

Redaktion  
H.P.Zenner, Tübingen

## Originalien

Christel Herold-Mende<sup>1</sup> · T. Andl<sup>2</sup> · F. Laemmler<sup>1</sup> · Ch. Reißer<sup>1</sup> · S. Eichhorn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> AG Molekulare Zellbiologie, Universitäts-HNO-Klinik Heidelberg  
(Ärztl. Direktor: Prof. Dr. H. Weidauer)

<sup>2</sup> Abteilung Tumorbologie, Wistar-Institut (Direktor: Prof. Dr. M. Herlyn), Philadelphia, PA, USA

# Expression und Lokalisation des EZM-Moleküls Tenascin in Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs\*

## Zusammenfassung

Tenascin, ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix (EZM), ist aufgrund seiner proliferations- und migrationsassoziierten Expression ein Zielmolekül in der intraläsionalen Glioblastomtherapie. Ob dieses Konzept auf Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes übertragbar ist, hängt wesentlich vom Tenascinexpressionsmuster in diesen Tumoren ab. Unser Ziel war es zu klären, von welchen Zellen und wie selektiv Tenascin exprimiert wird und ob ein Zusammenhang mit dem Tumorstadium besteht. Die Tenascinexpression wurde immunhistochemisch und über In-situ-Hybridisierung an Nativgeweben von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen ( $n=39$ ) sowie an Tumorzellkulturen ( $n=15$ ) untersucht. Die so erhaltenen Expressionsmuster wurden denen der Normalschleimhaut gegenübergestellt. Tenascin wurde in Tumoren verstärkt exprimiert und war in der gesamten tumorumgebenden EZM lokalisiert. Die mRNA-Analyse am Gewebeschnitt und die Proteinanalyse der Tumorzellkulturen ergab, daß die Tumorzellen selbst Tenascin synthetisierten. Ein Zusammenhang von Tenascinexpression und TNM-Stadium oder Tumorpheriferation war nicht nachweisbar. Unsere Ergebnisse zeigen, daß Tenascin in Kopf-Hals-Tumoren selektiv exprimiert wird und sich für eine gezielte, onkologische Therapie anbietet.

## Schlüsselwörter

Tenascin · Extrazelluläre Matrix · Kopf-Hals-Tumoren · In-situ-Hybridisierung

**G**enese, Proliferation, Differenzierung und Migration maligner Tumore werden durch eine Vielzahl regulierender Substanzen beeinflusst. Werden solche Substanzen selektiv von Tumorzellen produziert, bieten sie sich als Angriffsort für eine gezielte onkologische Therapie an. Dies kann entweder auf der Ebene des Proteins oder der exprimierten mRNA geschehen. Deshalb ist ein Hauptziel der angewandten, onkologischen Forschung die Identifizierung solcher differentiell exprimierter Gene, um so diese Gene bzw. ihre Genprodukte für neue Wege der therapeutischen Intervention zu nutzen.

Eine dieser Substanzen ist Tenascin. Hierbei handelt es sich um ein hexameres 190 kd Glykoprotein, das vor allem in der extrazellulären Matrix (EZM) von Prozessen mit einem hohen migratorischen und proliferativen Potential nachgewiesen werden kann. So wird es während der Embryonalentwicklung [5], der Wundheilung [12] und in malignen Tumoren ([4] und darin enthaltene Referenzen) vermehrt exprimiert.

Die funktionelle Rolle von Tenascin in diesen Prozessen ist noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, daß es z.B. während der Embryonalentwicklung die strukturelle Organisation des Hirngewebes beeinflusst [6]. Darüber hinaus scheint Tenascin in der Wundheilung die Zelladhäsion und die Zellmigration zu beeinflussen [13]. In bezug auf maligne Tumoren sind die bisherigen Kenntnisse eher deskriptiver Natur. Beispielsweise kann Tenascin im

Normalhirn nur in Spuren nachgewiesen werden, während seine Expression z.B. in bösartigen Hirntumoren, wie dem Glioblastom deutlich hochreguliert ist [9].

Diese Beobachtung führte in der Glioblastombehandlung zur Entwicklung einer Therapie, bei der gegen das Tenascinmolekül gerichtete radioaktiv markierte Antikörper verwendet wurden. Diese wurden im Rahmen zweier klinischer Phase-I- und -II-Studien intraläsional verabreicht mit dem Ziel am Ort der Bindung das entsprechende Gewebe durch radioaktiven Zerfall zu zerstören [2, 16]. In beiden klinischen Studien konnte eine deutliche Verbesserung des rezidivfreien Intervalls und der Überlebenszeit beobachtet werden.

Eine Hochregulation der Expression von Tenascin wurde auch für epitheliale Tumoren, z.B. das Mammakarzinom und das Dickdarmkarzinom [3, 7] beschrieben. In bezug auf HNO-Tumoren ist bekannt, daß auch hier Tenascin verstärkt exprimiert wird [15]. Der genaue Expressionsort in vivo, ob Tumorzelle selbst oder die sie umgebenden Fibroblasten, wurde jedoch nicht untersucht. Außerdem wurde bislang die Korrelation der Tenascinexpression

\* Herrn Professor Dr. H. Weidauer zum 60. Geburtstag gewidmet

Dr. C. Herold-Mende  
AG Molekulare Zellbiologie, Universitäts-HNO-Klinik, Im Neuenheimer Feld 400, D-69120 Heidelberg

C. Herold-Mende · T. Andl · F. Laemmler  
Ch. Reißer · S. Eichhorn

### Expression and localization profile of tenascin in squamous cell carcinomas of the head and neck

#### Summary

Tenascin is a glycoprotein of the extracellular matrix and is mainly expressed in association with a high proliferative and migratory activity. This characteristic has made it a successfully used target molecule in the treatment of glioblastoma. An application of anti-tenascin therapy concept in squamous cell carcinomas of the head and neck (HNSCC) mainly depends on the expression pattern of tenascin in a tumor type. In the present study, we analyzed the messenger (m) RNA and protein expression of tenascin in HNSCC tumors when compared to normal mucosa and determined its cellular localization and correlation with various clinical parameters, including tumor staging. In native tissue tenascin protein was localized in the entire extracellular matrix surrounding the tumor. Normal mucosa showed only a weak and interrupted basement membrane staining. In situ hybridization revealed a very faint tenascin mRNA signal in basal cells of normal mucosa and a strong signal in tumor cells. This tumor cell-specific expression of tenascin was confirmed at the protein level in HNSCC cultures. However, there was no correlation of tenascin expression with tumor staging or tumor cell proliferation. Our data clearly show that tenascin is selectively expressed in HNSCC and therefore could be useful for a therapeutic intervention in these tumors.

#### Key words

Tenascin · Extracellular matrix · Squamous cell carcinoma of the head and neck · In situ hybridization

## Originalien

zum klinischen Tumorstadium oder der Tumorpheriferation nicht analysiert.

Um zu beurteilen, ob sich ein Therapiekonzept ähnlich dem der Glioblastome auch für z.B. fortgeschrittene, inoperable Kopf-Hals-Tumoren anbietet, war es unser Anliegen das Expressionsmuster von Tenascin in diesen Tumoren umfassend zu analysieren. Dies sollte sowohl auf der Proteinebene wie auch auf der mRNA-Ebene und im Zu-

sammenhang mit der Proliferation und dem TNM-Stadium der Tumoren durchgeführt werden.

## Material und Methoden

### Gewebebeobachtung

Es wurden im Rahmen tumorbedingter Operationen Biopsien von primären Tumoren ( $n=29$ ) und Lymphknotenmetastasen ( $n=10$ ) gewonnen. Als Kontrolle

Tabelle 1

**Klassifikation, Lokalisation und immunhistochemische Analyse der untersuchten Plattenepithelkarzinome bzw. Lymphknotenmetastasen (+=schwach, +=mittel, +++=stark exprimiert, Ca. Karzinom)**

	TNM	Lokalisation	Tenascin	Mib
HNO 49	T1N0M0	Oropharynx-Ca.	+++	+++
HNO 82	T1N0M0	Oropharynx-Ca.	+++	++
HNO 88	T1N0M0	Oropharynx-Ca.	+++	++
HNO 30	T2N0M0	Larynx-Ca.	+++	+++
HNO 35	T2N0M0	Oropharynx-Ca.	+++	+++
HNO 73	T2N0M0	Oropharynx-Ca.	+++	++
HNO 75	T2N0M0	Oropharynx-Ca.	+++	+
HNO 89	T2N0M0	Larynx-Ca.	+++	++
HNO 13	T3N0M0	Oropharynx-Ca.	+++	+++
HNO 33	T3N0M0	Larynx-Ca.	+++	+
HNO 8	T3N0M0	Larynx-Ca.	+++	++
HNO 7	T4N0M0	Oropharynx-Ca.	+++	++
HNO 9	T4N0M0	Oropharynx-Ca.	+++	++
HNO 20	T4N0M0	Oropharynx-Ca.	+++	+++
HNO 21	T4N0M0	Larynx-Ca.	+++	+
HNO 40	T4N0M0	Larynx-Ca.	+++	+++
HNO 53	T4N0M0	NNH-Ca.	+++	+++
HNO 28 Met	TxN2bM0	CUP	+++	+++
HNO 70 Met	TxN2bM0	CUP	+++	++
HNO 77 Met	T1N2bM0	Oropharynx-Ca.	+++	+++
HNO 5	T2N2M0	Hypopharynx-Ca.	+++	+++
HNO 6	T2N1M0	Larynx-Ca.	+++	+
HNO 16	T2N2cM0	Oropharynx-Ca.	+++	+++
HNO 19 Met	T1N2cM0	Oropharynx-Ca.	+++	+
HNO 29 Met	T2N2bM0	Larynx-Ca.	+++	+++
HNO 37 Tu	T2N2bM0	Oropharynx-Ca.	+++	+++
Met			+++	+++
HNO 39 Met	T2N2bM0	Hypopharynx-Ca.	+++	+
HNO 48	T2N1M0	Oropharynx-Ca.	+++	++
HNO 14	T3N1–3M0	Hypopharynx-Ca.	+++	++
HNO 41 Tu	T3N2bM0	Oropharynx-Ca.	+++	+++
Met			+++	+
HNO 24	T4N2M0	Larynx-Oroph.-Ca.	+++	+++
HNO 25 Tu	T4N2bM0	Oropharynx-Ca.	+++	+++
Met			+++	++
HNO 26 Tu	T4N2bM0	Oropharynx-Ca.	+++	+++
Met			+++	+++
HNO 47	T4N2aM0	Larynx-Ca.	+++	+++
HNO 54	T4N2bM0	Hypopharynx-Ca.	+++	++

dienten Schleimhäute von Nicht-Tumorpatienten ( $n=5$ ); es handelte sich hierbei um Oropharynxschleimhäute aus Tonsillektomiepräparaten. Die Gewebeprobe wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bei den Tumoren handelte es sich ausschließlich um Plattenepithelkarzinome aus dem Oropharynx ( $n=16$ ), dem Larynx ( $n=9$ ), dem Hypopharynx ( $n=3$ ), den Nasennebenhöhlen ( $n=1$ ), davon stammenden Lymphknotenmetastasen ( $n=8$ ) und Metastasen bei unbekanntem Primärtumor plattenepithelialen Ursprungs (CUP,  $n=2$ ). Die Tumoren wurden histopathologisch entsprechend der WHO-Klassifikation (4. Auflage, 1987) beurteilt. Bei 15 Geweben wurde ein Teil der Biopsie zur Anlage einer primären Tumorzellkultur verwendet.

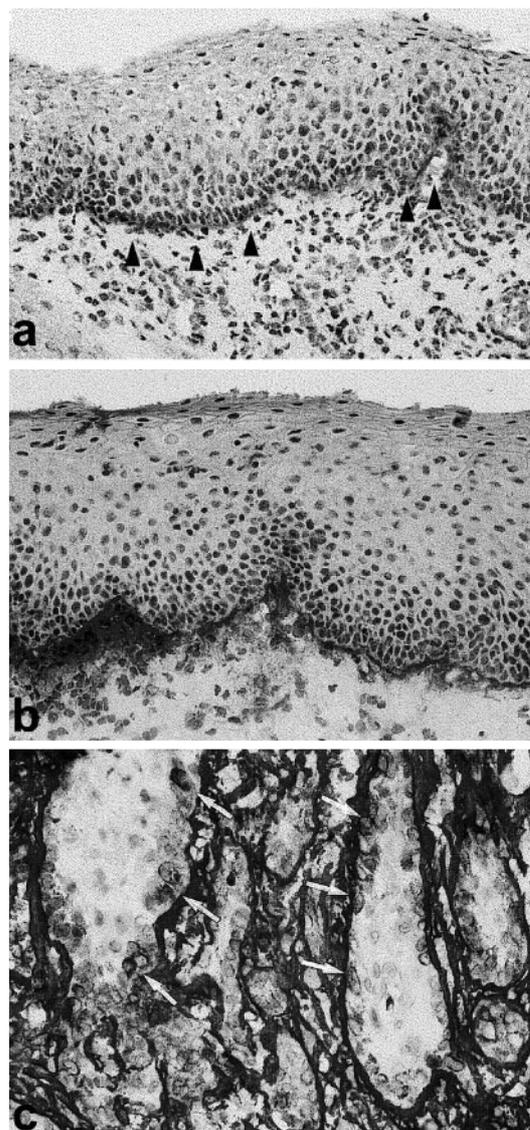
### Zellkulturbedingungen

Es wurden primäre Tumorzellkulturen von  $n=15$  Plattenepithelkarzinomen angelegt. Hierbei wurden Biopsien aus dem Tumorzentrum mittels Schere und Skalpell in kleine Stückchen von ca. 1 mm Durchmesser zerkleinert. Diese wurden auf Gewebekulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) ausgebracht und routinemäßig in RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum und Antibiotika (Penicillin und Streptomycin, Gibco Life Technologies, Karlsruhe) bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Wenn sowohl Tumorzellen als auch Fibroblasten auswuchsen, wurden die Fibroblasten durch differentielle Trypsinierung (Trypsin/EDTA-Lösung, Viralex, PAA, Linz, Österreich) entfernt. Die Tumorzellen wurden bei 2maligem Mediumwechsel pro Woche bis zur Konfluenz kultiviert und dann passagiert. Mittels Cytokeratinnachweis wurden die Tumorzellen immunhistochemisch hinsichtlich ihres epithelialen Ursprungs charakterisiert. Nur Kulturen, die homogen cytokeratinpositiv waren wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

### Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen wurden durchgeführt an seriellen Kryostat-schnitten ( $6-7\ \mu\text{m}$ ) von tiefgefrorenen Gewebebiopsien unter Verwendung von 3-Aminopropyl-Triethoxysilan-beschich-

Abb. 1a–c ► Proteinlokalisierung von Tenascin in der normalen Schleimhaut und in einem Plattenepithelkarzinom des Oropharynx. Tenascin ist in der normalen Oropharynxschleimhaut (a, b) auf den Bereich der Basalmembran beschränkt. Der Nachweis reicht von einer diskontinuierlichen (a) bis zu einer ununterbrochenen Färbung (b) dieses Areals. Pfeilköpfe weisen auf schwach positive Bereiche. Im Plattenepithelkarzinom (c) ist die gesamte tumorumgebende EZM Tenascin-positiv. Pfeile markieren Tumorzellen in denen Tenascin nachweisbar ist



teten Objektträgern sowie an primären Plattenepithelkarzinomzellen, die 24 h auf Objektträger aufgewachsen waren (Histobond, Marienfeld, Bad Mergentheim). Die Zellen und Gewebeschnitte wurden in Aceton bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert (10 min). Die Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper und der Nachweis erfolgten wie bereits beschrieben [8] mit dem Vectastain Laboratories Elite ABC-Kit. Als Primärantikörper wurden Antikörper verwendet, die gegen Tenascin gerichtet sind (TN2, monoklonal, Dako, Hamburg), zum Nachweis des Proliferationsstatus die Expression des Ki67-Antigens Mib1 (Dianova, Hamburg) und zur Sicherung des epithelialen Ursprungs ein gegen Cytokeratin 18 gerichteter Antikörper (Sigma, Deisenhofen). Die Beurtei-

lung der Tenascin- und Mib-Nachweise erfolgte semiquantitativ hinsichtlich der Homogenität der Färbung: als schwache Expression (+) galt, wenn Tenascin nicht im gesamten Tumorareal und Mib bei 20facher Objektivergrößerung nur in vereinzelten Tumorzellen (maximal 20) nachweisbar war; als mittlere Expression (++) wurde bewertet, wenn Tenascin zwar im gesamten Tumorareal aber mit geringer Färbeintensität und Mib bei 20facher Objektivergrößerung in maximal 60 Tumorzellen nachgewiesen werden konnte; eine Einstufung als starke Expression (+++) erfolgte, wenn Tenascin im gesamten Tumor mit hoher Färbeintensität und Mib bei 20facher Objektivergrößerung in mehr als 60 Tumorzellen gesehen werden konnte.

### In-situ-Hybridisierung

Der Nachweis der mRNA-Expression von Tenascin wurde nicht-radioaktiv mittels einer Digoxigenin(DIG)-markierten RNA-Sonde an Kryostatschnitten (6–7 µm) in Anlehnung an die von Komminoth [11] beschriebene Methodik durchgeführt. Zunächst wurden die Gewebeschnitte auf 3-Aminopropyl-Triethoxysilan-beschichtete Objektträger aufgebracht, in einer 4%igen Formaldehydlösung (PFA, 10 min, RT) fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert. Von der in einem Blueskriptvektor vorliegenden Tenascin-cDNA-Sonde (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. R. Chiquet-Ehrismann, Basel) wurden durch In-vitro-Transkription unter Einbau von DIG-UTP (In-vitro-Transkriptions-Kit, Boehringer Mannheim) Sense- und Antisense-Sonden hergestellt. Vor der Hybridisierung wurden die Objektträger 2 min bei 50°C hitzefixiert und um die Zu-

gänglichkeit der markierten Proben zu verbessern erfolgte ein Verdau der Schnitte mit 0,1 µg/ml Proteinase K in 2mal SSC (37°C, 5 min). Der darauffolgende Waschschrift mit 3mal SSC (3mal 5 min, RT) diente dazu Enzymreste zu entfernen bevor die DIG-markierte RNA-Sonde zur Hybridisierung aufgetragen wurde (200 ng/ml, 16 h, 50°C). Nichtgebundene Probe wurde unter stringenten Bedingungen (50°C) mit 50% Formamid in 2mal SSC ausgewaschen. Es erfolgten Äquilibration der Gewebeschnitte in 2mal SSC und anschließender RNase-Verdau (10 µg/ml in 2mal SSC, 37°C) zur Entfernung des Templates. Zur immunologischen Detektion wurde ein polyclonaler aus dem Schaf stammender Anti-DIG-Fab-fragmentalkalische phosphatase-konjugierter Antikörper (1:200, Boehringer, Mannheim) verwendet. Als Substrat diente eine Kombination von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblue-Tetrazolium (NBT) in Dimethylformamid (2–16 h, 37°C).

### Ergebnisse

#### Proteinlokalisierung und mRNA-Expression von Tenascin in nativen Geweben

Da es sich bei Tenascin um ein Molekül handelt, das in die EZM sezerniert wird, muß man zwischen dem Ort der Proteinlokalisierung und dem Ort der Synthese (mRNA-Expression) unterscheiden. Unser Ziel war es deshalb festzustellen, wo das Tenascinprotein in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs lokalisiert ist und von welchen Zellen die mRNA exprimiert wird.

Wir untersuchten zunächst immunhistochemisch die Lokalisation des Tenascinproteins in 29 Primärtumoren und 10 Lymphknotenmetastasen. Die erhaltenen Expressionsprofile wurden der Lokalisation von Tenascin in 5 Normalschleimhäuten gegenübergestellt. In den untersuchten Oropharynxschleimhäuten konnte Tenascin nur im Bereich der Basalmembran und hier z.T. mit variablen Unterbrechungen nachgewie-

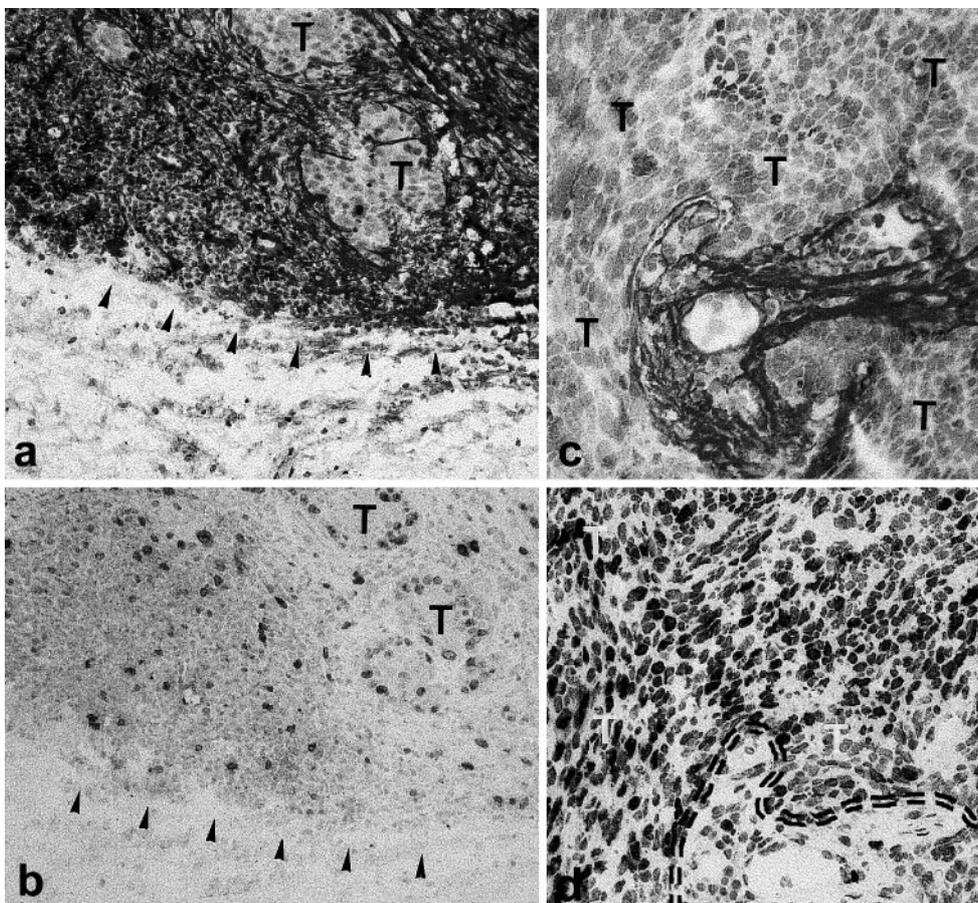


Abb. 2a–d ◀ Immunhistochemischer Nachweis von Tenascin in Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zur proliferativen Aktivität. Tenascin zeigt sowohl in geringer proliferierenden (b) wie auch in hochproliferativen Tumoren (d) eine einheitliche und starke Anfärbung der gesamten EZM (a, c). Pfeilköpfe in a und b markieren den Tumormrand. Hier bricht der Tenascinnachweis abrupt ab. Gestrichelte Doppellinie in d markiert zur Verdeutlichung die Tumorstromagrenze des ebenfalls in c dargestellten metastasierenden Larynxkarzinoms (T Tumor). a und b zeigen ein nicht metastasierendes Larynxkarzinom

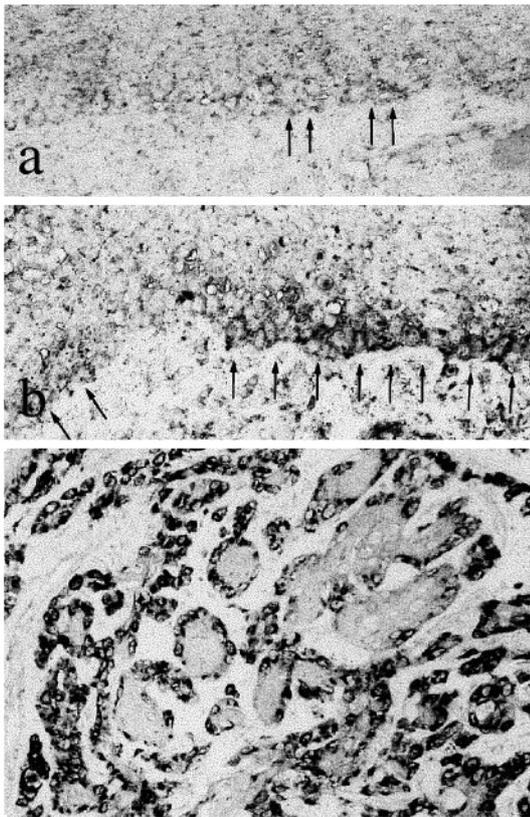


Abb. 3a–c ◀ **Tenascin-mRNA-Nachweis mittels In-situ-Hybridisierung in der normalen Oropharynxschleimhaut und im Plattenepithelkarzinom. Tenascin wird in der Normalschleimhaut in den Basalzellen der Schleimhaut exprimiert (Pfeile, a, b). Die Expression reicht von vereinzelt schwach positiven Schleimhautzellen a bis zu ausgedehnt mRNA-exprimierenden Basalzellarealen b. In c ist ein metastasierendes Hypopharynxkarzinom dargestellt; die Tenascin-mRNA wird in den an das Stroma angrenzenden Tumorzellen exprimiert**

sen werden (Abb. 1). Im Gegensatz hierzu war in den Tumorpräparaten die gesamte tumorumgebende EZM stark Tenascin-positiv (Abb. 1c, 2a,c, Tabelle 1). Es zeigten alle untersuchten Tumore eine starke Anfärbung mit dem Anti-Tenascinantikörper. Bisweilen konnten wir auch in den Tumorzellen selbst Spuren des Proteins feststellen (Abb. 1c, Pfeile). An der Tumorgrenze dagegen brach die Tenascin-Färbung abrupt ab, d.h. nur die unmittelbar den Tumor umgebende EZM war positiv (Abb. 2a, Pfeilköpfe).

Tabelle 1 zeigt den Vergleich von Tenascinexpression und klinischen Parametern. Es zeigte sich, daß der starke Proteinnachweis im Tumorgewebe unabhängig von Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Lokalisation des Primärtumors beobachtet werden konnte (Tabelle 1). Um zu beurteilen, ob die Tenascinexpression mit der proliferativen Aktivität der Tumoren in Zusammenhang steht wurde immunhistochemisch der Nachweis des Ki67-Antigens Mib1 in proliferierenden Zellen geführt. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, konnte Tenascin trotz deutlicher Unterschiede bezüglich der Anzahl proliferierender Tumorzellen stets in der gesamten tumor-

umgebenden EZM nachgewiesen werden. Die Abb. 2 zeigt die entsprechende immunhistochemische Analyse am Beispiel eines mäßig proliferierenden (Abb. 2a,b) und eines stark proliferierenden Plattenepithelkarzinoms (PEC) (Abb. 2c,d). Für Tenascin kommt unabhängig von der Anzahl sich teilender Zellen eine homogene, kräftige Anfärbung der tumorumgebenden Matrix zur Darstellung.

Um über die Proteinlokalisierung hinaus den genauen Ort der Tenascinsynthese zu ermitteln, untersuchten wir an den für den Proteinnachweis analysierten Geweben die mRNA-Expression von Tenascin mit einer spezifischen cDNA-Sonde mittels In-situ-Hybridisierung. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur Proteinlokalisierung konnten wir feststellen, daß die Tenascinexpression in der Schleimhaut eher geringer ist (Abb. 3a,b) und im Tumor deutlich an Signalstärke zunimmt (Abb. 3c). In den Oropharynxschleimhäuten konnten wir ebenfalls in Analogie zur Proteinlokalisierung eine variable, z.T. äußerst geringe Expression in den Basalzellen der Epithelien beobachten (Abb. 3a,b, Pfeile). Auch in den Tumorgeweben waren es Zellen epithe-

lialen Ursprungs, nämlich die Karzinomzellen an der Tumorselperipherie, die die Tenascin-mRNA exprimierten.

### Tenascinexpression in kultivierten primären Plattenepithelkarzinomzellen

Da von anderen Autoren postuliert wurde, daß möglicherweise Fibroblasten die Quelle der Tenascinexpression seien [14], analysierten wir die Expression von Tenascin in einem weiteren Versuchsansatz, nämlich in reinen Tumorzellkulturen. Hierzu wurden von 15 der untersuchten nativen Gewebe eine primäre Tumorzellkultur angelegt. Diese wurden für weitere Analysen verwendet, wenn homogen in allen Zellen immunhistochemisch die Expression epithelialer Cytoskelettmarker, nämlich der Cytokeratine, nachgewiesen werden konnte. Abb. 4a zeigt einen solchen Nachweis für Cytokeratin 18. Der immunhistochemische Tenascinnachweis der so charakterisierten primären Plattenepithelkarzinomzellen ergab, daß alle Tumorzellkulturen ebenfalls Tenascin exprimierten (Abb. 4b). Tenascin war hier ähnlich wie im nativen Gewebe vor allem in der extrazellulären Umgebung der Tumorzellen lokalisiert und nur in vergleichsweise geringer Menge in den Tumorzellen selbst nachweisbar.

### Diskussion

Um die therapeutische Nutzbarkeit eines bestimmten Moleküls zu beurteilen, müssen zunächst umfassende Kenntnisse zum Expressionsmuster in einem gegebenen Tumor erworben werden. Für das Zielmolekül mit dem wir uns in der vorliegenden Untersuchung beschäftigt haben, das Glycoprotein Tenascin, lagen solche Kenntnisse vor allem für die nicht-epithelialen Glioblastome vor, bei denen die Nutzung dieses Moleküls im Rahmen von Behandlungsmodellen mit Anti-Tenascin-Antikörperstudien zu einem für diese Tumorart beachtlichen Behandlungserfolg führte [2, 16]. Um einschätzen zu können, ob eine solche therapeutische Anwendung auch in Kopfhals-Tumoren sinnvoll sein könnte, haben wir uns vor allem mit der Untersuchung der folgenden Themenkomplexe beschäftigt: 1. sollte eine sowohl die

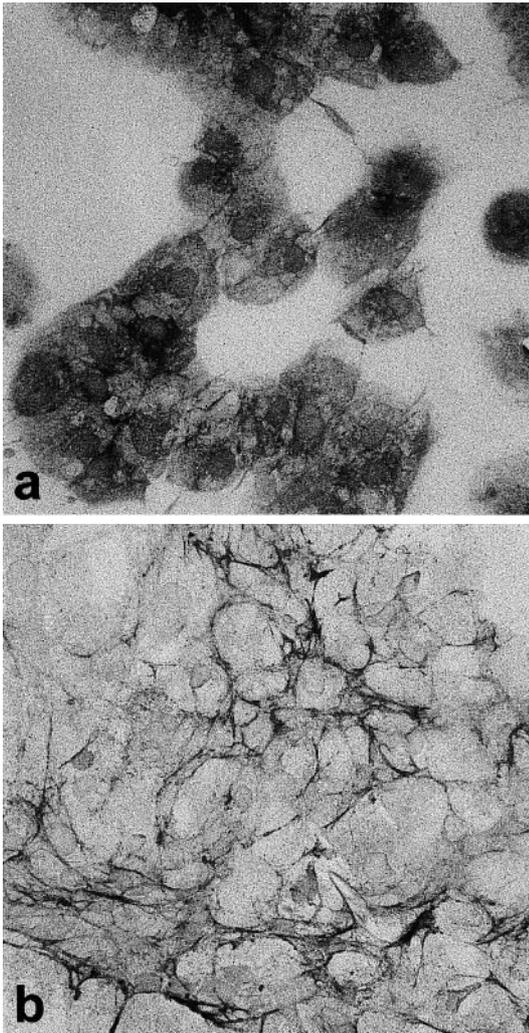


Abb. 4a,b ◀ **Tenascinexpression in kultivierten primären Plattenepithelkarzinomzellen eines Larynx-tumors. In a ist der immunhistochemische homogene Nachweis des Epithelmarkers Cytokeratin 18 dargestellt. b zeigt den Nachweis der Tenascinexpression in diesen Zellen. Tenascin kann vor allem extrazellulär nachgewiesen werden (s. Pfeilköpfe)**

Protein- als auch mRNA-Ebene umfassende Expressionsanalyse im Vergleich zur Normalschleimhaut durchgeführt werden, mit dem Ziel festzustellen, ob Tenascin auch in HNO-Tumoren selektiv exprimiert wird. Da es sich bei Tenascin um ein Molekül handelt, das in die EZM sezerniert wird, und somit der Ort der mRNA-Expression nicht zwangsläufig dem Ort der Proteinlokalisierung entspricht, galt es 2. die tenascinsynthetisierenden Zellen zu identifizieren sowohl über den mRNA-Nachweis am Gewebe und zur zusätzlichen Absicherung über die Proteinexpression an kultivierten Tumorzellen.

Wir konnten zeigen, daß die Expression von Tenascin in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs gegenüber der Normalschleimhaut deutlich zunimmt, d.h. Tenascin wird wie bereits für Gliome beschrieben auch in Tumoren des Kopf-Hals-

Bereichs selektiv exprimiert. So konnten wir in der Normalschleimhaut sowohl die Tenascin-mRNA als auch das daraus resultierende Protein nur in geringen Mengen und eng begrenzt auf den Bereich der Basalmembran nachweisen. Im Gegensatz dazu ließ sich das Tenascinprotein in den Tumoren nicht nur in der gesamten tumorumgebenden EZM nachweisen. Auch das mRNA-Signal ist bei gleichen Hybridisierungsbedingungen im Tumor gegenüber der Normalschleimhaut stark erhöht. Unsere Beobachtungen zur verstärkten, homogenen Nachweisbarkeit des Tenascinproteins in Kopf-Hals-Tumoren lassen sich durch Untersuchungen von anderen Autoren unterstützen [15, 17], die ebenfalls eine gegenüber der Schleimhaut zunehmende Expression von Tenascin in Plattenepithelkarzinomen beobachtet haben. Darüber hinaus sprechen die von uns erhobenen Befunde

dafür, daß die erhöhte Expression von Tenascin in Kopf-Hals-Tumoren ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung darstellt, das mit der Manifestation eines malignen Tumors bereits voll ausgeprägt ist. So konnten wir eine homogene starke Anfärbung der gesamten tumorumgebenden EZM unabhängig von der Tumorgroße, dem Lymphknotenstatus oder dem Maß der Proliferation beobachten. Auch bei einem den Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes ähnlichen Tumortyp, dem Ösophaguskarzinom, konnte kein Zusammenhang von TNM-Klassifikation und Tenascinexpression festgestellt werden [3]. Ein weiterer Hinweis für eine frühe Beteiligung der Tenascinexpression an der Tumorentstehung ist die Beobachtung einiger Autoren [15, 17, 18], daß die Ausdehnung der Proteinlokalisierung mit dem Dysplasiegrad ins submuköse Bindegewebe zunimmt.

In bezug auf unsere Frage nach dem zellulären Ursprung der Tenascinsynthese, konnten wir erstmals bei HNO-Tumoren zeigen, daß die Tenascin-mRNA sowohl in den untersuchten Schleimhaut- als auch den Karzinomgeweben von den Epithel- bzw. Tumorzellen selbst exprimiert wurde. Dabei ließ sich die Tenascin-mRNA speziell in den Basalzellen, die direkt an das darunterliegende bzw. umgebende Bindegewebe angrenzten, nachweisen. Übereinstimmend mit diesen mRNA-Befunden ließen sich gelegentlich auch Spuren des Tenascinproteins in den Tumorzellen beobachten. Der Nachweis des aus der mRNA-Expression resultierenden Proteins in Plattenepithelkarzinomzellkulturen bestätigte ebenfalls, daß Zellen epithelialen Ursprungs, nämlich hier die Tumorzellen des oberen Aerodigestivtraktes, Tenascin exprimieren. Diese Beobachtung ist insofern von besonderem Interesse, als der Vergleich von Untersuchungen zur mRNA-Expression in kultivierten Tumorzellen und Tumorgeweben bisher sehr widersprüchliche Ergebnisse lieferte. Es wurde beschrieben, daß in vitro sowohl Fibroblasten Tenascin exprimieren können [14] als auch kultivierte Tumorzellen [10]. Aufgrund der fehlenden Information zur Expression von Tenascin im Ausgangsgewebe konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, ob es sich hierbei um ein In-vitro-Artefakt handelt. An verletzter Rattenepidermis

konnte gezeigt werden, daß die Tenascin-mRNA im Rahmen von Wundheilungsvorgängen von den Basalzellen des regenerierenden Epithels exprimiert wird [1]. Außerdem kann Tenascin auch während der Embryonalentwicklung von Vögeln, im Zuge der frühen Federkeimentwicklung, von epidermalen Zellen exprimiert werden. Hier wird die Expression jedoch im späteren Verlauf von mesenchymalen Zellen übernommen [19]. In den wenigen existierenden mRNA-Untersuchungen an Tumoren wurde beschrieben, daß die Tenascin-mRNA in Plattenepithelkarzinomen der Haut [20] und in Kolonkarzinomen [7] in Übereinstimmung mit unseren Arbeiten von den Tumorzellen selbst exprimiert werden. In der zuletzt genannten Arbeit wurden zusätzlich Myofibroblasten und vaskuläre Zellen als Orte der Tenascin-expression identifiziert.

Die hier vorgestellten Untersuchungen zur Expression und Lokalisation von Tenascin in Kopf-Hals-Tumoren zeigen sowohl auf Protein- wie auf mRNA-Ebene sehr deutlich, daß Tenascin in dieser Tumorentität selektiv, nämlich in allen untersuchten Tumoren und dagegen in sehr geringem Maße in der Normalschleimhaut exprimiert wird und die Expression auf die Tumorzellen selbst zurückgeht. Somit könnte die therapeutische Nutzung dieses Moleküls, wie sie bereits für Gliome in der klinischen Anwendung ist, auch für Kopf-Hals-Tumoren vielversprechend sein. In Erweiterung der bisherigen Therapieansätze, in denen ausschließlich gegen Tenascin gerichtete Antikörper an das im Tumorbereich lokalisierte Protein binden, wären aufgrund der in den Tumorzellen selbst nachgewiesenen Tenascin-mRNA-Expression auch Interventionsstrategien mittels Antisense-Oligonukleotiden Erfolg versprechend.

## Fazit für die Praxis

**Wir konnten zeigen, daß das extrazelluläre Matrixmolekül Tenascin in Kopf-Hals-Tumoren selektiv und von den Tumorzellen selbst exprimiert wird und sich deshalb als Angriffspunkt für eine gezielte, onkologisch-therapeutische Intervention eignet.**

Unser besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hagen Weidauer für die stete und uneingeschränkte Unterstützung unserer Forschungsarbeiten und allen ärztlichen Kollegen, die bei der Gewinnung von Proben behilflich waren. Auch danken wir Frau Annette Buttler und Frau Elisabeth Specht-Dehlius für die technische Unterstützung, Herrn Stefan Lehnert und Herrn Markus Rave für professionelle Durchführung von Fotoarbeiten. Diese Untersuchungen wurden großzügigerweise gefördert vom „Verein zur Unterstützung der HNO-Klinik Heidelberg e.V.“ und vom „Verein zur Förderung der Krebsforschung in Deutschland e.V.“.

## Literatur

1. Aukhil I, Sahlberg C, Thesleff I (1996) **Basal layer of epithelium expresses tenascin mRNA during wound healing of incisional skin wounds.** J Periodont Res 31:105–112
2. Bigner DD, Brown MT, Friedman AH et al. (1998) **Iodine<sup>131</sup> labeled anti tenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with recurrent malignant gliomas: phase I trial results.** J Clin Oncol 16:2202–2212
3. Broll R, Meyer S, Neuber M, Bruch H-P (1995) **Expression of tenascin in tumors of the esophagus, small intestine and colorectum: an immunohistochemical study.** Gen Diagn Pathol 141:111–119
4. Chiquet-Ehrismann R (1993) **Tenascin and other adhesion-modulating proteins in cancer.** Cancer Biol 4:301–310
5. Doerries U, Schachner M (1994) **Tenascin mRNA isoforms in the developing mouse brain.** J Neurosci Res 37:336–347
6. End P, Panayoutou G, Entwistle A, Waterfield MD, Chiquet M (1992) **Tenascin: a modulator of cell growth.** Eur J Biochem 209:1041–1051
7. Hanamura N, Yoshida T, Matsumoto E, Kawarada Y, Sakakura T (1997) **Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas.** Int J Cancer 73:10–15
8. Herold-Mende C, Seiter S et al. (1996) **Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck.** J Pathol 179:66–73
9. Higuchi M, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Hayakawa T (1993) **Expression of tenascin in human gliomas: its relation to histological malignancy, tumor dedifferentiation and angiogenesis.** Acta Neuropathol 85:481–487
10. Kawakatsu H, Shiurba R, Obara M, Hiraiwa H, Kusakabe M, Sakakura T (1992) **Human carcinoma cells synthesize and secrete tenascin in vitro.** Jpn J Cancer Res 83:1073–1080
11. Komminoth P (1992) **Digoxigenin as an alternative probe labeling for in situ hybridization.** Diagn Mol Pathol 1:142–150
12. Laywell ED, Doerries U, Bartsch U, Faissner A, Schachner M, Steindler DA (1992) **Enhanced expression of the developmentally regulated extracellular matrix molecule tenascin following adult brain injury.** Proc Natl Acad Sci 89:2634–2638
13. Nakao N, Hiraiwa N, Yoshiki A, Ike F, Kusakabe M (1998) **Tenascin-C promotes healing of habu-snake venom-induced glomerulonephritis. Studies in knock out congenic mice and in culture.** Am J Pathol 152:1237–1245
14. Oike Y, Hiraiwa H, Kawakatsu H et al. (1990) **Isolation and characterization of human fibroblast tenascin. An extracellular matrix glycoprotein of interest for developmental studies.** Int J Dev Biol 34:309–314
15. Ramos DM, Chen, B, Regezi J, Zardi L, Pytela R (1998) **Tenascin-C matrix assembly in oral squamous cell carcinoma.** Int J Cancer 275:680–687
16. Riva P, Arista A, Franceschi G et al. (1995) **Local treatment of malignant gliomas by direct infusion of specific monoclonal antibodies labeled with <sup>131</sup>I: comparison of the results obtained in recurrent and newly diagnosed tumors.** Cancer Res 55 [Suppl]:5952–5956
17. Shrestha P, Sakamoto F, Takagi H, Yamada T, Mori M (1994) **Enhanced tenascin immunoreactivity in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral cavity: an immunohistochemical study.** Eur J Cancer B Oral Oncol 2:132–137
18. Tiitta O, Happonen RP, Virtanen I, Luomanen M (1994) **Distribution of tenascin in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma.** J Oral Pathol Med 23:446–450
19. Tucker RP (1991) **The sequential expression of tenascin mRNA in epithelium and mesenchyme during feather morphogenesis.** Roux's Arch Dev Biol 200:108–112
20. Tuominen H, Pollanen R, Kallioinen M (1997) **Multicellular origin of tenascin in skin tumors- an in situ hybridization study.** J Cutan Pathol 24:590–596

Eingegangen am 17. Februar 1999

Angenommen am 27. April 1999