationen in 50-80% der untersuchten Tumoren [11,13,42,48,53]. Das Vorhandensein dieser genetischen Alteration konnte mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes in Verbindung gebracht werden. Es zeigten sich sowohl verkürzte krankheitsfreie Intervalle, als auch schlechtere Überlebensraten [10,32]. Bei den häufigen Alterationen auf Chromosom 3q konnte als kleinste übereinstimmende Region mit häufigem Zugewinn die Sequenz 3q26-3q28 weiter eingegrenzt werden [13,42,48,53]. Hashimoto et al. [20] konnten Zugewinne oder Amplifikationen der Region 3q26-qter in 91% der untersuchten Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches nachweisen und sehen darin in Übereinstimmung mit vorausgehenden Studien ein frühes kritisches Ereignis in der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes [11,12,13,20,42,48,53].

Unterstützt wird diese Annahme durch Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen anderer Lokalisationen. Ein Zugewinn genetischen Materials von 3q wurde nicht nur in Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches nachgewiesen, auch in Karzinomen der Lunge, des Oesophagus und der Cervix uteri ist es ein häufiges Ereignis [5,8,21,22,27,38]. Björkvist et al. [8] verglichen genetische Alterationen von Plattenepithelkarzinomen mit denen von Adenokarzinomen der Lunge. Es konnte gezeigt werden, dass neben gemeinsamen Veränderungen Zugewinne des chromosomalen Abschnittes 3q signifikant häufiger in Plattenepithelkarzinomen (94% der Fälle) als in Adenokarzinomen (24%) auftraten. Daraus schloss man, dass auf der Sequenz 3q

Gene lokalisiert sein müssen, die wichtig für die Karzinogenese von Plattenepithelkarzinomen sind. Heselmeyer et al. [22] sehen im Zugewinn von 3q eine Schlüsselläsion beim Übergang von schweren prämaligen Läsionen in invasive Karzinome der Cervix uteri. Sie identifizierten Überrepräsentation von 3q in nur einer von 13 untersuchten schweren Dysplasien/CIS, wohingegen neun von zehn invasiven Zervixkarzinomen diese Alteration aufwiesen. Zusätzlich traten Amplifikationen von 3q auf, was die biologische Relevanz von chromosomalem Zugewinn dieses Abschnittes unterstreicht. Kettunen et al. [27] identifizierten durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit 11 verschiedenen YAC-Sonden für die Regionen 3q25-q27 in Plattenepithelkarzinomen der Lunge 3q26 als die am häufigsten involvierte Region.

Zusammengenommen spielen Veränderungen des Chromosoms 3, und speziell Zugewinne der Region 3q26, eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen unterschiedlicher Lokalisationen. Ist der genomische Zugewinn von 3q26 nun ursächlich an der Transformation von prämaligen Läsionen in invasive Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes beteiligt?

Die eigenen Ergebnisse bestätigen zweifelsfrei, dass Überrepräsentationen und Amplifikationen der Region 3q26.3 häufige Ereignisse in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes darstellen und am ausgeprägtesten in invasiven Karzinomen nachweisbar sind. So zeigte nur eine von sechs (17%) leicht- bis mittelgradigen Dysplasien einen signifikanten Zugewinn der Region 3q26.3, wohingegen bereits sieben von neun (78%) hochgradigen Dysplasien/CIS diese Alteration aufwiesen. Eine schwere Dysplasie zeigte eine 3q26.3-Amplifikation. Im Vergleich dazu fanden sich in allen untersuchten Fällen (100%) der invasiven Karzinome eine erhöhte Kopienanzahl von 3q26.3 und in sechs von elf Fällen (55%) Amplifikationen. Die Tatsache, dass nur eine schwere Dysplasie, aber sechs invasive Karzinome Amplifikationen aufwiesen, stimmt mit der Feststellung von Ried et al. [44] überein: Sie beobachteten, dass höhergradige Zugewinne der Kopienzahl chromosomaler Abschnitte selten in prämaligen Läsionen sind, in invasiven Karzinomen jedoch häufige Ereignisse darstellen.

Diese Daten im Zusammenhang mit den beschriebenen Untersuchungsergebnissen weisen auf eine wichtige Rolle der chromosomalen Region 3q26.3 bei der Progression hochgradiger Dysplasien in invasive Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes hin.

Eine Bestätigung dieser Schlussfolgerung liefert eine weitere FISH-Studie von Singh et al. [49] an Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Sie konnten eine Überrepräsentation von 3q26.3 in 25% der untersuchten Fälle prämaligener Läsionen und in 56% der untersuchten invasiven Karzinome finden. Zusätzlich zeigten sie, dass das Vorhandensein von 3q26.3 Amplifikationen mit einer signifikant höheren Tumorrezidivrate und tumorspezifischen Todesfällen assoziiert ist. Allerdings führten sie die Studie an intakten Gewebeschnitten durch, was die niedrigeren Prozentzahlen an Zugewinnen und Amplifikationen im Vergleich mit den eigenen Daten erklären könnte. FISH-Analysen an isolierten Zellkernen zeigen seltener Signalverluste, als es in Gewebeschnitten der Fall ist [39]. Zudem sind die Zellkerne in 5µm dicken Schnittpräparaten nur angeschnitten und nicht komplett erfasst.

In der CGH-Studie von Heselmeyer et al. [22] an Dysplasien und invasiven Karzinomen der Cervix uteri zeigte keine der untersuchten leicht-bis mittelgradigen Dysplasien und nur eine von 13 (8%) schweren Dysplasien/CIS einen Zugewinn der Sequenz 3q. In invasiven Karzinomen wurde bereits in 90% der untersuchten Fälle ein DNA-Zugewinn von 3q identifiziert und in 3 Fällen (30%) kamen Amplifikationen vor. Die im Vergleich dazu wesentlich höheren Werte der eigenen Ergebnisse und vor allem die hohe Rate an schwergradigen Dysplasien mit 3q26-Zugewinn lassen sich möglicherweise durch die höhere Sensitivität und Auflösung der FISH im Vergleich zur CGH erklären. CGH kann nur größere Regionen über- und/oder unterrepräsentierter chromosomaler DNA-Abschnitte detektieren, wenn mindestens 50% der Zellen diese Aberration aufweisen. Mit der Methode der FISH lassen sich hingegen geringere Zellzahlen untersuchen und auch Aberrationen, die kleiner als 20 Mb sind, identifizieren [56].

4.2 Auf dem chromosomalen Abschnitt 3q26-qter lokalisierte potentielle Onkogene

Da die chromosomalen Abschnitte 3q26-qter offensichtlich Gene beherbergen, die in die Karzinogenese von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes eingreifen, wurde nach Genen gesucht, die aufgrund ihrer Position und Funktion hierfür in Frage kommen.

Ein wichtiges mögliches Ziel der Überrepräsentation von 3q26 könnte das in dieser Arbeit untersuchte *PIK3CA*-Gen darstellen. Es ist auf der Sequenz 3q26.3 lokalisiert und kodiert für die katalytische Untereinheit p110 α der Phosphatidylinositol 3-Kinasen Klasse 1A [58]. Die

PI 3-Kinasen gehören zu einer großen Familie von Lipidkinasen und haben neben Funktionen wie Migration und Vesikeltransport auch Einfluss auf die Zellproliferation. Über den PI 3-Kinasen/Akt-Signalweg greifen sie in die Kontrolle von Zellwachstum und Apoptose ein. Durch Aktivierung der PI 3-Kinasen kommt es über mehrere Zwischenstufen zu einer Hemmung der Apoptose, was ein ungestörtes Zellwachstum zur Folge haben kann. Diese Rolle der PI 3-Kinasen in der Proliferationskontrolle könnte ein onkogenetisches Potential von *PIK3CA* erklären [2,26,40,57]. In mehreren Studien wurde die Onkogenität von p110 α überprüft. Chang et al. [15] identifizierten im Genom des Vögel-Sarkom-Virus 16 das retrovirale Onkogen *v-p3k*, welches für ein Homolog der katalytischen Untereinheit von PI3K kodiert. Das Vögel-Sarkom-Virus 16 verursacht Hämangiosarkome bei Hühnern. Durch Untersuchungen an Hühnerembryofibroblasten zeigten sie, dass das identifizierte Onkogen *v-p3k* die onkogenetische Transformation der Zellen induziert und wiesen erhöhte PI 3-Kinaseaktivität in den transformierten Zellen nach. Aoki et al. [3] bestätigten die Schlussfolgerung, dass die Onkogenität von *v-p3k* von der Lipid-Kinase-Aktivität abhängt. Benistant et al. [7] identifizierten erhöhte PI 3-K α -Aktivität in Kolonkarzinomen und konnten diese vermehrte Aktivität mit einer Zunahme der p110 α -Proteinexpression in Verbindung bringen. Die funktionelle Relevanz dieser Entdeckung wurde durch Microinjections-Versuche untersucht. Die Microinjektionen von neutralisierenden Antikörpern gegen p110 α induzierten Zellaoptosen. Sie schlossen daraus auf eine wichtige Rolle der PI 3-K α im Zellwachstum von Kolonkarzinomen. Die Transformation von Epithelzellen in invasive Karzinome beinhaltet unter anderem den Übergang der Zellen in einen Phänotyp mit mehr Motilität und Invasivität. Keely et al. [26] wiesen nach, dass die Aktivierung von PI 3-K zu so einem neuen Phänotyp führt. Alles in allem sprechen diese Ergebnisse für ein hohes onkogenetisches Potential der PI 3-Kinasen.

Kommt es jedoch durch Überrepräsentation von *PIK3CA* tatsächlich zu einer vermehrten Expression und Aktivierung von PI 3-Kinasen in der Zelle und somit zu einer unterdrückten Apoptose?

Singh et al. [48], die mittels FISH das Vorhandensein von Amplifikation auf 3q26 in Kopfhals-Tumoren nachwiesen, untersuchten die verwendeten YAC-Sonden nach möglichen Genen, die hier lokalisiert sein könnten. Sie stießen dabei lediglich auf *PIK3CA*, was sie darauf schließen ließ, dass *PIK3CA* mit großer Wahrscheinlichkeit ein Onkogen in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes ist. Auch in Zervix- und Ovarialkarzinomen wurde *PIK3CA* als Onkogen identifiziert. Ma et al. [33] wiesen

Amplifikation von 3q26.3 als die bedeutendste chromosomale Alteration in Zervixkarzinomen aus und konnten diese Aberration mit einer erhöhten Kopienanzahl von *PIK3CA* in Beziehung setzen. Shayesteh et al. [47] zeigten durch FISH-Studien, dass *PIK3CA* in Ovarialkarzinomen ebenfalls vermehrt vorkommt. In beiden Studien wurde nachgewiesen, dass ein Zugewinn der Kopienanzahl von *PIK3CA* sowohl zu einer erhöhten Expression seines Genproduktes p110 α , als auch zu gesteigerter PI3-Kinase-Aktivität führt. Dies ließ vermuten, dass ein Zugewinn von *PIK3CA* zu vermehrter Zellproliferation und verminderter Apoptose führt [33,47]. Dementsprechend steigerte die Behandlung der Zelllinien mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 die Apoptose und hemmte die Proliferation [47]. Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse eindeutig für eine onkogenetische Relevanz des *PIK3CA*-Zugewinns.

Die eigenen Daten sind gut mit dieser Erkenntnis vereinbar. Wie zuvor beschrieben findet sich ein Zugewinn der Sequenz 3q26.3, die das *PIK3CA*-Gen beinhaltet, in 17% der leicht- bis mittelgradigen Dysplasien, in 78% der schweren Dysplasien und in 100% der invasiven Karzinome. Im Vergleich mit der Proteinebene zeigten die leicht- bis mittelgradigen Dysplasien keine oder nur eine geringe p110 α Expression. In 50% der schwergradigen Dysplasien konnte eine geringe p110 α -Expression festgestellt werden, wobei bereits einer dieser Fälle eine mäßige und einer eine ausgeprägte Expression von p110 α zeigte. Neun der zehn untersuchten invasiven Karzinome wiesen mäßige oder ausgeprägte Überexpression auf. Es wurde deutlich, dass zwischen geringer Zunahme der Kopienanzahl von 3q26.3 und einer Überexpression von p110 α kein unmittelbarer Zusammenhang besteht. Jedoch konnte in jedem der Fälle mit einer Amplifikation (eine schwergradige Dysplasie und sechs der untersuchten invasiven Karzinome), das heißt einem hochgradigen Zugewinn von 3q26.3, ebenfalls eine erhöhte Expression von p110 α gefunden werden. Diese immunhistochemischen Werte stimmten mit den Ergebnissen der mRNA *in situ* Hybridisierungen überein, die an dreizehn der in dieser Arbeit untersuchten Fälle im anatomischen Institut für Veterinärmedizin der Universität Gießen unter der Leitung von Herrn PD Dr. K. Steger durchgeführt wurden [61]. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass eine Überrepräsentation von *PIK3CA* zu einer erhöhten Expression von p110 α in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes führt.

Zusätzlich zu *PIK3CA* wurden jedoch weitere Gene wie z.B. *ECT2*, *Dvl3*, *LPP*, *EVII*, *SNO*, *hTR* und *p40/p51/p63* identifiziert, die auf der Sequenz 3q26-qter lokalisiert sind, und die als

mögliche Onkogene eine Rolle in der Tumorentstehung von Plattenepithelkarzinomen in Frage kommen. *ECT2* gehört zu der dbl-Proteinfamilie, bewirkt eine Störung des Zellzyklus und hat möglicherweise Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismen. Das *Dvl3*-Gen greift in den Signaltransduktionsweg der Drosophila ein, seine Rolle in der menschlichen Tumorgenese ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Das *LPP*-Gen konnte ebenfalls mit dem zellulären Signalweg und der Tumorgenese in Verbindung gebracht werden [43].

EVII und *SNO* hemmen den TGF- β (transforming growth factor- β)-Signalweg, was zu einer vermehrten Proliferation und gehemmten Apoptose in Epithelzellen führt. Imoto et al. [24] wiesen eine Überexpression von *SNO* in Plattenepithelkarzinomen des Oesophagus nach und konnten diese mit Amplifikationen von 3q26 korrelieren. Dies legte die Vermutung nahe, dass *SNO* ein mögliches Ziel der 3q26-Amplifikation darstellt und in die Tumorentstehung involviert ist [24].

hTR ist die RNA-Komponente der humanen Telomerase [37]. Die Telomerase ist ein Ribonucleoprotein-Komplex, der durch DNA-Synthese an den chromosomalen Enden zu unbeschränkter Proliferation von Zellen beiträgt. Im gesunden Gewebe scheint die Aktivität der Telomerase unterdrückt zu sein, in Krebszellen hingegen ist sie offensichtlich reaktiviert und hält somit das Tumorwachstum aufrecht [28]. Soder et al. [51] fanden erhöhte Kopienzahlen des *hTR*-Genes in 97% der von ihnen untersuchten Zervix-, Lungen- und Kopf-Hals-Karzinomen. Nakano et al. [37] wiesen jedoch durch Untersuchungen an Zervix-Karzinomen unterschiedlicher Stadien nach, dass die Expression von *hTR* nicht mit der Telomeraseaktivität korreliert, und dass offensichtlich noch unbekannte Faktoren zu einer Aktivierung der Telomerase in Karzinomen der Cervix uteri beitragen müssen.

Das *p40/p51/p63*-Gen wurde als humanes Homolog zu dem Tumorsuppressorgen *p53* identifiziert. *p53* besitzt die Fähigkeit, die Transkription bestimmter Gene zu aktivieren, die in die Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose eingreifen [25]. In einigen Isoformen des *p40/p51/p63*-Gens fehlt eine bestimmte Domäne von *p53*, wodurch es offensichtlich zu einer Hemmung der tumorunterdrückenden Wirkung von *p53* kommt. Yamaguchi et al. [63] zeigten eine Zunahme des *p40/p51/p63*-Gens in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und unterstützten die Vermutung, dass dieses Gen eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung spielt.

Redon et al. [42] konnten in Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches Überrepräsentationen des *p63*-Gens und des *PIK3CA*-Gens in gleichem Ausmass nachweisen. Um jedoch zu differenzieren, welches dieser beiden Gene tatsächlich in die Karzinogenese eingreift, wurde wiederum ihre Transkription bestimmt. Es zeigte sich, dass die *p63*-Expression unabhängig

von der Gen-Kopienzahl war, wohingegen die p110 α -Transkription deutlich höher in den Tumoren mit 3q26-Zugewinn, als in denen mit normaler 3q26-Kopienanzahl waren. Dies bestätigt wiederum die Vermutung dieser Arbeit, dass *PIK3CA* ein relevantes Onkogen ist, welches durch 3q26 überexprimiert wird.

Dem entgegengesetzt fanden Imoto et al. [24] keine Korrelation zwischen Amplifikation von einigen dieser Onkogene, einschliesslich *PIK3CA*, und ihrer Expression auf Proteinebene. Dies lässt darauf schliessen, dass weitere genetische Mechanismen existieren, die unabhängig vom *PIK3CA*-Status die Expression von p110 α regulieren. Die Ergebnisse der eigenen Arbeit lassen diese Schlussfolgerung ebenfalls zu. So wiesen jeweils ein Fall der schweren Dysplasien und ein Fall der invasiven Karzinome zwar keine Amplifikationen von 3q26.3, jedoch eine starke Überexpression von p110 α auf.

In einer neuen Studie von Redon et al. [41] wurde ein weiteres potentiell Onkogen definiert. Sie identifizierten mittels microarray-CGH an Karzinomen der Kopf-Hals-Region eine neue Amplifikation auf 3q25.3. Diese Sequenz wurde zuvor nicht entdeckt, da mit der herkömmlichen CGH diese kleine Region nicht aufzuweisen war. Mit der neuen microarray-CGH ist eine hochauflösende Screening-Methode entwickelt worden, die die Möglichkeit bietet, das gesamte Genom auf Alterationen auch auf kleineren Sequenzen zu untersuchen. Ein auf der Sequenz 3q25.3 lokalisiertes Gen ist *Cyclin L*. Diesem Gen wurde eine wichtige Rolle beim Übergang der G0- in die G1-Phase des Zellzyklus zugeschrieben. Redon et al. [41] konnten nun aufweisen, dass es in differenzierten Tumoren aufgrund erhöhter Kopienzahl überexprimiert ist und schlossen daraus, dass *Cyclin L* ein mögliches Onkogen in Kopf-Hals-Karzinomen ist.

Zusammengenommen belegen die gefundenen Ergebnisse zweifelsfrei, dass *PIK3CA* in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes häufig überrepräsentiert ist, dass die Kopienanzahl von *PIK3CA* beim Übergang von Dysplasien zu invasiven Karzinomen zunimmt, und dass der Zugewinn der Kopienanzahl von *PIK3CA* zu einer vermehrten Expression von p110 α sowohl auf Protein-, wie auch auf mRNA-Ebene führt [61]. Im Hinblick auf die nachgewiesene onkogene Wirkung von p110 α spricht einiges dafür, dass eine Überexpression infolge von *PIK3CA*-Zugewinn ursächlich an der Progression von Dysplasien zu invasiven Karzinomen beteiligt ist. Somit könnte der Nachweis von *PIK3CA*-Zugewinn einen molekularen Marker in frühen Stadien von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes darstellen.

5 Literaturverzeichnis

1. Akervall, J.A., Michalides, R.J.A.M., Mineta, H., Balm, A., Borg, A., Dictor, M.R., Jin, Y., Loftus, B., Mertens, F., Wennerberg, J.P.
Amplification of Cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and Cyclin D1 overexpression
Cancer 1997; 79: 380-389
2. Alessi, D.R., Cohen, P.
Mechanism of activation and function of protein kinase B
Curr. Opin. Genet. Dev. 1998; 8: 55-62
3. Aoki, M., Schetter, C., Himly, M., Batista, O., Chang, H.W., Vogt, P.K.
The catalytic subunit of phosphoinositide 3-kinase: requirements for oncogenicity
J. Biol. Chem. 2000; 275: 6267-6275
4. Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland
in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut
Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends (3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe)
Saarbrücken, 2002; 16-20, 36-40
5. Balsara, B.R., Sonoda, G., du Manoir, S., Siegfried, J.M., Gabrielson, E., Testa, J.R.
Comparative genomic hybridization analysis detects frequent, often high-level, overrepresentation of DNA sequences at 3q, 5p, 7p, and 8q in human non-small cell lung carcinomas
Cancer Res. 1997; 57: 2116-2120
6. Becker, N., Wahrendorf, J. (Hrsg.)
Krebsmortalität nach Organen, in *Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republic of Germany* (3.Ausgabe)
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1998; 68-98
7. Benistant, C., Chapuis, H., Roche, S.
A specific function for phosphatidylinositol 3-kinase alpha (p85alpha-p110alpha) in cell survival and for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in de novo DNA synthesis of human colon carcinoma cells
Oncogene 2000; 19: 5083-90
8. Björkqvist, A.-M., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Tammilehto, L., Mattson, K., Vainio, H., Knuutila, S.
DNA gains in 3q occur frequently in squamous cell carcinoma of the lung, but not in adenocarcinoma
Genes Chromosomes Cancer 1998; 22: 79-82
9. Block, G., Patterson, B., Subar, A.
Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence
Nutr. Cancer 1992; 18: 1-29

10. Bockmühl, U., Schlüns, K., Küchler, I., Petersen, S., Petersen, I.
Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients
Am. J. Pathol. 2000; 157: 369-375
11. Bockmühl, U., Schwendel, A., Dietel, M., Petersen, I.
Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas
Cancer Res. 1996; 56: 5325-5329
12. Bockmühl, U., Wolf, G., Schmidt, S., Schwendel, A., Jahnke, V., Dietel, M., Petersen, I.
Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer
Head Neck 1998; 20: 145-151
13. Brzoska, P.M., Levin, N.A., Fu, K.K., Kaplan, M.J., Singer, M.I., Gray, J.W., Christman M.F.
Frequent novel DNA copy number increase in squamous cell head and neck tumors
Cancer Res. 1995; 55: 3055-3059
14. Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., Sidransky, D.
Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization
Cancer Res. 1996; 56: 2488-2492
15. Chang, H.W., Aoki, M., Fruman, D., Auger, K.R., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N., Cantley, L.C., Roberts, T.M., Vogt, P.K.
Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-Kinase
Science 1997; 276: 1848-1850
16. Cloos, J., Spitz, M.R., Schantz, S.P., Hsu, T.C., Zhang, Z., Tobi, H., Braakhuis, B.J.M., Snow, G.B.
Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma
J. Natl. Cancer Inst. 1996; 88: 530-534
17. Copper, M.P., Jovanovic, A., Nauta, J.J., Braakhuis, B.J., de Vries, N., van der Waal, I., Snow, G.B.
Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck
Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 1995; 121: 157-160
18. Doerr, W., Seifert, G., Uehlinger, E.
Pharynx-tumoren, in *Spezielle pathologische Anatomie, Band 4:HNO-Pathologie*
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1999; 176-178
19. Foulkes, W.D., Brunet, J.-S., Sieh, W., Black, M.J., Shenouda, G., Narod, S.A.
Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study
BMJ 1996; 313: 716-721

20. Hashimoto, Y., Oga, A., Kawauchi, S., Furuya, T., Shimizu, N., Nakano, T., Imate, Y., Yamashita, H., Sasaki, K.
Amplification of 3q26~qter correlates with tumor progression in head and neck squamous cell carcinomas
Cancer Genet. Cytogenet. 2001; 129: 52-56
21. Heselmeyer, K., Macville, M., Schröck, E., Blegen, H., Hellström, A.-C., Shah, K., Auer, G., Ried, T.
Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q
Genes Chromosomes Cancer 1997; 19: 233-240
22. Heselmeyer, K., Schröck, E., du Manoir, S., Blegen, H., Shah, K., Steinbeck, R., Auer, G., Ried, T.
Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93: 479-484
23. Hittelman, W.N., Voravud, N., Shin, D.M., Lee, J.S., Ro, J.Y., Hong, W.K.
Early genetic changes during upper aerodigestive tract tumorigenesis
J. Cell Biochem. Suppl. 1993; 17: 233-236
24. Imoto, I., Pimkhaokham, A., Fukuda, Y., Yang, Z.-Q., Shimada, Y., Nomura, N., Hirai, H., Imamura, M., Inazawa, J.
SNO is a probable target for gene amplification at 3q26 in squamous-cell carcinomas of the esophagus
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001; 286: 559-565
25. Kaelin, W.G., Jr
The emerging p53 gene family
J. Natl. Cancer Inst. 1999; 91: 594-598
26. Keely, P.J., Westwick, J.K., Whitehead, I.P., Der, C.J., Parise, L.V.
Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K
Nature 1997; 390: 632-636
27. Kettunen, E., El-Rifai, W., Björkqvist, A.-M., Wolff, H., Karjalainen, A., Anttila, S., Mattson, K., Husgafvel-Pursiainen, K., Knuutila, S.
A broad amplification pattern at 3q in squamous cell lung cancer—a fluorescence in situ hybridization study
Cancer Genet. Cytogenet. 2000; 117: 66-70
28. Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W.
Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer
Science 1994; 266: 2011-2014

29. Kulik, G., Klippel, A., Weber, M.J.
Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt
Mol. Cell. Biol. 1997; 17: 1595-1606
30. Leitch, A.R., Schwarzacher, T., Jackson, D., Leitch, I.J.
In situ-Hybridisierung
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994
31. Levin, B.
Onkogene und Krebs, in *Molekularbiologie der Gene*
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1998; 911-944
32. Liehr, T., Ries, J., Wolff, E., Fiedler, W., Dahse, R., Ernst, G., Steininger, H., Koscielny, S., Girod, S., Gebhart, E.
Gain of DNA copy number on chromosomes 3q26-qter and 5p14-pter is a frequent finding in head and neck squamous cell carcinomas
Int. J. Mol. Med. 1998; 2: 173-179
33. Ma, Y.Y., Wei, S.J., Lin, Y.C., Lung, J.C., Chang, T.C., Whang-Peng, J., Liu, J.M., Yang, D.M., Yang, W.K., Shen, C.Y.
PIK3CA as an oncogene in cervical cancer
Oncogene 2000; 19: 2739-2744
34. Maier, H., Dietz, A., Gewelke, U., Heller, W.D., Weidauer, H.
Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer
Clin. Investig. 1992; 70: 320-327
35. Nagai, M.A.
Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas
Braz. J. Med. Biol. Res. 1999; 32: 897-904
36. Naish, S.J. (Hrsg.), Boenisch, T., Farmilo, A.J., Stead, R.H.
Handbuch II immunchemischer Färbemethoden
DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, 1989
37. Nakano, K., Watney, E., McDougall, J.K.
Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer
Am. J. Pathol. 1998; 153: 857-864
38. Pack, S.D., Karkera, J.D., Zhuang, Z., Pak, E.D., Balan, K.V., Hwu, P., Park, W.-S., Pham, T., Ault, D.O., Glaser, M., Liotta, L., Detera-Wadleigh, S.D., Wadleigh, R.G.
Molecular cytogenetic fingerprinting of esophageal squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridization reveals a consistent pattern of chromosomal alterations
Genes Chromosomes Cancer 1999; 25: 160-168

39. Qian, J., Bostwick, D.G., Takahashi, S., Borell, T.J., Brown, J.A., Lieber, M.M., Jenkins, R.B.
Comparison of fluorescence *in situ* hybridization analysis of isolated nuclei and routine histological sections from paraffin-embedded prostatic adenocarcinoma specimens
Am. J. Pathol. 1996; 149: 1193-1199
40. Rameh, L.E., Cantley, L.C.
The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function
J. Biol. Chem. 1999; 274: 8347-8350
41. Redon, R., Hussenet, T., Bour, G., Caulee, K., Jost, B., Muller, D., Abecassis, J., du Manoir, S.
Amplicon mapping and transcriptional analysis pinpoint *Cyclin L* as a candidate oncogene in head and neck cancer
Cancer Res. 2002 ; 62 : 6211-6217
42. Redon, R., Muller, D., Caulee, K., Wanherdrick, K., Abecassis, J., du Manoir, S.
A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: *PIK3CA* but not *p63* gene as likely target of 3q26-qter gains
Cancer Res. 2001; 61: 4122-4129
43. Riazimand, S.H., Welkoborsky, H.-J., Bernauer, H.S., Jacob, R., Mann, W.J.
Investigations for fine mapping of amplifications in chromosome 3q26.3-28 frequently occurring in squamous cell carcinomas of the head and neck
Oncology 2002; 63: 385-392
44. Ried, T., Heselmeyer-Haddad, K., Blegen, H., Schröck, E., Auer, G.
Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation
Genes Chromosomes Cancer 1999; 25: 195-204
45. Scully, C., Field, J.K., Tanzawa, H.
Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control
Oral. Oncol. 2000; 36: 256-263
46. Shanmugaratnam, K., Sobin, L.H. (Hrsg.)
WHO. Histological typing of upper respiratory tract tumors, in *International Histological Classification of tumors*, Band 19
Springer-Verlag: Geneva, 1978; 27-31
47. Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.-L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B., Gray, J.W.
PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer
Nature Genet. 1999; 21: 99-103

48. Singh, B., Gogineni, S.K., Sacks, P.G., Shaha, A.R., Shah, J.P., Stoffel, A., Rao, P.H. Molecular cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification
Cancer Res. 2001; 61: 4506-4513
49. Singh, B., Stoffel, A., Gogineni, S., Poluri, A., Pfister, D.G., Shaha, A.R., Pathak, A., Bosl, G., Cordon-Cardo, C., Shah, J.P., Rao, P.H. Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas
Am. J. Pathol. 2002; 161: 365-371
50. Sobin, L.H., Wittekind, C. (Hrsg.)
TNM classification of malignant tumors (5. Ausgabe)
Union International Contre le Cancer, Wiley-Liss, New York, 1997
51. Soder, A.I., Hoare, S.F., Muir, S., Going, J.J., Parkinson, E.K., Keith, W.N. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer
Oncogene 1997; 14: 1013-1021
52. Soder, A.I., Hopman, A.H.N., Ramaekers, F.C.S., Conradt, C., Bosch, F.X. Distinct nonrandom patterns of chromosomal aberrations in the progression of squamous cell carcinomas of the head and neck
Cancer Res. 1995; 55: 5030-5037
53. Speicher, M.R., Howe, C., Crotty, P., du Manoir, S., Costa, J., Ward, D.C. Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas
Cancer Res. 1995; 55: 1010-1013
54. Sudbo, J., Bryne, M., Johannessen, A.C., Kildal, W., Danielsen, H.E., Reith, A. Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia
J. Pathol. 2001; 194: 303-310
55. Tabor, M.P., Brakenhoff, R.H., van Houten, V.M.M., Kummer, J.A., Snel, M.H.J., Snijders, P.J.F., Snow, G.B., Leemans, C.R., Braakhuis, B.J.M. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients
Clin. Cancer Res. 2001; 7:1523-1532
56. Taubald, A., Liehr, T., Ries, J., Girod, S., Hassfurter, E., Gebhart, E. CGH-detected DNA sequence copy number amplifications can be confirmed by interphase-FISH: new possibilities for prognostic approaches in oral squamous cell carcinomas
Int. J. Mol. Med. 1998; 2: 555-560
57. Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases
Exp. Cell Res. 1999; 253: 239-254

-
58. Volinia, S., Hiles, I., Ormondroyd, E., Nizetic, D., Antonacci, R., Rocchi, M., Waterfield, M.D.
Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 alpha (PIK3CA) gene
Genomics 1994; 24: 472-477
59. Warnakulasuriya, S.
Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer
J. Pathol. 2000; 190: 407-409
60. Weber, R.G., Scheer, M., Born, I.A., Joos, S., Cobbers, J.M., Hofele, C., Reifenberger, G., Zoller, J.E., Lichter, P.
Recurrent chromosomal imbalances detected in biopsy material from oral premalignant and malignant lesions by combined tissue microdissection, universal DNA amplification, and comparative genomic hybridization
Am. J. Pathol. 1998; 153: 295-303
61. Woenckhaus, J., Steger, K., Werner, E., Fenic, I., Gamerdinger, U., Dreyer, T., Stahl, U.
Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma
J. Pathol. 2002; 198: 335-342
62. Wolff, E., Girod, S., Liehr, T., Vorderwülbecke, U., Ries, J., Steininger, H., Gebhart, E.
Oral squamous cell carcinomas are characterized by a rather uniform pattern of genomic imbalances detected by comparative genomic hybridisation
Oral Oncol. 1998; 34: 186-190
63. Yamaguchi, K., Wu, L., Caballero, O.L., Hibi, K., Trink, B., Resto, V., Cairns, P., Okami, K., Koch, W.M., Sidransky, D., Jen, J.
Frequent gain of the *p40/p51/p63* locus in primary head and neck squamous cell carcinoma
Int. J. Cancer 2000; 86: 684-689

6 Anhang

6.1 Verwendete Geräte

Zentrifugen: Tischzentrifuge „Centrifuge“ 5415 C (Eppendorf, Hamburg)
Universal 16R (Hettich AG, Bäch, CH)

Inkubatoren: Wärmeschrank (Wilhelm Vogel GmbH, Giessen)
Modell 2735 (Köttermann GmbH, Uetze)

Wasserbäder: M3 (Lauda Dr.R.Wobser GmbH, Lauda-Königshofen)
WBU 45 (Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach)

Schüttler: Polymax 2040 (Heidolph Elektro GmbH, Kelheim)
MS1 Minishaker (Janke& Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen i. Br.)

Mikroskope: Zeiss Axiophot-Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen)
Auflichtmikroskop (Olympus, Hamburg)

Sonstiges: Gelelektrophoresegerät (Biometra, Göttingen)
Wärmeplatte Präzitherm (Störk-Tronic Störk GmbH, Stuttgart)
PCR-Gerät Biometra Personal Cycler (Biotron, Göttingen)
pH- Meßgerät : Mikroprozessor-pH-Meter 761 (Knick, Berlin)
Pipetten (Eppendorf, Hamburg)

6.2 Ansätze der Gebrauchslösungen

Phosphatpuffer (1xPBS): 120 mM NaCl
7 mM Na₂HPO₄
3 mM NaH₂PO₄
2,7 mM KCl

100xTE-Puffer:	1 M Tris/HCl 0,1 M EDTA
20xSSC :	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat
Tris-Waschpuffer:	Stammlösung pH 7,4 - 7,6 (Ansatz für 20 l Gebrauchslösung): 18 g Tris-Base 137 g Tris-HCl 175,5 g NaCl 2,5 l Aqua demin.
Citratpuffer :	Stammlösung A : 21,01 g 0,1 M Zitronensäure 1000 ml Aqua demin. Stammlösung B: 29,41 g Natriumcitrat 1000 ml Aqua demin. Gebrauchslösung: 9 ml Stammlösung A 41 ml Stammlösung B 450 ml Aqua demin.
Hämalaun:	1 g Hämatoxylin 0,2 g NaJO ₃ 50 g Kalialaun 1000 ml Aqua demin. 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Histologie der Dysplasien, CIS	8
Abb.2: PI3K / Akt - Signalweg	14
Abb.3: Prinzip der FISH	17
Abb.4: Schematischer Überblick über den Ablauf der FISH	18
Abb.5: Hybridisierungssignale	30
Abb.6: Prinzip der Immunhistochemie nach der LAB-Methode	31
Abb.7: mRNA in situ Hybridisierung und Immunhistologie	34
Abb.8: Prozentualer Zugewinn bzw. Amplifikation	38
Abb.9: Prozentualer Anteil der Fälle mit Zugewinn/Amplifikation über den jeweiligen Schwellenwerten	38
Abb.10: Prozentualer Anteil der Fälle ohne/mit immunhistochemischer Reaktion	41
Abb.11: Vergleich der prozentualen Anteile der Fälle mit Zugewinn bzw. Amplifikation und immunhistochemischer Reaktion	42

6.4 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Zusammenfassung der Patientendaten	16
Tab.2: YAC-Sonde	21
Tab.3: Filter für die Darstellung von Fluoreszenzfarbstoffen im Auflicht-Mikroskop	29
Tab.4: Zusammenfassung der Ergebnisse	39

7 Zusammenfassung

Die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes erfolgt über einzelne, histopathologisch definierte Stadien von normalem Epithel über zunehmende Dysplasien und Carcinomata in situ bis zum invasiven Karzinom. Dabei sind die einzelnen Stadien durch zunehmende genetische Veränderungen charakterisiert. Mit der Identifizierung der für die Progression von präkanzerösen Läsionen in invasive Karzinome verantwortlichen genetischen Alteration wäre ein wichtiger molekularer Marker mit prognostischem Wert gefunden.

Eine häufig in Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches nachweisbare genetische Alteration ist der genomische Zugewinn des chromosomalen Segmentes 3q26.3. Dieser Abschnitt beherbergt unter anderem das *PIK3CA*-Gen, welches mehrfach als potentiell Onkogen beschrieben wurde. Das *PIK3CA*-Gen kodiert die katalytische Untereinheit p110 α der Phosphatidylinositol 3-Kinase. Dieses Enzym katalysiert die Phosphorylierung der D3 Position von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI-4,5-P₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PI-3,4,5-P₃). Letzteres ist ein bedeutender „second messenger“, der über die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase (AKT) unter anderem eine Hemmung der Apoptose bewirkt. In verschiedenen Studien konnte ein onkogenes Potential von p110 α nachgewiesen werden. Auch wurde gezeigt, dass eine Überexpression der katalytischen Untereinheit von p110 α zu einer erhöhten Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität führt.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nicht geklärt, welche Rolle die Überrepräsentation von *PIK3CA* in der Tumorgenese von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes einnimmt, und ob dieser genetische Zugewinn mit einer erhöhten p110 α Proteinexpression assoziiert ist.

In dieser Arbeit wurde mit Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) der genetische Status des *PIK3CA*-Genes in invasiven Karzinomen und Dysplasien unterschiedlichen Schweregrades der Kopf-Hals-Region bestimmt und mit dem immunhistologischen p110 α -Expressionsmuster verglichen. Untersucht wurden sechs Fälle leicht- bis mittelgradiger Dysplasien, neun schwerer Dysplasien/CIS und elf invasiver Karzinome formalinfixierten und Paraffin- eingebetteten Gewebes aus dem Tumorarchiv des Institutes für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde an isolierten Zellkernen des zuvor unter mikroskopischer Kontrolle dissezierten Gewebeverbandes durchgeführt. Für die

Hybridisierung wurde zunächst eine YAC (yeast artificial chromosomes) – Sonde, die das *PIK3CA*-Gen (lokalisiert auf dem Abschnitt 3q26.3) enthielt, markiert. Die Sonde bindet an die komplementäre zelluläre DNA und ermöglicht somit den Nachweis von *PIK3CA* in den Zellkernen durch fluoreszenzmarkierte Antikörper. Ausgezählt wurden die Hybridisierungssignale mit einem Zeiss Axiophot Fluoreszenz-Mikroskop von zwei unabhängigen Untersuchern. Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach der LAB-Methode mit einem polyklonalen Antikörper gegen p110 α . Das Expressionsmuster wurde lichtmikroskopisch analysiert.

Die Ergebnisse der FISH ergaben einen signifikanten Zugewinn der Region 3q26 in einem der untersuchten Fälle leicht- bis mittelgradiger Dysplasien (17%), jedoch bereits in sieben von neun Fällen schwerer Dysplasien/CIS (78%). Alle elf analysierten invasiven Karzinome (100%) wiesen einen deutlichen 3q26-Zugewinn und sechs (55%) zusätzlich 3q26 Amplifikationen auf. Unter den sieben schweren Dysplasien mit 3q26-Zugewinn zeigte ein Fall (14%) zusätzlich Amplifikationen.

Die immunhistologischen Untersuchungen wiesen im Vergleich keine oder nur gering positive Farbreaktionen für p110 α in allen untersuchten Fällen leicht- bis mittelgradiger Dysplasien (100%) und in sechs von acht Fällen schwerer Dysplasien/CIS (75%) auf. Zwei schwere Dysplasien/CIS (25%) und neun der zehn untersuchten invasiven Karzinome (90%) zeigten eine mäßige bzw. ausgeprägte p110 α Expression.

Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Fälle, die einen 3q26-Zugewinn in mehr als 50% der ausgezählten Zellen und/oder Amplifikationen in mehr als 10% der Zellen aufwiesen, ebenfalls eine erhöhte p110 α -Proteinexpression zeigten. Demgegenüber wiesen nur zwei der Fälle (18%) (eine schwere Dysplasie und ein invasives Karzinom) mit deutlicher Überexpression von p110 α keinen oder nur einen geringen 3q26-Zugewinn auf.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Zugewinne von *PIK3CA* ein häufiges Ereignis in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes sind, und dass die Kopienanzahl von *PIK3CA* von den leicht- bis mittelgradiger Dysplasien über schwere Dysplasien/CIS bis hin zu invasiven Karzinomen zunimmt. Des weiteren scheint ein hochgradiger Zugewinn von *PIK3CA* zu einer erhöhten Proteinexpression von p110 α zu führen, wenn auch offensichtlich weitere epigenetische Mechanismen existieren mögen, die unabhängig vom *PIK3CA*-Status Einfluss auf die Proteinexpression nehmen. Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass der 3q26.3 (*PIK3CA*)-Zugewinn und die Amplifikation ein molekularer Marker der Progression vom Carcinoma in situ zum invasiven Karzinom ist.

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. A. Schulz, dem Direktor des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen, danke ich für die Bereitstellung technischer und materieller Voraussetzungen zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Joachim Woenckhaus möchte ich herzlich für die kompetente, umfangreiche Betreuung, sowie für die Überlassung des interessanten Themas danken.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Klaus Steger dafür, dass ich die am Institut für Veterinär Anatomie der JLU Gießen durchgeführten mRNA *in situ* Hybridisierungen in meine Diskussion aufnehmen durfte.

Frau Dr. Ulrike Gamerding danke ich für die hilfreiche Unterstützung während meiner gesamten Arbeit im Labor.

Frau P. Hahn-Kohlberger bin ich dankbar für die Anfertigung der Paraffinschnitte und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Frau Irina Fenic danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Immunhistochemie.

Christian Vokuhl danke ich von ganzem Herzen für seine grenzenlose Zuversicht und stete Aufmunterung.

Meinen Eltern, Dr. med. J. Peter und Gilda Werner, danke ich für ihre liebevolle und in jeglicher Hinsicht großartige Unterstützung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Eva Maria Werner
geboren am 16.01.1976
in Freiburg im Breisgau

Schulbildung

1982-1986 Weihermatten-Grundschule in Bad Säckingen
1986-1995 Scheffelgymnasium in Bad Säckingen
06 / 1995 Allgemeine Hochschulreife

Studium

1996-2002 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität
 Gießen
26.03.1998 Ärztliche Vorprüfung
23.03.1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.09.2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21.10.2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

1999-2003 Experimentelle Tätigkeit am Institut für Pathologie der
 Justus-Liebig-Universität Gießen und Ausarbeitung der
 Dissertation

Veröffentlichung

J. Woenckhaus, K. Steger, E. Werner, I. Fenic, U. Gamerdinger, T. Dreyer, U. Stahl:
Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with
progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. *Journal of Pathology*
2002; **198**: 335-342

Berufliche Tätigkeit

Seit 06 / 2003 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Gynäkologie und
 Geburtshilfe des Kreiskrankenhauses Rendsburg

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.