Koexpression von Intermediärfilamenten in Plattenepithelkarzinomen und undifferenzierten Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes

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

vorgelegt von Frank Wallner
aus Osnabrück

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen
Institut für Pathologie
Leiter: Prof. Dr. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. M. Altmannsberger

Gutachter: Prof. Dr. A. Meinhardt

Tag der Disputation: 11.06.2003

To Gayle

Inhaltsverzeichnis

1.Einleitung 7
1.1 Allgemeine Einführung 7
1.2. Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes 8
1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie 8
1.2.2. Pathogenese und Klinik 8
1.2.3. Diagnostik 9
1.2.4. Klassifikation 9
1.2.5. Therapie 9
1.2.6. Prognose 11
1.3. Intermediärfilamente 12
1.3.1. Intermediärfilamente als Teil des Zytoskeletts 12
1.3.2. Struktur der Intermediärfilamente 12
1.3.2.1. Aufbau des Moleküls, Funktion der einzelnen Abschnitte 12
1.3.2.2. Aufbau des Intermediärfilaments 13
1.3.2.3. Dynamik von Polymerisation und Depolymerisation 15
1.3.2.4. Intrazellulärer Transport von Intermediärfilamenten 16
1.3.3. Klassifikation der Intermediärfilamente 17
1.3.3.1. Geschichte (Histogenetische Klassifikation) 17
1.3.3.2. Die Superfamilie der Intermediärfilamente (Genetische Klassifikation, Evolution) 17
1.3.3.3. Intermediärfilamentklasse I und II: Der Katalog der Keratine 20
1.3.3.4 Intermediärfilamentklasse III 21
1.3.3.5. Intermediärfilamentklasse IV 22
1.3.3.6. Intermediärfilamentklasse V: Lamine 23
1.3.3.7. Neu entdeckte Intermediärfilamente 23
1.3.4. Funktion der Intermediärfilamente 24
1.3.4.1. Mechanische Integrität von Zelle und Gewebe 24
1.3.4.2. Intermediärfilament-assoziierte-Proteine (IFAP) 25
1.3.4.3. Räumliche und funktionelle Organisation des Zytoplasmas 28
1.3.4.4. Protektive Effekte 28
1.3.4.5. Erkenntnisse aus genetischen Manipulationen 29
1.3.4.6. Zusammenhang mit genetisch bedingten Erkrankungen 29
1.4. Fragestellung 31
2. Material und Methoden 32
2.1.Material 32
2.1.1. Tumorgewebe 32
2.1.1.1. Paraffineingebettetes Gewebe 32
2.1.1.2. Tiefgefrorenes Gewebe 32
2.2. Histopathologische Methoden 33
2.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung 33
2.2.2. Grading 34
2.2.3. Immunhistochemische Methoden 34
2.2.3.1. Antikörper (Primärantikörper) 34
2.2.3.2. APAAP-Methode 34
2.2.3.3. Doppelimmunfluoreszenz 38
2.2.3.4. Einfach-Immunfluoreszenz 39
2.3. Auswertung und photographische Dokumentation 40
3. Ergebnisse 41

3.1. Routineuntersuchungen ... 41
3.1.1. Klinik ... 41
3.1.2. Lokalisation ... 41
3.1.3. CUP ... 41
3.1.4. Weitere klinische Angaben: Lebensalter und Staging ... 41
3.2. Histologie des paraffineingebetteten Gewebes ... 41
Grading ... 42
3.3. Immunhistochemie des tiefgefrorenen Gewebes ... 43
3.3.1. Plattenepithelkarzinome ... 44
3.3.1.1. Keratin ... 44
3.3.1.2. Vimentin ... 44
3.3.1.3. Neurofilamente ... 45
3.3.1.4. Desmin ... 46
3.3.1.5. GFAP ... 46
3.3.2. Undifferenzierte Karzinome ... 46
3.3.2.1. Keratin ... 46
3.3.2.2. Vimentin ... 46
3.3.2.3. Neurofilamente ... 47
3.3.2.4. Desmin ... 47
3.3.2.5. GFAP ... 47
3.3.3. Therapierte Rezidivtumoren ... 47
3.3.3.1. Morphologie ... 47
3.3.3.2. Keratin ... 48
3.3.3.3. Vimentin ... 48
3.3.3.4. Neurofilamente ... 48
3.3.3.5. Desmin ... 48
3.3.3.6. GFAP ... 49
3.3.3.7. Veränderung des Koexpressionsmusters nach Therapie ... 49
3.3.4. Übersicht: Koexpression und Grading ... 49
Grading ... 50
3.3.5. Übersicht: Koexpression und Lokalisation ... 50
Lokalisation ... 50
3.3.6. Abbildungen ... 51
3.3.6.1. Hochdifferenziertes Plattenepithelkarzinom ... 51
3.3.6.2. Mittelgradig differenziertes Plattenepithelkarzinom ... 54
3.3.6.3. Niedrig differenziertes Plattenepithelkarzinom ... 56
3.3.6.4. Undifferenziertes Karzinom (rundzelliger Typ) ... 58
3.3.6.5. Undifferenziertes Karzinom (spindelzelliger Typ) ... 61
4. Diskussion ... 63
4.1. Geschichte der Immunhistochemie ... 63
4.2. Kritische Betrachtung der Methode ... 63
4.3. Expression von Intermediärfilamenten ... 64
4.3.1. Modifikation der Intermediärfilament-Expression während der ontogenetischen Entwicklung ... 65
4.3.2. Modifikation der Intermediärfilament-Expression durch zelluläre Lebensbedingungen ... 65
4.3.3. Modifikation der Intermediärfilament-Expression durch maligne Entartung ... 66
4.4. Koexpression von Intermediärfilamenten als Phänomen ... 67
4.4.1.Geschichte der Koexpression ... 67
4.4.2.Katalog der Koexpression ... 67
4.4.2.1. Koexpression *in vitro* ... 67

4.4.2.2 Koexpression während der Entwicklung 67
4.4.2.3 Koexpression in alterierten Geweben 68
4.4.2.4 Koexpression in Normalgeweben 68
4.4.2.5 Koexpression in Tumoren 69
4.5. Koexpression in Plattenepithelkarzinomen und undifferenzierten Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes 71
4.5.1. Koexpression von Keratin und Vimentin 71
4.5.2. Koexpression von Keratin und Neurofilamenten 71
4.5.3. Koexpression von Keratin und Desmin 71
4.5.4. Koexpressionsmuster vom Basalzellschicht-Typ 71
4.5.5. Koexpressionsmuster vom diffusen Typ 72
4.6. Bewertung des Koexpressionsphänomens 72
4.6.1. Koexpression als Ausdruck der Dynamik des Intermediärfilament-Zytoskeletts 72
4.6.2. Koexpression führt zur Relativierung der Zuordnung von Intermediärfilamenten zu Gewebetypen 73
4.6.3. Korrelation von Koexpression und biologischem Verhalten von Tumoren 73
5. Literatur 75
6. Zusammenfassung 101
7. Danksagung 102
8. Lebenslauf 103

1.Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

In der Disziplin der Onkologie ist durch die rasante Entwicklung der Molekularbiologe in der letzten Dekade ein großer Aufschwung in diagnostischer und therapeutischer Hinsicht zu verzeichnen. Genetik und Immunologie stellten und stellen für die Entwicklung des medizinischen Fortschrittes Methoden bereit, deren Potential gegenwärtig noch nicht in vollem Ausmaß abschätzbar ist.

Nach dem Ausschöpfen des Erkenntnisgewinns durch die bildgebenden Verfahren der Licht- und Elektronenmikroskopie waren diese neuen Verfahren des Nachweisens und Visualisierens von Epitopen, Proteinen, DNA und RNA sowie die Verfahren der DNA-Sequenzierung und Genmanipulation ein neuer qualitativer Schritt im Verständnis von biologischen Grundlagen und klinischer Pathologie.

In diesem Kontext hatte die Immunhistochemie, heute "Arbeitspferd" des Pathologen, eine Pionierfunktion, die es erlaubte, am histologischen Schnitt Strukturen wesentlich gezielter zu markieren und zu differenzieren als mit dem bis dahin verfügbaren Instrument der chemischen Farbstoffaffinität.

Zu den zellulären Strukturen, die schon früh das Interesse weckten, gehört das durch die Elektronenmikroskopie in drei Filamentsysteme unterschiedene Zytoskelett. Das mittlere dieser nach Durchmesser differenzierten Filamentsysteme, das der deshalb sogenannten Intermediärfilamente, ließ sich immunhistochemisch in zunächst fünf weitere Klassen differenzieren. Hochinteressant war, dass diese Klassen mit dem Ursprungsgewebe der untersuchten Zelle korrelierten (z.B. Keratine und Epithelgewebe) und diese Zuordnung auch bei maligner Entartung der Zelle bestehen blieb. Ein "histogenetischer Marker" war gefunden, der vor allem bei morphologisch gering differenzierten Neoplasien wertvolle diagnostische Hinweise liefern konnte (Osborn et al., 1977; Gabbiani et al., 1981; Osborn et al., 1983; Altmannsberger et al., 1985; Battifora, 1988). Die Anfangseuphorie wurde durch die Erkenntnis relativiert, dass die ontogenetische Zuordnung der Intermediärfilamente nicht ausnahmslos gültig war, dass sogar die Expression mehrerer Intermediärfilamentklassen, d.h. die Koexpression von Intermediärfilamenten, in einzelnen Zellen nachweisbar war (Gatter et al., 1986; Azumi et al., 1987; Swanson, 1991). Es ergab sich dadurch die Basis für eine rationale Bewertung der Möglichkeiten und Grenzen der Immunhistochemie in der onkologischen Diagnostik.

Der systematische Nachweis einer regelmäßigen Koexpression von Intermediärfilamenten in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes wurde durch die vorliegende Arbeit erstmals geführt.

1.2. Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

In Deutschland waren 1999 Krebserkrankungen von Lippe, Mund und Rachen die sechsthäufigste Krebstodesursache bei Männern (Anteil 3-4%) und die siebzehnhäufigste bei Frauen (Anteil 1%). Die Tendenz ist steigend, und die Inzidenz beträgt für Männer aus dem Saarland gemäß dem nur dort geführten Krebsregister 16,7 und für Frauen 2,4. Daraus ergibt sich eine geschätzte Zahl von jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland von 8000 für Männer und 2100 für Frauen. Als ursächlich für die steigenden Parameter wird der gestiegene Alkoholkonsum angesehen (s.u.). Krebserkrankungen des Nasenrachens betragen in dieser Gruppe weniger als fünf Prozent und sind somit sehr selten.

Kehlkopfkrebs war in demselben Zeitraum bei Männern die fünfzehnhäufigste Krebstodesursache (Anteil 1,5%), bei Frauen ist er mit weniger als 1% nicht unter den zwanzig häufigsten Krebstodesursachen vertreten. Die Tendenz ist seit Anfang der 90er Jahre stabil, allerdings zeichnet sich bei jüngeren Jahrgängen eine Zunahme ab. Die Inzidenzen liegen im Saarland bei 7.8 für Männer und 0.7 für Frauen. Daraus ergibt sich eine geschätzte Zahl von jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland von 3200 für Männer und 500 für Frauen (Becker et al., 1997).

Bei der Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms von Mund, Rachen und Kehlkopf stehen Tabak- und Alkoholexposition an erster Stelle. Den ca. 30 Karzinogenen des Tabakrauches verhelfen offenbar direkte und indirekte kokarzinogene Wirkungen des Alkohol (Mukosaschädigung, Einfluss auf Menge und Qualität des Speichels) zur verstärkten Wirkung (Brugere et al., 1986; Maier et al., 1988a; Tuyns et al., 1988; Maier et al., 1990).

Die Entstehung von Nasen-Rachen-Karzinomen steht in sehr engem Zusammenhang mit dem Ebstein-Barr-Virus und einer genetisch/ethnischen Disposition (z.B. HLA-BW46, chinesische Ethnie). Bei Karzinomen der Nasennebenhöhlen kann die Exposition mit Berufsstoffen eine Rolle spielen.

1.2.2. Pathogenese und Klinik

Es ist abhängig von der Lokalisation, wie früh die Tumoren symptomatisch werden und in welchem Tumorstadium die Diagnose gestellt werden kann. Beispielhaft für eine typische frühe Diagnose sind Stimmlippenkarzinome, die schon im T1-Stadium eine dauernde Heiserkeit verursachen und mit einer Laryngoskopie einfach identifiziert werden können. Zungen- oder Mundhöhlenkarzinome werden aufgrund der guten Sensibilität in diesem Bereich relativ früh wahrgenommen. Anders die Tumoren des Pharynx: Oft ist die Halslymphknotenmetastasierung das erste vom Patienten bemerkte Symptom, Heiserkeit als Zeichen eines Einbruchs in den Larynx, Kieferklemme bei Oropharynxtumoren und Nasenatmungsbehinderung und Tubenventilationsstörungen bei Nasopharynxkarzinomen sind ebenfalls Zeichen eines Spätstadiums, d.h. der Infiltration von Nachbarorganen. Auch Karzinome der Kieferhöhle äußern sich erst spät mit Durchwachsen in die Wangenweichteile oder Verdrängen des Orbitainhaltes mit konsekutivem Exophthalmus. Bei allen Tumoren

werden Schmerzen tendenziell erst spät angegeben, z.B. bei Infiltration vom Periost benachbarter Knochenstrukturen.

1.2.3. Diagnostik

Die meisten Areale des oberen Aerodigestivtraktes sind der direkten Inspektion oder der Inspektion mit Spiegeln und Endoskopen zugänglich. Eine Ausnahme bilden die tieferen Abschnitte des Hypopharnx und die Nasennebenhöhlen. Die Palpation suspekter Areale in Mundhöhle und Rachen sowie der Halsweichteile schließt die klinische Untersuchung ab. Ist die Verdachtsdiagnose eines malignen Tumors gestellt, muss sie durch eine Biopsie und deren histologische Untersuchung gesichert werden. Wenn der Tumor, wie z.B. in der Mundhöhle, direkt zugänglich ist, kann das in Lokalanästhesie geschehen. Wegen der hohen Frequenz von synchronen Zweitkarzinomen müssen diese immer durch eine Endoskopie des Larynx, Hypopharynx und Oesophagus als starre (Stütz-) Endoskopie in Intubationsnarkose ausgeschlossen werden. Bei den weniger gut zugänglichen Tumoren erfolgt dabei auch die bioptische Diagnosesicherung und Ausbreitungsbestimmung. Liegt eine Halslymphknotenmetastasierung ohne erkennbaren Primärtumor (CUP-Syndrom = Carcinoma of Unknown Primary) vor, wird die Tumorsuche zur Panendoskopie erweitert: Zusätzlich erfolgt eine Tonsillektomie, eine Zungengrundbiopsie, eine Epipharyngoskopie mit tiefer Biopsie vom Nasenrachendach und, bei röntgenologischer Verschattung, eine Kieferhöhlenendoskopie.
Das Ausmaß der Metastasierung wird durch folgende Untersuchungen abgeklärt: eine Ultraschalluntersuchung und eine Computertomographie des Halses zur Ermittlung des zervikalen Lymphknotenstatus, ein Röntgen des Thorax wegen möglicher pulmonaler Filiae, eine Oberbauchsonographie wegen möglicher Leberfiliae und eine Skelettszintigraphie zum Erfassen ossärer Metastasen.

1.2.4. Klassifikation

Die Klassifikation der Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes erfolgt durch Staging und Grading.

Das Staging, der Parameter der Tumorausdehnung, erfolgt mit Hilfe des TNM-Systems der UICC. Die Tumorgröße und -invasivität werden mit den Parametern T_{1-4} charakterisiert, die lokale Lymphknotenmetastasierung mit N_{0-3}, und die Fernmetastasierung mit M_{0-1}.

Zum Grading, dem Maß für die Entartung, werden Plattenepithelkarzinome in die Differenzierungsgrade G1-G3, entsprechend ihrer Abweichung vom Normalgewebe, eingeteilt. Unterschieden werden davon als Viertes die undifferenzierten Karzinome.

1.2.5. Therapie

Die Therapie der Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes folgt im Allgemeinen der Rangfolge

- chirurgische Tumorexstirpation,

- Bestrahlung und
- Chemotherapie.

Das Gros der operablen Tumore wird, ggf. unter Opfern von (Teil-) Organen, chirurgisch mit Sicherheitsabstand entfernt. Ist der Larynx betroffen, wird eine Teilresektion angestrebt. Bei totaler Laryngektomie kann eine Stimmrehabilitation durch Anlegen einer tracheo-ösophagealen Fistel - mit Einsetzen eines Sprechventils - oder einer Sprechfistel zum Pharynx erreicht werden. Größere Gewebedefekte im Pharynx oder der Mundhöhle werden durch den Einsatz von myokutanen oder myofaszialen Nahlappen (M. Pectoralis, Remmert-Lappen) oder durch mikrovaskulär anastomosierte Fernlappen (radialer Unterarmlappen) versorgt.

Kleine (T_1-) Stimmbandkarzinome können alternativ zur chirurgischen Chordektomie oder LASER-Exzision auch bestrahlt werden, wobei die funktionellen Ergebnisse aufgrund der Vernarbung nicht unbedingt überlegen sind. Gegenwärtig wird des weiteren, wegen der dadurch gegebenen Möglichkeit des Organerhalts, vorgeschlagen und in klinischen Studien evaluiert, ausgedehntere Larynxkarzinome zuerst zu bestrahlen und nur bei nicht-kompletter Remission eine "Rettungs"-Laryngektomie (salvage surgery) durchzuführen.

Nasopharynxkarziome werden aufgrund ihres guten Ansprechens generell primär mit einer kombinierten Radio-Chemo-Therapie behandelt, nachdem in den letzten Jahren eine Überlegenheit über die zuvor praktizierte alleinige Radiotherapie demonstriert werden konnte (Al-Sarraf et al., 1998).

Bei Befall der Halslymphknoten erfolgt zeitgleich mit der Operation des Tumors die Sanierung der zervikalen Lymphabflussgebiete durch eine chirurgische Halsausräumung (Neck dissection). Eine Nachbestrahlung des Operationsgebietes und der zervikalen Lymphabflusswege erfolgt immer bei histologisch nachgewiesener, zervikaler Metastasierung und bei den häufig mit okkulter zervikaler Metastasierung korrelierten Oro- und Hypopharynxkarzinomen.

Bei Kontraindikationen zum operativen Vorgehen (schlechter Allgemeinzustand des Patienten, Befall von mehr als der Hälfte der Zunge, der eine totale Glossektomie erforderlich machen würde, Infiltration der Schädelbasis und/oder der A. carotis interna) und bei Patienten mit fortgeschrittenen Hypopharynxkarzinomen ist eine primäre Bestrahlung indiziert, ggf. kombiniert mit einer Chemotherapie (Cis-Platin-/5-Fluor-Uracil). Dieses Vorgehen steht für einen Paradigmenwechsel in der HNO-Onkologie, der der Erkenntnis folgte, dass das o.g. Patientenkollektiv von einem radikalchirurgischen Vorgehen bezüglich der Überlebenszeit nicht profitiert. Durch die operativen Mutilationen wären diese Patienten in ihrer Lebensqualität gegenüber den ausschließlich bestrahlten Patienten jedoch deutlich benachteiligt.

Beim Auftreten von Rezidiven gelangt, nach Ausschöpfen aller anderen Therapiemöglichkeiten, die palliative Chemotherapie zur Anwendung, um die Tumorprogression aufzuhalten und infiltrationsbedingte Schmerzen zu lindern.

1.2.6. Prognose

Die Prognose, formuliert als prozentuale Wahrscheinlichkeit des Überlebens eines 5-Jahres-Zeitraumes, ist stark abhängig von Lokalisation, Ausdehnung, Wachstumsform und insbesondere der Metastasierung des Tumors.

Die Angaben zur 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit weisen in den verschiedenen Quellen z.T. erhebliche Differenzen auf. Entsprechend dem aktuellen Handbuch "Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis" (Naumann et al., 1992) beträgt sie bei Larynxkarzinomen insgesamt ca. 50-70% mit einer Spannweite von 95% bei $T_1N_0M_0$-Glottiskarzinomen und 17% bei Lymphknotenmetastasierung mit Kapseldurchbruch. Ähnlich günstig wie die $T_1N_0M_0$-Glottiskarzinome verhalten sich nur noch die Lippenkarzinome mit ca. 90% bei $T_{1-2}N_0M_0$-Stadien. Die Karzinome der vorderen zwei Zungendrittel und des Mundbodens bilden ein "Mittelfeld" mit durchschnittlich 40-50%, während die Karzinome der Tonsille (24-57%), des Zungengrundes (17-42%) sowie des restlichen Oro- und Hypopharynx (17-42%) sich durch frühzeitige zervikale Metastasierung auszeichnen und die schlechtesten Prognosen besitzen. Die Strahlentherapie des Nasenrachenkarzinoms ergibt, bezogen auf alle Tumorstadien, eine 5-Jahres-Rezidivfreiheit von 40-50%.

Die Bedeutung unterschiedlicher Therapiekonzepte für die Prognose hat sich in den letzten Jahren relativiert. Nicht zuletzt aus diesem Grund ist das Kriterium der Lebensqualität in den Vordergrund gerückt (siehe 1.2.5.).

1.3. Intermediärfilamente

1.3.1. Intermediärfilamente als Teil des Zytoskeletts

Das Zytoplasma von Vertebraten erhält eine feste Struktur durch ein Zytoskelett, das aus drei Gruppen unterschiedlicher biopolymerer Filamente besteht: aus 1. Mikrofilamenten, 2. Mikrotubuli und 3. Intermediärfilamenten. Die Einteilung in diese Gruppen wurde ursprünglich elektronenmikroskopisch nach der Dimension ihres Durchmessers vorgenommen: 5-7 nm entspricht den Mikrofilamenten, 22-25 nm den Mikrotubuli und 7-11 nm den größenordnungstechnisch dazwischen liegenden (und deshalb so genannten) Intermediärfilamenten (Ishikawa et al., 1968). In ihrem grundsätzlichen Aufbau sind diese drei Filamenttypen lineare Polymere der Proteine Aktin, Tubulin oder der Intermediärfilament-Proteine.

Im Gegensatz zu den Mikrofilamenten und Mikrotubuli, deren Bestandteile evolutionär hochgradig konserviert sind und die sich in verschiedenen Zellen einer bestimmten Spezies sehr ähneln, zeigen die Intermediärfilamente eine sehr viel größere Unterschiedlichkeit in Anzahl, Aufbau und Menge des Vorkommens in einer Zelle. Sie bestehen nach immunologischen und genetischen Untersuchungen aus einer großen Gruppe oder sog. "Superfamilie" von mehr als 50 (strukturell unterschiedlich) verwandten Proteinen und stellen ca. 1% des Gesamtproteins des Körpers dar (Fuchs et al., 1998).

Die Entwicklung der Erkenntnisse über die Intermediärfilamente hat in den letzten Jahren einen stürmischen Verlauf genommen. Die ehemals gültige Einteilung der Intermediärfilamente nach ihren Ursprungsgeweben wurde, als Folge molekularbiologischer Aufklärung von Protein- und Gensequenzen, durch ein genetisches Evolutions- und Verwandtschaftssystem ersetzt. Immer neue, seltene Intermediärfilamente und -klassen wurden beschrieben, wobei Abgrenzungen zu strukturell ähnlichen Proteinen bzw. filamentösen Polypeptidpolymeren oft nur durch Sequenzierung und Identifikation spezifischer, hochkonservierter Intermediärfilamentmotive möglich war (Klymkowsky, 1995). Die Ultrastruktur der Intermediärfilamente und die hohe Dynamik ihres Auf-, Ab- und Umbaus ist deutlich geworden, das Verständnis für ihre spezifischen Funktionen wuchs angesichts der Möglichkeiten, diese durch gezielte Manipulationen selektiv auszuschalten oder zu amplifizieren. Und aus der Klärung der Pathogenese bestimmter Krankheiten als Folge eines mutationsbedingten Ausfalls einzelner Intermediärfilament-Gene ergaben sich für die Klinik relevante Erkenntnisse.

1.3.2. Struktur der Intermediärfilamente

1.3.2.1. Aufbau des Moleküls, Funktion der einzelnen Abschnitte

Alle Intermediärfilamentpolypeptide zeigen einen prinzipiell ähnlichen, dreigeteilten Aufbau: An einen zentralen, einheitlich langen Abschnitt mit α-helikaler Sekundärstruktur schließen sich nicht-helikale Endabschnitte an. Während der zentrale Abschnitt bezüglich seiner α-helikalen Sekundärstruktur große Homologie aufweist und insbesondere an den Enden hochgradig konserviert ist (Herrmann et al., 2000b), sind die nicht-helikalen Endabschnitte in Dimension und Aufbau variabel und hochvariabel, können z.T. sogar ganz fehlen.

Intermediärfilamente unterscheiden sich also im wesentlichen durch die sehr unterschiedlichen Kopf- und Schwanzdomänen. Die Kopfdomäne hat einen Amino-Rest am Ende, die Schwanzdomäne einen Carboxy-Rest.

Der zentrale, stabförmige Abschnitt der Intermediärfilamente besteht aus insgesamt 310 Aminosäuren bei Typ I-IV und VI-Intermediärfilamenten. Bei den Laminen, d.h. Typ V, besteht dieser Abschnitt dagegen aus 352 Aminosäuren. Die α-helikale Struktur ist Folge eines heptagoiden (7er-) Repetitionsmusters nach dem Schema "(A-b-c-D-e-f-g)n", wobei die erste und vierte Position überwiegend durch apolare Reste besetzt ist, die übrigen durch polare oder geladene.
Diese Konfiguration der zentralen, stabförmigen Doppelhelix des Intermediärfilament-Moleküls wird in ihrer Stabilität durch eine Vielzahl von intrahelikalen Ionenbindungen (ca. 50) zwischen entgegengesetzt geladenen Resten, die vier Aminosäuren voneinander entfernt liegen, gewährleistet (Steinert et al., 1988; Parry et al., 1992; Letai et al., 1995). Diese Anordnung begünstigt das Entstehen von "gedrehten Spiralen" (engl. "coiled coils") als Quartärstruktur, einem weit verbreiteten Strukturprinzip von Proteinen (Burkhard et al., 2001). Dabei verdrillen sich zwei Moleküle zu einer „Superspirale“. Es konnten besondere Sequenzmotive (in den Abschnitten 1B und 2B, s.u.) nachgewiesen werden, die zum Start der Ausbildung der Coiled-Coil-Formation notwendig sind (Wu et al., 2000).

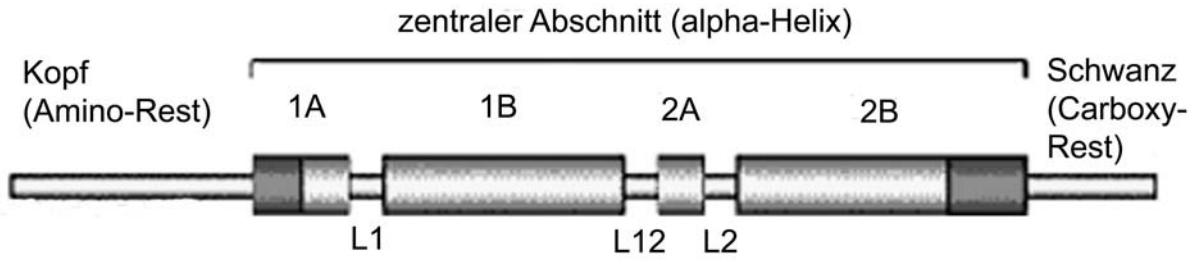


Abb. 1.1. Aufbau des Intermediärfilamentmoleküls (nach Coulombe)

Die α-Helix wird bei allen Intermediärfilamenten in gleicher Weise durch drei Verbindungsglieder (engl. sog."Linker") in vier unterschiedlich große Abschnitte geteilt, nämlich 1A (35 As), 1B (101 As), 2A (19 As) und 2B (121 As). 1A und 1B ergeben das Segment 1, entsprechend 2A und 2B Segment 2. Bei Laminen ist das Segment 1 durch Insertion von sechs Heptiden in den Abschnitt 1B exakt 42 As länger. Alle Intermediärfilamente weisen im Abschnitt 2B eine "Stufe", d.h. eine Störung bzw. Unterbrechung der α-helikalen Sekundärstruktur an definierter Position auf. Die "Linker" stellen - außer bei den Laminen - Unterbrechungen der α-Helix dar, wobei L1 (zwischen 1A und 1B, 8-14 As) nicht-helikal ist, L12 (zwischen 1B und 2A, 16 oder 17 As) vermutlich eine β-Faltblatt-Struktur aufweist und L2 (zwischen 2A und 2B, 8 As) α- helikal anderer Dimension, d.h. nicht heptagoid, ist. Im Sonderfall der Lamine sind die "Linker"-Abschnitte zwar sequenziell erfassbar, aber nicht strukturell unterschieden, d.h. die α-Helix setzt sich ununterbrochen in ihnen fort (Steinert et al., 1988).

1.3.2.2. Aufbau des Intermediärfilaments

Es scheint keine exakte, eindeutige Makrostruktur eines polymerisierten 10nm-Intermediärfilamentes zu existieren, vielmehr gibt es Anhalt dafür, dass Intermediärfilamente

im Gegensatz zu den anderen zwei zellulären Filamentsystemen einen polymorphen Charakter haben. Das bedeutet, dass nur Substrukturen eindeutig definiert sind, während das endgültige Filament offenbar Variationen der Gesamtzahl von Proteinketten pro Querschnitt aufweist (Steinert et al., 1993).

Sicher ist, dass der Grundbaustein der Intermediärfilamente ein Dimer aus zwei parallel angeordneten Proteinen darstellt. Genauer gesagt, es lagern sich zwei Intermediärfilamentmoleküle mit ihren stäbchenförmigen, α-helikalen, zentralen Anteilen parallel aneinander – in Form einer Coiled-Coil (s. 1.3.2.1.). Aus den Dimeren werden Tetramere (oder Protofilamente) gebildet, indem sich die Dimere meist antiparallel und halbversetzt zusammenlagern (Geisler et al., 1985). Dieses Konzept der Tetramer-Protofilamente als Grundbaustein der Intermediärfilamente wird durch den Nachweis von Quervernetzungsstellen innerhalb dieser Protofilamente nachhaltig unterstützt (Parry et al., 2001). Weiterhin werden Oktamere oder Protofibrillen, und schließlich Halbfilamente aus 16 Einheiten im Pool der zytoplasmatisch gelösten höheren Untereinheiten beobachtet (Coulombe et al., 1990a; Coulombe et al., 1990b). Die häufigste bzw. wahrscheinlichste Gesamtzahl von 32 Proteinketten kann um plus/minus 2-3 Tetramere variieren, d.h. 20 - 44 Proteinketten sind möglich, sowohl innerhalb eines Filamentes als auch im Unterschied zu benachbarten Filamenten (Nagle, 1988). Diese Beobachtung korreliert mit der hohen Dynamik des ständigen Austausches von Untereinheiten der Intermediärfilamente (s. 1.3.2.3.).

Die Dimere sind je nach Intermediärfilamenttyp aus denselben oder verschiedenen Intermediärfilamenten zusammengesetzt, d.h. sie sind homo- oder heteropolymerisierend. Keratine sind auf dem Niveau der Dimere obligate Heteropolymere. Lamine und Neurofilamenttriplet heteropolymerisieren dagegen erst auf dem Level höherer Organisation. Die Typ III-Intermediärfilamente Vimentin, Desmin, GFAP und Peripherin, das Neurofilament α-Internexin und das Typ VI-Intermediärfilament Nestin sind *in vitro* homopolymerisierend.

Unter *in vitro*-Bedingungen, die den *in vivo*-Bedingungen nachgebildet sind, bilden die vier zytoplasmatischen Intermediärfilamentklassen in vergleichbarem Zeitraum (2s) Filamente, die im Querschnitt unterschiedlich viele Moleküle enthalten. Die Filamentbildung läuft – unter *in vitro*-Bedingungen – in einem 3-Schritt-Vorgang ab: Tetramere lagern sich seitlich zu einheitlich kurzen, „dicken“ Filamenten zusammen (16 nm Durchmesser, 58 nm Länge: sog. ULF = unit-lenght filaments). Diese Bausteine verbinden sich dann longitudinal zu langen, „provisorischen“ – weil noch zu dicken – Filamenten. In einem letzten Schritt findet dann eine Verdichtung der Filamente auf den bekannten Durchmesser von ca. 10 nm statt (Herrmann et al., 1999).

Es sind Versuche unternommen worden zu klären, welche Funktion die verschiedenen Teile des Intermediärfilament-Moleküls für die Polymerisation haben. Dazu wurden künstlich hergestellte Mutanten der Intermediärfilamente untersucht:

Experimente ergaben, dass die nicht-helikalen Enden für die Dimerbildung nur bedingt erforderlich sind (Stewart, 1993). Wesentlich sind bestimmte Anteile des α-helikalen, d.h. mittleren Anteils für die Polymerisation bzw. Seitanlagerung. So führten Mutationen in zwei hochkonservierten, kurzen Abschnitten (ca. 10 AS) an den Enden des stabförmigen zentralen Anteils des Intermediärfilamentmoleküls zu wesentlich stärkeren negativen Effekten auf die Fähigkeit zur Polymerisation zu Filamenten als Mutationen an anderen Stellen dieses Abschnitts (Letai et al., 1992). Versuche mit dem Polymerisationsverhalten chimärer

Moleküle aus Vimentin und Keratin zeigten, dass für das Erkennen des "richtigen" Polymerisationspartners (auch über die Dimer-Bildung hinaus) die Helixabschnitte 1B und 2B am wichtigsten sind (McCormick et al., 1991). Mutationen an den nicht-helikalen Amino- und Carboxyenden von Vimentin beeinträchtigen deren Fähigkeit zur Bildung von Filamenten *in vitro* und in transfizierten Zellen - wegen der seitlichen Anlagerung - nicht wesentlich (McCormick et al., 1993; Andreoli et al., 1994). Eine neue experimentelle Untersuchung belegt, dass die Affinität der Vimentin-Kopfdomäne mit den letzten zwanzig Aminosäuren des 2B-Abschnittes eines anderen Vimentinmoleküls von deren Phosphorylierung abhängt (Gohara et al., 2001).

Kopf- und Schwanzdomänen scheinen nur bei bestimmten Intermediärfilamenten für die Polymerisation eine Rolle zu spielen. *In vitro*- und Transfektionsversuche mit verkürzten Keratin 14-Mutanten zeigten einen deutlicheren Einfluss von Verlusten am Amino-Ende als am Carboxy-Ende. Schäden am Amino-Ende verhinderten vor allem die Elongation des Filaments. Die seitlichen Anlagerungen waren hingegen weniger stark beeinträchtigt (Coulombe et al., 1990a). Die Fähigkeit zur Bildung von Homo- oder Heteropolymeren hängt bei Typ-IV-Intermediärfilamenten (α-Internexin, NF-L, NF-M, NF-H) von der Kopfdomäne der Intermediärfilaments ab. Das wurde durch Versuche mit Chimären Proteinen (Austausch der Kopfdomänen unter den Intermediärfilamenten) nachgewiesen (Ching et al., 1999). Bei *in vitro*-Studien der Filamentbildung von CK5/14 Keratinen, deren nicht-helikale Kopf- und/oder Schwanzdomänen entfernt wurden, ergab sich, dass die Schwanzdomänen zur Filamentstabilisation erforderlich, die Kopfdomänen von CK 5, aber nicht von CK 14 zur Filamentverlängerung und seitlichen Anlagerung notwendig sind und dass das α-helikale 7er-Repetitions-Motiv zur seitlichen Anlagerung, aber nicht zur Filamentverlängerung notwendig ist (Wilson et al., 1992).

Besonders bei Intermediärfilamenten mit sehr langen Schwanzdomänen, die als Heteropolymerisate vorzugsweise in die peripheren Teile des polymerisierten Filamentstranges eingelagert werden, ragen diese Schwanzdomänen offenbar nach außen aus dem Filament heraus und stehen so für eine Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten zur Verfügung – von sterischen Aufgaben über Phosphorylierungen bis hin zu sehr speziellen Interaktionen wie z.B. die des Synemins mit den Z-Streifen der Skelettmuskulatur (Herrmann et al., 1998, 2000a; Bellin et al., 2001).

Abschließend muss darauf hingewiesen werden, dass trotz der Unterschiede in der Primärstruktur der Intermediärfilament-Monomere die Intermediärfilament-Polymere sehr ähnlich sind in Bezug auf ihre räumlichen Dimensionen und physikalischen Eigenschaften (Herrmann et al., 1998).

1.3.2.3. Dynamik von Polymerisation und Depolymerisation

Die Polymerisation findet spontan ohne weitere Katalysatoren, Hilfsproteine oder Energielieferanten *in vivo* und *in vitro* statt, ist aber abhängig von der Konzentration und bestimmten Milieubedingungen (pH, Temperatur) (Shoeman et al., 1993).

In Fluoreszenzbleichversuchen wurde nachgewiesen, dass polymerisierte Vimentin-Intermediärfilamente über ihre ganze Länge aus einem Pool von gelösten tetrameren Untereinheiten relativ rasch in einem steady-state-System ausgetauscht werden (Vikstrom et al., 1992). In weiteren Fluoreszenzbleichversuchen wurde gezeigt, dass auch die

Neurofilamente reifer Neuronen innerhalb von 40 Minuten zu 50% ausgetauscht werden (Okabe et al., 1993).

Dieser dynamische Auf- und Abbau mit einem Fließgleichgewicht zwischen gelösten oligomeren Untereinheiten im Zytoplasma und polymerisierten unlöslichen Filamenten, der ständig unterschiedlichen, vermutlich erst zu einem kleinen Teil erfassten Funktionsabläufen angepasst wird, erfordert übergeordnete zelluläre Steuerungsmechanismen (Eriksson et al., 1992). Der bekannteste solcher Steuerungsmechanismen ist die Phosphorylierung, weiterhin können Glucuronidierung und Chromatinkontakt (bei Laminen) eine Rolle spielen. Posttransitional modifizierende Kinasen stellen mit ihrer phosphorylierenden Funktion bei vielen Zellfunktionen ein regulierendes Element dar. Bei Intermediärfilamenten findet nicht nur der Abbau der Lamine A und C (B bleibt davon unberührt) während der Mitose aufgrund einer Überphosphorylierung statt, auch andere Intermediärfilamente sind mit speziellen Domänen zur Phosphorylierung ausgestattet. Beim Vimentin kann die dazu notwendige Proteinkinase C durch die Anwesenheit des Gewebshormons Melatonin aktiviert werden (Benitez-King, 2000). Die Dephosphorylierung von Vimentin und damit die Verhinderung seines Abbaus erfolgt durch die Proteinphosphatase 2A bzw. ihre regulierende Untereinheit B55 (Turowski et al., 1999).

Die hohe Dynamik des Umbaus von Keratin-Intermediärfilamenten kann experimentell durch Modulation der Phosphorylisation beeinflusst werden (Paramio, 1999). Die Regulation des CK19 erfolgt durch Phosphorylierung eines Serin-Restes. Ser-35 ist der Hauptphosphorylierungsort von Keratin 19. Der Austausch mit Alanin mittels Transfektion führt zu einem Defekt bei der Filamentbildung (Zhou et al., 1999).

Auch bei dem neuen Intermediärfilament Nestin konnte nachgewiesen werden, dass die Umbauvorgänge während der Mitose durch Phosphorylierung mittels cdc2-Kinase gesteuert werden (Sahlgren et al., 2001).

1.3.2.4. Intrazellulärer Transport von Intermediärfilamenten

Durch Untersuchungen mit GFP's (Grün-Fluoreszierenden Fusionsproteinen) konnten in den letzten Jahren interessante Beobachtungen zur intrazellulären Bereitstellung von Untereinheiten zum Aufbau von Intermediärfilamenten gemacht werden. Vimentin-Partikel und kurze Vimentin-Fibrillen, sog. „Schnörkel" (engl. Squiggles), werden beim Zellwachstum mit schnellen, kurzen, sprungartig unterbrochenen Bewegungen überwiegend nach peripher, aber auch nach zentral transportiert. Dieser Transport ist offensichtlich an Motorproteine der Mikrotubuli (Kinesin / Dynein) gebunden. Ähnliches wurde für Keratin beobachtet, allerdings zentripetal und daher vermutlich mit dem Dynein-Motor verbunden. Da die Synthese der Intermediärfilamente eigentlich keine Kofaktoren benötigt, scheint es sich hier um logistische Vorgänge zu handeln, die Auf- oder Umbauvorgänge beschleunigen können (Liao et al., 1998; Chou et al., 2000; Chou et al., 2001; Yoon et al., 2001).

Auch der scheinbar langsame axonale Transport von im Zellkörper synthetisierten Neurofilamenten (Nixon, 1992, 1998) erwies sich als eine Kombination aus kurzen Phasen sehr schnellen Transports und aus längeren Pausen (Shah et al., 2000; Wang et al., 2000a).

Schließlich gibt es auch noch den sehr langsamen Transport großer Teile des Intermediärfilament-Zytoskeletts unbekannter Art, z.B. die juxtanukleäre Retraktion des

Vimentin-Netzwerkes in bestimmten Situationen und das Sammeln von Vimentin-Fraktionen an den Zentrosomen während der Mitose.

1.3.3. Klassifikation der Intermediärfilamente

1.3.3.1. Geschichte (Histogenetische Klassifikation)

Ausgangspunkt dieser Einteilung war die Beobachtung einer gewebespezifischen Expression der Intermediärfilamente in normalen Zellen. Auf dieser Grundlage wurden fünf Klassen beschrieben:

1. Keratin für Epithelien
2. Vimetin für mesenchymales Gewebe
3. Desmin für Muskelgewebe
4. Neurofilamente für neuronales Gewebe
5. GFAP für Neuroglia und Astrozyten

1.3.3.2. Die Superfamilie der Intermediärfilamente (Genetische Klassifikation, Evolution)

Nicht nur die Sekundärstruktur der Proteine, sondern auch die Struktur der Gene der Intermediärfilamente ist bemerkenswert konserviert geblieben (Position der Introns etc.), (Marchuk et al., 1984). Die Intermediärfilamente bestehen nach immunologischen und genetischen Untersuchungen aus einer Gruppe strukturell unterschiedlich eng verwandter Proteine. Die wegen dieser strukturellen Homologien der genetischen Sequenz mögliche Einteilung der Intermediärfilamente deckt sich nur teilweise mit der in der Einleitung geschilderten „alten“ histogenetischen Einteilung. Die Klassifikation der Intermediärfilamente und ihrer Subtypen gestaltet sich derzeit folgendermaßen: Die sauren Keratine (CK 9-20) bilden die Klasse I, die neutralen und basischen Keratine (CK 1-8) die Klasse II. Die eng verwandtem Intermediärfilamente Vimentin, GFAP (glial fibrillary acidic protein), Desmin und Peripherin sind die Repräsentanten der Klasse III, die drei Neurofilamente (H, M und L) sowie α-Internexin die der Klasse IV. Die Zellkern-Lamine (A, C und B), die erst nach Analyse ihrer Aminosäure-Sequenz den Intermediärfilamenten zugeordnet werden konnten (Franke, 1987), werden zur Klasse V zusammengefasst, während Nestin der bisher einzige bekannte Vertreter der Klasse VI ist (Lendahl et al., 1990). Einige Autoren folgen der Aufstellung einer sechsten Klasse nicht (Herrmann et al., 2000a). Auch die Linsen-Intermediärfilamente und einige andere neu entdeckte Intermediärfilamente sind bisher noch keiner Klasse zugeordnet.

Es wird angenommen, dass der entwicklungsgeschichtliche Urahn der Intermediärfilamente ein Lamin-ähnliches Protein war. Diese Annahme stützt sich auf umfangreiche gensequenzanalytische Arbeiten, die es erlauben, differenzierte Rückschlüsse auf die Evolution dieser Proteingruppe zu ziehen (Dodemont et al., 1990; Doring et al., 1990). Lamine unterscheiden sich von zytoplasmatischen Intermediärfilamenten durch eine längere, ca. 352 Aminosäuren enthaltende zentrale α-Helix, weiterhin durch ein Zellkern-Lokalisierungs-Signal (engl. NLS: nuclear lokalisation signal) und die CaaX-Box (s. 1.3.3.6.). Zunächst sind offenbar die beiden letztgenannten Merkmale verlorengegangen, dadurch entstanden primitive zytoplasmatische Intermediärfilamente mit „langem“ Mittelteil, wie sie heute noch in Invertebratenzellen zu finden sind. Als nächster Schritt, vor der dann einsetzenden Differenzierung, muss es zum Verlust von sechs Siebener-Windungen, also 42 Aminosäuren, im zentralen Anteil 1B gekommen sein, da alle Vertebraten-Intermediärfilamente hier nur noch ca. 310 Aminosäuren aufweisen (Dodemont et al., 1994). In der Klasse der Wirbeltiere erfolgte dann die dramatische Explosion der

Intermediärfilament-Klasse	Intermediärfilament	Anzahl Gene	Übliches Vorkommen
I	Saure Keratine (CK 9-20)	>15	Epithelien
II	Neutrale und basische Keratine (CK 1-8)	>15	Epithelien
III	Vimentin	1	Mesenchymale Zellen
	GFAP	1	Astrozyten, Glia-Zellen
	Desmin	1	Muskelzellen
	Peripherin	1	Differenzierte Neurone (PNS)
IV	Neurofilamente (H, M, L)	1	Neurone (ZNS), peripheres neuroendokrines System
	α-Internexin	1	Axone der meisten Neurone (ZNS)
V	Lamine A,C	1	Kernmatrix
	Lamin B1 Lamin B2	1 1	Kernmatrix
VI (?)	Nestin (IV/III*)	1	Neuronale Stammzellen, Muskel
Linse	Phakinin/CP49 (I?*)	1	Augenlinse
	Filensin (IV?*)	1	Augenlinse
Andere	Synemin (III/IV*) Paranemin (IV/I*) Syncoilin (III/IV*) Plasticin, Gelfiltin Tanabin, XNIF		Muskel Muskel Skelett- und Herzmuskel Sehnerv Goldfisch Xenopus
	(* = Sequenzhomologie zu genannter Klasse)		

Tabelle 1.1.: Übersicht über die Intermediärfilamentklassen

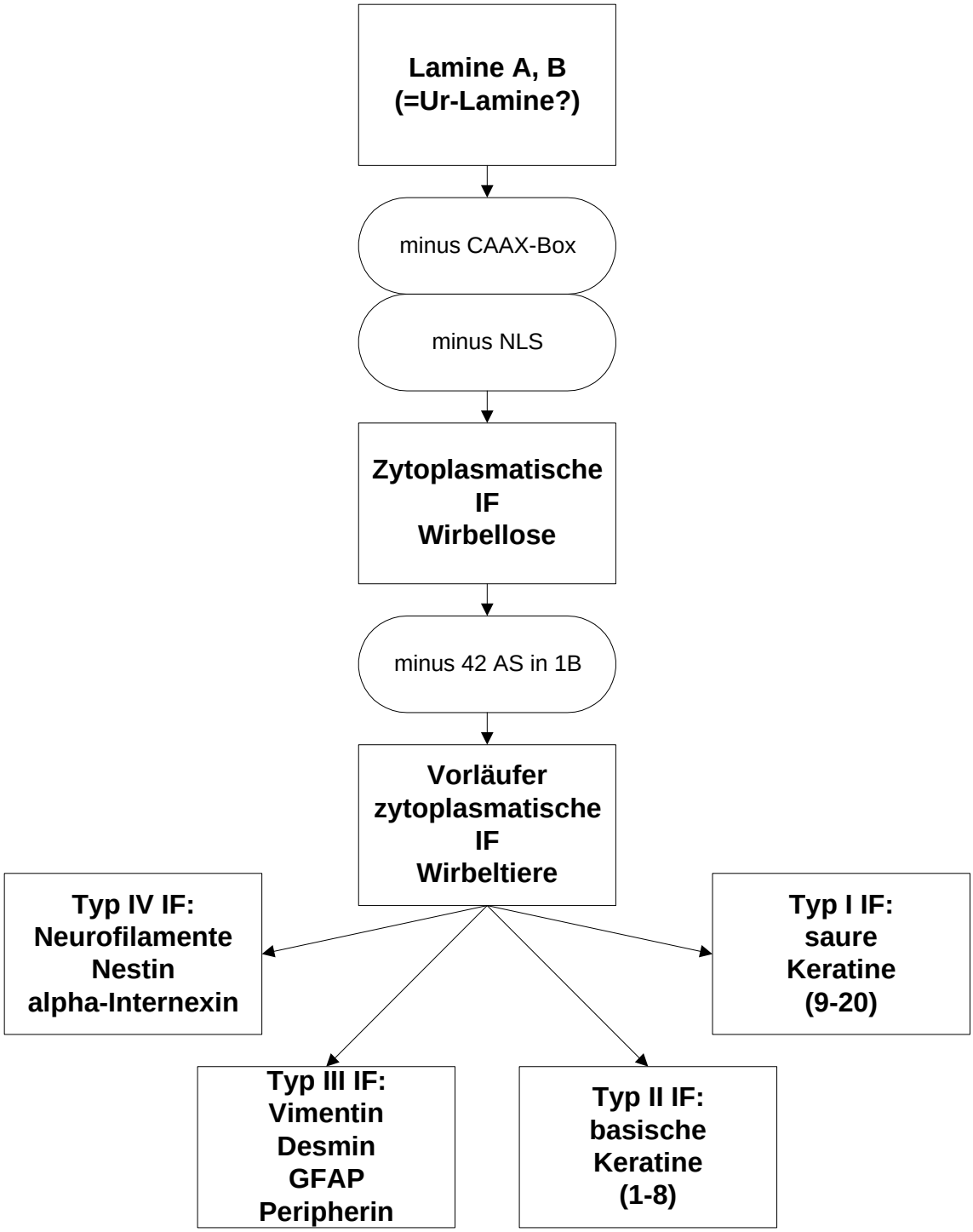


Abb. 1.2. Schema der genetischen Evolution der Intermediärfilamente

Intermediärfilamentproteinfamilie. Sie teilte sich in die Keratine, mit ihrer Besonderheit, nicht mit anderen Intermediärfilamentklassen zu polymerisieren, untereinander aber obligate Heteropolymere ihrer zwei Subklassen zu sein, und in Vimentin-ähnliche Intermediärfilamente. Letztere sind Homopolymerisate, können aber auch in ihrer Gruppe heteropolymerisieren. Aus dieser Gruppe hat sich dann schließlich durch Verlust bzw. Änderung der Intron/Exon-Struktur die Gruppe der neuronalen Intermediärfilamente abgespalten.

Die hohe Diversifikation der Intermediärfilament-Proteine im Gegensatz zu Aktin und Tubulin legt nahe, dass es unterschiedliche Bedürfnisse der Zytoskelettarchitektur zu befriedigen galt (Fuchs et al., 1983).

1.3.3.3. Intermediärfilamentklasse I und II: Der Katalog der Keratine

Keratin-Proteine bilden die größte und komplexeste Klasse der Intermediärfilamente. Sie werden in epithelialen Zellen des ganzen Körpers exprimiert, in denen sie ein Netzwerk bilden, das Plasmamembran, Kernmembran und weitere zytoskelettale Strukturen miteinander verbindet. Keratine sind schon in Mollusken nachweisbar. Der Wechsel von Organismen mit einem Exoskelett zu Organismen mit einem Endoskelett führte offensichtlich zu einem wesentlichen Wechsel bei den Keratinen: Die Keratine expandierten von einem einzelnen Gen zu einer multigenen Familie (Fuchs, 1995).

Die Differenzierung in ca. 20 verschiedenen Polypeptide mit unterschiedlichem relativen Molekülgewicht und isoelektrischen Punkt ist wohl – wie bereits für die Intermediärfilamente allgemein postuliert - mit einer Anpassung an unterschiedliche funktionelle Anforderungen zu erklären. Das erscheint insbesondere plausibel, wenn man die Variationen der einzelnen Keratine in Abhängigkeit vom Epitheltyp und der Epithellokalisation berücksichtigt (Smack et al., 1994).

Die Keratine lassen sich einerseits nach ihrer Expression in harte Epithelien (Haare, Nägel, Papillae Filiformes der Zunge) und in weiche Epithelien (allen anderen) unterscheiden.

Die wesentlichere Unterscheidung aber ist die nach ihrem isoelektrischen Punkt: Die Keratine lassen sich in eine basische (Typ II) und eine saure (Typ I) Subklasse unterteilen und trennen. Diese proteinchemische Klassifizierung ist anhand einer vergleichenden Untersuchung der Aminosäuresequenzen, inklusive der Differenzierung von Keratinen einfacher und komplexer Epithelien (s.u.) innerhalb beider Gruppen, exakt reproduzierbar.

Die Aufteilung in die beiden multigenen Unterfamilien der saueren und basischen Keratine ist unter evolutionären Aspekten seit der gesamten Wirbeltierevolution konserviert worden. Das gilt sowohl für die genetische Ebene als auch für die Ebene der Proteine und ist ein Indikator für die Bedeutung, die beide Keratintypen in Synthese und Struktur des Keratinfilaments haben (Fuchs et al., 1983).

Im Folgenden sollen ausschließlich die Keratine der weichen Epithelien beschrieben werden. Zur Klasse der sauren Keratine (Typ I) gehören die Keratine CK 9 bis 20, zur Klasse der basischen (Typ II) die Keratine CK 1 bis 8. Bei der Polymerisation zu Intermediärfilamenten zeigen Keratine – wie bereits erwähnt - eine Besonderheit: Sie können aus strukturellen Gründen beim ersten Polymerisationsschritt nur heteropolymere Keratinintermediärfilamente bilden, die aus je einem Vertreter beider Subklassen (Typ I und Typ II) bestehen. Sie sind also obligat heterogene Dimere. In jeder Epithelzelle findet sich deshalb mindestens ein Paar von Keratinpolypeptiden, oft sogar mehrere Paare. Die 12 Typ-I- und 8 Typ-II-Keratin-Monomere polymerisieren in bestimmten definierten Kombinationen, die gewebespezifisch und entwicklungsgesteuert sind. Dabei folgen die Muster der Keratinexpression bestimmten generellen Regeln, die für die meisten Epithelien vorhersagbar sind: Einschichtige Epithelien enthalten die Kombination aus CK 8/18, ggf. plus CK 7/19. Mehrschichtige Epithelien enthalten Kombinationen aus CK 1-6/9-17: So ist die Kombination aus CK 5/14 (ggf. plus15,19) typisch für alle komplexen Epithelien, die aus CK 1/10 für verhornende Epithelien, die aus CK 4/13 für die nicht-verhornenden Schleimhäute von Mund, Zunge und Oesophagus und die aus CK 3/12 für die

Kornea. Suprabasale Schichten mehrschichtiger Epithelien enthalten oft CK 1,2,9,10,11.(Moll et al., 1982; Nagle et al., 1985; Bosch et al., 1988; Nagle, 1988, 1994).

Die Keratine CK6/16 werden bei Wundheilungsvorgängen innerhalb weniger Stunden exprimiert, ersetzen die „normalen" Keratinintermediärfilamente und verbessern offensichtlich durch Reorganisation des Intermediärfilament-Zytoskeletts die Migrationsfähigkeit der Keratinozyten (s. auch 4.4.2.3.) (Paladini et al., 1996).

	Basische Keratine (Typ II)	Saure Keratine (Typ I)
Einschichtige Epithelien		
• Sekretorische Epithelien	8	18
• Intestinale Epithelien	8	18, 19
• Duktale Epithelien	7, 8	18, 19
Mehrschichtige Epithelien		
• Verhornendes Plattenepithel	1, 5	10, 14
• Nicht-verhornende Schleimhaut	4, 5	13, 14
• Kornea	3, 5	12, 14
• Suprabasale Schichten vieler Epithelien	1, 2	9, 10, 11
Wundheilung		
•	6	16

Tabelle 1.2: Keratin-Expression der verschiedenen Epithelien

Diese epitheltyp-charakteristischen Keratin-Muster wurden sogar als Hilfsmittel zur Diagnostik von Halslymphknotenmetastasen bei unbekanntem Primärtumor (sog. CUP-Syndrom, i.e. carcinoma of unknown primary) vorgeschlagen (Bartel-Friedrich et al., 2000).

Wie unabdingbar gesetzmäßig die Expression von Typ I-/ Typ-II-Keratinpaaren ist, zeigt die durch Transfektion erzwungene Expression eines Typ-II-Keratins in Fibroblasten: Sie kann die Expression eines endogenen Typ-I-Keratins auslösen. Dieser Effekt ist allerdings nicht umkehrbar. Die Autoren folgern, dass die Typ-I-Keratin-Expression von der Akkumulation nicht-polymerisierten Typ-II-Keratins abhängig sein könnte (Giudice et al., 1987).

Transfektionsexperimente zeigen weiterhin, dass der Verlust eines Typ-I-Keratins komplexer Epithelien (CK 14) nicht durch ein Typ-I-Keratin einfacher Epithelien (CK 18) ausgeglichen werden kann, weil das Keratin-Netzwerk aus CK 5/18 den mechanischen Belastungen einer Epidermiszelle nicht gewachsen ist (Hutton et al., 1998). Auch diese Experimente bestätigen, dass die hohe Differenzierung der Keratine sehr unterschiedliche Anforderungen der verschiedenen Epithelien widerspiegelt.

1.3.3.4 Intermediärfilamentklasse III

Die Gruppe der „klassischen Intermediärfilamente" Vimentin, Desmin und GFAP (Intermediärfilamentklasse III) zeigt untereinander starke strukturelle Ähnlichkeit. Alle Mitglieder sind prinzipiell in der Lage zu homopolymerisieren, bilden aber in vivo oft Heteropolymere mit kleinen Mengen von Intermediärfilamenten ihrer eigenen oder der Gruppe der neu entdeckten Intermediärfilamente (z.B. Desmin mit Paranemin und Synemin) .

Vimentin, das in allen Geweben mesenchymalen Ursprungs vorkommende Intermediärfilament, bildet wellige Netzwerke, die Kern- und Plasmamembran der Zellen verbinden (Ferrari et al., 1986). Die Kopfdomäne hat eine exklusive Affinität zum Zellkern, während die Schwanzdomäne Mikrotubulus-abhängig auf das Zytoplasma orientiert ist (Lowrie et al., 2000).

Desmin ist ein muskelspezifisches Intermediärfilament, das im Skelett-, in Herz- und glatter Muskulatur vorkommt. Es formt ein Gerüst um Myofibrillen mit vielen Verknüpfungen und mit Verbindungen zum Sarkolemm und der Kernmembran (Carlsson et al., 1999; Wang et al., 2000c). Desmin scheint daher die strukturelle Integrität der Muskulatur zu gewährleisten (Chou et al., 1997). Desmin ist ein wichtiger Marker für embryonale Rhabdomyosarkome (Altmannsberger et al., 1985).

GFAP kommt in Gliazellen und Zellen glialen Ursprungs vor, vor allem in reifen Astrozyten des ZNS, weiterhin in ependymalen Zellen, unreifer Oligodendroglia und den Schwann'schen Zellen des peripheren Nervensystems. Die Funktion scheint wie bei den anderen Intermediärfilamenten die Gewährleistung der mechanischen Integrität der Neuroglia zu sein. GFAP wird nach Trauma bei Wundheilungsvorgängen vermehrt exprimiert, und bei null-defizienten Mäusen wurde eine erhöhte Sensitivität für Verletzungen des zervikalen Rückenmarks bei plötzlichen Kopfbeschleunigungen festgestellt (Eng et al., 2000). GFAP ist ein wichtiger Marker für Glioblastome und Astrozytome (Tascos et al., 1982).

Peripherin kommt in differenzierten Neuronen des peripheren Nervensystems vor (Portier et al., 1983). Es kann sowohl homopolymerisieren als auch mit NF-L (aber nicht mit NF-M und NF-H) ko-polymerisieren (Beaulieu et al., 1999). Peripherin ist ein Marker für Neuroblastome (Foley et al., 1994). Es wurde auch in neuroendokrinen Hautkarzinomen, Melanomen und gutartigen Naevi in wechselnder Häufigkeit nachgewiesen (Kanitakis et al., 1998).

1.3.3.5. Intermediärfilamentklasse IV

Die drei Neurofilament-Proteine (NF-L, NF-M u. NF-H) machen einen signifikanten Anteil der zytoplasmatischen strukturellen Einheiten von Dendriten und Axonen aus. Die drei Proteine der Gruppe, das sog. Triplet, unterscheiden sich nach ihrem Molekülgewicht, nach dem sie auch benannt sind: „L“ für „light“, „M“ für „medium“ und. „H“ für „heavy“. Neurofilament-Intermediärfilamente sind aus den drei Proteinen NF-H, NF-M und NF-L im Verhältnis 1:2:6 zusammengesetzt und an Serin-Resten extensiv phosphoryliert (Lewis et al., 1985; Hisanaga et al., 1990).

Neurofilamente kontrollieren offenbar die Zunahme des axonalen Durchmessers nach Ausbildung neuer Synapsen im reifen Neuronen. Dabei dient NF-L als Ausgangspunkt, um den herum NF-M und NF-H das axonale Zytoplasma organisieren (Cochard et al., 1984; Marszalek et al., 1996).

α-Internexin ist hauptsächlich im reifen ZNS vorhanden (Fliegner et al., 1990). α-Internexin kommt auch während der Entwicklung des Nervensystems in großen Mengen in Neuronen vor und kann in der Differenzierungsphase in Axonen nach dem Auftreten von Vimentin, aber vor dem von NF-L nachgewiesen werden. α-Internexin unterstützt die Elongation von Axonen und damit die Ausbildung der neuralen Polarität der Neuriten. Sein Ausschalten führt darüber hinaus zur Verminderung der Zahl stabiler Mikrotubuli.(Shea et al., 1999). Eine Funktion als „Gerüst“ bei der Formierung des zytoplasmatischen NF-Zytoskeletts wurde ebenfalls

postuliert, konnte aber bei genetischen Deletionsversuchen nicht belegt werden (Levavasseur et al., 1999).

1.3.3.6. Intermediärfilamentklasse V: Lamine

Lamine sind die ursprünglichsten Intermediärfilamente (s. 1.3.3.2.) und bilden die Kernmatrix. Lamine können in die Typen A und B (B1 und B2) unterschieden werden. Typ C ist eine alternative Spleißvariante von Typ A (McKeon et al., 1986). Die Besonderheiten der Lamine sind ein verlängerter α-helikaler Mittelteil im Abschnitt 1B (s. 1.3.2.1.), ein Zellkern-Lokalisierungs-Signal (NLS, nuclear location signal) und mehrere Angriffspunkte für spezielle Phosphorylierungskinasen. Schließlich enthalten die B-Lamine und ein kurzlebiger A-Vorläufer an ihrer (Amino-) Kopfdomäne ein spezifisches Muster, die sog. CaaX-Box.. Die CaaX-Box, bekannt z.B. von ras-verwandten Proteinen, ist Ansatzpunkt für posttranslationale Modifikationen wie Proteolyse, Isoprenylierung und Methylierung. Kernlamine werden in mehreren Schritten posttranslational modifiziert.

Lamine verleihen dem Zellkern nicht nur mechanische Festigkeit, sondern stehen auch in Verbindung zu Interphase-Chromosomen und dem NPC (nuclear pore complex). Sie sind wichtig für den Wiederaufbau der Kernmembran nach der Mitose (Vorburger et al., 1989; Nigg, 1992a, b; Georgatos et al., 1994b).

1.3.3.7. Neu entdeckte Intermediärfilamente

Nestin, von den meisten Autoren der dafür neu definierten Klasse VI zugeordnet, ist ein Marker für neuronale Stammzellen (Lendahl et al., 1990), der auch in der Skelettmuskulatur (überwiegend transient) exprimiert wird (Sejersen et al., 1993). Nestin ist auch in vielen Tumoren des ZNS und malignen Melanomen nachweisbar (Florenes et al., 1994).

Als eine eigenständige Gruppe wurde die der Linsen-Intermediärfilmente definiert. Sie enthält die zwei Intermediärfilamente Filensin und Phakinin, die ausschließlich in der Augenlinse nachgewiesen wurden. Sie sind obligate Heteropolymere im Verhältnis 1:3. Filensin ist durch das Fehlen weiterer 29 Aminosäuren in seinem zentralen Abschnitt gekennzeichnet, während Phakinin Ähnlichkeiten mit den Typ I - Keratinen aufweist, aber kein carboxyterminales, nicht-alpha-helikales Endstück hat, d.h. ohne Schwanzdomäne ist (Gounari et al., 1993; Merdes et al., 1993; Georgatos et al., 1994a).

Synemin, zunächst als Intermediärfilament-assoziiertes Protein (IFAP, s. 1.3.4.2.) klassifiziert, stellte sich als außergewöhnlich großes Intermediärfilament heraus, dessen größter Teil aus einem sehr langen carboxyterminalen Ende besteht (Bilak et al., 1998; Bellin et al., 1999). Es ist einerseits obligat heteropolymerisierend mit Desmin und Vimentin und hat andererseits eine Bindungsstelle für das α-Aktinin der Z-Linien und stellt so vermutlich ein wichtiges Bindeglied dar (Bellin et al., 2001).

Auch Paranemin wurde zunächst für ein IFAP gehalten. Es kommt analog wie Synemin in Muskelzellen vor und heteropolymerisiert dort in kleinen Mengen mit Desmin bzw. Vimentin (Hemken et al., 1997). Neue Untersuchungen legen nahe, dass es wesentlich für die regelrechte Ausbildung und Organisation des Desmin-Netzwerkes ist (Schweitzer et al., 2001).

Syncoilin ist das jüngste neuentdeckte Intermediärfilament des Muskels: Es wurde an der neuromuskulären Verbindung, der motorischen Endplatte, zusammen mit alpha-Dystobrevin-1 (einem wichtigen Strukturprotein) lokalisiert, an das es offenbar gebunden ist. Es ist kann nicht homopolymerisieren und heteropolymerisiert wahrscheinlich mit Desmin und/oder Nestin (Newey et al., 2001).

Neuere, neuronale oder vimentinähnliche Intermediärfilamente sind das XNIF und das Tannabin, isoliert aus dem Frosch Xenopus, sowie das Plasticin und das Gelfiltin, beide vom Sehnerven des Goldfisches (Glasgow et al., 1992; Fuchs et al., 1994). Die exakte Zuordnung zu den bekannten Gruppen ist genauso wenig abgeschlossen wie die Bewertung, ob es sich um originär neue oder nur „Nicht-Säuger-Varianten" bekannter Intermediärfilamente handelt. So wird Plasticin wegen seiner Homologien zu Vimentin zwar den Intermediärfilamenten der Klasse III zugeordnet, ist aber obligat heteropolymerisierend (Asch et al., 2000).

1.3.4. Funktion der Intermediärfilamente

Die Frage nach der Funktion der Intermediärfilamente ist eng verbunden mit der Frage nach der Bedeutung der Diversifikation der Intermediärfilamente, die sowohl in Phylo- als auch Ontogenese als wesentliches Merkmal auffällt. Sie fällt zusammen mit einer Diversifikation und Differenzierung der Ursprungsgewebe, insbesondere der Epithelien. Die Hauptaufgabe der Intermediärfilamente ist offenbar, äußerlichen Belastungen der Zelle zu widerstehen und das Zytoplasma zu strukturieren, so wie es Lazarides schon 1980 hellsichtig postulierte (Lazarides, 1980).

1.3.4.1. Mechanische Integrität von Zelle und Gewebe

Die drei zellulären Filamentsysteme, d.h. die Mikrofilamente, die Mikrotubuli und die Intermediärfilamente, die den zytoplasmatischen Raum durchziehen und einen großen Anteil des gesamten Zellproteins ausmachen, gewährleisten gemeinsam die elastisch-mechanischen Eigenschaften des Zytoplasma-Gels und damit der Zelle. Sie können untereinander spezifisch interagieren, ihre Expression und Polymerisation ist aber weitgehend unabhängig voneinander reguliert. Einige Kompartimente der Zelle enthalten alle drei Filamenttypen, während andere Zellregionen nahezu exklusiv nur ein Filamentsystem enthalten. Diese Unterschiede in der Quantität und der räumlichen Verteilung sind offenbar funktional bedingt.

Die mechanische Integrität der Zelle wird durch die Kombination der unterschiedlichen viskoelastischen Eigenschaften der drei Filamentsysteme gewährleistet, in erster Linie durch die der Mikrofilamente (respektive Aktin) und die der Intermediärfilamente. Aktin bildet Netzwerke mit der größten Widerstandsfähigkeit gegen Scherbelastungen, reißt aber aber bei einer kritischen höheren, deformierend-mechanischen Belastung. Unter der Zelloberfläche eingesetzt, vereinbart es die Forderungen nach mechanischer Stabilität und dem Auflösen derselben zum Zweck der Lokomotion, Vesikel-Inkorporation usw..
Intermediärfilamente, im untersuchten Fall Vimentin, bilden Netzwerke mit ausreichender Flexibilität und hoher Reißfestigkeit auch unter Spitzenbelastungen und gewährleisten so die grundlegende Stabilität der Zellform. Als dreidimensionales Netz durch die Zelle gespannt, bilden sie so mit dem Aktin-Netzwerk ein ideales Verbundmaterial an Festigkeit und Flexibilität, das durch ein einzelnes System so nicht erreicht werden könnte. Die Mikrotubuli ergänzen dieses System durch ihre Steifheit (Janmey et al., 1991). Weiterhin kollabiert das Vimentin-Netzwerk bei Zerstörung der Mikrotubuli durch Tubulin-Antikörper. Offenbar ist

die Verbindung von Vimentin-Filamenten und Mikrotubuli wesentlich für das Ausspannen des Vimentin-Netzwerkes (Ho et al., 1998).

Ein holistischer Ansatz zum Verständnis des Zusammenwirkens der drei Filamentsysteme, der mittlerweile durch viele Experimente bestätigt wurde, ist die These der sog. „Tensegrity" (Ingber, 1993; Wang et al., 1993; Ingber, 1997). Sie postuliert, dass die verschiedenen Filamentsysteme gegeneinander verspannt bzw. vorgespannt sind und so eine höhere mechanische Stabilität erzielen, als es durch der Summe ihrer Einzelkomponenten möglich wäre. Dabei übernehmen die Mikrotubuli den Part des steifen Elements, dass durch Aktin- und Intermediärfilamente unter Zugspannung gesetzt wird. Jede Zelle ist in dieser Konstruktion zwischen Zug- und Druckkräften ausbalanciert, ähnlich wie Spannbeton-Konstruktionen in der Architektur. Die optimierte mechanische Stabilität ist aber nur einer der Vorteile dieser Konstruktion: Mechanische Belastungen, die an einem Teil der Oberfläche der Zelle angreifen, wirken so auf das Gesamtsystem und können Reaktionen am anderen Pol der Zelle auslösen (z.B. bei Endothelzellen). Vermittler zwischen extra- und intrazellulärer Mechanik sind die transmembranalen Integrine. Das Tensegrity-System stellt so ein mechanisches Signalsystem dar („Mechanotransduktion"), das bei Stimulation durch die extrazelluläre Matrix, durch Nachbarzellen oder durch anderen mechanischen Stress Vorgänge auslösen kann wie z.B. intrazelluläre Freisetzung von Ca-Ionen und Neurotransmittern (innerhalb von 1-2 ms), lokale Proteinsynthesen, Modulationen der extrazellulären Matrix (z.B. Vermehrung des Fibronectins) usw..

So wurden z.B. erhebliche, rasche Reorganisationen des Vimentin-Netzwerkes in Endothelien unter der Scherbelastung einer Flüssigkeitströmung nachgewiesen (Helmke et al., 2001).

Schließlich entscheidet die Zellform, die bei Epithelien durch die extrazelluläre Matrix wesentlich bestimmt wird, über genetische Programme im Spektrum von Differenzierung bis Apoptose, und die Zellform kann letztlich nur durch die mechanische Signalisierung des Zytoskeletts von der Zelle registriert werden (Chicurel et al., 1998; Chen et al., 1999; Wang et al., 2000b; Wang et al., 2001).

Bei T-Lymphozyten, die im Blutstrom zirkulieren, wird die dabei benötigte mechanische Steifheit durch einen sphärischen Vimentin-„Käfig" gewährleistet. Im Falle einer Aktivierung und vor einer Transmigration durch die Gefäßwand kollabiert dieses Vimentin-Gerüst im Rahmen der Zytokin-induzierten Polarisierung der Zelle in juxtanukläre Aggregate und führt so zu einem wesentlich flexibleren Zytoplasma (Brown et al., 2001a). Bei der Steuerung dieser Vorgänge spielt möglicherweise Plectin eine Rolle (Brown et al., 2001b).

Die Stützzellen des Corti-Organs, die die Haarzellen mit der Basalmembran verbinden, enthalten apikal und basal ausgedehnte Keratin-Netzwerke (CK 8, 18&19), welche die großen transzellulären Bündel von Mikrotubuli mit der Zelloberfläche verbinden, um die Übertragung mechanischer Kräfte von Zelle zu Zelle zu gewährleisten (Mogensen et al., 1998).

1.3.4.2. Intermediärfilament-assoziierte-Proteine (IFAP)

Damit die Intermediärfilamente die mechanischen Integration der Zelle vom Zellkern bis zur Zellmembran und im Kontext mit anderen Filamentsystemen gewährleisten können, müssen sie mit diesen Strukturen verbunden werden. Diese Aufgabe übernehmen die Intermediärfilament-assoziierten-Proteine (IFAP) (Wang, 1985).

Klasse	**Protein**	**Expressions-ort**	**In vivo Bindungs-partner**	**Intrazelluläre Lokalisation**
Intermediärfilament-bündelnde Proteine (exklusiv)	Filaggrin	Verhornende Epithelien	Keratine	Zytoplasma
	Trichohyalin	Differenzierende Keratinozyten in Haarfollikeln, Zunge	Keratine	Zytoplasma
Plakine	**Plectin**	Fast alle Zelltypen	Verschiedene Intermediärfilamente, Fodrin/Spectrin, Desmoplakin, Integrin , Aktin, Mikrotubuli	Zytoplasma (mit IFs), Sub-Plasma membran, Desmosomen, Hemidesmosomen, Fokale Kontakte
	Desmoplakin	Epithelien; Muskel	Keratin, Desmin	Desmosomen
			Vimentin, Plakoglobin, Plakophilin 1	Z-Linien Muskel
	BPAG1	Epithelien, Neuronen	Keratine, Neurofilamente	Hemidesmosomen
			F-Aktin, Mikrotubuli	Axonaler Cortex
Aktin-bindende Proteine	Fimbrin/Plastin	Alle sich teilenden Zellen	Vimentin-Untereinheiten	
			F-Aktin	
	Calponin	Muskel und viele andere Zelltypen	Desmin	Kolokalisiert mit F-Aktin oder Actomyosin
			F-Aktin, Myosin Tropomyosin, Caldesmon	
Andere	B-Kristalline	Linse, Muskel, Astrozyten	Vimentin	Zytoplasma
	HSP27		Peripherin	
	14-3-3 Proteine	Isoform-abhängig, verschiedene Zelltypen	Keratin	Zytoplasma, Zellkern
	Plakophilin 1	Komplexe Epithelien	Keratin	Desmosomen, Zellkern

Tabelle 1.3.: Übersicht IFAP (nach Coulombe et al., 2000)

Die wichtigste Gruppe wird aufgrund von Sequenzhomologien zur Familie der Plakine zusammengefasst: Zu ihr gehören Plectin, Desmoplakin, BPAG1 (Bullous Pemphigoid Antigen 1) und Envoplakin (Ruhrberg et al., 1997).

IFAP stellen einerseits Kreuzverbindungen zwischen Intermediärfilamenten selbst und andererseits zu den anderen zytoskelettalen Elementen, den Mikrofilamenten und den Mikrotubuli, her (Chou et al., 1997).

- Ein prominenter Vertreter dieser Gruppe ist das Plectin. Plectin ist ein sehr großes (580kDa), hantelförmiges, elastisches, homo-dimeres zytoplasmatisches Protein, das Intermediärfilamente mit Aktin-Filamenten, Mikrotubuli und Membranbestandteilen (Hemidesmosomen) flexibel verknüpft (Borradori et al., 1996; Steinbock et al., 1999). Weiterhin scheint es für die Verbindung des Desmin-Zytoskeletts an die Z-Streifen der Skelettmuskulatur verantwortlich zu sein (Schroder et al., 2000). Es sorgt für ein eine elastische Zugfestigkeit des dreidimensionalen Zytoplasmas. Ein Ausfall des Plectin-Gens führt zu Epidermiolyse und Muskeldegeneration bei Menschen und im Mäusemodell (Allen et al., 1999).
- Fimbrin beteiligt Vimentin durch Bildung von Komplexen am Aktin-abhängigen Zelladhäsionsgeschehen (Correia et al., 1999).

Zum Anderen vermitteln die IFAP die Verankerung der Intermediärfilamente an der Zellmembran . Die Verbindungen zur Zellmembran sind wichtig für die Definition der Zellform und deren Gewebefestigkeit (Djabali, 1999). Diese Verbindung wird (z.T. zelltypspezifisch unterschiedlich) hergestellt durch Desmoplakin mit Verbindung zu Desmosomen, BPAG1 mit Verbindung zu Hemidesmosomen, und weiterhin durch das Spectrin-Zellmembranskelett und durch die Proteine Ankyrin, Myosin und Plectin.

- Zwischen Desmoplakin und Typ-II-Keratinen höherer Epithelien (CK 1,2,5 und 6) konnte eine direkte chemischen Verbindung nachgewiesen werden (Carboxy-Ende-zu-Amino-Ende), die zu Typ-II-Keratine einfacher Epithelien, Typ-I-Keratine und Vimentin nicht besteht (Kouklis et al., 1994).
- Zur Bindung an Desmosomen sind neben Desmoplakin noch Plakoglobin und Plakophilin notwendig. Sie sind desmosomale Komponenten, die mit der aminoterminalen Kopfdomäne von Typ-II-Keratinen eine Verbindung herstellen. Desmoplakin und Plakoglobin lagern sich dabei an desmosomale Cadherine und aneinander an und bilden eine geordnete Struktur, an die dann die Keratin-Intermediärfilamente gebunden werden. Plakophilin kommt schlussendlich als molekulare Verstärkung hinzu (Smith et al., 1998).
- Das BPAG1 existiert in zwei Spleiß-Varianten (e und n), die in Epithelien oder Neuronen Keratin- respektive Neurofilamente an Hemidesmosomen binden. Beim Ausfall des BPAG1 kommt es zur Epidermiolyse bzw. neurologischen sensorischen Ausfällen (Guo et al., 1995).
- Die mechanische Verbindung von Keratinozyten zur Basalmembran wird unter anderem durch eine Plectin-vermittelte Verbindung von Keratinen zu Integrinen und damit zu Lamininen und Kollagen VII der extrazellulären Matrix erheblich verstärkt (Burgeson et al., 1997)

Intermediärfilamente und IFAP bilden im Zusammenwirken ein flexibles zelluläres Gerüst, das unterschiedlichsten Gewebetypen im ganzen Körper Unversehrtheit und mechanische Widerstandsfähigkeit verleiht (s. 1.3.4.1.). Entlang der Intermediärfilamente befinden sich zytoplasmatisch gelöste Filament-Untereinheiten, die an jedem Ort in die Filamente integriert werden können. Das ist die Basis für die raschen Wechsel in der Intermediärfilament-Organisation. Neben Phosphorylierungen (s. 1.3.2.3.) können auch die IFAP durch

Interaktionen mit den Intermediärfilamenten regulatorische Effekte auslösen (Übersichten: Houseweart et al., 1998; Coulombe et al., 2000)

1.3.4.3. Räumliche und funktionelle Organisation des Zytoplasmas

Die Intermediärfilamente gewährleisten nicht nur die mechanische Integrität der Zelle, sie sind darüber hinaus an der funktionellen Abgrenzung von Zellkompartimenten beteiligt, binden Funktionsproteine, Organellen und mRNA nicht nur, sondern halten sie auch vor, und sie spielen eine Rolle bei der Zellmotilität.

Bei Experimenten mit großen, fluoreszierenden Tracerpartikeln ist die Abgrenzung bestimmter Kompartimente des Zytoplasmas durch das Zytoskelett unter Beteiligung von Intermediärfilamenten festgestellt worden. Aus diesen Kompartimenten werden auch bestimmte Organellen ausgeschlossen (Luby-Phelps, 1994). Eine funktionelle Ursache dieser zytoplasmatischen Kompartimentierung liegt nahe. Diese Mechanismen tragen vermutlich zu der präzisen Steuerung der räumlichen und zeitlichen Verteilung von Ionen, Metaboliten, Makromolekülen und Organellen in der lebenden Zelle bei (Giuliano et al., 1995).

Die Transport- und Lokalisationsfunktionen des Zytoskeletts sind bei den Mikrotubuli bezüglich der Mitose bekannt, der Transport von mRNA und Ribosomen ist mit Mikrotubuli assoziiert. Neu hingegen sind Erkenntnisse darüber, dass kleine Ribonukleoproteine, sog. Prosomen, und die Proteinkinase C an Intermediärfilamente gebunden sind (Luby-Phelps, 1994). Bei Prosomen konnten das durch konfokale Mikroskopie bestätigt werden: sie sind, je nach Zusammensetzung ihrer Untereinheiten, vor allem perinukleär am Vimentin-Intermediärfilamentsystem lokalisiert (Arcangeletti et al., 2000). Auch ein Protein, das zur exozytischen Membranfusion notwendig ist, das SNAP23, wird an Vimentin temporär gebunden und bis zur Anwendung vorgehalten (Faigle et al., 2000). Der Golgi-Apparat wird in untersuchten Zellkulturen über das spezielle Protein FTCD (formiminotransferase cyclodeaminase) an das Vimentin-Netzwerk gebunden und von diesem in Position gehalten. Das FTCD hat regulierenden Einfluss auf die Ausformung des Vimentin-Netzwerkes (Gao et al., 2001). Die mRNA des Entzündungsmediators IL-1b wird in Monozyten an das Vimentin-Zytoskelett von Monozyten gebunden. Das dadurch erreichte subzelluläre Positionieren ist ein Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression und Translation. Somit ist diese Zytokin-Regulation gekoppelt an die Funktion und den Aufbau von Zytoskelett-Strukturen (Bocker et al., 2001).

Zellbewegung und Mitose erfordern eine exakt koordinierte Regulation des Auf- und Abbaus des Zytoskeletts. Für die Zellmotilität scheinen, neben dem Aktin-System, die dynamischen Eigenschaften des Intermediärfilament-Zytoskeletts eine Rolle zu spielen, da vimentin-null-mutante Fibroblasten eine eingeschränkte Motilität aufwiesen und Vimentin in in Wundheilungsvorgängen involvierten Fibroblasten hoch reguliert war (Gilles et al., 1999). Analoge Effekte wurden bei entsprechenden Versuchen mit Astrozyten ohne Intermediärfilamentskelett beobachtet (Lepekhin et al., 2001).

1.3.4.4. Protektive Effekte

Es wurde nachgewiesen, dass die Anwesenheit der Keratine 8/18 in einschichtigen Epithelien der Leber eine Resistenz gegen Tumor-Nekrose-Faktor vermittelte Apoptose gewährleistet und damit eine Resistenz gegen Lebertoxine darstellt. Keratin 8/18-defiziente Zellen sind

hundertmal sensitiver gegen TNF als normale Zellen. (Caulin et al., 2000; Inada et al., 2001; Marceau et al., 2001).

1.3.4.5. Erkenntnisse aus genetischen Manipulationen

Wesentliche Erkenntnisse über die Funktion und Bedeutung der Intermediärfilamente haben sich aus Beobachtungen genetischer Störungen oder Defekte ergeben. Das gilt sowohl für die experimentelle Seite, d.h. die gezielte genetische Manipulationen zur Unter- oder Überexpression von Intermediärfilament-Proteinen (Oshima, 1992) als auch für klinische Untersuchungen, d.h. die genetische Ursachenforschung bei bestimmten Erkrankungen vor allem der Haut (s. 1.3.4.6.)

Die große Bedeutung der Keratine für die mechanische Integrität der Zelle und der Zellverbände ergab sich aus Versuchen mit transgenen Mäusen (mit mutanten Keratinen), die phänotypisch eine verletzliche und zerreißliche, "epidermiolytische" Haut zeigten (Coulombe et al., 1991b). Zur selben Zeit wurde beschrieben, dass der Phänotyp transgener Mäuse mit CK10-Mutation wegen der suprabasalen Zellschädigungen dem von Patienten mit epidermiolytischer Hyperkeratose (EH) gleicht. Die Vermutung, dass bei diesen Patienten ein CK1/10-Defekt vorliegt (Fuchs et al., 1992), wurde erst später bestätigt (Yang et al., 1999) (s. 1.3.4.6.).

Die Expression von GFAP in Astrozyten bestimmt deutlich die Zellmorphologie (polygonal vs. sternförmig) und ist positiv durch TGF-beta-1 (transforming growth factor-beta1) und negativ durch FGF-2 (basic fibroblast growth factor) zu beeinflussen (Reilly et al., 1998). Astrozyten ohne Intermediärfilamente sind in ihrer Motilität so eingeschränkt, dass im Maus-Modell eine Narbenbildung nach Verletzungen des Gehirns und des Rückenmarks deutlich behindert ist (Lepekhin et al., 2001).

Muskulatur ohne Desmin entwickelt sich zunächst normal, wird dann aber wesentlich schwächer ausgebildet, ist bei Belastung weniger ausdauernd und neigt zu Degeneration. Das ergaben Versuche mit nullmutanten Mäusen. (Chou et al., 1997). Weiterhin wurde an nullmutanten Mäusen erhebliche Störungen der Positionierung und damit im Stoffwechsel von Mitochondrien festgestellt (Milner et al., 2000).

Bei Knockout-Mäusen ohne Neurofilament-H und /oder NF-M stellte sich heraus, dass NF-M entscheidend ist für den korrekten Axondurchmesser, während NF-H den regulären Aufbau von Typ-IV-Intermediärfilamente und den axonalen Transport von NF-L gewährleistet (Jacomy et al., 1999). Bei NF-M-nullmutanten-Mäusen kommt es alterungsabhängig zur Atrophie der Axone der lumbalen Vorderwurzeln. Neurofilamente haben also neben der zentralen Funktion des Bestimmens des Axondurchmessers offenbar auch eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Axonintegrität im Alterungsprozeß (Elder et al., 1999).

1.3.4.6. Zusammenhang mit genetisch bedingten Erkrankungen

Durch den weitverbreiteten Einsatz genetischer Manipulationen an Versuchstieren konnte in den letzten Jahren bewiesen werden, dass die Hauptfunktion der Intermediärfilamente der Widerstand gegen äußeren, mechanischen Stress ist. Bei Störungen dieses Systems ist die mechanische Belastbarkeit erheblich herabgesetzt (Fuchs, 1994). Offensichtliche Analogien führten zur Aufklärung der Ursache genetischer Erkrankungen, welche die Intermediärfilament-Proteine betreffen.

Beispiel für durch Mutationen in Keratin-Genen ausgelöste genetische Hautkrankheiten sind

- die Epidermiolysis bullosa simplex (EBS). Sie ist in allen Unterformen eine autosomal dominante genetische Erkrankung durch Mutationen der basalen epidermalen Keratine CK5/14 (Coulombe et al., 1991a; Chan et al., 1993; Chan et al., 1994a; Batta et al., 2000). Betrifft die Mutation nicht die stabförmigen Abschnitte, sondern die Verbindungselemente („Linker"), kommt es zu einer milderen Form der EBS, der Weber-Cockayne-EBS (Chan et al., 1994b)
- die Epidermiolytische Hyperkeratose (EH) mit Mutationen der suprabasalen Keratine CK 1/10 (Cheng et al., 1992; Yang et al., 1999).
- die Ichthyosis bullosa Siemens (IBS; CK2, CK1) (Whittock et al., 2001).
- die palmoplantare Keratose(Epidermiolytische palmoplantare Keratodermatose EPPK; K9) (Reis et al., 1994).
- die Pachyonichia congenita (PC; CK17, CK16, CK6a) (McLean et al., 1995).
- Der White Sponge Naevus (WSN; CK4/CK13) (Ness et al., 1998).
- Mutationen der Kornea-spezifischen Keratine CK3/CK12 führen zur degenerativen Meesmann'schen Korneadystrophie (Irvine et al., 1997).
- Mutationen in Haar-Keratinen hHb6 führen zur Erkrankung Monilethrix (Winter et al., 1997).

Myopathien konnten mit Defekten des Desmin-Intermediärfilamentsystems in Zusammenhang gebracht werden (Goebel et al., 1993; Goebel, 1995; Goebel et al., 2000; Banwell, 2001). Auch bei Kardiomyopathien wurde ein Zusammenhang mit Desmin-Mutationen berichtet (Bowles et al., 2000; Dalakas et al., 2000; Di Somma et al., 2000). Bei einem Patienten wurde eine Mutation von Desmin im Helixbereich des Intermediärfilaments festgestellt, die zu einer schweren Myopathie führte. *In vitro* war das mutierte Desmin nicht zur Bildung von Filamenten in der Lage (Munoz-Marmol et al., 1998).

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) hängt mit einem Defekt der Neurofilamente zusammen, die im Zellkörper und dem proximalen Axon kumulieren. Das konnte durch genetische Mausmodelle zumindest teilweise nachvollzogen werden (Beaulieu et al., 2000). Möglicherweise ist ätiologisch ein gestörter axonaler Transport verantwortlich (Collard et al., 1995), siehe auch 1.3.2.4. (Chou et al., 2001). Bei der Myasthenia gravis konnte als eines der Antigene, das durch Autoantikörper attackiert wird, das NF-M identifiziert werden (Schultz et al., 1999).

1.4. Fragestellung

Die Koexpression von Intermediärfilamenten in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes sollte untersucht werden, weil sich aufgrund einer Einzelfallbeobachtung (Vollrath et al., 1987) die Vermutung ergab, dass eine regelmäßige Koexpression von Intermediärfilamenten, die bis dato nur für Tumorgewebe anderer Lokalisation (s. 4.4.2.5.) beschrieben war, auch bei Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes zu finden sein könnte. In genanntem Einzelfall hatte ein sarkomartig differenzierter Tumor des Larynx, dessen Einordnung als Karzinom oder Sarkom schwierig war, bei der immunhistochemischen Untersuchung positive Reaktionen sowohl mit Keratin- als auch mit Vimentinantikörpern gezeigt.

Durch die vorliegende Arbeit sollten deshalb die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Kann die beobachtete Koexpression von Intermediärfilamenten als reproduzierbares Phänomen bestätigt werden?

2. Kann die Koexpression von Intermediärfilamenten darüber hinaus bei Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes regelmäßig nachgewiesen werden?

3. Kann das Auftreten einer Koexpression bestimmten Differenzierungsgraden von Tumoren in Form von typischen Mustern zugeordnet werden?

2. Material und Methoden

2.1.Material

2.1.1. Tumorgewebe

Das Tumorgewebematerial, das in der vorliegenden Untersuchung verwendet wurde, stammte von Patienten der Universitäts-HNO-Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen und - zum kleineren Teil - der Universitäts-HNO-Klinik der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Dabei handelt es sich zum einen um Frischmaterialproben aus Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes, die intraoperativ gewonnen wurden, und zum anderen um die dazugehörigen, formalinfixierten Eingangspräparate, die in das zuständige pathologische Institut zur Einsendung kamen. Tiefgefrorene und paraffineingebettete Proben aus dem Heidelberger Patientenkollektiv wurden vom Pathologischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität zur Verfügung gestellt.

2.1.1.1. Paraffineingebettetes Gewebe

Entsprechend konventioneller Methoden wurden die Operationspräparate im histologischen Eingangslabor nach dem Zuschnitt in ca. 1 x 2 x 0,5 cm große Proben 3 - 24 Stunden in 4%igem Formalin fixiert, danach mit Hilfe eines Autotechnikons (Fa. Shandon) in mehreren Schritten zunächst durch Inkubation in 70%igem, 95%igem und reinem Äthanol dehydriert und nach Durchlauf des Zwischenmediums Xylol in flüssiges Paraffin bei 56 °C überführt. Nach vollständiger Durchdringung der Proben durch das Paraffin (ca. 3 Stunden später) wurden sie in kleine Schalen eingebettet und härteten bei Raumtemperatur zu Blöckchen aus. Diese wurden in ein Schlittenmikrotom (Fa. Reichert & Jung) eingespannt. Nun wurden von ihnen ca. 3 - 4 µm dünne Schnitte angefertigt und im Wasserbad auf Objektträger, die zuvor mit Poly-L-Lysin (Sigma, # 1524) beschichtet worden waren, aufgezogen. Nach 12-stündiger Trocknung im Wärmeschrank bei 37°C (zur Verbesserung der Haftung der Schnitte auf den Objektträgern) erfolgte die Deparaffinierung in Xylol (10 min) und das Überführen in die wässrige Phase durch Passage einer in der Konzentration absteigenden Reihe von Alkohollösungen mit 100%igem, 95%igem und 70%igem Äthanol.

	Dauer	Prozess-Schritt
1.	3 – 24 h	Formalinfixierung
2.		Dehydration durch aufsteigende Alkoholreihe (Autotechnikon)
3.	> 3 h	Paraffinierung (Autotechnikon)
4.		Eingießen in Paraffinblöckchen
5.		Schneiden und Aufziehen auf Objektträger
6.	12 h	Trocknen im Wärmeschrank (37°C)
7.		Entfetten (Xylol), Rehydrierung durch absteigende Alkoholreihe (100%, 95%, 70%)

Tabelle 2.1.: Aufbereitung der formalinfixierten Gewebeproben

2.1.1.2. Tiefgefrorenes Gewebe

Intraoperativ gewonnene Frischmaterialproben von durchschnittlich 1 x 0,5 x 0,5 cm Größe wurden nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in Plastikbehältern mit Schnappdeckeln in einer -70°C-Gefriertruhe aufbewahrt. Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die Gewebeproben in der Kühlkammer des Kryostaten (Fa. Reichert & Jung) bei -20 °C mit einem Gel (tissue tec, Fa. Miles, # 4580) überschichtet und auf spezielle Objekthalter aufgefroren. Nach dem Schneiden in 7 µm dünne

Schnitte wurden diese mit einem raumtemperaturwarmen, äthanolentfetteten Objektträger vom Messer des Kryostaten abgenommen und 4 - 24 Stunden bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Danach wurde die Immunhistochemie durchgeführt. Falls die Weiterverarbeitung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen musste, wurden die Objektträger in Aluminiumfolie eingewickelt und bei -20°C zwischengelagert.

	Dauer	Prozess-Schritt
1.		Schockfrieren in flüssigem Stickstoff (-70°C)
2.		Aufbewahren im Plastikbehälter in Gefriertruhe (-70°C)
3.		Schneiden im Kryostaten, Aufschmelzen auf Objektträger
4.	4 – 24 h	Lufttrocknung
5.		Ggf. Zwischenlagerung in Aluminiumfolie in Gefriertruhe (–20°C)

Tabelle 2.2.: Aufbereitung der tiefgefrorenen Gewebeproben

2.2. Histopathologische Methoden

Histologische Schnitte der paraffineingebetteten Proben wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Von den Kryostatschnitten der Frischmaterialproben wurden ebenfalls Hämatoxylin-Eosin-Färbungen hergestellt und die benachbarten Schnitte anschließend immunhistochemisch mit Hilfe der APAAP- und (Doppel-)Immunfluoreszenzmethode verarbeitet.

2.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die (wie oben beschrieben) vorbereiteten Paraffinschnitte wurden zunächst 5 min in Hämatoxylin und anschließend nach 10 min Zwischenwässerung 30 sec in Eosin gefärbt. Nach erneuter Dehydration mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden sie in Xylol überführt und schließlich in Eukitt (Fa. Kindler) eingedeckt.

	Dauer	Prozess-Schritt
1.	5 min	Hämatoxylin
2.	10 min	Zwischenwässerung
3.	30 s	Eosin
4.		Dehydration mit aufsteigender Alkoholreihe (70%, 95%, 100%)
5.		Xylol
6.		Eindecken mit Eukitt

Tabelle 2.3.: HE-Färbung der formalinfixierten Gewebeproben

Bei Kryostatschnitten wurde die Inkubationsdauer auf 2 Minuten für Hämatoxylin und auf dreimaliges Eintauchen in Eosin verkürzt, das weitere Vorgehen war identisch.

	Dauer	Prozess-Schritt
1.	2 min	Hämatoxylin
2.	10 min	Zwischenwässerung
3.	3 x Tauchen	Eosin
4.		Dehydration mit aufsteigender Alkoholreihe (70%, 95%, 100%)
5.		Xylol
6.		Eindecken mit Eukitt

Tabelle 2.4.: HE-Färbung der tiefgefrorenen Gewebeproben

2.2.2. Grading

Das Grading wurde entsprechend WHO-Kriterien durchgeführt. Wegen der besser erhaltenen Gewebequalität wurden dazu histologische Schnitte von paraffineingebetteten, formalinfixierten Proben verwendet. Dabei wurde zum einen der Grad der plattenepithelialen Differenzierung, zum anderen der Grad der Verhornung bestimmt. Aus der Summe der zugewiesenen Punktwerte wurde die Einteilung in hoch-, mittel- und niedrigdifferenzierte Plattenepithelkarzinome vorgenommen (s. Tab. 2.5.). Karzinome, die weder eine Plattenepitheldifferenzierung zeigten noch adenomatöse Elemente aufwiesen, wurden den undifferenzierten Karzinomen zugeordnet.

Zugewiesene Punktwerte	Ausprägung der plattenepithelialen Differenzierung (D)	Ausmaß der Verhornung (V)
3	Hochdifferenziert	Stark Verhornt
2	Mittelgradig differenziert	Mäßig verhornt
1	Niedrig differenziert	Wenig verhornt
0	Undifferenziert	Nicht verhornt

Summe D und V	Grading
0	Undifferenziertes Karzinom
1-2	Niedrig differenziertes Plattenepithelkarzinom
3-4	Mittelgradig differenziertes Plattenepithelkarzinom
5-6	Hochdifferenziertes Plattenepithelkarzinom

Tabelle 2.5.: Kriterien für das Grading der Tumoren

2.2.3. Immunhistochemische Methoden

2.2.3.1. Antikörper (Primärantikörper)

- Keratinantikörper: KL1 (Viac et al., 1983) (Dianova, Hamburg) und lu-5 (von Overbeck et al., 1985) sind monoklonale Antikörper, die beide ein fast allen Keratinen gemeinsames Antigen erkennen und deshalb als sogenannte Pan-Keratin-Antikörper verwendet wurden. Sie reagieren mit allen Epithelien, wobei KL1 bei mehrschichtigen Epithelien nur mit den suprabasalen Zellen reagiert.
- Vimentinantikörper : Der monoklonale Antikörper V9 (Osborn et al., 1984) gegen Vimentin aus Augenlinsen vom Schwein und der polyklonale Meerschweinchenantikörper GP 110 (Osborn et al., 1982), der an Vimentin aus Kaninchenchondrozyten, das an Sepharose 4 B gebunden war, herstellerseitig affinitätsgereinigt worden war.
- Desminantikörper: Die monoklonalen Antikörper De-B-5, De-R-11 (Debus et al., 1983b) und De 33.
- Neurofilamentantikörper: Die monoklonalen Antikörper 2F11 (Dako, Hamburg) gegen das 68- und 160kD-Protein, NR 4 (Debus et al., 1983a) gegen das 68kD-Protein und N 52 (Shaw et al., 1986) gegen das 200kD Protein des Neurofilamenttriplets.
- GFAP-(Glial Fibrillary Acidic Protein)Antikörper: Der monoklonale Antikörper GA-5 (Debus et al., 1983a).

2.2.3.2. APAAP-Methode

Die APAAP-Methode ist eine hochsensitive Technik zum Markieren antigener Strukturen (Cordell et al., 1984). Deren Funktionsprinzip lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: Die antigene Zielstruktur wurden in einem ersten Schritt durch einen (sog. primären) Antikörper einer bestimmten Spezies, in diesem Fall der Spezies Maus, gebunden. Weiterhin

wurde das Enzym, das die abschließende Farbstoffreaktion katalysieren soll, ebenfalls mit einem gegen antigene Strukturen dieses Enzyms gerichteten Antikörper derselben Spezies, also auch Maus, gebunden. Es entstand ein Komplex aus dem Enzym alkalische Phosphatase und den gegen sie gerichteten Anti-alkalische-Phosphatase-Antikörpern. Dieser Komplex wurde als Fertigprodukt erworben. Sowohl dieser Enzym-Anti-Enzym-Komplex als auch der Komplex aus Zielantigen und primärem Antikörper enthielten also Immunglobulin ein- und derselben Spezies, nämlich der Maus. Verbunden wurden sie durch einen Antikörper, der spezifisch gegen Immunglobuline der verwendeten Spezies gerichtet war, in unserem Fall also Anti-Maus-Immunglobulin. Dieser Antikörper wurde Brückenantikörper genannt.

Nachdem der primäre Antikörper aufgetragen worden war, folgte zweitens der Brückenantikörper und drittens der APAAP-Komplex. Durch erneutes Auftragen von Brückenantikörper und APAAP-Komplex in einem vierten und fünftem Schritt wurde die Menge der an das Zielantigen angelagerten Enzymkomplexe weiter gesteigert.

Abschließend erfolgte die Markierung des Zielantigens durch einen Neufuchsinfarbstoffniederschlag, der durch eine Reaktion der alkalischen Phosphatase am Bindungsort katalysiert wurde.

Zur Anwendung der APAAP-Methode wurden im Einzelnen folgende Arbeitsschritte ausgeführt:

Die Kryostatschnitte wurden vor Beginn der Verarbeitung jeweils 30 min in Aceton (Merck # 14) und anschließend in Chloroform (Merck # 2445) fixiert, danach wurden die Schnittpräparate erneut getrocknet.

Bei den verwendeten Primärantikörpern handelte es sich ausschließlich um monoklonale Antikörper von der Maus gegen die fünf Intermediärfilamentklassen:

- KL1 und lu-5 gegen Keratin,
- V9 gegen Vimentin,
- De-B-5, De-R-11 und De 33 gegen Desmin,
- 2F11, NR 4 und N 52 gegen Neurofilamente und
- GA-5 gegen GFAP.

Zur Verdünnung der Primärantikörperlösungen wurde RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium, Fa. Seromed, #1640) (50 ml)(Moore et al., 1967), inaktiviertes Rinderserum (Albumin Fraktion V, Merck # 12018)(50 ml), Aqua bidestillata (450 ml) und Natriumazid (Merck # 6688) (0,5 g) gemischt und auf einen pH von 7,4 bis 7,6 eingestellt. Entsprechend einer zuvor durchgeführten Titratonsreihe wurden die Antikörperkonzentrate mit dieser Verdünnungslösung im Verhältnis 1:100 (KL 1), 1:50 (V 9) und 1:20 (alle übrigen Antikörper) gemischt.

	Dauer	Prozess-Schritt
1.		50 ml RPMI (Seromed #1640)
2.		50 ml inaktiviertes Rinderserum (Albumin Fraktion V, Merck #12018)
3.		450 ml Aqua bidestillata
4.		0,5g Natriumazid (Merck #6688)
5.		Mischen
6.		pH 7,4 bis 7,6 einstellen

Tabelle 2.6.: Verdünnungslösung für Primärantikörper

Diese Antikörpergebrauchslösungen wurden auf die (wie oben beschrieben) vorbereiteten Kryostatschnitte in einer Menge von je ca. 100 µl mit einer Pipette aufgetragen. Die Objekträger wurden bei Raumtemperatur für eine Inkubationsdauer von 30 min auf einem Tablett in einer feuchten Kammer, d.h. einem luftdicht abgeschlossenen Kasten, an dessen Boden eine Schale mit Wasser steht, aufbewahrt, um ein Antrocknen der Lösungen zu verhindern.

Nach diesem Arbeitsschritt wurden die Schnitte mit Spülpuffer zweimal vorsichtig abgespült. Die Herstellung des Spülpuffers erfolgte durch Lösen von 4,5 g Tris-Base (Sigma # T 1503), 34,25 g Tris-HCl (Sigma # T 3253) und 43,90 g NaCl (Merck # 6404) in 5000 ml aqua bidest und Einstellen auf einen pH von 7,4 bis 7,6. Anschließend wurde überschüssiger, die histologischen Schnitte seitlich überragende Spülpuffer vom Objektträger mit Papiertüchern abgenommen.

	Dauer	Prozess-Schritt
1.		4,5g Tris-Base (Sigma T #1503)
2.		34,25g Tris-HCl (Sigma T #3252)
3.		43,90g NaCl (Merck #6404)
4.		5000 ml Aqua bidest
5.		Mischen
6.		pH 7,4 bis 7,6 einstellen

Tabelle 2.7.: Spülpuffer

Als zweiter APAAP-Arbeitsschritt wurde der Brückenantikörper aufgetropft und die Schnitte erneut zur Inkubation für 30 min in die feuchte Kammer gestellt. Bei dem Brückenantikörper handelte es sich um einen polyklonalen Antikörper vom Kaninchen, der Mäuse-Immunglobulin erkennt (Dako # Z 259). Er wurde im Verhältnis 1:20 verdünnt mit der oben beschriebenen RPMI-Lösung, der zur Vermeidung von Hintergrundreaktionen (Kaninchen versus Human) inaktiviertes Humanserum im Verhältnis 1:8 zugesetzt wurde.

Nach erneutem Waschen mit Spülpuffer wurde als Drittes der APAAP-Komplex (Dako # D 651), der aus dem Enzym alkalische Phosphatase und monoklonalen Mäuseantikörpern gegen dieses Enzym bestand und mit RPMI-Lösung 1:50 verdünnt wurde, auf die Schnitte aufgetragen. Wiederum erfolgte eine dreißigminütige Inkubation in der feuchten Kammer. Anschließend wurden die letzten beiden Arbeitsschritte, d.h. die Inkubation mit Brückenantikörper und die Inkubation mit APAAP-Komplex, jeweils auf 10 min verkürzt wiederholt, um so durch eine baumartig verzweigte Anlagerung die an den Primärantikörper gebundene Enzymmenge zu erhöhen (sog. multistep method).

Zum Darstellen der Antigen-Antikörperbindungsreaktion wurden die Proben in einer Neufuchsin-Entwicklungslösung („fast red“) gefärbt. Es handelt sich um eine Azofarbreaktion von Naphtol und Neufuchsin unter Anwesenheit von Natriumnitrit, wobei das Naphtol das Substrat der Hydrolyse von Naphtol-AS-Biphosphat durch die alkalische Phosphatase war, sodass der Azofarbstoffniederschlag am Ort der an das Antigen gebundenen alkalischen Phosphatase erfolgte. Die Herstellung des Entwicklers musste immer unmittelbar vor der Verwendung erfolgen. Es wurde zunächst ein Entwicklungspuffer aus 175 ml aqua bidest, 8,7 g NaCl, 1,5 g Tris-HCl und 4,9 g Tris-Base angesetzt, der nach Hinzufügen von 62,5 ml Propandiol-Lösung (Merck # 801464) (21 g Propandiol auf 1000 ml aqua bidest) auf einen pH von 9,75 eingestellt wurde. Dann wurden 100 mg Levamisol (Sigma # L-9765) zugegeben. Als zweites wurden 50 mg Natriumnitrit (Merck # 102 F-0220) in 1250 aqua bidest

gelöst, anschließend 500 µl Neufuchsinlösung (Merck # 4040) (5g Neufuchsin auf 100 ml 2n HCl) hinzugefügt und diese Lösung nach exakt 60 Sekunden Reaktionszeit in den Entwicklungspuffer gegeben. Als drittes wurde eine Lösung aus 125 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat (Sigma # N 2250) und 1500 µl Dimethylformamid (DMF, Merck # 3034), die schon vorher angesetzt werden kann, hinzugefügt und die Lösung auf pH 8,8 eingestellt. Abschließend erfolgte eine Filtration der Entwicklungslösung und das Umfüllen in Küvetten, wobei ca. 80 ml für 8 Objektträger benötigt wurden. Die Schnitte wurden unter ständiger Bewegung in einem Rüttler in den Küvetten stehend 15 min entwickelt.

	Dauer	Prozess-Schritt
		Entwicklungspuffer ansetzen:
1.		4,9g Tris-Base (Sigma T #1503)
2.		1,5g Tris-HCl (Sigma T #3252)
3.		8,7g NaCl (Merck #6404)
4.		175 ml Aqua bidest
5.		Mischen
6.		62,5 ml Propandiol-Lösung (21g / 1000ml Aqua bidest)(Merck #801464)
7.		pH 9,75 einstellen
8.		100mg Levamisol lösen (Sigma #L-9765)
9.		50mg Natriumnitrit (Merck #102 F0220)
10.		In 1250ml Aqua bidest lösen
11.	60 s	500µl Neufuchsinlösung zugeben (5g / 100ml 2N HCl) (Merck #4040)
12.		In Entwicklungspuffer geben
13.		125mg Naphtol-AS-Biphosphat (Sigma #N 2250)
14.		In 1500µl Dimethylformamid (DMF, Merck #3034) lösen
15.		In Entwicklungspuffer geben
16.		pH 8,8 einstellen
17.		Filtrieren

Tabelle 2.8.: Neufuchsin-Entwicklungslösung „fast red“

Nach Spülen in Waschpuffer wurden die Schnitte 60 sek in Hämalaun zum Gegenfärben der Kerne getaucht und anschließend wieder gespült. Hämalaun besteht aus einer Lösung von 1 g Hämatoxylin (Merck # 4305), 0,2 g NaJ3 (Merck # 6225) und 50 g Kalialaun (Merck # 507 A 95744) in 1000 ml aqua bidest, der 50 g Chloralhydrat (Merck # 2425) und 1 g Zitronensäure (Merck # 244) zugesetzt werden.

	Dauer	Prozess-Schritt
1.		1g Hämatoxilin (Merck #4305)
2.		0,2g NaJ3 (Merck #6225)
3.		50g Kalialaun (Merck #507 A 95744)
4.		1000ml Aqua bidest
5.		Mischen
6.		50g Chloralhydrat (Merck #2425) zufügen
7.		1g Zitronensäure (Merck #244) zufügen

Tabelle 2.9.: Hämalaun

Abschließend wurden die Schnitte mit Deckgläsern unter Verwendung von im Wasserbad auf 50° C erhitztes Glycergel (Dako # C 488) blasenfrei eingedeckt.

Bei jedem Arbeitsgang wurden zum Erkennen einer eventuell unspezifischen Hintergrundfärbung eine Negativkontrolle mit verarbeitet, d.h. auf einen Schnitt wurde kein Primärantikörper, sondern nur das RPMI-Verdünnugsmedium, aufgetragen, die weitere Verarbeitung erfolgte genau gleich wie bei den übrigen Schnitten.

	Dauer	Prozess-Schritt
1.	30min	Fixieren der Schnitte in Aceton (Merck #14)
2.	30min	Fixieren der Schnitte in Chloroform (Merck #2445)
3.		Lufttrocknen der Schnitte
4.		Verdünnen der Primärantikörper mit RPMI-Lösung (s. Tab. 2.6.)
5.		100µl Primärantikörperlösung pro Schnitt
6.	30min	Inkubation in feuchter Kammer
7.	2mal	Spülen mit Spülpuffer (s. Tab. 2.7.)
8.		100µl Brückenantikörper pro Schnitt (1:20 verdünnt) (Dako #Z259)
9.	30min	Inkubation in feuchter Kammer
10.	2mal	Spülen mit Spülpuffer
11.		100µl APAAP-Komplex (1:50 verdünnt) (Dako #D651)
12.	30min	Inkubation in feuchter Kammer
13.	2mal	Spülen mit Spülpuffer
14.		100µl Brückenantikörper pro Schnitt (1:20 verdünnt)
15.	10min	Inkubation in feuchter Kammer
16.	2mal	Spülen mit Spülpuffer
17.		100µl APAAP-Komplex (1:50 verdünnt)
18.	10min	Inkubation in feuchter Kammer
19.	2mal	Spülen mit Spülpuffer
20.	15min	Entwicklung unter Bewegung im Rüttler (s. Tab. 2.8.)
21.	2mal	Spülen mit Spülpuffer
22.	60s	Hämalaun zum Kernfärben (s. Tab. 2.9.)
23.		Spülen mit Spülpuffer
24.		Eindecken mit Glycergel (Dako #C488)

Tabelle 2.10.: APAAP-Methode

2.2.3.3. Doppelimmunfluoreszenz

Die Doppelimmunfluoreszenz diente dazu, an einem einzigen histologischen Schnitt zwei verschiedene Antigene gleichzeitig und unterscheidbar markieren zu können.

Zur Anwendung kam dazu die indirekte Immunfluoreszenz, bei der die unmarkierten Primärantikörper durch Sekundärantikörper gebunden wurden, die mit fluoreszierenden Partikeln gekoppelt waren. Dazu mussten die Primärantikörper verschiedenen Spezies entstammen, damit sie von den Sekundärantikörpern unterschieden werden konnten. Diese Anti-IgG-Antikörper waren spezies-spezifisch. Gleichzeitig waren die Sekundärantikörper mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Agentien gekoppelt, sodass die Markierungen farblich unterscheidbar waren: das FITC enthielt Fluoreszein und leuchtet bei Anregung gelb-grün, das TRITC enthielt Rhodamin und leuchtet bei Anregung rot. Durch Wahl der passenden Wellenlänge des anregenden UV-Lichtes konnte jeweils das eine oder das andere Agens zur Fluoreszenz gebracht werden (Franke et al., 1978).

Vor Beginn der Verarbeitung wurden die Schnitte in -10° C kaltem Aceton 10 min lang fixiert und anschließend luftgetrocknet.

Als Primärantikörper wurden der monoklonale Keratin-Antikörper KL 1 von der Maus (Viac et al., 1983) (Dianova, Hamburg) und der polyklonale, affinitätsgereinigte Vimentin-Antikörper GP 110 vom Meerschweinchen (Osborn, Max-Planck-Institut, Göttingen) 1:10 mit PBS (phosphate buffered saline) verdünnt, miteinander gemischt (d.h. effektive Verdünnung 1:20) und auf die Schnitte mit einer Pipette aufgetropft. Es folgt eine Inkubation von 45 min bei 37° C in einer feuchten Kammer.

Als zweiter Antikörper gelangten von der Ziege stammende FITC-gekoppelte anti-Maus-IgG-Antikörper und TRITC-gekoppelte anti-Meerschweinchen-IgG-Antikörper (beide: Osborn, Max-Planck-Institut, Göttingen) zur Anwendung. Zur Vermeidung von Kreuzreaktionen waren die jeweils zweiten Antikörper zuvor an ungebundenem IgG der jeweils nicht zu erkennenden Spezies absorbiert worden. Unmittelbar vor der Anwendung wurden sie gemischt und 10 min bei 10000 U/min zum Abtrennen ungebundenen Fluoreszeins bzw. Rhodamins zentrifugiert. Dann wurden sie 1:10 mit PBS verdünnt.
Nach dem Waschen der Schnitte mit PBS und Abtupfen des überschüssigen Puffers vom Objektträgerrand wurden die zweiten Antikörper aufgetropft und eine Inkubationszeit von 30 min angeschlossen. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte in Moviol 4-88 (Hoechst, Frankfurt/M.) eingedeckt und bis zur Auswertung lichtabgeschlossen bei 4° C aufbewahrt.

Bei jedem Arbeitsgang wurde zur Negativkontrolle ein Schnitt ohne Primärantikörperauftrag mitverarbeitet.

	Dauer	Prozess-Schritt
2.	10min	Fixieren der Schnitte in Aceton bei –4°C
3.		Lufttrocknen der Schnitte
4.		Verdünnen der Primärantikörper mit PBS (1:10)
		Mischen der beiden Primärantikörper
5.		100µl Primärantikörperlösung pro Schnitt
6.	45min	Inkubation in feuchter Kammer bei 37°C
7.	2mal	Spülen mit PBS
	10min	Mischen und Zentrifugieren der Sekundärantikörper (10000U/min)
8.		100µl Sekundärantikörpermischung pro Schnitt (1:10 verdünnt)
9.	30min	Inkubation in feuchter Kammer
10.	2mal	Spülen mit PBS
11.		Eindecken mit Moviol 4-88 (Hoechst)
12.		Aufbewahren im Kühlschrank bei 4°C

Tabelle 2.11.: DIF-Methode

2.2.3.4. Einfach-Immunfluoreszenz

Zum Überprüfen der Koexpression mit Neurofilamenten konnte die Doppel-Immunfluoreszenz-Methode nicht eingesetzt werden, da keine Neurofilamentantikörper vom Meerschweinchen zur Verfügung standen, die Methode aber auf den Speziesunterschied der Primärantikörper angewiesen ist. Die Methode der ersatzweise durchgeführten (Einzel-) Immunfluoreszenz erfolgte analog zur beschriebenen Doppel-Immunfluoreszenz-Methode, mit der Einschränkung, dass der Primärantikörper vom Meerschweinchen und der rhodaminmarkierte Sekundärantikörper gegen Meerschweinchenimmunglobuline weggelassen wurde. Auch die

Absorption des Sekundärantikörpers an unspezifisches Immunglobulin der nicht zu erkennenden Spezies war natürlich nicht mehr nötig.

2.3. Auswertung und photographische Dokumentation

Zur Auswertung diente das Mikroskop Orthoplan (Leitz, Wetzlar). HE- und APAAP-gefärbte Präparate wurden in der Durchlichtmikroskopie beurteilt, Immunfluoreszenz-Präparate in der Auflichtmikroskopie. Histomorphologische Einordnung und positive Reaktionen in der Immunhistochemie wurden durch Fachärzte des Instituts mitbeurteilt. Die Stärke der Anfärbungen wurde entsprechend einer Bewertungsskala von „negativ“ bis „kräftig“ eingestuft.

negativ	0
schwach	1
mittel	2
kräftig	3

Tabelle 2.12.: Analoge Bewertungsskala für Stärke der (immun-)histochemischen Anfärbung.

Zur Fotodokumentation der Ergebnisse wurde ebenfalls das Mikroskop Orthoplan mit dem Fotoaufsatz Vario-Orthomat (beide: Leitz, Wetzlar) verwandt, als Kunstlicht-Diapositivfilm fand der Kodak EPY für die Durchlichtmikroskopie und als Tageslicht-Diapositivfilm der Kodak Ektachrome 400 (beide: Kodak Eastman) für die Fluoreszenzmikroskopie Verwendung.

Die bei den Abbildungen angegebenen Vergrößerungen ergeben sich aus Objektiv-vergrößerung x dem Faktor des Kameraaufsatztubus x der Vergrößerung von Filmformat auf die Druckvorlagengröße.

3. Ergebnisse

3.1. Routineuntersuchungen

3.1.1. Klinik

Von den insgesamt einundsechzig untersuchten Tumorproben stammten zweiundfünfzig aus Tumoren, die vor der Biopsie noch nicht radio- und/oder chemotherapiert worden waren (zumeist Operationspräparate) und neun von Patienten mit vorbehandelten Tumorrezidiven, bei denen ein Zustand nach Radio- und/oder Chemotherapie bestand. Drei Proben stammten von Patienten, denen bereits mit einem zeitlichen Abstand zuvor eine Biopsie entnommen worden war. In einem Fall handelte es sich bei diesem Probenpaar um einen unbehandelten Primärtumor und sein Rezidiv, in zwei Fällen um das erste und das zweite Rezidiv. Daraus ergibt sich, dass die einundsechzig Proben von insgesamt achtundfünfzig Patienten stammten.

3.1.2. Lokalisation

Die Lokalisation der Tumoren verteilte sich auf die anatomischen Regionen folgendermaßen: zweimal Nasennebenhöhlen, zwölf mal Mundhöhle, dreiundzwanzig mal Oropharynx, fünf mal Hypopharynx und dreizehn mal Larynx.

Lokalisation	Alle Tumoren	Nicht-therapierte Tumoren	Nach Radio-/Chemotherapie
Nasennebenhöhlen	2	2	0
Mundhöhle	12	10	2
Oropharynx	23	16	7
Hypopharynx	5	5	0
Larynx	13	13	0
CUP	6	6	0
Summe	61	52	9

Tabelle 3.1.: Tumorlokalisation

3.1.3. CUP

In 6 Fällen konnte bei zervikalen Lymphknotenmetastasen trotz Panendoskopie kein Primärtumor gefunden werden, d.h. es lag ein sog. CUP-Syndrom (carcinoma of unknown primary) vor.

3.1.4. Weitere klinische Angaben: Lebensalter und Staging

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Durchschnitt 54 Jahre alt, mit einer Standardabweichung von 13 Jahren. Zum Staging lagen folgende Angaben vor: Tumorgröße T_1 5%, T_2 12%, T_3 42% und T_4 41%, Lymphknotenmetastasen N_0 22%, N_1 41%, N_2 27% und N_3 10% und Fernmetastasen M_0 98% und M_1 2%.

3.2. Histologie des paraffineingebetteten Gewebes

Das Grading wurde, wie bereits erwähnt, wegen der besser erhaltenen Gewebequalität an histologischen Schnitten von formalinfixierten, paraffin-eingebetteten Proben durchgeführt. Dabei wurden das Ausmaß der plattenepitheloiden Differenzierung und der Verhornung getrennt, nach dem in 2.2.2. beschriebenen Schlüssel bewertet und, entsprechend der Summe der beiden Parameter, ein Differenzierungsgrad zugeordnet.

Das Grading ergab vierundfünfzig Plattenepithelkarzinome, die entsprechend ihres Differenzierungsgrads in drei Gruppen eingeteilt wurden: neun hochdifferenzierte, dreiunddreißig mittelgradig differenzierte und neun niedrig differenzierte Plattenepithelkarzinome. Neun Karzinome, die weder Plattenepitheldifferenzierung zeigten noch adenomatöse Elemente aufwiesen, wurden den undifferenzierten Karzinomen zugeordnet.

Bezogen auf den Status vor oder nach antineoplastischer Therapie ergaben sich für die Gruppe der nicht therapierten Tumore acht hochdifferenzierte, dreißig mittelgradig und zehn niedrig differenzierte Plattenepithelkarzinome sowie vier undifferenzierte Karzinome. In der Gruppe der vorbehandelten Rezidivtumore fanden sich ein hochdifferenziertes, drei mittelgradig und zwei niedrig differenzierte Plattenepithelkarzinome sowie vier undifferenzierte Karzinome. Es gab bezüglich der Verteilung der Lokalisation der Rezidivtumoren im Verhältnis zum Gesamtkollektiv der Proben keine Auffälligkeiten. Bezüglich ihres Grading fällt, wie zu erwarten war, auf, dass der Anteil undifferenzierter Karzinome bei ihnen deutlich höher ist (33% versus 15%).

Grading	**Alle Tumore**	Mittelwert (D+V)	**Nicht-therapierte Tumore**	Mittelwert (D+V)	**Nach Radio-/Chemotherapie**	Mittelwert (D+V)
Plattenepithel-karzinome	**53**		**48**		**6**	
Hochdifferenziert	8	5,80	7	5,70	1	6,00
Mittelgradig differenziert	33	3,39	30	3,40	3	3,33
Niedrig differenziert	12	1,67	10	1,80	2	1,00
Undifferenzierte Karzinome	**8**	*****	**5**	*****	**3**	*****
Summe	**61**		**52**		**9**	

Tabelle 3.2.: Grading der Tumoren
* Bei undifferenzierten Karzinomen ist die Summe aus D und V definitionsgemäß „0“.

Die Aufschlüsselung der verschiedenen Differenzierungsgrade auf die sechs nach Lokalisation gebildeten Gruppen ergab, dass die meisten niedrig differenzierten Plattenepithelkarzinome in Proben aus dem Oropharynx und der Mundhöhle gefunden wurden, die meisten undifferenzierten Karzinome im Oropharynx. Hochdifferenzierte Plattenepithelkarzinome fanden sich am häufigsten in der Mundhöhle, während mittelgradig differenzierte Plattenepithelkarzinome am häufigsten der Larynx und Oropharynx entstammten.

Lokalisation vs. Grading	Alle Tumoren	Nicht-therapierte Tumoren	Nach Radio-/Chemotherapie
Nasennebenhöhlen	**2**	**2**	**-**
Hochdifferenziert	-	-	-
Mittelgradig Differenziert	-	-	-
Niedrig Differenziert	-	-	-
Undifferenziert	2	2	-
Mundhöhle	**12**	**10**	**2**
Hochdifferenziert	4	3	1
Mittelgradig Differenziert	4	4	-
Niedrig Differenziert	4	3	1
Undifferenziert	-	-	-
Oropharynx	**23**	**16**	**7**
Hochdifferenziert	2	2	-
Mittelgradig Differenziert	13	10	3
Niedrig Differenziert	3	2	1
Undifferenziert	5	2	3
Hypopharynx	**5**	**5**	**-**
Hochdifferenziert	1	1	-
Mittelgradig Differenziert	3	3	-
Niedrig Differenziert	1	1	-
Undifferenziert	-	-	-
Larynx	**13**	**13**	**-**
Hochdifferenziert	1	1	-
Mittelgradig Differenziert	10	10	-
Niedrig Differenziert	2	2	-
Undifferenziert	-	-	-
CUP	**6**	**6**	**-**
Hochdifferenziert	-	-	-
Mittelgradig Differenziert	3	3	-
Niedrig Differenziert	2	2	-
Undifferenziert	1	1	-
Summe	**61**	**52**	**9**

Tabelle 3.3.: Grading in Bezug zur Lokalisation

3.3. Immunhistochemie des tiefgefrorenen Gewebes

Tiefgefrorenes Frischmaterialgewebe wurde zur immunhistochemischen Untersuchung verwendet, um die bestmögliche Epitoppräservation zu erreichen.. Bei den Titrationsversuchen der verschiedenen Primärantikörper, bei denen das Verdünnungsverhältnis ermittelt wurde, das die kräftigste Anfärbung des jeweiligen Antigens bei möglichst geringer unspezifischer Hintergrundfärbung ergab (Konzentrationen siehe unter "Material und Methoden", 2.2.1.), zeigte sich bei Anwendung der so ermittelten optimalen Konzentrationen am mituntersuchten

formalinfixierten Material eine teilweise oder vollständige Maskierung der Epitope, d.h. eine abgeschwächte oder gar keine Reaktion.

Die zur Untersuchung aller Proben eingesetzte APAAP-Methode bewährte sich als hochsensitiv und zugleich spezifisch. Auch geringen Antigenmengen entsprechende, schwächere Anfärbungen ließen sich eindeutig identifizieren, d.h. von der meist nur minimalen Hintergrundfärbung unterscheiden. Unspezifische Anfärbungen wurden als Trocknungsartefakte nur an den Rändern der histologischen Schnitte und manchmal im avitalen Zentrum aufgefalteter Verhornungsperlen der Plattenepithelkarzinome gesehen.

Die zur Verifikation der Koexpression von Keratin und Vimentin benutzte Doppel-Immunfluoreszenz-Methode ermöglichte zweifelsfrei den Nachweis einer echten, d.h. intrazellulären Ausprägung der zwei Intermediärfilamentsysteme durch die bei wiederholtem Wechsel des Auflichts erkennbare Doppelmarkierung einzelner Zellen. Die Hintergrundfärbung war, wie bei dieser Methode zu erwarten, deutlich kräftiger als bei der APAAP-Methode, ließ aber eine klare Unterscheidung zwischen positiver und negativer Reaktion zu.

Die zur Verifikation der Koexpression von Keratin und Neurofilamenten benutzte Immunfluoreszenz stellte bei identischen Primärantikörpern und unterschiedlichen Visualisierungstechniken eine zusätzliche Sicherheit dar, eventuelle falsch positive Reaktionen zu erkennen. Die Hintergrundfärbung war bei der Immunfluoreszenz deutlich stärker und die Deutlichkeit der Markierung schwächer als bei der APAAP-Methode.

3.3.1. Plattenepithelkarzinome

3.3.1.1. Keratin

Alle untersuchten Plattenepithelkarzinome zeigten eine deutliche positive Reaktion mit den beiden Keratin-Antikörpern KL1 und lu-5, was ihrem epithelialen Charakter entspricht. Dabei erwies sich die Markierung von Tumorgewebe durch KL1 durchweg als stärker und homogener als die mit lu-5, obwohl KL1 im Gegensatz zu lu-5 am normalen Plattenepithel nicht mit der Basalzellschicht reagiert. Die heterogene Färbung durch lu-5 war auch insofern uneinheitlich, als manchmal überwiegend periphere, basale Tumorzellen, manchmal mehr zentrale und aus-differenzierte Areale markiert wurden.

Unterscheidet man die verschiedenen Differenzierungsgrade, zeigt sich, dass mit abnehmender plattenepithelialer Ausprägung auch die Intensität der Anfärbung mit beiden Antikörpern abfällt, wobei dies bei lu-5 deutlicher ausgeprägt ist. Im Fall eines mittelgradig differenzierten Plattenepithelkarzinoms reagierte lu-5 sogar negativ, KL1 hingegen wies eine schwach positive Reaktion auf.

	KL1	lu-5
Hochdifferenzierte Plattenepithelkarzinome	2,6	2,4
Mittelgradig differenzierte Plattenepithelkarzinome	2,3	1,6
Niedrig differenzierte Plattenepithelkarzinome	2,3	1,5

Tab. 3.4.: Durchschnittliche Stärke der Reaktion mit Keratin-Antikörpern auf einer analogen Bewertungsskala von 0=negativ, 1=schwach, 2=mittel bis 3=kräftig.

3.3.1.2. Vimentin

In zwölf der dreiundfünfzig Plattenepithelkarzinome fand sich eine verschieden starke und unterschiedlich konfigurierte positive Reaktion des Vimentinantikörpers V9 mit Tumorzellen. Dieses Ergebnis wurde mit Hilfe des Antikörpers GP110 in der Doppelimmunfluoreszenz

überprüft: Bei zwei Proben konnte die Koexpression mit dieser Methode nicht dargestellt werden, sie wurden deshalb als negativ gewertet. Somit ergab sich eine Koexpression von Keratin- und Vimentinintermediärfilamenten in zehn von dreiundfünfzig Proben.

Der Anteil der vimentinpositiven Zellen war unterschiedlich: In drei Proben waren nur einzelne Zellen oder kleine Tumorzellnester positiv, also insgesamt weniger als fünf Prozent aller Tumorzellen. Es handelte sich dabei ausnahmslos um mittelgradig differenzierte Plattenepithelkarzinome. Bei den übrigen sieben Proben lag der Anteil zwischen fünf und zwanzig Prozent aller Zellen. Das war charakteristisch für die niedrig differenzierten, aber im Besonderen auch für die hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinome (s. auch Tabelle 3.5., Spalte 5 und 6).

Es ließen sich morphologisch zwei Koexpressionsmuster voneinander abgrenzen, die dem histologischen Differenzierungsgrad zugeordnet werden konnten:

- Das erste fand sich fast ausschließlich in den hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinomen (3 von 8 = 38%), die anteilig die höchste Koexpressionsrate aufwiesen (mit der Ausnahme eines einzigen mittelgradig differenzierten Plattenepithelkarzinoms): vimentinpositive Zellen waren dabei nur im Bereich der Basalzellschicht, d.h. an der Invasionsfront der Karzinomzungen, nachweisbar. Die vimentinpositive Zellschicht war ein bis zwei Zellagen stark, alle weiter suprabasal gelegenen Zellen inklusive der ausdifferenzierten zentralen Verhornungsbezirke waren vimentinnegativ.
- Das zweite fand sich bei den Karzinomen der beiden anderen Differenzierungsgrade. Mittelgradig und niedrig differenzierte Plattenepithelkarzinome wiesen seltener (5 von 33 = 15% bzw. 2 von 12 = 17%) und ohne erkennbare strukturelle Regel eine Koexpression auf, die sich meist in einzelnen Zellen oder kleinen Zellgruppen heterogen manifestierte.

Überraschenderweise zeigten also gerade die hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinome am häufigsten eine Koexpression, die zudem noch in einer sehr spezifischen Weise stattfand.

	Anzahl insgesamt	Anzahl Vimentin-positiv	Prozent Vimentin-positiv	V9*	GP110*	Verteilung
Hochdifferenzierte Plattenepithelkarzinome	8	3	38%	2,0	2,0	basal
Mittelgradig differenzierte Plattenepithelkarzinome	33	5	15%	1,5	1,25	fokal, diffus
Niedrig differenzierte Plattenepithelkarzinome	12	2	17%	2,0	1,5	diffus
Alle Plattenepithelkarzinome	53	10	19%	1,75	1,52	

Tabelle 3.5.: Koexpression von Vimentin in Plattenepithelkarzinomen
* Durchschnittliche Stärke der Reaktion mit Vimentin-Antikörpern auf einer analogen Bewertungsskala von 0=negativ, 1=schwach, 2=mittel bis 3=kräftig.

3.3.1.3. Neurofilamente

Bei sieben der dreiundfünfzig Plattenepithelkarzinome zeigten sich positive Reaktionen von mindestens einem der drei Neurofilamentantikörper unter Verwendung der APAAP-Methode. Allerdings konnte in drei Fällen bei der Kontrolluntersuchung in der Immunfluoreszenz dieser Nachweis von Neurofilamenten nicht bestätigt werden, sodass sie deshalb als negativ gewertet wurden.

Am Häufigsten zeigten sich positive Reaktionen mit dem Antikörper NR 4, der spezifisch für NF-L ist. N52 war in einer Probe positiv, während 2F11 keine positiven Reaktionen zeigte.

In keinem Fall wiesen mehr als 5% der Tumorzellen eine Neurofilamentreaktivität auf. Die Häufigkeitsverteilung, bezogen auf den Differenzierungsgrad ist bei so geringen Fallzahlen nur insofern interpretierbar, als dass alle Differenzierungsgrade, einbezogen sind. Auch hier findet sich teilweise das Muster der basalen und parabasalen Koexpression, ohne allerdings auf die hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinome beschränkt zu sein.

	Anzahl insgesamt	Anzahl NF-positiv	Prozent NF-positiv	NR4*	2F11*	N52*	Verteilung
Hochdifferenzierte Plattenepithelkarzinome	8	1	13%	1,0	-	-	fokal
Mittelgradig differenzierte Plattenepithelkarzinome	33	1	3%	1,0	-	-	basal
Niedrig differenzierte Plattenepithelkarzinome	12	2	17%	2,0	-	2,0	basal, fokal
Alle Plattenepithelkarzinome	53	4	7%				

Tabelle 3.6.: Koexpression von Neurofilamenten in Plattenepithelkarzinomen
* Durchschnittliche Stärke der Reaktion mit Neurofilament-Antikörpern auf einer analogen Bewertungsskala von 0=negativ, 1=schwach, 2=mittel bis 3=kräftig.

3.3.1.4. Desmin

In keiner der dreiundfünfzig Plattenepithelkarzinomproben konnte mit den verwendeten Antikörpern eine Reaktion gegen Desmin nachgewiesen werden.

3.3.1.5. GFAP

Auch gegen GFAP konnte mit keinem der verwendeten Antikörper eine Reaktion in den dreiundfünfzig Plattenepithelkarzinomproben nachgewiesen werden.

3.3.2. Undifferenzierte Karzinome

3.3.2.1. Keratin

Alle acht undifferenzierten Karzinome exprimierten Keratin, nachgewiesen durch positive Reaktionen mit den Keratin-Antikörpern KL 1 und lu-5. Allerdings war der Anteil der Keratin-positiven Zellen und die Intensität der Anfärbung deutlich geringer als bei den Plattenepithelkarzinomen. In zwei Proben war sogar gar keine Reaktion mit dem Antikörper lu-5 zu verzeichnen.

	KL1	lu-5
Undifferenzierte Karzinome	1,6	0,8

Tab. 3.7.: Durchschnittliche Stärke der Reaktion mit Keratin-Antikörpern auf einer analogen Bewertungsskala von 0=negativ, 1=schwach, 2=mittel bis 3=kräftig

3.3.2.2. Vimentin

In ihrem Koexpressionsmuster unterschieden sich die undifferenzierten Karzinome deutlich von den Plattenepithelkarzinomen: Sie zeigten zu einem sehr hohen Anteil (75%) eine diffuse Koexpression mit stärker ausgeprägter Reaktivität. Der Anteil der vimentinpositiven Zellen war viel höher als bei den Plattenepithelkarzinomen und überstieg teilweise den der ausschließlich keratinpositiven Zellen. Nur bei zwei Tumorproben waren lediglich ca. 5% der Zellen

vimentinpositiv, bei einer Probe waren ca. 35% und bei drei Tumorproben waren mehr als 50% der Zellen vimentinpositiv.

	Anzahl insgesamt	Anzahl Vimentin-positiv	Prozent Vimentin-positiv l	V9*	GP110*	Verteilung
Undifferenzierte Karzinome	8	6	75%	2,3	2,3	diffus

Tabelle 3.8.: Koexpression von Vimentin in undifferenzierten Karzinomen
* Durchschnittliche Stärke der Reaktion mit Vimentin-Antikörpern auf einer analogen Bewertungsskala von 0=negativ, 1=schwach, 2=mittel bis 3=kräftig.

3.3.2.3. Neurofilamente

Ein Karzinom zeigte eine positive Reaktion mit dem Neurofilament-Antikörper N 52, der phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes NF-H erkennt. Diese Koexpression fand sich in ungefähr 25% der Zellen und zeigte ein heterogenes Muster; sie ließ sich sowohl mit der APAAP-Methode als auch durch Immunfluoreszenz nachweisen.

	Anzahl insgesamt	Anzahl NF-positiv	Prozent NF-positiv	NR4*	2F11*	N52*	Verteilung
Undifferenzierte Karzinome	8	1	12,5%	-	-	2,0	diffus

Tabelle 3.9.: Koexpression von Neurofilamenten in undifferenzierten Karzinomen
* Durchschnittliche Stärke der Reaktion mit Neurofilament-Antikörpern auf einer analogen Bewertungsskala von 0=negativ, 1=schwach, 2=mittel bis 3=kräftig.

3.3.2.4. Desmin

Drei Karzinomproben zeigten eine positive Reaktion mit Desmin-Antikörpern. Eine Probe von diesen dreien reagierte nur mit De-B-5, die anderen beiden auch mit De-D-33 und De-R-11. Der Anteil der desminpositiven Zellen lag bei über 50%, das Verteilungsmuster war diffus.

	Anzahl insgesamt	Anzahl Desmin-positiv	Prozent Desmin-positiv	De-B-5*	De-R-11*	De 33*	Verteilung
Undifferenzierte Karzinome	8	3	38%	1,7	1,0	1,0	diffus

Tabelle 3.10.: Koexpression von Desmin in undifferenzierten Karzinomen
* Durchschnittliche Stärke der Reaktion mit Desmin-Antikörpern auf einer analogen Bewertungsskala von 0=negativ, 1=schwach, 2=mittel bis 3=kräftig.

3.3.2.5. GFAP

Gegen GFAP konnte mit keinem der verwendeten Antikörper eine Reaktion in den acht undifferenzierten Karzinomen nachgewiesen werden.

3.3.3. Therapierte Rezidivtumoren

3.3.3.1. Morphologie

Die insgesamt neun Rezidivtumor-Proben, die alle aus durch Bestrahlung und/oder Chemotherapie vorbehandelten Tumoren stammten, ließen sich histomorphologisch in ein hochdifferenziertes, drei mittelgradig differenzierte und zwei niedrig differenzierte Plattenepithelkarzinome sowie in drei undifferenzierte Karzinome unterscheiden.

	Plattenepithelkarzinome			Undifferenzierte Karzinome
	Hochdifferenziert	Mittelgradig differenziert	Niedrig differenziert	
Anzahl	1	3	2	3

Tabelle 3.11.: Morphologie der Rezidivtumoren

3.3.3.2. Keratin

Alle Rezidivtumoren waren durch eine eindeutige Keratinexpression als Karzinome zu identifizieren. Wie bei allen anderen Gruppen war auch hier die Anfärbung durch lu-5 etwas schwächer als die durch KL1.

	KL1	lu-5
Rezidive	2,2	1,6

Tab. 3.12.: Durchschnittliche Stärke der Reaktion mit Keratin-Antikörpern auf einer analogen Bewertungsskala von 0=negativ, 1=schwach, 2=mittel bis 3=kräftig

3.3.3.3. Vimentin

Vier Rezidivtumorproben zeigten eine diffuse Reaktion mit Vimentinantikörpern.

	Anzahl insgesamt	Anzahl Vimentin-positiv	V9*	GP110*	Verteilung
Rezidive	9	4	2,0	0,9	diffus

Tabelle 3.13.: Koexpression von Vimentin in Rezidiven
* Durchschnittliche Stärke der Reaktion mit Vimentin-Antikörpern auf einer analogen Bewertungsskala von 0=negativ, 1=schwach, 2=mittel bis 3=kräftig.

3.3.3.4. Neurofilamente

In einer der Rezidivtumorproben, die eine Koexpression mir Vimentin zeigten, konnte zusätzlich eine Expression mit Neurofilamenten durch die Antikörper NR4 und N52 nachgewiesen werden.

	Anzahl insgesamt	Anzahl Neurofilament-positiv	NR4*	N52*	Verteilung
Rezidive	9	1	1,0	1,0	diffus

Tabelle 3.14.: Koexpression von Vimentin in Rezidiven
* Durchschnittliche Stärke der Reaktion mit Vimentin-Antikörpern auf einer analogen Bewertungsskala von 0=negativ, 1=schwach, 2=mittel bis 3=kräftig.

3.3.3.5. Desmin

In einer weiteren vimentinpositiven Rezidivtumorprobe konnte eine zusätzliche Koexpression von Desmin durch den Antikörper De-B-5 nachgewiesen werden.

	Anzahl insgesamt	Anzahl Desmin-positiv	De-B-5*	Verteilung
Rezidive	9	4	3,0	diffus

Tabelle 3.15.: Koexpression von Desmin in Rezidiven
* Durchschnittliche Stärke der Reaktion mit Vimentin-Antikörpern auf einer analogen Bewertungsskala von 0=negativ, 1=schwach, 2=mittel bis 3=kräftig.

3.3.3.6. GFAP

Gegen GFAP konnte mit keinem der verwendeten Antikörper eine Reaktion in den neun Rezidivtumoren nachgewiesen werden.

3.3.3.7. Veränderung des Koexpressionsmusters nach Therapie

Insgesamt in drei Fällen konnten Proben vor und nach einer Radio-/ Chemotherapie untersucht werden. Einmal handelte es sich dabei um einen Primärtumor und sein Rezidiv, zweimal um erstes und zweites Rezidiv eines Tumors. Bei zwei Rezidiven war histomorphologisch eine deutliche Entdifferenzierung festzustellen, im dritten Fall war schon die erste Probe ein undifferenziertes Karzinom. Bei allen drei Proben trat erst beim Rezidiv erstmalig eine Koexpression auf: jedes Mal mit Vimentin, und einmal zusätzlich mit Neurofilamenten.

Probe	Grading	Keratin	Vimentin	Neurofilamente	Desmin	GFAP	Anmerkung
A1	Hochdifferenziert	+++	-	-	-	-	Primärtumor
A2	Niedrig differenziert	++	++ diffus	+ diffus	-	-	Radio- und Chemotherapie
B1	Mittelgradig differenziert	+	-	-	-	-	Radiotherapie
B2	Undifferenziert	++	+ diffus	-	-	-	Radio- und Chemotherapie
C1	Undifferenziert	+ - ++	-	-	-	-	Radiotherapie
C2	Undifferenziert	+ - ++	+++ diffus	-	-	-	Radiotherapie

Tabelle 3.16: Veränderung des Koexpressionsmusters nach Radio- / Chemotherapie

3.3.4. Übersicht: Koexpression und Grading

Bei der Übersicht über das Koexpressionsmuster aller Intermediärfilamente in allen Tumorproben fällt zunächst auf, dass die Koexpression mit Vimentin die mit Abstand frequenteste ist. Wie in den entsprechenden Abschnitte erwähnt, gilt das auch für die Menge der vimentinpositiven Zellzahl in Bezug auf die gesamte Tumorzellzahl und die Kräftigkeit der Anfärbung. Neurofilamente waren wesentlich seltener nachweisbar und wenn, dann auch nur in relativ wenigen Zellen. Desmin war in differenzierten Plattenepithelkarzinomen nicht nachweisbar, dafür in undifferenzierten Karzinomen aber relativ häufig. GFAP konnte mit den verwendeten Antikörpern in keiner der Proben nachgewiesen werden.

Im Vergleich von Plattenepithelkarzinomen und undifferenzierten Karzinomen ist festzustellen, dass Koexpressionshäufigkeit und Bandbreite der Koexpression bei den undifferenzierten Karzinomen deutlich höher sind als bei den Plattenepithelkarzinomen. Aber auch in der Gruppe der hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinome war relativ häufig eine Koexpression nachweisbar.

Grading	Anzahl Tumore	Keratin	Vimentin	Neurofilamente	Desmin	GFAP
Hochdifferenziert	8	8	3	1	-	-
Mittelgradig differenziert	33	33	5	1	-	-
Niedrig differenziert	12	12	2	2	-	-
Alle Plattenepithel-karzinome	53	53	10	4	-	-
Prozent		100%	18,9%	7,6%	-	-
Undifferenzierte Karzinome	8	8	6	1	3	-
Prozent		100%	75%	12,5%	37,5%	-
Summe	61	61	16	5	3	-
Prozent		100%	26,2%	8,2%	4,9%	-

Tabelle 3.17.: Koexpression in Bezug auf das Grading der Tumoren

3.3.5. Übersicht: Koexpression und Lokalisation

Die Betrachtung der Koexpression von Intermediärfilamenten unter dem Aspekt der Lokalisation zeigt, dass in Tumoren aus allen anatomischen Regionen Koexpression auftritt.

Lokalisation	Anzahl Tumore	Keratin	Vimentin	Neurofilamente	Desmin	GFAP
Nasennebenhöhle	2	2	2	1	2	-
Mundhöhle	12	12	2	1	-	-
Oropharynx	23	23	6	1	1	-
Hypopharynx	5	5	2	-	-	-
Larynx	13	13	2	2	-	-
CUP	6	6	2	-	-	-
Summe	61	61	16	5	3	-

Tabelle 3.18.: Koexpression in Bezug auf die Lokalisation der Tumoren

3.3.6. Abbildungen

3.3.6.1. Hochdifferenziertes Plattenepithelkarzinom

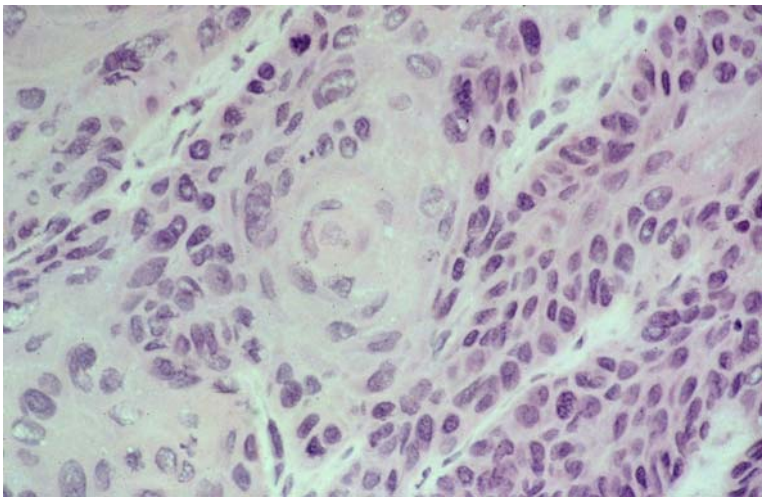


Abb. 3.1. HE (x 420)

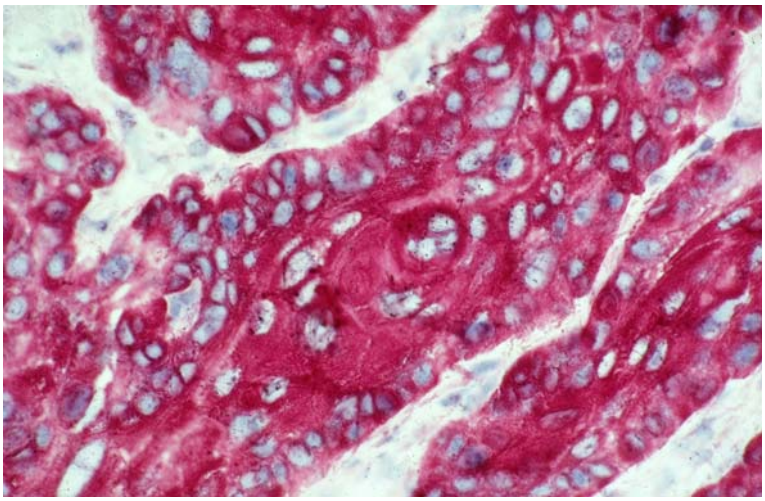


Abb. 3.2. APAAP mit KL1 (x 420)

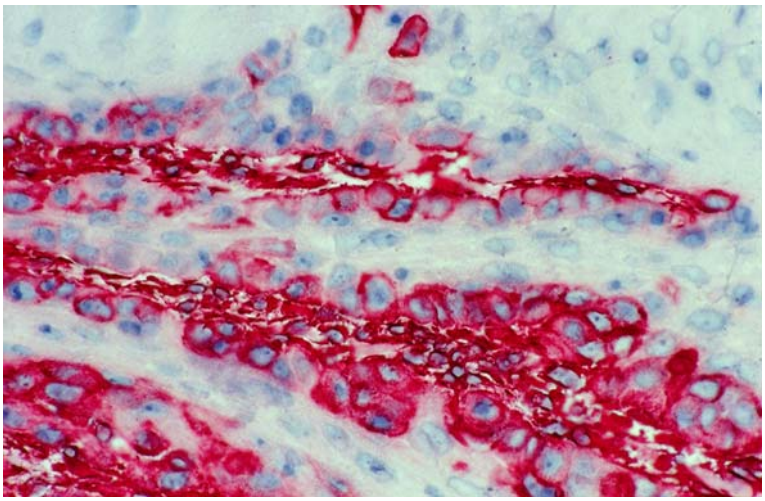


Abb. 3.3. APAAP mit V9 („basal layer“ Koexpression mit Vimentin, x 420)

Fortsetzung hochdifferenziertes Plattenepithelkarzinom

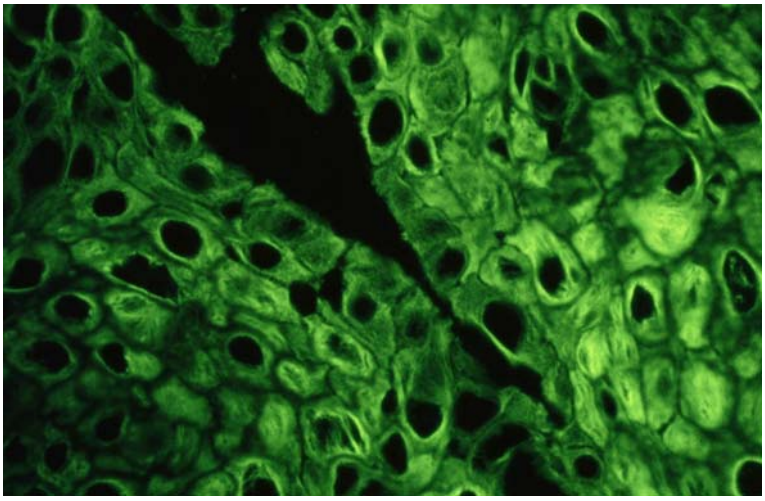


Abb. 3.4. DIF mit KL1 (x 900)

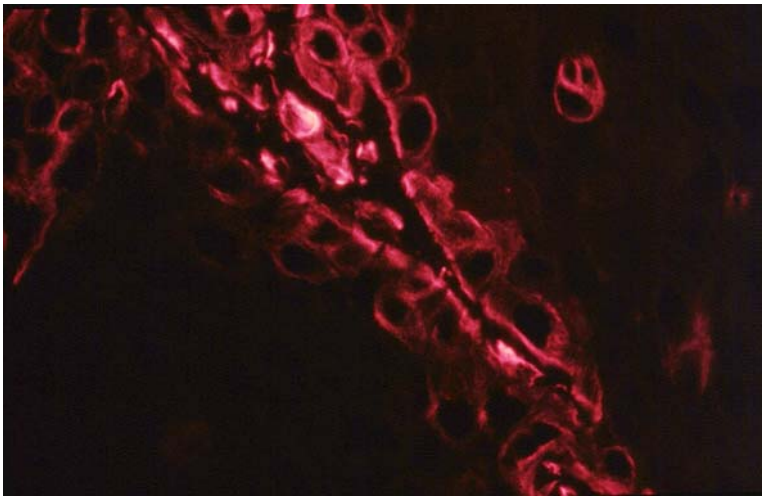


Abb. 3.5. DIF mit GP 110 (identischer Schnitt wie Abb. 3.4., Nachweis von Koexpression mit Vimentin in identischen Zellen, x 900)

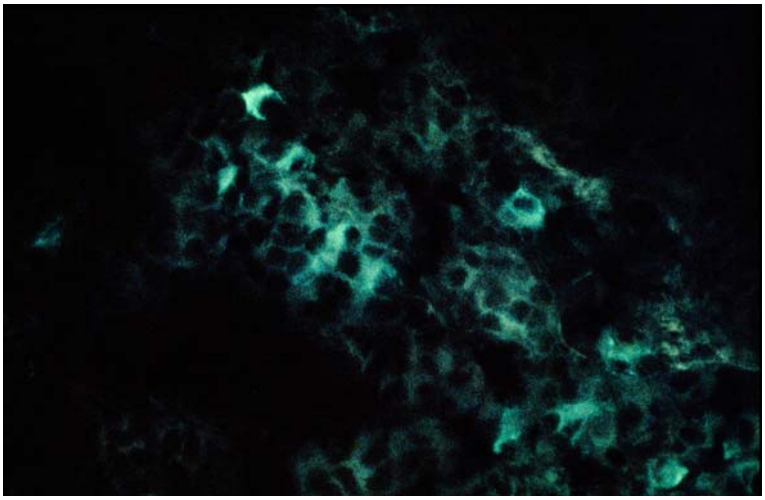


Abb. 3.6. IF mit NR4 (Einzelzellen Koexpression mit Neurofilamenten, x 900)

Fortsetzung hochdifferenziertes Plattenepithelkarzinom

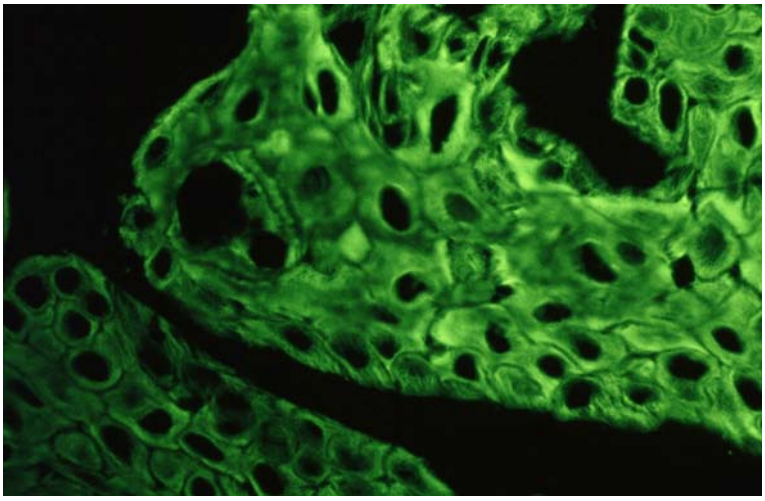


Abb. 3.7. DIF mit KL1 (x 900)

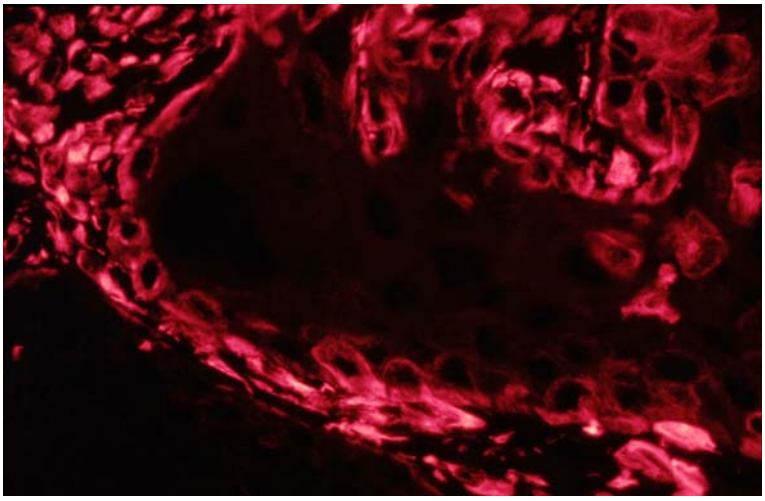


Abb. 3.8. DIF mit GP110 (identischer Schnitt wie Abb. 3.7., Nachweis von Koexpression mit Vimentin in identischen Zellen, x 900)

3.3.6.2. Mittelgradig differenziertes Plattenepithelkarzinom

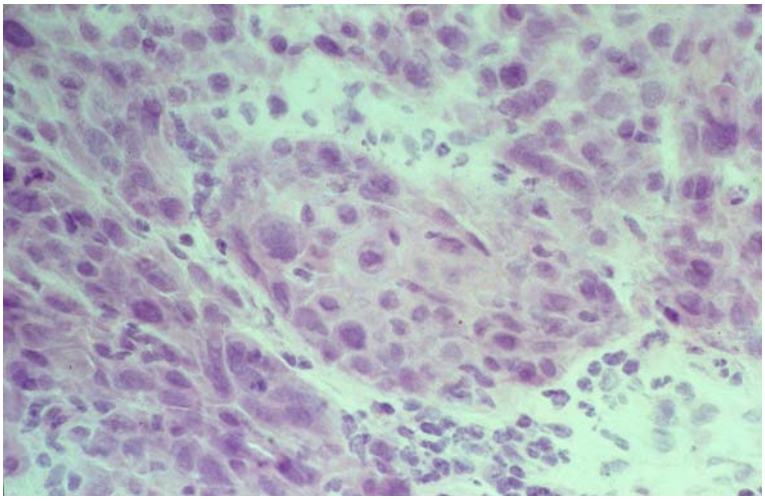


Abb. 3.9. HE (x 670)

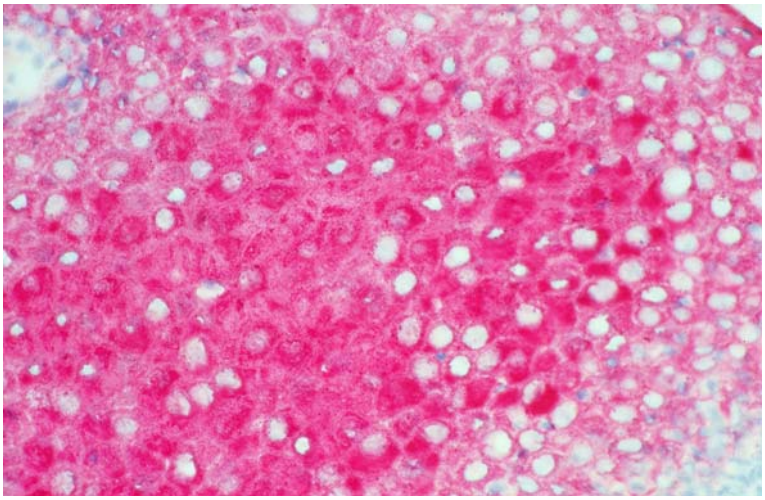


Abb. 3.10. APAAP mit KL1 (x 670)

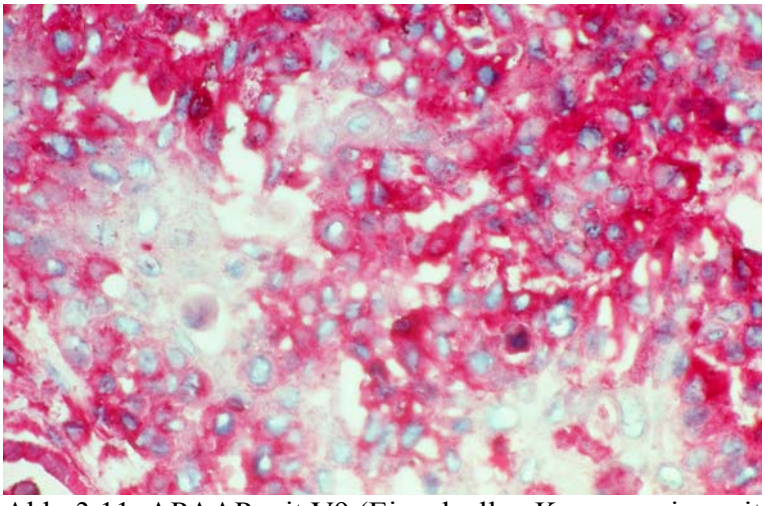


Abb. 3.11. APAAP mit V9 (Einzelzellen Koexpression mit Vimentin, x 670)

Fortsetzung mittelgradig differenziertes Plattenepithelkarzinom

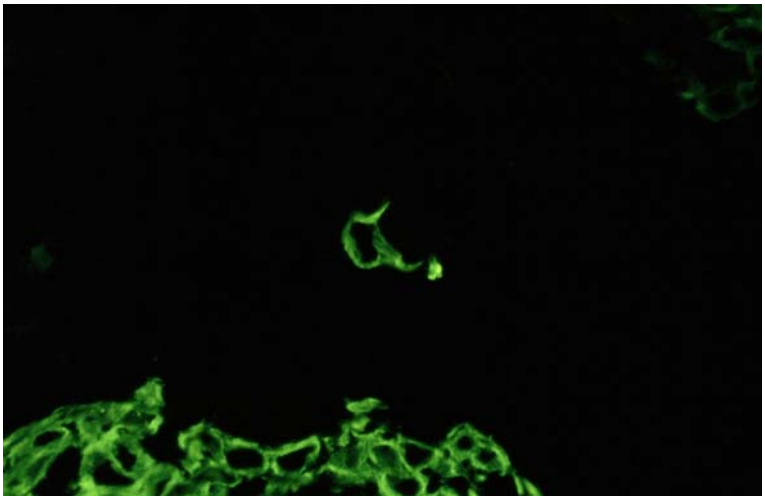


Abb. 3.12. DIF mit KL1 (x 900)

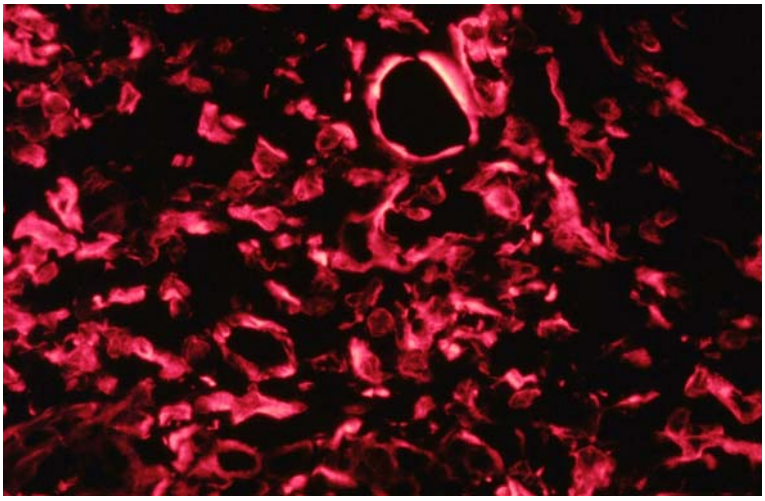


Abb. 3.13. DIF mit GP110 (identischer Schnitt wie Abb. 3.12., Nachweis von Koexpression mit Vimentin in identischen Zellen, x 900)

3.3.6.3. Niedrig differenziertes Plattenepithelkarzinom

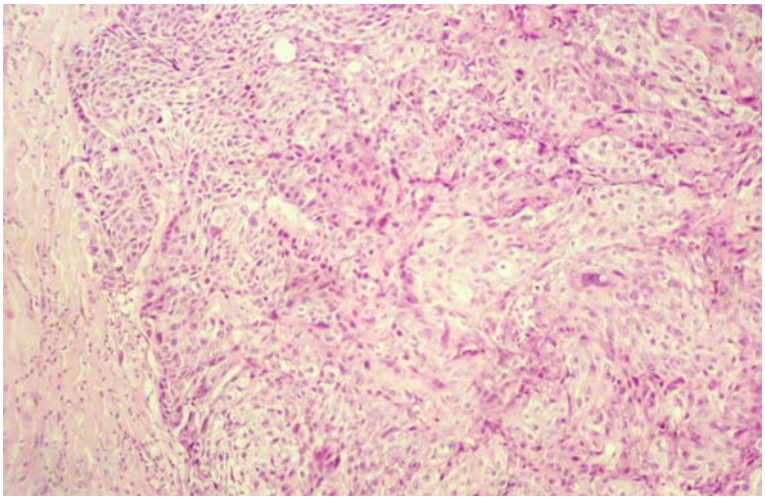


Abb. 3.14. HE (x 180)

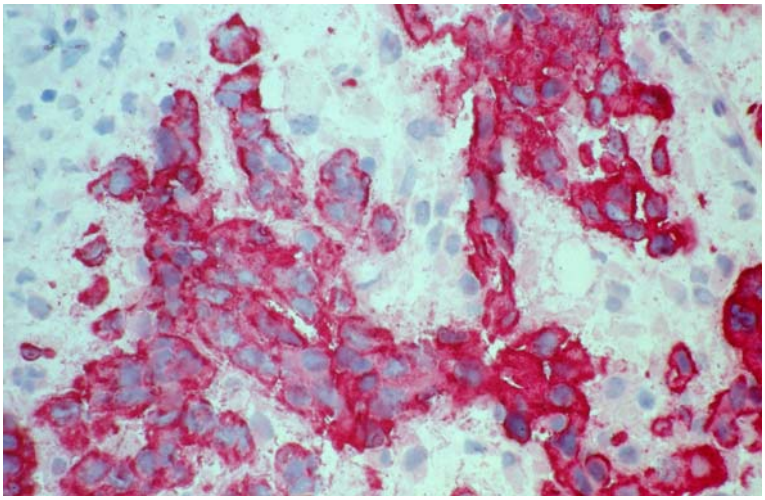


Abb. 3.15 APAAP mit KL1 (x 340)

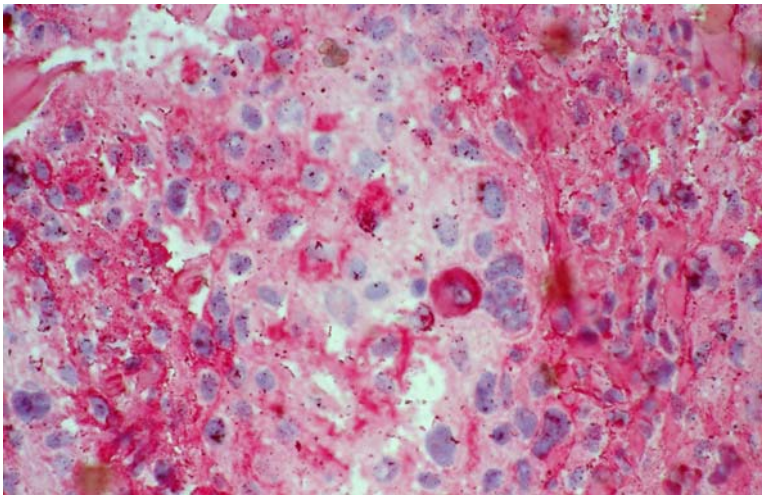


Abb. 3.16. APAAP mit V9 (Einzelzellen Koexpression mit Vimentin, x 340)

Fortsetzung niedrig differenziertes Plattenepithelkarzinom

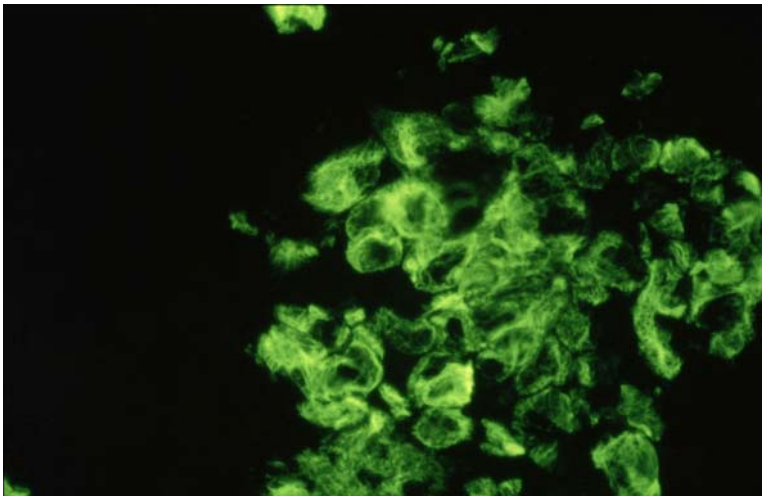


Abb. 3.17. DIF mit KL1 (x 900)



Abb. 3.18 DIF mit GP110 (identischer Schnitt wie in Abb. 3.17., Nachweis von Koexpression mit Vimentin in identischen Zellen, x 900)

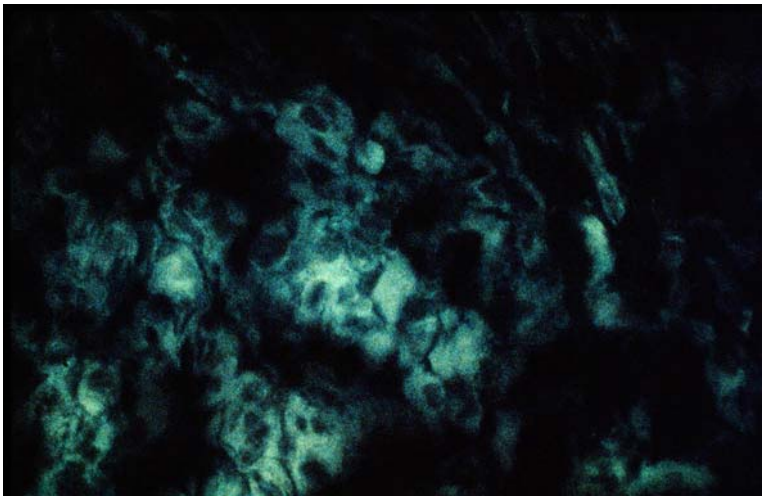


Abb. 3.19 IF mit N52 (Einzelzellen Koexpression mit Neurofilamenten, x 900)

3.3.6.4. Undifferenziertes Karzinom (rundzelliger Typ)

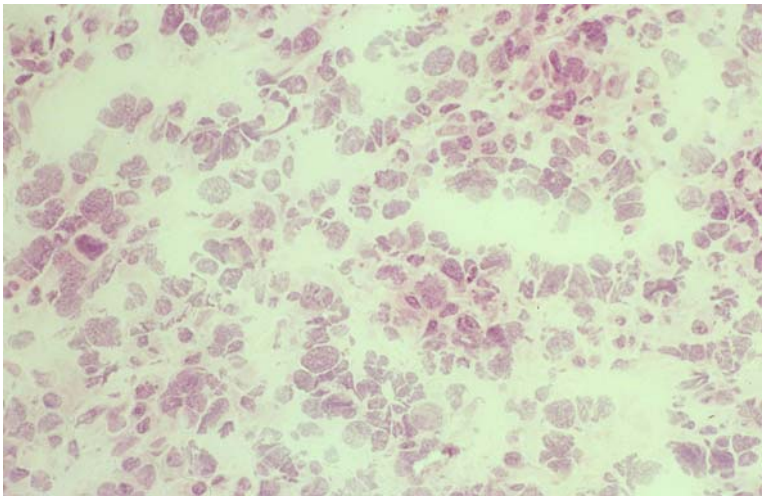


Abb. 3.20. HE (x270)

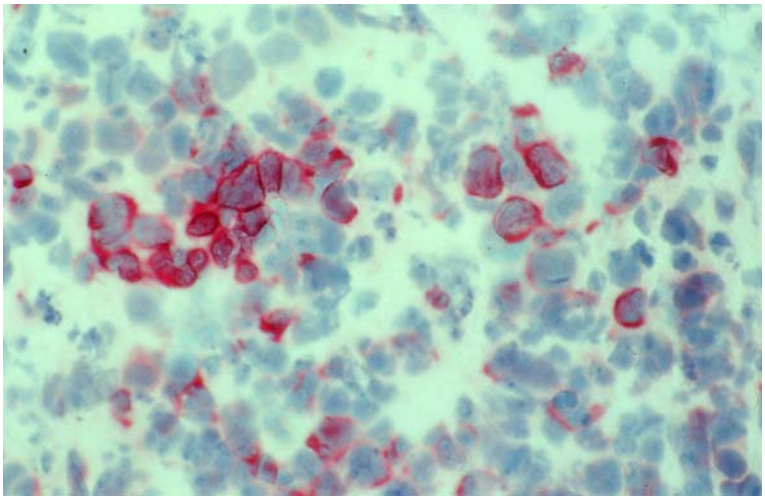


Abb. 3.21. APAAP mit KL1 (relativ wenig Tumorzellen positiv, x 340)

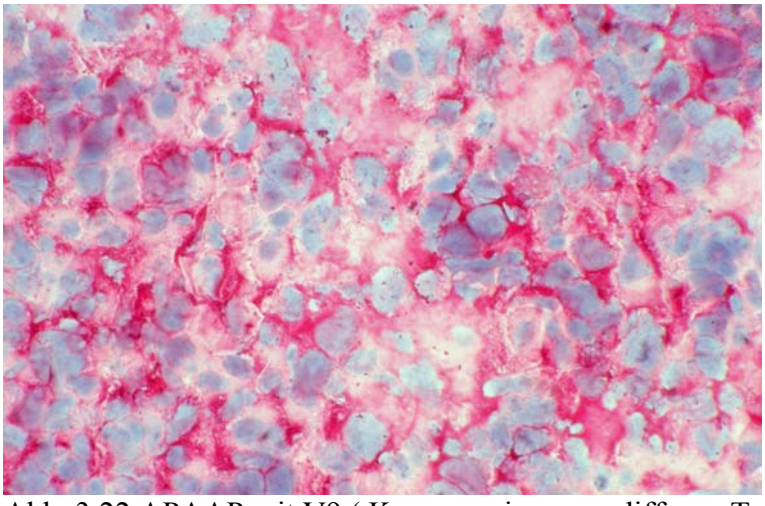


Abb. 3.22 APAAP mit V9 (Koexpression vom diffusen Typ mit Vimentin, x 420)

Fortsetzung undifferenziertes Karzinom (rundzelliger Typ)

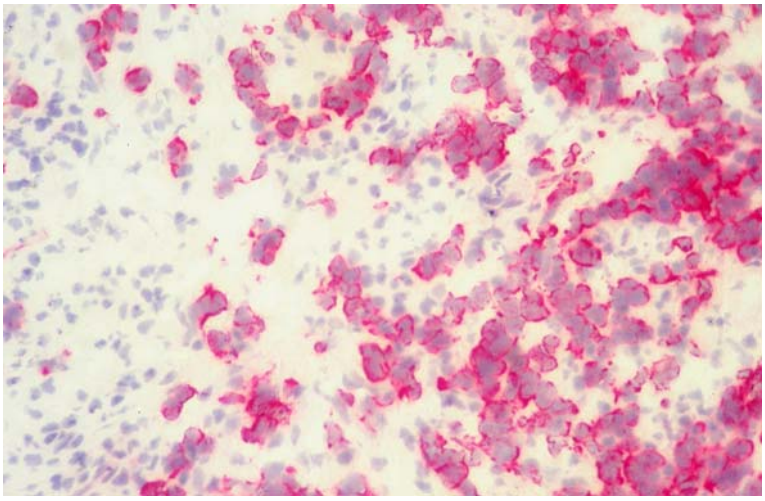


Abb. 3.23 APAAP mit DeR11 (Koexpression mit Desmin, x 270)

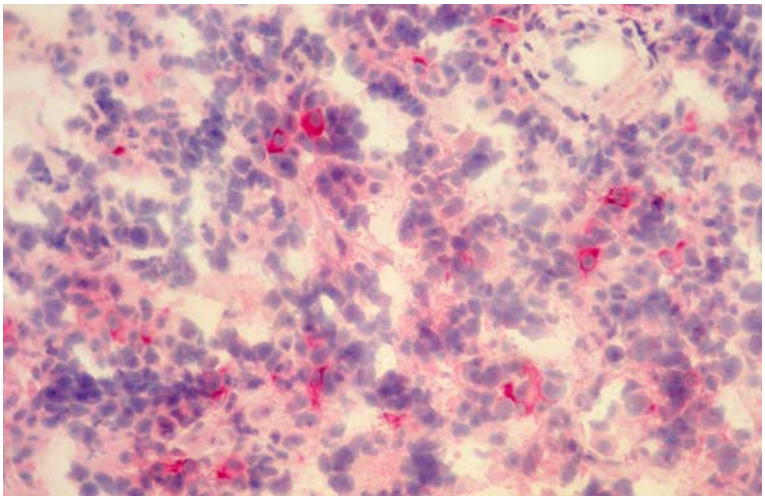


Abb. 3.24. APAAP mit 2F11 (Koexpression mit Neurofilamenten, x 270)

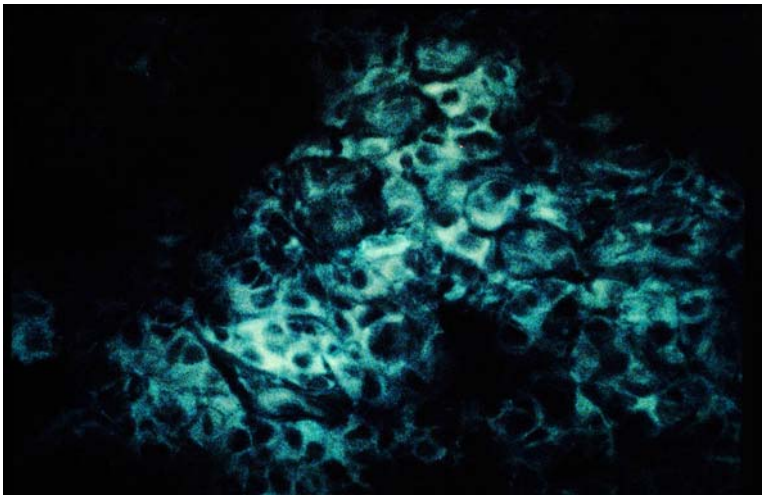


Abb. 3.25. IF mit N52 (Koexpression mit Neurofilamenten, x 340)

Fortsetzung undifferenziertes Karzinom (rundzelliger Typ)

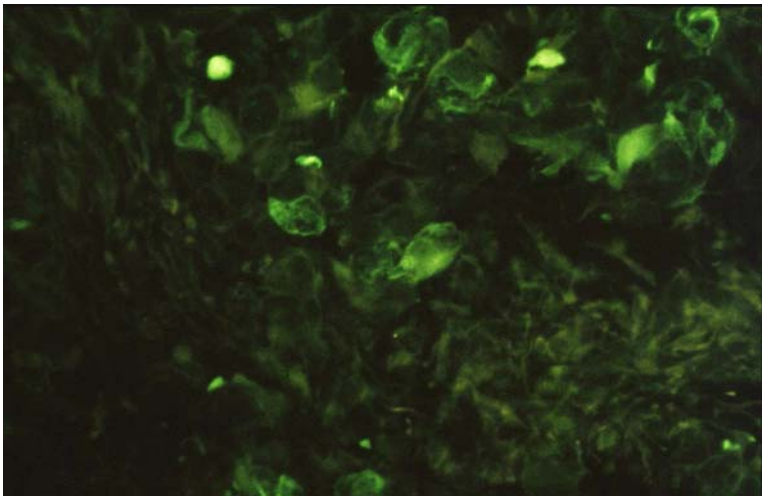


Abb. 3.26. DIF mit KL1 (x 900)

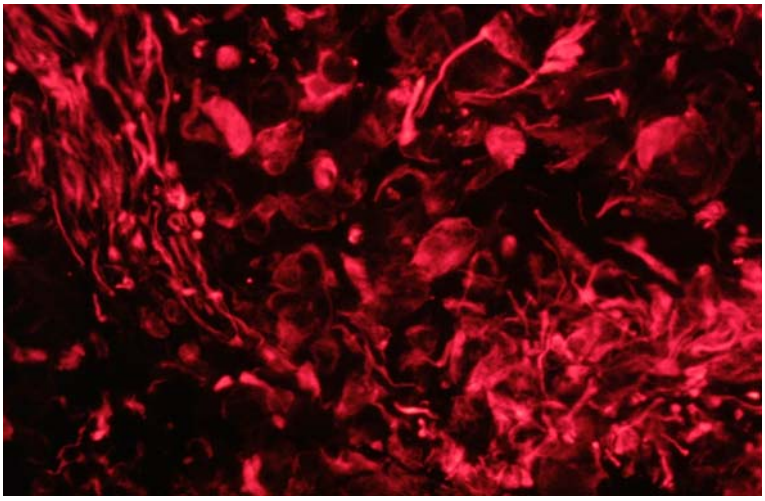


Abb. 3.27. DIF mit GP110 (identischer Schnitt wie in Abb. 3.26., Nachweis von Koexpression mit Vimentin in identischen Zellen, x 900)

3.3.6.5. Undifferenziertes Karzinom (spindelzelliger Typ)

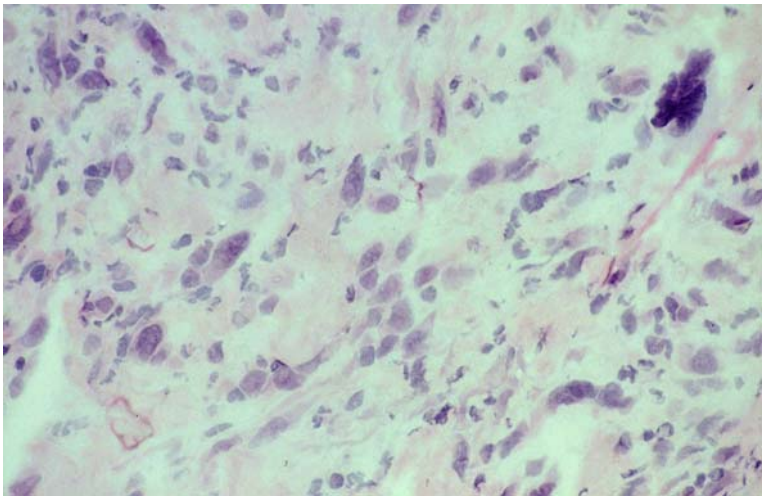


Abb. 3.28. HE (x 340)

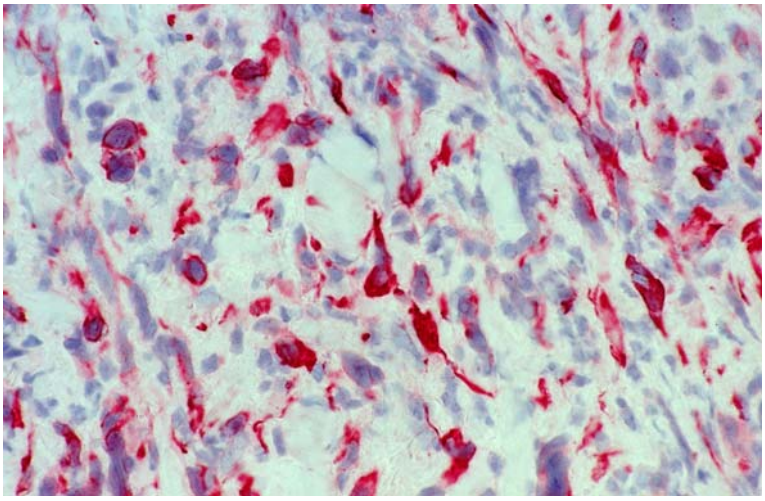


Abb. 3.29. APAAP mit KL1 (x 340)

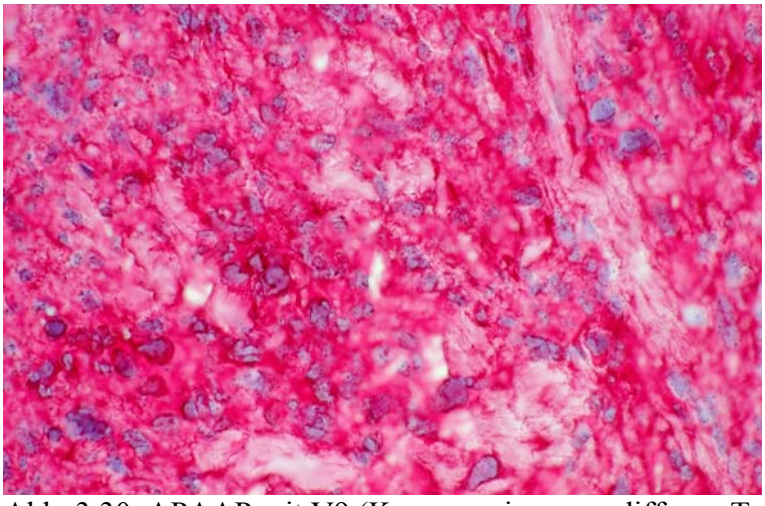


Abb. 3.30. APAAP mit V9 (Koexpression vom diffusen Typ, Anzahl der Vimentin-positiven Zellen überwiegt deutlich, x 340)

Fortsetzung undifferenziertes Karzinom (spindelzelliger Typ)

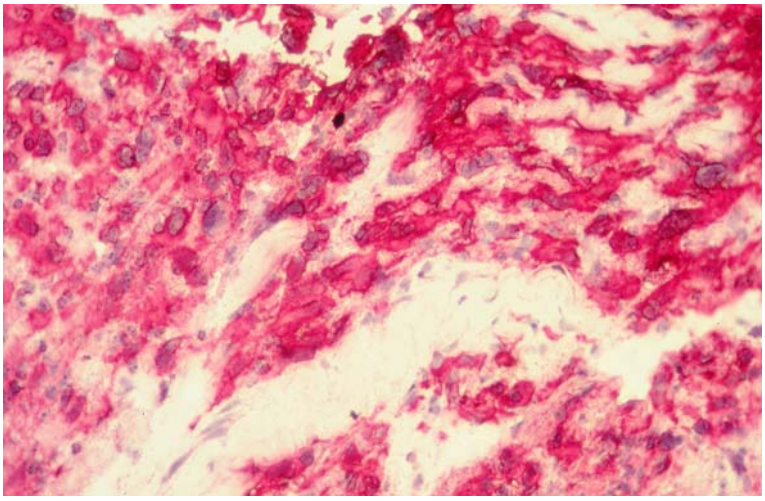


Abb. 3.31. APAAP mit DeR11 (Koexpression mit Desmin vom diffusen Typ, x 420)

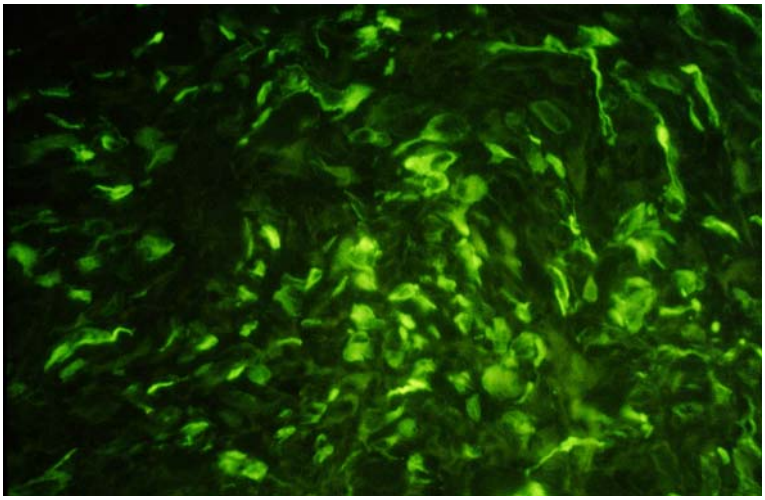


Abb. 3.32. DIF mit KL1 (x 700)

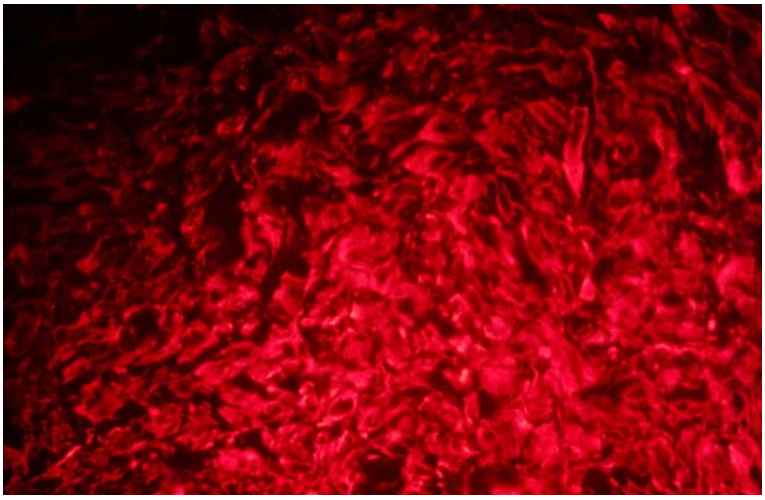


Abb. 3.33. DIF mit GP110 ((identischer Schnitt wie in Abb. 3.32., Nachweis von diffuser Koexpression mit Vimentin in identischen Zellen, x 700)

4. Diskussion

4.1. Geschichte der Immunhistochemie

Die erste erfolgreiche immunhistochemische Anfärbung eines Antigens erfolgte 1934 durch Reiner, der Antikörper gegen Typhus und Cholera mit einem Diazofarbstoff markierte. Creech und Jones führten 1941 die erste Fluoreszenzmarkierung eines Antikörpers durch. Grundprinzip dieser Technik ist der direkte Nachweis des lokalisierten Antigens mit markierten Antikörpern.

Einen Fortschritt bedeuteten die indirekten Techniken, die von Leduc und Conolly 1955 entwickelt wurden. Hierbei wird nicht der Primärantikörper, sondern ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper farblich markiert. Der konzeptionelle Vorteil der indirekten Methoden besteht darin, dass der Primärantikörper in seiner Bindungsfähigkeit nicht durch ein angekoppeltes Farbstoffmolekül behindert wird.

Statt einer unmittelbaren Farbstoffkoppelung an den Primär- oder Sekundärantikörper können auch Substanzen angekoppelt werden, die eine Farbstoffreaktion erst in einem späteren Schritt auslösen. So sind kräftigere Anfärbungen möglich, da sich mehr als ein Farbstoffmolekül pro erfolgreicher Antikörperbindung anlagern können. Zunächst wurde dafür die natürliche Affinität zwischen Biotin und Avidin genutzt (mit einer Avidin-gekoppelten Farbstoffreaktion), später bestimmte Enzyme kovalent dazu an Antikörper gebunden. Nakane schlug 1966 für diesen Zweck die Peroxidase vor. Diese Enzyme katalysieren Reaktionen, bei denen ein Farbstoffniederschlag ausgelöst wird.

Den letzten Schritt dieser Entwicklung stellte die immunologische Bindung der Enzyme durch Antikörper gegen diese Enzyme dar. Dieser Komplex aus Enzym und Anti-Enzym-Antikörper wird durch einen sogenannten Brückenantikörper an den Primärantikörper gebunden. Bekannte Anwendungen dieser Methode sind der Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (PAP) (Sternberger et al., 1970) und der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex (APAAP) (Cordell et al., 1984). Durch Aufbringen einer zweiten Lage von Brückenantikörper und APAAP-Komplex lässt sich bei letzterer die Dynamik von positivem Signal zu Hintergrundrauschen nochmals erheblich steigern.

4.2. Kritische Betrachtung der Methode

Der Nachweis von Intermediärfilamentproteinen durch die Immunhistochemie erfolgt durch das Identifizieren und Markieren von antigenen Strukturen der Proteine. Dieser Vorgang setzt voraus, dass die Antigene durch Konservierung und Fixierung nicht verändert, zerstört oder unzugänglich gemacht wurden, wie das z.B. durch die mit einer Formalin-Fixierung verbundene Denaturierung von Proteinen geschehen kann (Valnes et al., 1984). Die Verwendung von Gefrierschnitten stellte somit bessere Voraussetzungen für ein Erhalten auch empfindlicher Epitope dar als die konventionelle Formalinfixierung. Die Unterlegenheit der Gefrierschnitte in Bezug auf die Zellmorphologie, d.h. erhaltene Gewebequalität und Detailreichtum, stellte bei den histologisch gut zu identifizierenden Karzinomzellen keinen Nachteil im Sinne der zu untersuchenden Fragestellung dar. Für das histologische Grading der Tumoren wurden dagegen formalinfixierte Paraffinschnitte verwendet, da hierbei die oben genannten Gewebeeigenschaften relevant sind.

Falsch positive Reaktionen von primären und sekundären Antikörpern sowie durch die endogene alkalische Phosphatase können prinzipiell die Spezifität einer immunhistochemischen Untersuchung beeinträchtigen. Während bei monoklonalen Antikörpern die Gefahr des

Reagierens mit anderen, nicht erwünschten Epitopen gering ist, besteht sie bei polyklonalen Antikörpern, die in der vorliegenden Arbeit überwiegend als Brückenantikörper zum Einsatz kamen, durchaus. Diese Gefahr wurde dadurch minimiert, dass bei Speziesunterschieden zwischen dem zu erkennendem und den nicht zu erkennenden Antigenen die Antikörperlösung vor dem Einsatz mit Plasmaproteinen der nicht zu erkennden Spezies inkubiert und so die unerwünschte Reaktivität neutralisiert wurde. Bei dem polyklonalen Primärantikörper GP 110 wurde eine aufwendigere Affinitätsreinigung bereits vom Hersteller durchgeführt. Die endogene alkalische Phosphatase des zu untersuchenden Gewebes, die eine unspezifische Reaktion der Farbstoffentwicklungslösung in Konkurrenz zur spezifischen, an die Antikörper gebundenen alkalischen Phosphatase katalysieren könnte, wurde durch das der Entwicklungslösung beigesetzte Levamisol geblockt. Generell wurde zur Identifizierung falsch positiver Reaktionen bei allen immunhistochemischen Färbungen Negativkontrollen mitverarbeitet, die immer das zu fordernde negative Ergebnis erbrachten.

Der Nachweis des Vorhandenseins von zwei oder mehr Intermediärfilamentproteinen in einem Tumor erfolgte bei der APAAP-Methode durch das Färben sequentieller Schnitte mit den verschiedenen monoklonalen Antikörpern. Da durch diese Methode zwar eine Koexpression innerhalb eines Tumors nachgewiesenen werden, der Nachweis einer Koexpression innerhalb einer Zelle aber nicht geführt werden konnte (Schnittdicke 7 μm), wurde in positiven (Koexpressions-)Fällen zusätzlich weitere Verfahren wie die Doppelimmunfluoreszenz angewendet, bei der das gleichzeitige Anfärben zweier Antigene auf einem Schnitt durch Verwendung zweier verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe möglich war.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung stellte die verwendete APAAP-Methode eine hochsensitive und wegen ihrer geringen Hintergrundfärbung zugleich spezifische Methode dar. Die Doppelimmunfluoreszenzmethode erlaubte den gleichzeitigen Nachweis zweier Antigene auch innerhalb einer Zelle. Heute würde man diese Methoden durch den direkten Nachweis von Proteinen und m-RNA ergänzen.

4.3. Expression von Intermediärfilamenten

Der Terminus "Expression von Intermediärfilamenten" beschreibt, wann, in welcher Zellart und unter welchen Bedingungen ein bestimmtes Intermediärfilament-Protein als Bestandteil des Zytoskeletts nachweisbar ist. Die vorliegende Untersuchung befasst sich mit der zum Zeitpunkt der Untersuchung noch unerwarteten (Ko-)Expression von Intermediärfilamenten, die für Epithelien untypisch sind (wie z.B. Vimentin), in Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes (s. 1.1.).

Die Expression von Intermediärfilamenten in der Ontogenese und in der reifen Zelle ist in den späten 80er und den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen. Es erwies sich dabei, dass das ursprüngliche Paradigma der fixen, gewebespezifischen Expression von Intermediärfilament-Klassen (zum Beispiel Gown et al., 1984) viel zu einfach und zu dogmatisch war. Beispielsweise wurden Hirntumoren "keratingefärbt", um primäre Hirntumoren von Metastasen zu unterscheiden (Gottschalk et al., 1987). Die Keratin-Koexpression eines undifferenzierten Hirntumors hätte so zu einer Fehldiagnose führen können.

Die ständigen, in einem Fließgleichgewicht befindlichen Auf- und Abbauprozesse des Intermediärfilament-Zytoskeletts (s.1.3.2.3.) erlauben vielmehr seine dynamische Veränderung und Anpassung bei wechselnden Entwicklungsschritten, bei wechselnden Lebensbedingungen und bei der malignen Entartung der Zelle.

4.3.1. Modifikation der Intermediärfilament-Expression während der ontogenetischen Entwicklung

Als Ausdruck von ablaufenden Differenzierungsprogrammen können bei embryonalen Zellen das Auftreten und Verschwinden verschiedener Intermediärfilament-Muster beobachtet werden .

Bei der Embryogenese sind die ersten Intermediärfilament-Gene, die exprimiert werden, die der Keratine CK 8 und 18, welche während des frühen Morulastadiums in enger Beziehung zu ursprünglichen, desmosomalen Strukturen nachgewiesen werden können. Noch vor dem Nachweis aktivierter Gene ist allerdings das Vorhandensein von Intermediärfilament-Proteinen beschrieben: In Form eines kompakten „zytoskelettalen Blattes“ sind ca. sechs verschiedene Keratine, darunter CK 5,6,16 und 18, intrazytoplasmatisch organisiert. Eine Speicherung von Keratinen wird für genauso wahrscheinlich gehalten wie eine gewisse mechanische Stabilisierungsfunktion (Gallicano, 2001). Als nächstes folgt Vimentin am achten Gestationstag bei der Differenzierung der ersten mesenchymalen Zellen. Die übrigen Intermediärfilamente werden in diesem frühen Stadium noch nicht beobachtet. Neurofilamente treten erst später bei neurogenen Vorläuferzellen auf, und GFAP ist erst sehr spät in einigen glioblastösen Zellen nachweisbar. Bemerkenswert ist aber insbesondere der bei der Umdifferenzierung der mesenchymalen Zellen auftretende Wechsel von Keratin zu Vimentin (Franke et al., 1982; Oshima et al., 1983).

Auch andere Untersuchungen an Embryonen zeigten abrupte Wechsel der Intermediärfilament-Expression innerhalb kurzer Zeit:

Ein Prinzip scheint die Änderung von „ubiquitären“ zu „spezialisierten“ Intermediärfilamenten zu sein: In der Augenlinse prä- und postnataler Mäuse wurde zunächst Vimentin nachgewiesen. Erst nach fast vollständiger Elongation der Zellen traten auch Phakinin und Filensin auf (Blankenship et al., 2001). Am sich entwickelnden Muskelzellen wurde der Wechsel von Vimentin zu Desmin beobachtet, in der Neuroglia gibt es einen Wechsel von Vimentin zu GFAP (Cary et al., 1994) und in Neuronen den Wechsel von Vimentin zu Neurofilamenten (Cochard et al., 1984). Selbst im Innenohr kann entwicklungsabhängig eine Vimentinexpression in der epithelialen Auskleidung der Innenohrräume vorübergehend nachgewiesen werden (Kuijpers et al., 1992).

Ein weiteres Prinzip scheint der Wechsel von Entwicklungs- zu Differenzierungs-Intermediärfilamenten zu sein: An Neuronen der Wechsel von Peripherin und α-Internexin zu Neurofilamenten, in der Neuroglia von Nestin zu GFAP, und im Muskel von Nestin auf Desmin (Sejersen et al., 1993; Carlsson et al., 1999).

4.3.2. Modifikation der Intermediärfilament-Expression durch zelluläre Lebensbedingungen

In Zellkulturen können häufig Wechsel der Intermediärfilament-Expression beobachtet werden (Virtanen et al., 1981). So schalten Mesothelzellen in Kultur unter Wachstumsbedingungen auf fast ausschließliche Vimentinexpression um. Bei späterer Ausdifferenzierung wird die Keratin-Expression wieder aufgenommen (Connell et al., 1983).

Analog konnte an Zellen solider, ausschließlich Keratin-exprimierender Tumoren, die aus einem malignen Erguss des Pleura- oder Peritonealraumes gewonnen wurden, eine zusätzliche Vimentin-Expression nachgewiesen werden (Ramaekers et al., 1983).

Zellformwechsel zwischen „sphärisch“ in Suspension und „flach“ bei Auswachsen auf einem Substrat führen zu drastischem Herunter- oder Hochregulieren von Vimentin und anderen zytoplasmatischen Proteinen (Ben-Ze'ev, 1983; Ben-Ze'ev et al., 1988), während die Keratinexpression vom Ausmaß der Zell-Zell-Kontakte abhängt (Ben-Ze'ev, 1990).

Retinol kann bei LP-9-Zellkulturen (menschliche Mesothelialzellen) eine erhöhte Keratin-Synthese, eine verminderte Vimentin-Synthese und eine epidermoide Differenzierung auslösen. Auch die Zelldichte ist entscheidend: Bei zu großem Zell-Zell-Abstand kann die Keratinsynthese nicht mehr aufrecht erhalten werden. EGF hat einen umgekehrten Effekt wie Retinol: Es unterdrückt die Keratin-Synthese und die epitheloide Differenzierung (Kim et al., 1987). Weitere Untersuchungen an einer Reihe von Zellkulturen epithelialen und mesenchymalen Ursprungs bestätigten den Effekt des Retinols (auf transskriptionaler Ebene), stuften ihn aber als sekundär im Vergleich zu funktionalen Aspekten ein (Stellmach et al., 1989).

Während der Apoptose werden verschiedene Intermediärfilamente durch Caspase-Proteasen abgebaut. Bei Laminen, Typ-I-Keratinen und Vimentin wurden Caspase-spezifische Aminosäuresequenzen nachgewiesen. (Ihre Lage im L2-Segment des Intermediärfilament-Moleküls unterstreicht dessen Bedeutung für die Fähigkeit der Intermediärfilamente, zu Filamenten zu polymerisieren.) Die Abbauprodukte dienen als Promotoren des weiteren Zelltods (Prasad et al., 1999; Byun et al., 2001)

4.3.3. Modifikation der Intermediärfilament-Expression durch maligne Entartung

Bei der Entwicklung eines neoplastischen Phänotyps können typische Interaktionen von Intermediärfilamenten mit den IFAP (s. 1.3.4.2.) beobachtet werden. Die dynamischen Reorganisation der Intermediärfilamente ist für den zellulären Kontext spezifisch und erfolgt in Interaktion mit den IFAP. Normalerweise stabilisieren Intermediärfilamente in Zusammenarbeit mit den Desmosomen Zellen durch Kontrolle der Motilität und Quervernetzung mit anderen Zellen. In Tumorzellen wird durch Änderungen der Intermediärfilament-Expression und /oder der Phosphorylierung von Intermediärfilament-Proteinen und desmosomalen Komponenten der Abbau der junktionalen Elemente reguliert, der mit der erhöhten Motilität und verminderten Adhäsion einhergehen. Die veränderte Intermediärfilament-Expression trägt so zur Ausbildung des neoplastischen Phänotyps bei (Prasad et al., 1999). Bei einer Mammakarzinom-Zellkultur wurde eine direkte Abhängigkeit der CK 19 Expression von der Stimulation des Östrogen-Rezeptors nachgewiesen (Choi et al., 2000).

Bei Karzinomen, z.B. des oberen Aerodigestivtraktes, tritt oft eine andere Keratin-Paar-Expression als im gesunden Ausgangsgewebes auf (Weidauer et al., 1986).

Keratinmuster in Transitionalzellkarzinomen der Blase geben Hinweise auf die Tumorbiologie, in einigen Fällen sogar auf die Prognose: Die Kombination aus CK 8 und 18 markiert invasive Tumoranteile, CK 17 gilt als Proliferationsmarker. Das Neuauftreten von CK 14 soll ein Indikator für eine schlechte Prognose sein, während CK 20 für eine normale Differenzierung und in der Tumornachsorge gegen ein Tumorrezidiv spreche (Southgate et al., 1999). Im Widerspruch dazu wird in einer anderen Untersuchung CK 20 in Urinproben als Marker für Urothelkarzinome einstuft (Lin et al., 2001). Lungenkarzinomzellen mit Keratin-8/18-Expression zeigen ein verstärktes Invasionsverhalten *in vitro* (Chu et al., 1997). Keratin 34 beta E-12 ist ein Marker für maligne Acinus-Drüsenveränderungen, auch in

Prostatagewebe (Goldstein et al., 1999). Überexpression von K19 in Plattenepithelkarzinom-Zellkulturen der Mundhöhle vermindert das Invasionspotential durch Beeinträchtigung der Migrationsfähigkeit (Crowe et al., 1999).

4.4. Koexpression von Intermediärfilamenten als Phänomen

Im ursprünglichen Verständnis der festen Zuordnung der Intermediärfilament-Klassen zu bestimmten Gewebetypen stellte die Koexpression von zwei oder mehr Intermediärfilamenten in einer Zelle einen Sonderfall dar. Sie war wegen der Qualität der immunhistochemischen Methode, die in ihren Anfängen stark von polyklonalen Antikörpern abhängig war, zunächst unbemerkt geblieben bzw. als Artefakt klassifiziert worden. Im Laufe der folgenden Jahre hat sich aber gezeigt, dass die Koexpression ein regelmäßiges Phänomen in normalen Geweben, in alterierten Geweben und in Tumorgeweben ist.

4.4.1.Geschichte der Koexpression

Die Koexpression von Keratin und Vimentin wurde anfangs als mesenchymale, sarkomatöse Umdifferenzierung von Karzinomen interpretiert, die als sog. Spindelzellkarzinome schon durch elektronenmikroskopische Untersuchungen beschrieben worden war (Battifora, 1976; Zarbo et al., 1986; Ellis et al., 1987; Meijer et al., 1988).

Eine regelmäßige Koexpression von Intermediärfilamenten wurde dann in einer Reihe von Tumorentitäten und auch in wenigen, besonderen Normalgeweben beobachtet (s. Tabelle) (Gatter et al., 1986; Coggi et al., 1989).

Die Intermediärfilamentsysteme können dabei unabhängig voneinander existieren wie etwa Keratin und Vimentin, oder sie können miteinander zu einem gemischten Netzwerk polymerisieren wie etwa Vimentin und Desmin. Unterschieden wurde das durch Versuche zur selektiven Aggregation eines der Filamentsysteme (Klymkowsky, 1982; Tolle et al., 1986).

4.4.2.Katalog der Koexpression

4.4.2.1. Koexpression *in vitro*

Die stark veränderten Lebensbedingungen von Zellen in Kultur, wie z.B. Zell-Zell-Kontakt, Adhäsion an einer Unterlage und sphärische oder flache Zellform führen zu Veränderungen in der Struktur des Zytoskeletts und dabei häufig zur Koexpression von Intermediärfilamenten. Beispielsweise koexprimieren Keratinozyten in Zellkulturmedium ohne Haftgrundlage Keratin und Vimentin (Prignano et al., 1999). Eine Zellkultur von Blasenkarzinomzellen zeigte nach Mediumwechsel eine Umdifferenzierung mit Auflösung des Zellverbandes, Umverteilung der Hemidesmosomen und Koexpression von Vimentin (Boyer et al., 1989)

4.4.2.2 Koexpression während der Entwicklung

Während der Ausdifferenzierung von Geweben kommt es nicht nur zum Wechsel der Expression von Intermediärfilamenten (s. 4.3.1.), sondern damit verbunden auch zur vorübergehenden Koexpression beim "Umschalten" zwischen den verschiedenen Intermediärfilament(klassen) (Lane et al., 1983). In einigen Fällen scheint sogar das Vorhandensein eines Vorläufer-Intermediäfilaments zum Aufbau des Netzwerkes des Nachfolgers zwingend erforderlich zu sein, wie z.B. bei Desmin in sich entwickelnden Muskelzellen.

4.4.2.3 Koexpression in alterierten Geweben

Während der Wundheilung wird Vimentin in epithelialen Zellen exprimiert und steht in direktem Zusammenhang mit den migratorischen Fähigkeiten der Wundrandzellen. Dies konnte in entsprechenden Zellkulturmodellen nachgewiesen werden (Gilles et al., 1999).

Peripherin wird mit NF-L vor allem während der Regeneration und dem Wachstum peripherer Nerven koexprimiert (Beaulieu et al., 1999).

Am sich regenerierenden oder am denervierten Muskel wird Vimentin mit Desmin koexprimiert (Goebel et al., 1993; Goebel, 1995), auch Nestin tritt während Regenerationsphasen vermehrt auf (Carlsson et al., 1999).

In erkrankten Nierentubuli kann neben Keratin regelmäßig Vimentin nachgewiesen werden (Grone et al., 1987).

4.4.2.4 Koexpression in Normalgeweben

Einige wenige, spezielle Normalgewebe zeigen auch in ausdifferenziertem, nicht alterierten Zustand regelmäßig eine Koexpression von Intermediärfilamenten. Beispiele sind die Koexpression von Keratin und Vimentin im Mesothel (LaRocca et al., 1984), in der Schilddrüse (McNutt et al., 1985), in Granulosazellen des Ovars und im Endometrium (Dabbs et al., 1986), die Koexpression von Keratin, Vimentin und GFAP in myoepithelialen Zellen von Brust- und Speicheldrüsen (Gould et al., 1990) sowie die Koexpression von Desmin, GFAP und Nestin in Sternzellen der Leber (Niki et al., 1999).

Kondition	Gewebe	Koxeprimierte Intermediärfilamente	Literatur
Zellkultur, keine Adhäsion			
	Keratinozyten	Keratin + Vimentin	(Prignano et al., 1999)
Entwicklung			
	Muskel	Vimentin + Desmin + Nestin	(Sejersen et al., 1993)
Normalgewebe			
	Mesothel	Keratin + Vimentin	(LaRocca et al., 1984)
	Schildrüse	Keratin + Vimentin	(McNutt et al., 1985; Azumi et al., 1987)
	Endometrium	Keratin + Vimentin	(Dabbs et al., 1986)
	Niere distaler Tubulus	Keratin + Vimentin	(Azumi et al., 1987)
	Nebennierenrinde	Keratin + Vimentin	(Azumi et al., 1987)
	Granulosazellen Ovar	Keratin * Vimentin	(McNutt et al., 1985)
	Myoepitheliale Zellen Brust- und Speicheldrüsen	Keratin + GFAP + Vimentin Keratin + Vimentin	(Gould et al., 1990) (Azumi et al., 1987)
	Sternzellen Leber	Desmin + GFAP + Nestin	[Niki, 1999 #49]

Tab. 4.1. Koexpression in Normalgeweben

4.4.2.5 Koexpression in Tumoren

Bei einer großen Anzahl unterschiedlicher Tumorentitäten wurde die Koexpression von zwei oder mehr Intermediärfilamenten beschrieben. Beispiele sind die Koexpression von Keratin und Vimentin in Endometriumkarzinomen (Dabbs et al., 1986), in Schilddrüsenkarzinomen (Altmannsberger et al., 1986), in Mesotheliomen (LaRocca et al., 1984), in Nierenzellkarzinomen (McNutt et al., 1985), in Adenoidzystischen Karzinomen der Speicheldrüsen (Caselitz et al., 1984), in sog. Karzinosarkomen und in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes (Vollrath et al., 1987; Maier et al., 1988b; Fischer et al., 1989; Wallner et al., 1990). Die Koexpression von Keratinen, Vimentin und GFAP wurde beschrieben in pleomorphen Adenomen der Speicheldrüsen (Caselitz et al., 1982; Domagala et al., 1988)und in Mammakarzinomen (Gould et al., 1990). Die Koexpression von Keratin und Neurofilamenten wurde nachgewiesen in Paragangliomen der Cauda equina (Labrousse et al., 1999), in Karzinoiden, in Plattenepithel- und kleinzelligen Karzinomen der Lunge (Broers et al., 1987) und Merkelzelltumoren (Baudoin et al., 1993). Die Koexpression von Keratin (CAM 5.2) und LCA (leucocyte common antigene) wurde in einem hochmalignen T-Zell-Lymphom (CD 30 negativ) nachgewiesen (McCluggage et al., 1998). Die Koexpression von Nestin und Vimentin wurde in Melanomen nachgewiesen (Florenes et al., 1994).

Kondition	Gewebe	Koxeprimierte Intermediärfilamente	Literatur
Tumoren			
	ACC	Keratin + Vimentin	(Caselitz et al., 1984)
	Mesotheliome	Keratin + Vimentin	(LaRocca et al., 1984)
	Nierenzellkarzinom	Keratin + Vimentin	(McNutt et al., 1985; Domagala et al., 1988)
	Granuloszelltumoren Ovar	Keratin + Vimentin	(McNutt et al., 1985) (Czernobilsky et al., 1987)
	Endometriumkarzinom	Keratin + Vimentin	(McNutt et al., 1985; Dabbs et al., 1986; Domagala et al., 1988)
	Nebennierenrindenkarzin.	Keratin + Vimentin	(Miettinen et al., 1985)
	Nephroblastom	Keratin + Vimentin	(Gluer et al., 1998)
	Schilddrüsenadenome (follikulär)	Keratin + Vimentin	(Altmannsberger et al., 1986)
	Schildrüsenkarzinome (follikulär und papillär) (medullär)	Keratin + Vimentin Keratin + NF + Vimentin	(Altmannsberger et al., 1986) (Domagala et al., 1988)
	Karzinosarkom oberer Aerodigestivtrakt	Keratin + Vimentin	(Meijer et al., 1988)
	Plattenepithelkarzinome oberer Aerodigestivtrakt	Keratin + Vimentin (+ Neurofilamente + Desmin)	(Vollrath et al., 1987; Maier et al., 1988b; Fischer et al., 1989; Wallner et al., 1990)
	Pleomorphes Adenom Parotis	Keratin + Vimentin + GFAP	(Domagala et al., 1988)
	Mammakarzinom	Keratin + Vimentin +GFAP	(Gould et al., 1990)
	T-Zell-Lymphom	Keratin + Vimentin + LCA	(McCluggage et al., 1998)
	Kleinzellige Karzinome Lunge	Keratin + NF	(Broers et al., 1987)
	Plattenepithelkarzinome Lungen	Keratin + NF	(Broers et al., 1987)
	Paragangliome Cauda equina	Keratin + NF	(Labrousse et al., 1999)
	Karzinoide	Keratin + NF	(McNutt et al., 1985; Broers et al., 1987)
	Merkelzelltumoren	Keratin 8 + NF-L +Peripherin	(McNutt et al., 1985; Baudoin et al., 1993)
	Ewingsarkom	Vimentin + Keratin + NF	(Moll et al., 1987)
	Melanome	Vimentin + Nestin	(Florenes et al., 1994)
	Rhabdomyosarkom	Desmin + Vimentin	(Altmannsberger et al., 1985)
	Leiomyosarkom	Desmin + Vimentin	(Domagala et al., 1988)

Tabelle 4.2.: Koexpression in Tumoren

4.5. Koexpression in Plattenepithelkarzinomen und undifferenzierten Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes

4.5.1. Koexpression von Keratin und Vimentin

Die vorliegenden Untersuchung zeigt nachdrücklich und erstmalig, dass es sich bei der Koexpression von Intermediärfilamenten in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes nicht um eine seltene Ausnahme, sondern um ein regelmäßig auftretendes Phänomen handelt. Die am weitaus häufigsten festgestellte Koexpression ist die von Keratin und Vimentin, insgesamt in 26,2% der untersuchten Proben, dabei in 18,9% der Plattenepithelkarzinome und in 75% der undifferenzierten Karzinome.

Bemerkenswerterweise lassen sich zwei voneinander verschiedene Koexpressionsmuster abgrenzen:

- Zum einen findet sich eine Koexpression von Keratin und Vimentin bei hochdifferenzierten Karzinomen nahezu ausschließlich an der Basalzellschicht, d.h. der Invasionsfront der Karzinomzungen auftretend.
- Zum anderen fällt die diffuse, mit abnehmendem Differenzierungsgrad an Häufigkeit und Ausdehnung zunehmende Koexpression in einzelnen Zellen und Zellnestern bei mittelgradig- und niedrigdifferenzierten Plattenepithelkarzinomen sowie bei undifferenzierten Karzinomen auf.

4.5.2. Koexpression von Keratin und Neurofilamenten

Die zweithäufigste Koexpression war die von Keratin und Neurofilamenten, insgesamt in 8,2% der Proben, unterteilt nach Plattenepithelkarzinomen und undifferenzierten Karzinomen ergaben sich 7,6% und 12,5%. Auch hier zeigten sich in einigen Fällen eine Lokalisationen der Koexpression in der Basalzellschicht, die allerdings neben hochdifferenzierten auch bei mittelgradig differenzierten Plattenepithelkarzinomen auftrat. Die übrigen Fälle zeigten eine diffuse Verteilung der koexprimierenden Zellen.

4.5.3. Koexpression von Keratin und Desmin

Die dritthäufigste Koexpression mit Keratin war mit 4,9% die von Desmin. Sie kam im untersuchten Material nur in Proben von undifferenzierten Karzinomen vor, dabei jedoch mit einer Häufigkeit von 37,5%.

4.5.4. Koexpressionsmuster vom Basalzellschicht-Typ

Das Koexpressionsmuster mit Lokalisation in der Basalzellschicht scheint Ausdruck der Proliferationsaktivität der Invasionsfront zu sein. Wahrscheinlich ist sie auf die veränderte Form des Zell-Zell-Kontaktes bei Fehlen einer Basalmembran und den dadurch gelockertem epithelialen Verband zurückzuführen. Dieses Phänomen wurde ansonsten nur bei der Koexpression von Nestin und Vimentin an der Invasionsfront von malignen Melanomen beschrieben (Florenes et al., 1994). Eine Grundlage für diese Interpretation geben *in vitro*- Beobachtungen an Zellkulturen: Keratinozytenkulturen zeigen an den freien Rändern, d.h. in proliferierenden Abschnitten, eine starke Vimentinexpression, nicht dagegen in sich differenzierenden, verhornenden Abschnitten (Van Muijen et al., 1987). Versuche mit epithelialen Zellkulturen reflektieren einen direkten Zusammenhang der Vimentinsynthese mit der Zellform. Eine Zellkultur von Blasenkarzinomzellen zeigte nach Mediumwechsel eine Umdifferenzierung mit Auflösung des Zellverbandes, Umverteilung der Hemidesmosomen und Koexpression von

Vimentin (Boyer et al., 1989). Schließlich exprimieren auch in Aszites schwimmenden Karzinomzellen Vimentin. Sowohl der verminderte Zell-Zell-Kontakt, die Veränderung der Zellform von flach nach kubisch als auch Mediatoren des Bindegewebes sind also offenbar relevant (Prignano et al., 1999).

4.5.5. Koexpressionsmuster vom diffusen Typ

Der diffuse, zunächst nur verteilte Einzelzellen, dann Zellgruppen und schließlich den ganzen Tumor erfassende zweite Typ der Koexpression, vorrangig bei gering bis gar nicht differenzierten Tumoren, lässt aufgrund dieses Auftretens weniger an funktionelle Phänomene als an eine genetische Fehl- bzw. Deregulationen denken. Denn selbst das Aufrechterhalten eines ausdifferenzierten, „gesunden" Zelltyps erfordert einen kontinuierlichen Prozess durch positiv und negativ agierende genetische Regulationsfaktoren (wie z.B. „tissue specific extinguishers") (Baron, 1993). An Mammakarzinomzelllinien konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass die Koexpression von Vimentin mit der Anwesenheit des Transkriptionsfaktors PEA3 zusammenhängt (Chen et al., 1996). Bei der Zellkultur eines Plattenepithelkarzinoms des oberen Aerodigestivtraktes konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von Vimentin und Keratin vergesellschaftet ist mit einem ganzen Bündel genetischer Umorientierungen, resultierend in verminderter Zell-Zell-Adhäsion, Motilitätszunahme und Spindelzellform (Tomson et al., 1996).

4.6. Bewertung des Koexpressionsphänomens

Zurückschauend auf die Diskussion der letzten Jahre erscheint die Bewertung des Phänomens der Koexpression von Intermediärfilamenten unter drei Aspekten sinnvoll zu sein:

4.6.1. Koexpression als Ausdruck der Dynamik des Intermediärfilament-Zytoskeletts

Der erste Aspekt ist der Paradigmenwechsel von der Annahme eines statischen, im Aufbau einem bradytrophen „Skelett" gleichenden Gerüsts des Zytoplasmas zu einem System, das als hochdynamisch und in ständiger Umstrukturierung begriffen verstanden wird. Nur so kann dieses System eine Vielzahl von wechselnden Aufgaben erfüllen:

- die mechanische Integration von Zytoplasma, Kern- und Zellmembran, (Hemi-) Desmosomen und der anderen beiden Filamentsysteme,
- die funktionelle Kompartimentisierung des Zytoplasmas,
- den Transport von funktionellen Proteinen und -komplexen und
- eine Reihe von Signalübertragungen.

Je nach funktioneller Situation einer Zelle und je nach ihrem genetischem Status (bei sich entwickelnden Geweben, bei bestimmten Sonderanforderungen und erst recht bei maligner Entartung) sind Abweichungen vom „Standard-Intermediärfilament" regelmäßig nachweisbar.

Bei dieser Koexpression zusätzlicher, „atypischer" Intermediärfilamente, bei der es sich meistens um Vimentin handelt, wird in aller Regel das ursprüngliche Intermediärfilament stabil weiter exprimiert (Coggi et al., 1989).

An dieser Stelle sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einzuordnen:

- Die in den gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen gezeigte Koexpression von Vimentin, zum geringern Teil auch von Neurofilamenten, in den basalen Zellschichten der invasiven Tumorzungen als funktionelles Phänomen eines gelockerten Zellverbandes genauso wie

- die den niedrig bis undifferenzierten und vorbehandelten Karzinomen eigene, diffuse Koexpression von Vimentin, Neurofilamenten und Desmin in einem teilweise hohen Anteil der Gesamtzellzahl als Ausdruck einer genetischen Deregulation.

Wie zuvor beschrieben überwog auch in dieser Untersuchung die Koexpression von Vimentin bei weitem die Koexpression mit allen anderen „nichtepithelialen" Intermediärfilamenten, und das ursprüngliche Intermediärfilament Keratin blieb ebenfalls in den koexprimierenden Zellen erhalten.

4.6.2. Koexpression führt zur Relativierung der Zuordnung von Intermediärfilamenten zu Gewebetypen

Der zweite Aspekt ist die aus der Tatsache, dass Intermediärfilamente eher nach den situativen Anforderungen als nach der histogenetischen Abstammung exprimiert werden, folgende Erkenntnis, dass es keine „fest verdrahtete" Zuordnung der Expression von Intermediärfilamentklassen zu bestimmten Gewebetypen gibt. Als Konsequenz ergab sich, dass die Immunhistochemie der Intermediärfilamente zur Diagnostik von undifferenzierten Malignomen zwar hilfreich ist, aber immer mit dem Wissen um o.g. Zusammenhänge interpretiert werden muss (Bsp.: Nicht jeder Vimentin-positive Tumor ist zwangsläufig ein Sarkom (Azumi et al., 1987)). Trotzdem bleibt die Typisierung der Intermediärfilamente durch die Immunhistochemie ein wichtiges Instrument zur Diagnostik von klinisch und morphologisch nicht gut beurteilbaren, undifferenzierten Malignomen und von Metastasen bei unbekanntem Primärtumor. In einigen Fällen kann die Koexpression von Intermediärfilamenten sogar als diagnostisches Kriterium herangezogen werden (Coggi et al., 1989).

4.6.3. Korrelation von Koexpression und biologischem Verhalten von Tumoren

Zum Dritten gab es in den letzten Jahren Untersuchungen darüber, ob sich das Phänomen der Koexpression von Intermediärfilamenten mit einem bestimmten biologischen Verhalten von Malignomen korrelieren lässt und des weiteren darüber, ob es sich darüber hinaus um einen Prognosemarker handelt.

So wurde beschrieben, dass Melanomzelllinien, die eine Koexpression von Vimentin und Keratin 8/18 aufwiesen, *in vitro* 6-mal invasiver waren als Melanomzelllinien, die nur Vimentin exprimierten (Hendrix et al., 1992; Chu et al., 1996; Hendrix et al., 1998). Eine Aussage zur klinischen Relevanz dieser Aussage wurde von den Autoren nicht gemacht.

Nestin wurde zwar in menschlichen Melanomen nachgewiesen, nicht aber in normalen Melanozyten und deshalb als Malignitätsmarker interpretiert (Florenes et al., 1994).

Auch an Vimentin und Keratin koexprimierenden Mammakarzinomzelllinien wurde ein erhöhtes Invasivitätspotential beobachtet, dass z.B. der mit der „mesenchymalen Transformation" verbundenen Fähigkeit zur Bildung von Stromaproteasen oder einer verbesserten Fähigkeit der Zellen zur Interpretation von Signalen der extrazellulären Matrix zugeschrieben wurde (Hendrix et al., 1996; Hendrix et al., 1997; Gilles et al., 1999). In einer späteren Arbeit der Gruppe wurden koexprimierende Mammakarzinomzelllinien auf weitere genetische Unterschiede untersucht. Dabei wurde eine Reihe von Faktoren identifiziert, die mit dem Invasionsverhalten positiv oder negativ assoziiert sind. Die Bedeutung der Koexpression wurde von den Autoren stark relativiert (Kirschmann et al., 1999). Von einer anderen Gruppe wurde eine Korrelation zwischen Koexpression und hohen Proliferationsmarkern (Ki67) sowie niedrigen Östrogenrezeptoren beschrieben. Beide Merkmale sprechen für eine ungünstige Prognose (Domagala et al., 1990).

In Bezug auf Plattenepithelkarzinome wurde mitgeteilt, dass eine Koexpression von Keratin und Vimentin in invasiven Zervixkarzinomen gesehen wurde, jedoch nie in höhergradigen Dysplasien. Daraus wurde gefolgert, die Vimentin-Expression sei ein Invasivitätsmarker (Gilles et al., 1996). Allerdings wurden die Beobachtung an invasiven Zervixkarzinomen, die koexprimierten, nicht mit Zervixkarzinomen, die nicht koexprimierten, verglichen, sodass die Schlussfolgerung, einen Invasivitätsmarker entdeckt zu haben, sehr fraglich zu sein scheint.

Weitere Untersuchungen des Autors an Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes konnte keine Korrelation zwischen biologischem Tumorverhalten und Koexpression von Intermediärfilamenten nachweisen.

Abschließend kann gesagt werden, dass es nach dem gegenwärtigen Stand der wissenschaftlichen Diskussion keinen Anhalt dafür gibt, dass die Koexpression von Intermediärfilamenten in Malignomen und insbesondere in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes eine prognostischen Aussage über das Tumorverhalten zulässt. Angesichts der hohen funktionalen und genetischen Interdependenz der Intermediärfilament-Expression mit wahrscheinlich wesentlich mehr als den bisher bekannten Faktoren bleibt abzuwarten, ob sich ein solcher Indikator-artiger Zusammenhang in der Zukunft nachweisen lassen wird.

5. Literatur

ALLEN, P.G.,SHAH, J.V., (1999):
Brains and brawn: plectin as regulator and reinforcer of the cytoskeleton.
Bioessays, 21(6): 451-4.

AL-SARRAF, M., LEBLANC, M., GIRI, P.G., FU, K.K., COOPER, J., VUONG, T., FORASTIERE, A.A., ADAMS, G., SAKR, W.A., SCHULLER, D.E.,ENSLEY, J.F., (1998):
Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099.
J Clin Oncol, 16(4): 1310-7.

ALTMANNSBERGER, M., DIRK, T., OSBORN, M.,WEBER, K., (1986):
Immunohistochemistry of cytoskeletal filaments in the diagnosis of soft tissue tumors.
Semin Diagn Pathol, 3(4): 306-16.

ALTMANNSBERGER, M., WEBER, K., DROSTE, R.,OSBORN, M., (1985):
Desmin is a specific marker for rhabdomyosarcomas of human and rat origin.
Am J Pathol, 118(1): 85-95.

ANDREOLI, J.M.,ET AL., (1994):
Fate of a headless vimentin protein in stable cell cultures: soluble and cytoskeletal forms.
Exp Cell Res., 214(1): 177-88.

ARCANGELETTI, C., DE CONTO, F., SUTTERLIN, R., PINARDI, F., MISSORINI, S., GERAUD, G., AEBI, U., CHEZZI, C.,SCHERRER, K., (2000):
Specific types of prosomes distribute differentially between intermediate and actin filaments in epithelial, fibroblastic and muscle cells.
Eur J Cell Biol, 79(6): 423-37.

ASCH, W.S.,SCHECHTER, N., (2000):
Plasticin, a type III neuronal intermediate filament protein, assembles as an obligate heteropolymer: implications for axonal flexibility.
J Neurochem, 75(4): 1475-86.

AZUMI, N.,BATTIFORA, H., (1987):
The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors.
Am J Clin Pathol, 88(3): 286-96.

BANWELL, B.L., (2001):
Intermediate filament-related myopathies.
Pediatr Neurol, 24(4): 257-63.

BARON, M.H., (1993):
Reversibility of the differentiated state in somatic cells.
Curr Opin Cell Biol, 5(6): 1050-6.

BARTEL-FRIEDRICH, S., FRIEDRICH, R.E.,HOLZHAUSEN, H.J., (2000):
Expression of cytokeratins and additional markers in undifferentiated lymph node metastases of the neck.
Anticancer Res, 20(6D): 4931-40.

BATTA, K., RUGG, E.L., WILSON, N.J., WEST, N., GOODYEAR, H., LANE, E.B., GRATIAN, M., DOPPING-HEPENSTAL, P., MOSS, C.,EADY, R.A., (2000):
A keratin 14 'knockout' mutation in recessive epidermolysis bullosa simplex resulting in less severe disease.
Br J Dermatol, 143(3): 621-7.

BATTIFORA, H., (1976):
Spindle cell carcinoma: ultrastructural evidence of squamous origin and collagen production by the tumor cells.
Cancer, 37(5): 2275-82.

BATTIFORA, H., (1988):
Clinical applications of the immunohistochemistry of filamentous proteins.
Am J Surg Pathol, 12 Suppl 1: 24-42.

BAUDOIN, C., MENEGUZZI, G., PORTIER, M.M., DEMARCHEZ, M., BERNERD, F., PISANI, A.,ORTONNE, J.P., (1993):
Peripherin, a neuronal intermediate protein, is stably expressed by neuroendocrine carcinomas of the skin, their xenograft on nude mice, and the corresponding primary cultures.
Cancer Res, 53(5): 1175-81.

BEAULIEU, J.M., JACOMY, H.,JULIEN, J.P., (2000):
Formation of intermediate filament protein aggregates with disparate effects in two transgenic mouse models lacking the neurofilament light subunit.
J Neurosci, 20(14): 5321-8.

BEAULIEU, J.M., ROBERTSON, J.,JULIEN, J.P., (1999):
Interactions between peripherin and neurofilaments in cultured cells: disruption of peripherin assembly by the NF-M and NF-H subunits.
Biochem Cell Biol, 77(1): 41-5.

BECKER, N.,WAHRENDORF, J., 1997:
Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland/ Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republic of Germany 1981-1990.

BELLIN, R.M., HUIATT, T.W., CRITCHLEY, D.R.,ROBSON, R.M., (2001):
Synemin may function to directly link muscle cell intermediate filaments to both myofibrillar Z-lines and costameres.
J Biol Chem, 276(34): 32330-7.

BELLIN, R.M., SERNETT, S.W., BECKER, B., IP, W., HUIATT, T.W.,ROBSON, R.M., (1999):
Molecular characteristics and interactions of the intermediate filament protein synemin. Interactions with alpha-actinin may anchor synemin-containing heterofilaments.
J Biol Chem, 274(41): 29493-9.

BENITEZ-KING, G., (2000):
PKC activation by melatonin modulates vimentin intermediate filament organization in N1E-115 cells.
J Pineal Res, 29(1): 8-14.

BEN-ZE'EV, A., (1983):
Cell configuration-related control of vimentin biosynthesis and phosphorylation in cultured mammalian cells.
J Cell Biol, 97(3): 858-65.

BEN-ZE'EV, A., (1990):
Application of two-dimensional gel electrophoresis in the study of cytoskeletal protein regulation during growth activation and differentiation.
Electrophoresis, 11(3): 191-200.

BEN-ZE'EV, A., ROBINSON, G.S., BUCHER, N.L.,FARMER, S.R., (1988):
Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes.
Proc Natl Acad Sci U S A, 85(7): 2161-5.

BILAK, S.R., SERNETT, S.W., BILAK, M.M., BELLIN, R.M., STROMER, M.H., HUIATT, T.W.,ROBSON, R.M., (1998):
Properties of the novel intermediate filament protein synemin and its identification in mammalian muscle.
Arch Biochem Biophys, 355(1): 63-76.

BLANKENSHIP, T.N., HESS, J.F.,FITZGERALD, P.G., (2001):
Development- and differentiation-dependent reorganization of intermediate filaments in fiber cells.
Invest Ophthalmol Vis Sci, 42(3): 735-42.

BOCKER, U., SIRENKO, O., MORRIS, J., SARTOR, R., SINGER, M., HASKILL, J.,WATSON, J., (2001):
Expression and localization of IL-1beta mRNA is interrelated with cytoskeletal rearrangement in monocytes stimulated by adherence: A light microscopy in situ hybridization study.
Immunol Cell Biol, 79(5): 444-53.

BORRADORI, L.,SONNENBERG, A., (1996):
Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases.
Curr Opin Cell Biol, 8(5): 647-56.

BOSCH, F.X., LEUBE, R.E., ACHTSTATTER, T., MOLL, R.,FRANKE, W.W., (1988):
Expression of simple epithelial type cytokeratins in stratified epithelia as detected by immunolocalization and hybridization in situ.
J Cell Biol, 106(5): 1635-48.

BOWLES, N.E., BOWLES, K.R.,TOWBIN, J.A., (2000):
The "final common pathway" hypothesis and inherited cardiovascular disease. The role of cytoskeletal proteins in dilated cardiomyopathy.
Herz, 25(3): 168-75.

BOYER, B., TUCKER, G.C., VALLES, A.M., FRANKE, W.W.,THIERY, J.P., (1989):
Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells.
J Cell Biol, 109(4 Pt 1): 1495-509.

BROERS, J.L., ROT, M.K., OOSTENDORP, T., HUYSMANS, A., WAGENAAR, S.S., WIERSMA-VAN TILBURG, A.J., VOOIJS, G.P.,RAMAEKERS, F.C., (1987):
Immunocytochemical detection of human lung cancer heterogeneity using antibodies to epithelial, neuronal, and neuroendocrine antigens.
Cancer Res, 47(12): 3225-34.

BROWN, M.J., HALLAM, J.A., COLUCCI-GUYON, E.,SHAW, S., (2001a):
Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments.
J Immunol, 166(11): 6640-6.

BROWN, M.J., HALLAM, J.A., LIU, Y., YAMADA, K.M.,SHAW, S., (2001b):
Cutting edge: integration of human T lymphocyte cytoskeleton by the cytolinker plectin.
J Immunol, 167(2): 641-5.

BRUGERE, J., GUENEL, P., LECLERC, A.,RODRIGUEZ, J., (1986):
Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth.
Cancer, 57(2): 391-5.

BURGESON, R.E.,CHRISTIANO, A.M., (1997):
The dermal-epidermal junction.
Curr Opin Cell Biol, 9(5): 651-8.

BURKHARD, P., STETEFELD, J.,STRELKOV, S.V., (2001):
Coiled coils: a highly versatile protein folding motif.
Trends Cell Biol, 11(2): 82-8.

BYUN, Y., CHEN, F., CHANG, R., TRIVEDI, M., GREEN, K.J.,CRYNS, V.L., (2001):
Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis.
Cell Death Differ, 8(5): 443-50.

CARLSSON, L., LI, Z., PAULIN, D.,THORNELL, L.E., (1999):
Nestin is expressed during development and in myotendinous and neuromuscular junctions in wild type and desmin knock-out mice.
Exp Cell Res, 251(1): 213-23.

CARY, R.B.,KLYMKOWSKY, M.W., (1994):
Differential organization of desmin and vimentin in muscle is due to differences in their head domains.
J Cell Biol, 126(2): 445-56.

CASELITZ, J., BECKER, J., SEIFERT, G., WEBER, K.,OSBORN, M., (1984):
Coexpression of keratin and vimentin filaments in adenoid cystic carcinomas of salivary glands.
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 403(4): 337-44.

CASELITZ, J., OSBORN, M., WUSTROW, J., SEIFERT, G.,WEBER, K., (1982):
The expression of different intermediate-sized filaments in human salivary glands and their tumours.
Pathol Res Pract, 175(2-3): 266-78.

CAULIN, C., WARE, C.F., MAGIN, T.M.,OSHIMA, R.G., (2000):
Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis.
J Cell Biol, 149(1): 17-22.

CHAN, Y., ANTON-LAMPRECHT, I., YU, Q.C., JACKEL, A., ZABEL, B., ERNST, J.P.,FUCHS, E., (1994a):
A human keratin 14 "knockout": the absence of K14 leads to severe epidermolysis bullosa simplex and a function for an intermediate filament protein.
Genes Dev, 8(21): 2574-87.

CHAN, Y.M., YU, Q.C., FINE, J.D.,FUCHS, E., (1993):
The genetic basis of Weber-Cockayne epidermolysis bullosa simplex.
Proc Natl Acad Sci U S A, 90(15): 7414-8.

CHAN, Y.M., YU, Q.C., LEBLANC-STRACESKI, J., CHRISTIANO, A., PULKKINEN, L., KUCHERLAPATI, R.S., UITTO, J.,FUCHS, E., (1994b):
Mutations in the non-helical linker segment L1-2 of keratin 5 in patients with Weber-Cockayne epidermolysis bullosa simplex.
J Cell Sci, 107(Pt 4): 765-74.

CHEN, C.S.,INGBER, D.E., (1999):
Tensegrity and mechanoregulation: from skeleton to cytoskeleton.
Osteoarthritis Cartilage, 7(1): 81-94.

CHEN, J.H., VERCAMER, C., LI, Z., PAULIN, D., VANDENBUNDER, B.,STEHELIN, D., (1996):
PEA3 transactivates vimentin promoter in mammary epithelial and tumor cells.
Oncogene, 13(8): 1667-75.

CHENG, J., SYDER, A.J., YU, Q.C., LETAI, A., PALLER, A.S.,FUCHS, E., (1992):
The genetic basis of epidermolytic hyperkeratosis: a disorder of differentiation-specific epidermal keratin genes.
Cell, 70(5): 811-9.

CHICUREL, M.E., CHEN, C.S.,INGBER, D.E., (1998):
Cellular control lies in the balance of forces.
Curr Opin Cell Biol, 10(2): 232-9.

CHING, G.Y.,LIEM, R.K., (1999):
Analysis of the roles of the head domains of type IV rat neuronal intermediate filament proteins in filament assembly using domain- swapped chimeric proteins.
J Cell Sci, 112(Pt 13): 2233-40.

CHOI, I., GUDAS, L.J.,KATZENELLENBOGEN, B.S., (2000):
Regulation of keratin 19 gene expression by estrogen in human breast cancer cells and identification of the estrogen responsive gene region.
Mol Cell Endocrinol, 164(1-2): 225-37.

CHOU, Y.H.,GOLDMAN, R.D., (2000):
Intermediate filaments on the move.
J Cell Biol, 150(3): F101-6.

CHOU, Y.H., HELFAND, B.T.,GOLDMAN, R.D., (2001):
New horizons in cytoskeletal dynamics: transport of intermediate filaments along microtubule tracks.
Curr Opin Cell Biol, 13(1): 106-9.

CHOU, Y.H., SKALLI, O.,GOLDMAN, R.D., (1997):
Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions.
Curr Opin Cell Biol, 9(1): 49-53.

CHU, Y.W., SEFTOR, E.A., ROMER, L.H.,HENDRIX, M.J., (1996):
Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility.
Am J Pathol, 148(1): 63-9.

CHU, Y.W., YANG, P.C., YANG, S.C., SHYU, Y.C., HENDRIX, M.J., WU, R.,WU, C.W., (1997):
Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line.
Am J Respir Cell Mol Biol, 17(3): 353-60.

COCHARD, P.,PAULIN, D., (1984):
Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo.
J Neurosci, 4(8): 2080-94.

COGGI, G., DELL'ORTO, P., BRAIDOTTI, P., COGGI, A.,VIALE, G., (1989):
Coexpression of intermediate filaments in normal and neoplastic human tissues: a reappraisal.
Ultrastruct Pathol, 13(5-6): 501-14.

COLLARD, J.F., COTE, F.,JULIEN, J.P., (1995):
Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.
Nature, 375(6526): 61-4.

CONNELL, N.D.,RHEINWALD, J.G., (1983):
Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells: reversible loss of keratin and increase in vimentin during rapid growth in culture.
Cell, 34(1): 245-53.

CORDELL, J.L., FALINI, B., ERBER, W.N., GHOSH, A.K., ABDULAZIZ, Z., MACDONALD, S., PULFORD, K.A., STEIN, H.,MASON, D.Y., (1984):
Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).
J Histochem Cytochem, 32(2): 219-29.

CORREIA, I., CHU, D., CHOU, Y.H., GOLDMAN, R.D.,MATSUDAIRA, P., (1999):
Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages.
J Cell Biol, 146(4): 831-42.

COULOMBE, P.A., BOUSQUET, O., MA, L., YAMADA, S.,WIRTZ, D., (2000):
The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization.
Trends Cell Biol, 10(10): 420-8.

COULOMBE, P.A., CHAN, Y.M., ALBERS, K.,FUCHS, E., (1990a):
Deletions in epidermal keratins leading to alterations in filament organization in vivo and in intermediate filament assembly in vitro.
J Cell Biol, 111(6 Pt 2): 3049-64.

COULOMBE, P.A.,FUCHS, E., (1990b):
Elucidating the early stages of keratin filament assembly.
J Cell Biol, 111(1): 153-69.

COULOMBE, P.A., HUTTON, M.E., LETAI, A., HEBERT, A., PALLER, A.S.,FUCHS, E., (1991a):
Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses.
Cell, 66(6): 1301-11.

COULOMBE, P.A., HUTTON, M.E., VASSAR, R.,FUCHS, E., (1991b):
A function for keratins and a common thread among different types of epidermolysis bullosa simplex diseases.
J Cell Biol, 115(6): 1661-74.

CROWE, D.L., MILO, G.E.,SHULER, C.F., (1999):
Keratin 19 downregulation by oral squamous cell carcinoma lines increases invasive potential.
J Dent Res, 78(6): 1256-63.

CZERNOBILSKY, B., MOLL, R., LEPPIEN, G., SCHWEIKHART, G.,FRANKE, W.W., (1987):
Desmosomal plaque-associated vimentin filaments in human ovarian granulosa cell tumors of various histologic patterns.
Am J Pathol, 126(3): 476-86.

DABBS, D.J., GEISINGER, K.R.,NORRIS, H.T., (1986):
Intermediate filaments in endometrial and endocervical carcinomas. The diagnostic utility of vimentin patterns.
Am J Surg Pathol, 10(8): 568-76.

DALAKAS, M.C., PARK, K.Y., SEMINO-MORA, C., LEE, H.S., SIVAKUMAR, K.,GOLDFARB, L.G., (2000):
Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene.
N Engl J Med, 342(11): 770-80.

DEBUS, E., WEBER, K.,OSBORN, M., (1983a):
Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides.
Differentiation, 25(2): 193-203.

DEBUS, E., WEBER, K.,OSBORN, M., (1983b):
Monoclonal antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament protein.
Embo J, 2(12): 2305-12.

DI SOMMA, S., MAROTTA, M., SALVATORE, G., CUDEMO, G., CUDA, G., DE VIVO, F., DI BENEDETTO, M.P., CIARAMELLA, F., CAPUTO, G.,DE DIVITIIS, O., (2000):
Changes in myocardial cytoskeletal intermediate filaments and myocyte contractile dysfunction in dilated cardiomyopathy: an in vivo study in humans.
Heart, 84(6): 659-67.

DJABALI, K., (1999):
Cytoskeletal proteins connecting intermediate filaments to cytoplasmic and nuclear periphery.
Histol Histopathol, 14(2): 501-9.

DODEMONT, H.,ET AL., (1994):
Eight genes and alternative RNA processing pathways generate an unexpectedly large diversity of cytoplasmic intermediate filament proteins in the nematode Caenorhabditis elegans.
Embo J., 13(11): 2625-38.

DODEMONT, H., RIEMER, D., WEBER, K., STEINERT, P.M., MAREKOV, L.N., FRASER, R.D., PARRY, D.A., ERIKSSON, J.E., OPAL, P., GOLDMAN, R.D., OSHIMA, R.G., SINGH, S., KOKE, J.R., GUPTA, P.D.,MALHOTRA, S.K., (1990):
Structure of an invertebrate gene encoding cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins: implications for the origin and the diversification of IF proteins.
Embo J, 9(12): 4083-94.

DOMAGALA, W., HALCZY-KOWALIK, L., WEBER, K.,OSBORN, M., (1988):
Coexpression of glial fibrillary acid protein, keratin and vimentin. A unique feature useful in the diagnosis of pleomorphic adenoma of the salivary gland in fine needle aspiration biopsy smears.
Acta Cytol, 32(3): 403-8.

DOMAGALA, W., LASOTA, J., BARTKOWIAK, J., WEBER, K.,OSBORN, M., (1990):
Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction.
Am J Pathol, 136(1): 219-27.

DORING, V.,STICK, R., (1990):
Gene structure of nuclear lamin LIII of Xenopus laevis; a model for the evolution of IF proteins from a lamin-like ancestor.
Embo J, 9(12): 4073-81.

ELDER, G.A., FRIEDRICH, V.L., JR., MARGITA, A.,LAZZARINI, R.A., (1999):
Age-related atrophy of motor axons in mice deficient in the mid-sized neurofilament subunit.
J Cell Biol, 146(1): 181-92.

ELLIS, G.L., LANGLOSS, J.M., HEFFNER, D.K.,HYAMS, V.J., (1987):
Spindle-cell carcinoma of the aerodigestive tract. An immunohistochemical analysis of 21 cases.
Am J Surg Pathol, 11(5): 335-42.

ENG, L.F., GHIRNIKAR, R.S.,LEE, Y.L., (2000):
Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000).
Neurochem Res, 25(9-10): 1439-51.

ERIKSSON, J.E., OPAL, P.,GOLDMAN, R.D., (1992):
Intermediate filament dynamics.
Curr Opin Cell Biol, 4(1): 99-104.

FAIGLE, W., COLUCCI-GUYON, E., LOUVARD, D., AMIGORENA, S.,GALLI, T., (2000):
Vimentin filaments in fibroblasts are a reservoir for SNAP23, a component of the membrane fusion machinery.
Mol Biol Cell, 11(10): 3485-94.

FERRARI, S., BATTINI, R., KACZMAREK, L., RITTLING, S., CALABRETTA, B., DE RIEL, J.K., PHILIPONIS, V., WEI, J.F.,BASERGA, R., (1986):
Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene.
Mol Cell Biol, 6(11): 3614-20.

FISCHER, H.P., WALLNER, F., MAIER, H., WEBER, K., OSBORN, M.,ALTMANNSBERGER, M., (1989):
Coexpression of intermediate filaments in squamous cell carcinomas of upper aerodigestive tract before and after radiation and chemotherapy.
Lab Invest, 61(4): 433-9.

FLIEGNER, K.H., CHING, G.Y.,LIEM, R.K., (1990):
The predicted amino acid sequence of alpha-internexin is that of a novel neuronal intermediate filament protein.
Embo J, 9(3): 749-55.

FLORENES, V.A., HOLM, R., MYKLEBOST, O., LENDAHL, U.,FODSTAD, O., (1994):
Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas.
Cancer Res, 54(2): 354-6.

FOLEY, J., WITTE, D., CHIU, F.C.,PARYSEK, L.M., (1994):
Expression of the neural intermediate filament proteins peripherin and neurofilament-66/alpha-internexin in neuroblastoma.
Lab Invest, 71(2): 193-9.

FRANKE, W.W., (1987):
Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: a growing multigene family.
Cell, 48(1): 3-4.

FRANKE, W.W., GRUND, C., KUHN, C., JACKSON, B.W.,ILLMENSEE, K., (1982):
Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments.
Differentiation, 23(1): 43-59.

FRANKE, W.W., SCHMID, E., OSBORN, M.,WEBER, K., (1978):
Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy.
Proc Natl Acad Sci U S A, 75(10): 5034-8.

FUCHS, E., (1994):
Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength.
J Cell Biol, 125(3): 511-6.

FUCHS, E., (1995):
Keratins and the skin.
Annu Rev Cell Dev Biol, 11: 123-53.

FUCHS, E.,CLEVELAND, D.W., (1998):
A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease.
Science, 279(5350): 514-9.

FUCHS, E., ESTEVES, R.A.,COULOMBE, P.A., (1992):
Transgenic mice expressing a mutant keratin 10 gene reveal the likely genetic basis for epidermolytic hyperkeratosis.
Proc Natl Acad Sci U S A, 89(15): 6906-10.

FUCHS, E.,MARCHUK, D., (1983):
Type I and type II keratins have evolved from lower eukaryotes to form the epidermal intermediate filaments in mammalian skin.
Proc Natl Acad Sci U S A, 80(19): 5857-61.

FUCHS, E.,WEBER, K., (1994):
Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease.
Annu Rev Biochem, 63: 345-82.

GABBIANI, G., KAPANCI, Y., BARAZZONE, P.,FRANKE, W.W., (1981):
Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells. A diagnostic aid for the surgical pathologist.
Am J Pathol, 104(3): 206-16.

GALLICANO, G.I., (2001):
Composition, regulation, and function of the cytoskeleton in mammalian eggs and embryos.
Front Biosci, 6: D1089-108.

GAO, Y.,SZTUL, E., (2001):
A novel interaction of the Golgi complex with the vimentin intermediate filament cytoskeleton.
J Cell Biol, 152(5): 877-94.

GATTER, K.C., DUNNILL, M.S., VAN MUIJEN, G.N.,MASON, D.Y., (1986):
Human lung tumours may coexpress different classes of intermediate filaments.
J Clin Pathol, 39(9): 950-4.

GEISLER, N., KAUFMANN, E.,WEBER, K., (1985):
Antiparallel orientation of the two double-stranded coiled-coils in the tetrameric protofilament unit of intermediate filaments.
J Mol Biol, 182(1): 173-7.

GEORGATOS, S.D., GOUNARI, F.,REMINGTON, S., (1994a):
The beaded intermediate filaments and their potential functions in eye lens.
Bioessays, 16(6): 413-8.

GEORGATOS, S.D., MEIER, J.,SIMOS, G., (1994b):
Lamins and lamin-associated proteins.
Curr Opin Cell Biol, 6(3): 347-53.

GILLES, C., POLETTE, M., PIETTE, J., DELVIGNE, A.C., THOMPSON, E.W., FOIDART, J.M.,BIREMBAUT, P., (1996):
Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential.
J Pathol, 180(2): 175-80.

GILLES, C., POLETTE, M., ZAHM, J.M., TOURNIER, J.M., VOLDERS, L., FOIDART, J.M.,BIREMBAUT, P., (1999):
Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration.
J Cell Sci, 112 (Pt 24): 4615-25.

GIUDICE, G.J.,FUCHS, E., (1987):
The transfection of epidermal keratin genes into fibroblasts and simple epithelial cells: evidence for inducing a type I keratin by a type II gene.
Cell, 48(3): 453-63.

GIULIANO, K.A.,TAYLOR, D.L., (1995):
Measurement and manipulation of cytoskeletal dynamics in living cells.
Curr Opin Cell Biol, 7(1): 4-12.

GLASGOW, E., DRUGER, R.K., LEVINE, E.M., FUCHS, C.,SCHECHTER, N., (1992):
Plasticin, a novel type III neurofilament protein from goldfish retina: increased expression during optic nerve regeneration.
Neuron, 9(2): 373-81.

GLUER, S., ZENSE, M.,VON SCHWEINITZ, D., (1998):
Cell adhesion molecules and intermediate filaments on embryonal childhood tumors [In Process Citation].
Pathol Res Pract, 194(11): 773-80.

GOEBEL, H.H., (1995):
Desmin-related neuromuscular disorders.
Muscle Nerve, 18(11): 1306-20.

GOEBEL, H.H.,BORNEMANN, A., (1993):
Desmin pathology in neuromuscular diseases.
Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 64(3): 127-35.

GOEBEL, H.H.,WARLO, I.A., (2000):
Progress in desmin-related myopathies.
J Child Neurol, 15(9): 565-72.

GOHARA, R., TANG, D., INADA, H., INAGAKI, M., TAKASAKI, Y.,ANDO, S., (2001):
Phosphorylation of vimentin head domain inhibits interaction with the carboxyl-terminal end of alpha-helical rod domain studied by surface plasmon resonance measurements.
FEBS Lett, 489(2-3): 182-6.

GOLDSTEIN, N.S., UNDERHILL, J., ROSZKA, J.,NEILL, J.S., (1999):
Cytokeratin 34 beta E-12 immunoreactivity in benign prostatic acini. Quantitation, pattern assessment, and electron microscopic study.
Am J Clin Pathol, 112(1): 69-74.

GOTTSCHALK, J., DOPEL, S.H., SCHULZ, J., FUCHS, M.,MARTIN, H., (1987):
[Significance of immunohistochemistry in neuro-oncology. V. Keratin as a marker for epithelial differentiation of primary and secondary intracranial and intraspinal tumors].
Zentralbl Allg Pathol, 133(2): 133-45.

GOULD, V.E., KOUKOULIS, G.K., JANSSON, D.S., NAGLE, R.B., FRANKE, W.W.,MOLL, R., (1990):
Coexpression patterns of vimentin and glial filament protein with cytokeratins in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast.
Am J Pathol, 137(5): 1143-55.

GOUNARI, F., MERDES, A., QUINLAN, R., HESS, J., FITZGERALD, P.G., OUZOUNIS, C.A.,GEORGATOS, S.D., (1993):
Bovine filensin possesses primary and secondary structure similarity to intermediate filament proteins.
J Cell Biol, 121(4): 847-53.

GOWN, A.M.,VOGEL, A.M., (1984):
Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. II. Distribution of filament proteins in normal human tissues.
Am J Pathol, 114(2): 309-21.

GRONE, H.J., WEBER, K., GRONE, E., HELMCHEN, U.,OSBORN, M., (1987):
Coexpression of keratin and vimentin in damaged and regenerating tubular epithelia of the kidney.
Am J Pathol, 129(1): 1-8.

GUO, L., DEGENSTEIN, L., DOWLING, J., YU, Q.C., WOLLMANN, R., PERMAN, B.,FUCHS, E., (1995):
Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration.
Cell, 81(2): 233-43.

HELMKE, B.P., THAKKER, D.B., GOLDMAN, R.D.,DAVIES, P.F., (2001):
Spatiotemporal analysis of flow-induced intermediate filament displacement in living endothelial cells.
Biophys J, 80(1): 184-94.

HEMKEN, P.M., BELLIN, R.M., SERNETT, S.W., BECKER, B., HUIATT, T.W.,ROBSON, R.M., (1997):
Molecular characteristics of the novel intermediate filament protein paranemin. Sequence reveals EAP-300 and IFAPa-400 are highly homologous to paranemin.
J Biol Chem, 272(51): 32489-99.

HENDRIX, M.J., SEFTOR, E.A., CHU, Y.W., SEFTOR, R.E., NAGLE, R.B., MCDANIEL, K.M., LEONG, S.P., YOHEM, K.H., LEIBOVITZ, A.M., MEYSKENS, F.L., JR.,ET AL., (1992):
Coexpression of vimentin and keratins by human melanoma tumor cells: correlation with invasive and metastatic potential.
J Natl Cancer Inst, 84(3): 165-74.

HENDRIX, M.J., SEFTOR, E.A., CHU, Y.W., TREVOR, K.T.,SEFTOR, R.E., (1996):
Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis.
Cancer Metastasis Rev, 15(4): 507-25.

HENDRIX, M.J., SEFTOR, E.A., SEFTOR, R.E., GARDNER, L.M., BOLDT, H.C., MEYER, M., PE'ER, J.,FOLBERG, R., (1998):
Biologic determinants of uveal melanoma metastatic phenotype: role of intermediate filaments as predictive markers.
Lab Invest, 78(2): 153-63.

HENDRIX, M.J., SEFTOR, E.A., SEFTOR, R.E.,TREVOR, K.T., (1997):
Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior.
Am J Pathol, 150(2): 483-95.

HERRMANN, H.,AEBI, U., (1998):
Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions.
Curr Opin Struct Biol, 8(2): 177-85.

HERRMANN, H.,AEBI, U., (2000a):
Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics.
Curr Opin Cell Biol, 12(1): 79-90.

HERRMANN, H., HANER, M., BRETTEL, M., KU, N.O.,AEBI, U., (1999):
Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins.
J Mol Biol, 286(5): 1403-20.

HERRMANN, H., STRELKOV, S.V., FEJA, B., ROGERS, K.R., BRETTEL, M., LUSTIG, A., HANER, M., PARRY, D.A., STEINERT, P.M., BURKHARD, P.,AEBI, U., (2000b):
The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly.
J Mol Biol, 298(5): 817-32.

HISANAGA, S., IKAI, A.,HIROKAWA, N., (1990):
Molecular architecture of the neurofilament. I. Subunit arrangement of neurofilament L protein in the intermediate-sized filament.
J Mol Biol, 211(4): 857-69.

HO, C.L., MARTYS, J.L., MIKHAILOV, A., GUNDERSEN, G.G.,LIEM, R.K., (1998):
Novel features of intermediate filament dynamics revealed by green fluorescent protein chimeras [In Process Citation].
J Cell Sci, 111(Pt 13): 1767-78 [MEDLINE record in process].

HOUSEWEART, M.K.,CLEVELAND, D.W., (1998):
Intermediate filaments and their associated proteins: multiple dynamic personalities.
Curr Opin Cell Biol, 10(1): 93-101.

HUTTON, E., PALADINI, R.D., YU, Q.C., YEN, M., COULOMBE, P.A.,FUCHS, E., (1998):
Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia.
J Cell Biol, 143(2): 487-99.

INADA, H., IZAWA, I., NISHIZAWA, M., FUJITA, E., KIYONO, T., TAKAHASHI, T., MOMOI, T.,INAGAKI, M., (2001):
Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD.
J Cell Biol, 155(3): 415-26.

INGBER, D.E., (1993):
Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton.
J Cell Sci, 104 (Pt 3): 613-27.

INGBER, D.E., (1997):
Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction.
Annu Rev Physiol, 59: 575-99.

IRVINE, A.D., CORDEN, L.D., SWENSSON, O., SWENSSON, B., MOORE, J.E., FRAZER, D.G., SMITH, F.J., KNOWLTON, R.G., CHRISTOPHERS, E., ROCHELS, R., UITTO, J.,MCLEAN, W.H., (1997):
Mutations in cornea-specific keratin K3 or K12 genes cause Meesmann's corneal dystrophy.
Nat Genet, 16(2): 184-7.

ISHIKAWA, H., BISCHOFF, R.,HOLTZER, H., (1968):
Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle.
J Cell Biol, 38(3): 538-55.

JACOMY, H., ZHU, Q., COUILLARD-DESPRES, S., BEAULIEU, J.M.,JULIEN, J.P., (1999):
Disruption of type IV intermediate filament network in mice lacking the neurofilament medium and heavy subunits.
J Neurochem, 73(3): 972-84.

JANMEY, P.A., EUTENEUER, U., TRAUB, P.,SCHLIWA, M., (1991):
Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks.
J Cell Biol, 113(1): 155-60.

KANITAKIS, J., BOURCHANY, D., FAURE, M.,CLAUDY, A., (1998):
Expression of the intermediate filament peripherin in skin tumors.
Eur J Dermatol, 8(5): 339-42.

KIM, K.H., STELLMACH, V., JAVORS, J.,FUCHS, E., (1987):
Regulation of human mesothelial cell differentiation: opposing roles of retinoids and epidermal growth factor in the expression of intermediate filament proteins.
J Cell Biol, 105(6 Pt 2): 3039-51.

KIRSCHMANN, D.A., SEFTOR, E.A., NIEVA, D.R., MARIANO, E.A.,HENDRIX, M.J., (1999):
Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer [In Process Citation].
Breast Cancer Res Treat, 55(2): 127-36 [MEDLINE record in process].

KLYMKOWSKY, M.W., (1982):
Vimentin and keratin intermediate filament systems in cultured PtK2 epithelial cells are interrelated.
Embo J, 1(2): 161-5.

KLYMKOWSKY, M.W., (1995):
Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions.
Curr Opin Cell Biol, 7(1): 46-54.

KOUKLIS, P.D., HUTTON, E.,FUCHS, E., (1994):
Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins.
J Cell Biol, 127(4): 1049-60.

KUIJPERS, W., TONNAER, E.L., PETERS, T.A.,RAMAEKERS, F.C., (1992):
Developmentally-regulated coexpression of vimentin and cytokeratins in the rat inner ear.
Hear Res, 62(1): 1-10.

LABROUSSE, F., LEBOUTET, M.J., PETIT, B., PARAF, F., BONCOEUR-MARTEL, M.P., MOREAU, J.J.,CATANZANO, G., (1999):
Cytokeratins expression in paragangliomas of the cauda equina.
Clin Neuropathol, 18(4): 208-13.

LANE, E.B., HOGAN, B.L., KURKINEN, M.,GARRELS, J.I., (1983):
Co-expression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of early mouse embryo.
Nature, 303(5919): 701-4.

LAROCCA, P.J.,RHEINWALD, J.G., (1984):
Coexpression of simple epithelial keratins and vimentin by human mesothelium and mesothelioma in vivo and in culture.
Cancer Res, 44(7): 2991-9.

LAZARIDES, E., (1980):
Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space.
Nature, 283(5744): 249-256.

LENDAHL, U., ZIMMERMAN, L.B.,MCKAY, R.D., (1990):
CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein.
Cell, 60(4): 585-95.

LEPEKHIN, E.A., ELIASSON, C., BERTHOLD, C.H., BEREZIN, V., BOCK, E.,PEKNY, M., (2001):
Intermediate filaments regulate astrocyte motility.
J Neurochem, 79(3): 617-25.

LETAI, A., COULOMBE, P.A.,FUCHS, E., (1992):
Do the ends justify the mean? Proline mutations at the ends of the keratin coiled-coil rod segment are more disruptive than internal mutations.
J Cell Biol, 116(5): 1181-95.

LETAI, A.,FUCHS, E., (1995):
The importance of intramolecular ion pairing in intermediate filaments.
Proc Natl Acad Sci U S A, 92(1): 92-6.

LEVAVASSEUR, F., ZHU, Q.,JULIEN, J.P., (1999):
No requirement of alpha-internexin for nervous system development and for radial growth of axons.
Brain Res Mol Brain Res, 69(1): 104-12.

LEWIS, S.A.,COWAN, N.J., (1985):
Genetics, evolution, and expression of the 68,000-mol-wt neurofilament protein: isolation of a cloned cDNA probe.
J Cell Biol, 100(3): 843-50.

LIAO, G.,GUNDERSEN, G.G., (1998):
Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin.
J Biol Chem, 273(16): 9797-803.

LIN, S., HIRSCHOWITZ, S.L., WILLIAMS, C., SHINTAKO, P., SAID, J.,RAO, J.Y., (2001):
Cytokeratin 20 as an immunocytochemical marker for detection of urothelial carcinoma in atypical cytology: preliminary retrospective study on archived urine slides.
Cancer Detect Prev, 25(2): 202-9.

LOWRIE, D.J., JR., STICKNEY, J.T.,IP, W., (2000):
Properties of the nonhelical end domains of vimentin suggest a role in maintaining intermediate filament network structure.
J Struct Biol, 132(2): 83-94.

LUBY-PHELPS, K., (1994):
Physical properties of cytoplasm.
Curr Opin Cell Biol, 6(1): 3-9.

MAIER, H., BORN, I.A.,MALL, G., (1988a):
Effect of chronic ethanol and nicotine consumption on the function and morphology of the salivary glands.
Klin Wochenschr, 66 Suppl 11: 140-50.

MAIER, H., DIETZ, A., GEWELKE, U., SEITZ, H.K.,HELLER, W.D., (1990):
[Tobacco- and alcohol-associated cancer risk of the upper respiratory and digestive tract].
Laryngorhinootologie, 69(10): 505-11.

MAIER, H., WEIDAUER, H.,ALTMANNSBERGER, M., (1988b):
[Co-expression of vimentin and keratin in tumors of the head and neck].
Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir, 12(3): 244-7.

MARCEAU, N., LORANGER, A., GILBERT, S., DAIGLE, N.,CHAMPETIER, S., (2001):
Keratin-mediated resistance to stress and apoptosis in simple epithelial cells in relation to health and disease.
Biochem Cell Biol, 79(5): 543-55.

MARCHUK, D., MCCROHON, S.,FUCHS, E., (1984):
Remarkable conservation of structure among intermediate filament genes.
Cell, 39(3 Pt 2): 491-8.

MARSZALEK, J.R., WILLIAMSON, T.L., LEE, M.K., XU, Z., HOFFMAN, P.N., BECHER, M.W., CRAWFORD, T.O.,CLEVELAND, D.W., (1996):
Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport.
J Cell Biol, 135(3): 711-24.

MCCLUGGAGE, W.G., EL-AGNAFF, M.,O'HARA, M.D., (1998):
Cytokeratin positive T cell malignant lymphoma.
J Clin Pathol, 51(5): 404-6.

MCCORMICK, M.B., COULOMBE, P.A.,FUCHS, E., (1991):
Sorting out IF networks: consequences of domain swapping on IF recognition and assembly.
J Cell Biol, 113(5): 1111-24.

MCCORMICK, M.B., KOUKLIS, P., SYDER, A.,FUCHS, E., (1993):
The roles of the rod end and the tail in vimentin IF assembly and IF network formation.
J Cell Biol, 122(2): 395-407.

MCKEON, F.D., KIRSCHNER, M.W.,CAPUT, D., (1986):
Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins.
Nature, 319(6053): 463-8.

MCLEAN, W.H.,LANE, E.B., (1995):
Intermediate filaments in disease.
Curr Opin Cell Biol, 7(1): 118-25.

MCNUTT, M.A., BOLEN, J.W., GOWN, A.M., HAMMAR, S.P.,VOGEL, A.M., (1985):
Coexpression of intermediate filaments in human epithelial neoplasms.
Ultrastruct Pathol, 9(1-2): 31-43.

MEIJER, J.W., RAMAEKERS, F.C., MANNI, J.J., SLOOFF, J.J., ALDEWEIRELDT, J.,VOOYS, G.P., (1988):
Intermediate filament proteins in spindle cell carcinoma of the larynx and tongue.
Acta Otolaryngol, 106(3-4): 306-13.

MERDES, A., GOUNARI, F.,GEORGATOS, S.D., (1993):
The 47-kD lens-specific protein phakinin is a tailless intermediate filament protein and an assembly partner of filensin.
J Cell Biol, 123(6 Pt 1): 1507-16.

MIETTINEN, M., LEHTO, V.P.,VIRTANEN, I., (1985):
Immunofluorescence microscopic evaluation of the intermediate filament expression of the adrenal cortex and medulla and their tumors.
Am J Pathol, 118(3): 360-6.

MILNER, D.J., MAVROIDIS, M., WEISLEDER, N.,CAPETANAKI, Y., (2000):
Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function.
J Cell Biol, 150(6): 1283-98.

MOGENSEN, M.M., HENDERSON, C.G., MACKIE, J.B., LANE, E.B., GARROD, D.R.,TUCKER, J.B., (1998):
Keratin filament deployment and cytoskeletal networking in a sensory epithelium that vibrates during hearing.
Cell Motil Cytoskeleton, 41(2): 138-53.

MOLL, R., FRANKE, W.W., SCHILLER, D.L., GEIGER, B.,KREPLER, R., (1982):
The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.
Cell, 31(1): 11-24.

MOLL, R., LEE, I., GOULD, V.E., BERNDT, R., ROESSNER, A.,FRANKE, W.W., (1987):
Immunocytochemical analysis of Ewing's tumors. Patterns of expression of intermediate filaments and desmosomal proteins indicate cell type heterogeneity and pluripotential differentiation.
Am J Pathol, 127(2): 288-304.

MOORE, G.E., GERNER, R.E.,FRANKLIN, H.A., (1967):
Culture of normal human leukocytes.
Jama, 199(8): 519-24.

MUNOZ-MARMOL, A.M., STRASSER, G., ISAMAT, M., COULOMBE, P.A., YANG, Y., ROCA, X., VELA, E., MATE, J.L., COLL, J., FERNANDEZ-FIGUERAS, M.T., NAVAS-PALACIOS, J.J., ARIZA, A.,FUCHS, E., (1998):
A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy.
Proc Natl Acad Sci U S A, 95(19): 11312-7.

NAGLE, R.B., (1988):
Intermediate filaments: a review of the basic biology.
Am J Surg Pathol, 12 Suppl 1: 4-16.

NAGLE, R.B., (1994):
A review of intermediate filament biology and their use in pathologic diagnosis.
Mol Biol Rep, 19(1): 3-21.

NAGLE, R.B., MOLL, R., WEIDAUER, H., NEMETSCHEK, H.,FRANKE, W.W., (1985):
Different patterns of cytokeratin expression in the normal epithelia of the upper respiratory tract.
Differentiation, 30(2): 130-40.

NAUMANN, H.H., HELMS, J., HERBERHOLD, C.,KASTENBAUER, E., 1992:
Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis, 2, Stuttgart.

NESS, S.L., EDELMANN, W., JENKINS, T.D., LIEDTKE, W., RUSTGI, A.K.,KUCHERLAPATI, R., (1998):
Mouse keratin 4 is necessary for internal epithelial integrity.
J Biol Chem, 273(37): 23904-11.

NEWEY, S.E., HOWMAN, E.V., PONTING, C.P., BENSON, M.A., NAWROTZKI, R., LOH, N.Y., DAVIES, K.E.,BLAKE, D.J., (2001):
Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle.
J Biol Chem, 276(9): 6645-55.

NIGG, E.A., (1992a):
Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina.
Semin Cell Biol, 3(4): 245-53.

NIGG, E.A., (1992b):
Assembly-disassembly of the nuclear lamina.
Curr Opin Cell Biol, 4(1): 105-9.

NIKI, T., PEKNY, M., HELLEMANS, K., BLESER, P.D., BERG, K.V., VAEYENS, F., QUARTIER, E., SCHUIT, F.,GEERTS, A., (1999):
Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells [see comments].
Hepatology, 29(2): 520-7.

NIXON, R.A., (1992):
Slow axonal transport.
Curr Opin Cell Biol, 4(1): 8-14.

NIXON, R.A., (1998):
The slow axonal transport of cytoskeletal proteins.
Curr Opin Cell Biol, 10(1): 87-92.

OKABE, S., MIYASAKA, H.,HIROKAWA, N., (1993):
Dynamics of the neuronal intermediate filaments.
J Cell Biol, 121(2): 375-86.

OSBORN, M., DEBUS, E.,WEBER, K., (1984):
Monoclonal antibodies specific for vimentin.
Eur J Cell Biol, 34(1): 137-43.

OSBORN, M., FRANKE, W.W.,WEBER, K., (1977):
Visualization of a system of filaments 7-10 nm thick in cultured cells of an epithelioid line (Pt K2) by immunofluorescence microscopy.
Proc Natl Acad Sci U S A, 74(6): 2490-4.

OSBORN, M.,WEBER, K., (1982):
Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: tubulin-containing structures.
Methods Cell Biol, 24: 97-132.

OSBORN, M.,WEBER, K., (1983):
Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology.
Lab Invest, 48(4): 372-94.

OSHIMA, R.G., (1992):
Intermediate filament molecular biology.
Curr Opin Cell Biol, 4(1): 110-6.

OSHIMA, R.G., HOWE, W.E., KLIER, F.G., ADAMSON, E.D.,SHEVINSKY, L.H., (1983):
Intermediate filament protein synthesis in preimplantation murine embryos.
Dev Biol, 99(2): 447-55.

PALADINI, R.D., TAKAHASHI, K., BRAVO, N.S.,COULOMBE, P.A., (1996):
Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16.
J Cell Biol, 132(3): 381-97.

PARAMIO, J.M., (1999):
A role for phosphorylation in the dynamics of keratin intermediate filaments.
Eur J Cell Biol, 78(1): 33-43.

PARRY, D.A., MAREKOV, L.N.,STEINERT, P.M., (2001):
Subfilamentous protofibril structures in fibrous proteins. cross-linking evidence for protofibrils in intermediate filaments.
J Biol Chem, 276(42): 39253-8.

PARRY, D.A.,STEINERT, P.M., (1992):
Intermediate filament structure.
Curr Opin Cell Biol, 4(1): 94-8.

PORTIER, M.M., DE NECHAUD, B.,GROS, F., (1983):
Peripherin, a new member of the intermediate filament protein family.
Dev Neurosci, 6(6): 335-44.

PRASAD, S., SOLDATENKOV, V.A., SRINIVASARAO, G.,DRITSCHILO, A., (1999):
Intermediate filament proteins during carcinogenesis and apoptosis (Review).
Int J Oncol, 14(3): 563-70.

PRIGNANO, F., DOMENICI, L., GERLINI, G., PIMPINELLI, N.,ROMAGNOLI, P., (1999):
Human keratinocytes cultured without a feeder layer undergo progressive loss of differentiation markers [In Process Citation].
Histol Histopathol, 14(3): 797-803 [MEDLINE record in process].

RAMAEKERS, F.C., HAAG, D., KANT, A., MOESKER, O., JAP, P.H.,VOOIJS, G.P., (1983):
Coexpression of keratin- and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells.
Proc Natl Acad Sci U S A, 80(9): 2618-22.

REILLY, J.F., MAHER, P.A.,KUMARI, V.G., (1998):
Regulation of astrocyte GFAP expression by TGF-beta1 and FGF-2.
Glia, 22(2): 202-10.

REIS, A., HENNIES, H.C., LANGBEIN, L., DIGWEED, M., MISCHKE, D., DRECHSLER, M., SCHROCK, E., ROYER-POKORA, B., FRANKE, W.W., SPERLING, K.,ET AL., (1994):
Keratin 9 gene mutations in epidermolytic palmoplantar keratoderma (EPPK).
Nat Genet, 6(2): 174-9.

RUHRBERG, C.,WATT, F.M., (1997):
The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture.
Curr Opin Genet Dev, 7(3): 392-7.

SAHLGREN, C.M., MIKHAILOV, A., HELLMAN, J., CHOU, Y.H., LENDAHL, U., GOLDMAN, R.D.,ERIKSSON, J.E., (2001):
Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase.
J Biol Chem, 276(19): 16456-63.

SCHRODER, R., FURST, D.O., KLASEN, C., REIMANN, J., HERRMANN, H.,VAN DER VEN, P.F., (2000):
Association of plectin with Z-discs is a prerequisite for the formation of the intermyofibrillar desmin cytoskeleton.
Lab Invest, 80(4): 455-64.

SCHULTZ, A., HOFFACKER, V., WILISCH, A., NIX, W., GOLD, R., SCHALKE, B., TZARTOS, S., MULLER-HERMELINK, H.K.,MARX, A., (1999):
Neurofilament is an autoantigenic determinant in myasthenia gravis.
Ann Neurol, 46(2): 167-75.

SCHWEITZER, S.C., KLYMKOWSKY, M.W., BELLIN, R.M., ROBSON, R.M., CAPETANAKI, Y.,EVANS, R.M., (2001):
Paranemin and the organization of desmin filament networks.
J Cell Sci, 114(Pt 6): 1079-89.

SEJERSEN, T.,LENDAHL, U., (1993):
Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development.
J Cell Sci, 106 (Pt 4): 1291-300.

SHAH, J.V., FLANAGAN, L.A., JANMEY, P.A.,LETERRIER, J.F., (2000):
Bidirectional translocation of neurofilaments along microtubules mediated in part by dynein/dynactin.
Mol Biol Cell, 11(10): 3495-508.

SHAW, G., OSBORN, M.,WEBER, K., (1986):
Reactivity of a panel of neurofilament antibodies on phosphorylated and dephosphorylated neurofilaments.
Eur J Cell Biol, 42(1): 1-9.

SHEA, T.B.,BEERMANN, M.L., (1999):
Neuronal intermediate filament protein alpha-internexin facilitates axonal neurite elongation in neuroblastoma cells [In Process Citation].
Cell Motil Cytoskeleton, 43(4): 322-33 [MEDLINE record in process].

SHOEMAN, R.L.,TRAUB, P., (1993):
Assembly of intermediate filaments.
Bioessays, 15(9): 605-11.

SMACK, D.P., KORGE, B.P.,JAMES, W.D., (1994):
Keratin and keratinization.
J Am Acad Dermatol, 30(1): 85-102.

SMITH, E.A.,FUCHS, E., (1998):
Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes.
J Cell Biol, 141(5): 1229-41.

SOUTHGATE, J., HARNDEN, P.,TREJDOSIEWICZ, L.K., (1999):
Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications.
Histol Histopathol, 14(2): 657-64.

STEINBOCK, F.A.,WICHE, G., (1999):
Plectin: a cytolinker by design.
Biol Chem, 380(2): 151-8.

STEINERT, P.M., MAREKOV, L.N., FRASER, R.D.,PARRY, D.A., (1993):
Keratin intermediate filament structure. Crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly.
J Mol Biol, 230(2): 436-52.

STEINERT, P.M.,ROOP, D.R., (1988):
Molecular and cellular biology of intermediate filaments.
Annu Rev Biochem, 57: 593-625.

STELLMACH, V.M.,FUCHS, E., (1989):
Exploring the mechanisms underlying cell type-specific and retinoid- mediated expression of keratins.
New Biol, 1(3): 305-17.

STERNBERGER, L.A., HARDY, P.H., JR., CUCULIS, J.J.,MEYER, H.G., (1970):
The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes.
J Histochem Cytochem, 18(5): 315-33.

STEWART, M., (1993):
Intermediate filament structure and assembly.
Curr Opin Cell Biol, 5(1): 3-11.

SWANSON, P.E., (1991):
Heffalumps, jagulars, and cheshire cats. A commentary on cytokeratins and soft tissue sarcomas.
Am J Clin Pathol, 95(4 Suppl 1): S2-7.

TASCOS, N.A., PARR, J.,GONATAS, N.K., (1982):
Immunocytochemical study of the glial fibrillary acidic protein in human neoplasms of the central nervous system.
Hum Pathol, 13(5): 454-8.

TOLLE, H.G., WEBER, K.,OSBORN, M., (1986):
Microinjection of monoclonal antibodies to vimentin, desmin, and GFA in cells which contain more than one IF type.
Exp Cell Res, 162(2): 462-74.

TOMSON, A.M., SCHOLMA, J., MEIJER, B., KONING, J.G., DE JONG, K.M.,VAN DER WERF, M., (1996):
Adhesion properties, intermediate filaments and malignant behaviour of head and neck squamous cell carcinoma cells in vitro.
Clin Exp Metastasis, 14(6): 501-11.

TUROWSKI, P., MYLES, T., HEMMINGS, B.A., FERNANDEZ, A.,LAMB, N.J., (1999):
Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55.
Mol Biol Cell, 10(6): 1997-2015.

TUYNS, A.J., ESTEVE, J., RAYMOND, L., BERRINO, F., BENHAMOU, E., BLANCHET, F., BOFFETTA, P., CROSIGNANI, P., DEL MORAL, A., LEHMANN, W.,ET AL., (1988):
Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France).
Int J Cancer, 41(4): 483-91.

VALNES, K., BRANDTZAEG, P.,ROGNUM, T.O., (1984):
Sensitivity and efficiency of four immunohistochemical methods as defined by staining of artificial sections.
Histochemistry, 81(4): 313-9.

VAN MUIJEN, G.N., WARNAAR, S.O.,PONEC, M., (1987):
Differentiation-related changes of cytokeratin expression in cultured keratinocytes and in fetal, newborn, and adult epidermis.
Exp Cell Res, 171(2): 331-45.

VIAC, J., REANO, A., BROCHIER, J., STAQUET, M.J.,THIVOLET, J., (1983):
Reactivity pattern of a monoclonal antikeratin antibody (KL1).
J Invest Dermatol, 81(4): 351-4.

VIKSTROM, K.L., LIM, S.S., GOLDMAN, R.D.,BORISY, G.G., (1992):
Steady state dynamics of intermediate filament networks.
J Cell Biol, 118(1): 121-9.

VIRTANEN, I., LEHTO, V.P., LEHTONEN, E., VARTIO, T., STENMAN, S., KURKI, P., WAGER, O., SMALL, J.V., DAHL, D.,BADLEY, R.A., (1981):
Expression of intermediate filaments in cultured cells.
J Cell Sci, 50: 45-63.

VOLLRATH, M., OSBORN, M.,ALTMANNSBERGER, M., (1987):
[Immunohistological demonstration of the intermediate filaments in a laryngeal carcinosarcoma: considerations on its histogenesis].
Laryngol Rhinol Otol (Stuttg), 66(6): 307-10.

VON OVERBECK, J., STAHLI, C., GUDAT, F., CARMANN, H., LAUTENSCHLAGER, C., DURMULLER, U., TAKACS, B., MIGGIANO, V., STAEHELIN, T.,HEITZ, P.U., (1985):
Immunohistochemical characterization of an anti-epithelial monoclonal antibody (mAB lu-5).
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 407(1): 1-12.

VORBURGER, K., KITTEN, G.T.,NIGG, E.A., (1989):
Modification of nuclear lamin proteins by a mevalonic acid derivative occurs in reticulocyte lysates and requires the cysteine residue of the C-terminal CXXM motif.
Embo J, 8(13): 4007-13.

WALLNER, F., MAIER, H., FISCHER, H.P., BORN, A.,ALTMANNSBERGER, M., (1990):
[The coexpression of keratin and vimentin in untreated squamous cell carcinoma of the ENT tract].
Laryngorhinootologie, 69(12): 636-41.

WANG, E., (1985):
Intermediate filament associated proteins.
Ann N Y Acad Sci, 455: 32-56.

WANG, L., HO, C.L., SUN, D., LIEM, R.K.,BROWN, A., (2000a):
Rapid movement of axonal neurofilaments interrupted by prolonged pauses.
Nat Cell Biol, 2(3): 137-41.

WANG, N., BUTLER, J.P.,INGBER, D.E., (1993):
Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton.
Science, 260(5111): 1124-7.

WANG, N., NARUSE, K., STAMENOVIC, D., FREDBERG, J.J., MIJAILOVICH, S.M., TOLIC-NORRELYKKE, I.M., POLTE, T., MANNIX, R.,INGBER, D.E., (2001):
Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model.
Proc Natl Acad Sci U S A, 98(14): 7765-70.

WANG, N.,STAMENOVIC, D., (2000b):
Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth.
Am J Physiol Cell Physiol, 279(1): C188-94.

WANG, S.M., HUANG, Y.S., WU, J.C.,TSENG, Y.Z., (2000c):
Role of desmin filaments in chicken cardiac myofibrillogenesis.
J Cell Biochem, 77(4): 635-44.

WEIDAUER, H., NAGLE, R.B., MOLL, R.,FRANKE, W.W., (1986):
[Cytokeratin expression in normal and malignant tongue epithelium].
Laryngol Rhinol Otol (Stuttg), 65(4): 164-8.

WHITTOCK, N.V., ASHTON, G.H., GRIFFITHS, W.A., EADY, R.A.,MCGRATH, J.A., (2001):
New mutations in keratin 1 that cause bullous congenital ichthyosiform erythroderma and keratin 2e that cause ichthyosis bullosa of Siemens.
Br J Dermatol, 145(2): 330-5.

WILSON, A.K., COULOMBE, P.A.,FUCHS, E., (1992):
The roles of K5 and K14 head, tail, and R/K L L E G E domains in keratin filament assembly in vitro.
J Cell Biol, 119(2): 401-14.

WINTER, H., ROGERS, M.A., LANGBEIN, L., STEVENS, H.P., LEIGH, I.M., LABREZE, C., ROUL, S., TAIEB, A., KRIEG, T.,SCHWEIZER, J., (1997):
Mutations in the hair cortex keratin hHb6 cause the inherited hair disease monilethrix.
Nat Genet, 16(4): 372-4.

WU, K.C., BRYAN, J.T., MORASSO, M.I., JANG, S.I., LEE, J.H., YANG, J.M., MAREKOV, L.N., PARRY, D.A.,STEINERT, P.M., (2000):
Coiled-coil trigger motifs in the 1B and 2B rod domain segments are required for the stability of keratin intermediate filaments.
Mol Biol Cell, 11(10): 3539-58.

YANG, J.M., NAM, K., KIM, S.W., JUNG, S.Y., MIN, H.G., YEO, U.C., PARK, K.B., LEE, J.H., SUHR, K.B., PARK, J.K.,LEE, E.S., (1999):
Arginine in the beginning of the 1A rod domain of the keratin 10 gene is the hot spot for the mutation in epidermolytic hyperkeratosis.
J Dermatol Sci, 19(2): 126-33.

YOON, K.H., YOON, M., MOIR, R.D., KHUON, S., FLITNEY, F.W.,GOLDMAN, R.D., (2001):
Insights into the dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells.
J Cell Biol, 153(3): 503-16.

ZARBO, R.J., CRISSMAN, J.D., VENKAT, H.,WEISS, M.A., (1986):
Spindle-cell carcinoma of the upper aerodigestive tract mucosa. An immunohistologic and ultrastructural study of 18 biphasic tumors and comparison with seven monophasic spindle-cell tumors.
Am J Surg Pathol, 10(11): 741-53.

ZHOU, X., LIAO, J., HU, L., FENG, L.,OMARY, M.B., (1999):
Characterization of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 19 and its role in filament organization.
J Biol Chem, 274(18): 12861-6.

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.

6. Zusammenfassung

Die Intermediärfilamente sind neben Mikrofilamenten und Mikrotubuli das dritte zytoplasmatische Filamentsystem. Anders als die beiden letztgenannten sind sie aber durch eine hohe Diversifikation gekennzeichnet, die offenbar einer Anpassung an unterschiedliche Funktionsanforderungen entspricht.

Dadurch ergab sich die Möglichkeit, einzelne Intermediärfilamentklassen bestimmten Gewebetypen zuzuordnen, im Fall der Keratine sogar einzelne Keratinpaarungen bestimmten Epithelien. Das erhielt erhebliche klinische Relevanz durch die immunhistochemische Identifikation der Intermediärfilament-Expression in Tumoren, vor allem in den Fällen, in denen die klassische Histochemie bzw. Morphologie differentialdiagnostisch nicht mehr weiterhelfen konnte.

Die ursprüngliche Ansicht, dass die Zuordnung von Intermediärfilamenten und Gewebetypen so stabil sei, dass sie unter allen Lebensbedingungen einer Zelle unverändert bliebe, ließ sich allerdings nicht lange aufrecht erhalten. Immer mehr Änderungen der Intermediärfilament-Expression bei Änderung der Lebensbedingungen einer Zelle wurden beschrieben, und immer mehr Koexpressionen mehrerer Intermediärfilamentklassen innerhalb einer Zelle konnten nachgewiesen werden.

Erstmalig wurde in der vorliegenden Untersuchung die Koexpression von Intermediärfilamenten in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes systematisch untersucht. Dabei wurden die zum Zeitpunkt der Untersuchung aktuellen immunhistochemischen Verfahren der APAAP-Methode und der indirekten Immunfluoreszenz angewendet.

Bemerkenswerterweise konnte nicht nur gezeigt werden, das die untersuchten Karzinomproben neben dem zu erwartenden Keratin auch Vertreter der drei anderen zytoplasmatischen Intermediärfilamentklassen (Klasse VI: Nestin ausgenommen) exprimieren. Es ließen sich darüber hinaus zwei verschiedene Koexpressionsmuster feststellen und klar voneinander abgrenzen: Nicht nur bei genetisch deregulierten undifferenzierten Karzinomen war Koexpression zu beobachten, in diesem Fall vom Verteilungsmuster her diffus oder in Zellnestern.. Als zweites Phänomen konnte in einer beeindruckend hohen Zahl von hoch- und mittelgradig differenzierten Plattenepithelkarzinomen eine Koexpression in den äußeren ein bis zwei Zelllagen des Tumorgewebes, d.h. an der Invasionsfront festgestellt werden. Es ist naheliegend, dass das mit den funktional geänderten Lebensbedingungen dieser Zellen in Zusammenhang steht. Dieser zweite Typ von Koexpression ließ sich mit Vimentin und mit Neurofilamenten nachweisen.

Die Häufigkeit der Koexpression war unterschiedlich: Am häufigsten wurde Vimentin koexprimiert, seltener Neurofilamente und Desmin. Beim untersuchten GFAP konnte keine Koexpression nachgewiesen werden. Insgesamt gesehen trat die Koexpression in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes so häufig auf, dass man sie nachdrücklich als regelmäßiges Phänomen bewerten muss.

7. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. M. Altmannsberger nicht nur für das Überlassen des Themas meiner Dissertation danken, sondern insbesondere für die mir umfassend gewährte fachliche Betreuung, für die freundschaftliche Unterstützung, die ich von ihm erfahren habe, und nicht zuletzt für seine Geduld, die das späte Beenden dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

Ich danke Frau Petra Hahn-Kohlberger, von der ich die histologischen und immunhistologischen Methoden erlernen konnte und die für alle labortechnischen Fragen stets zugänglich war.

Den Universitäts-HNO-Kliniken Gießen und Heidelberg danke ich für das Überlassen von Untersuchungsmaterial und von Informationen zum Krankheitsverlauf.

Mein besonderer Dank gilt allen Freunden und Kollegen, die mich im Lauf der Zeit beim Erstellen dieser Arbeit ermutigt und unterstützt haben, insbesondere Susanne und Ralph.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung mein Studium ermöglicht haben.

8. Lebenslauf

Name	Frank Karl-Heinz Wallner
Geburtsdatum	22.04.1960
Geburtsort	Osnabrück
Eltern	Ernst Wallner und Hedwig Wallner, geb. Thye
Familienstand	Ledig
Schulbildung	
1966 – 1969	Martinusschule, Bramsche
1969 – 1978	Gymnasium Bramsche
03.05.1978	Abitur
Grundwehrdienst	
1978 – 1979	1. / Flugabwehrraketenbatallion 25
Studium	
1979 – 1986	Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
05.05.1986	Ärztliche Prüfung
06.06.1986	Approbation als Arzt
Ärztliche Tätigkeit	
1987 – 1988	Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pathologie der JLU
Seit 1988	Wissenschaftlicher Assistent an der Universitäts-HNO-Klinik Heidelberg
15.03.1995	Anerkennung zum Arzt für Hals-Nasen-Ohren-Krankheiten
01.05.1995	Ernennung zum Oberarzt an der Universitäts-HNO-Klinik Heidelberg
1996	Zusatzbezeichung „Allergologie“
1999 - 2000	Ausbildung zum Ärztlichen Qualitätsmanager
01.05.2003	Ernennung zum Leitenden Oberarzt an der Universitäts-HNO-Klinik Heidelberg
Preise	
2001	Lehrpreis der Medizinischen Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg