

Aus dem Lehrstuhl für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Ferdinand Hofstädter
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

*"Zytogenetische Untersuchungen an
oralen Leukoplakien der Mundhöhle
zur Identifizierung prämaligner Läsionen"*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johannes Christian Bier
Januar 2011

Meinen lieben Eltern

Aus dem Lehrstuhl für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Ferdinand Hofstädter
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

*"Zytogenetische Untersuchungen an
oralen Leukoplakien der Mundhöhle
zur Identifizierung prämaligner Läsionen"*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johannes Christian Bier
Januar 2011

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	PD Dr. Gero Brockhoff
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
Tag des Rigorosums:	23. Mai 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Einführung	6
1.2. Anatomie und Physiologie der Mundhöhle	6
1.3. Orale Leukoplakie	9
1.3.1. Definition	9
1.3.2. Epidemiologie	9
1.3.3. Ätiologie und Pathogenese	10
1.3.4. Morphologie	10
1.3.5. Leukoplakie und ihre histologischen Formen	11
1.3.6. Klinische Gesichtspunkte	14
1.4. Fragestellung und Zielsetzung	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Probenmaterial	17
2.2. <i>Tissue - Multi - Array - Block - Technik (TMA)</i>	18
2.3. Verwendete Materialien	19
2.3.1. Materialien	19
2.3.2. Reagenzien	20
2.3.3. Verwendete FISH-Sonden	21
2.3.4. Antikörper für p16-Immunhistochemie	22
2.3.5. Geräte für histologische Begutachtung, Dokumentation und immunhistochemische Auswertung	22
2.3.6. Geräte für die FISH-Auswertung	23
2.4. Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	23
2.4.1. Prinzip der Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	23
2.4.2. FISH-Protokoll: Gewebepräparation und Hybridisierung	24
2.4.3. Ergebnisevaluation der FISH	26
2.4.4. Schwellenwert, Statistik und Auswertungskriterien	28
2.5. Immunhistochemie	29
2.5.1. Prinzip der Immunhistochemie	29
2.5.2. Immunhistochemieprotokoll für p16: Gewebepräparation	29
2.5.3. Ergebnisevaluation der immunhistochemischen Färbung	30
3. Ergebnisse	31
3.1. Präparation der TMA-Blöcke und Färbeprotokoll	31
3.2. Statistische Zusammenfassung der einzelnen Entitäten	32
3.3. Numerische Chromosomenaberrationen in der FISH	33
3.3.1. Allgemeine Übersicht zu FHIT	33
3.3.2. Vergleich Deletion und Polysomie bei FHIT	35
3.3.3. Einzel-Abhängigkeit von Deletion und Polysomie bei FHIT	37
3.3.4. Polysome Subpopulation bei FHIT	38
3.3.5. Übersicht von Chromosomen-Index und Polysomie-Index bei FHIT	39
3.3.6. Allgemeine Übersicht zu p16	39
3.3.7. Vergleich Deletion und Polysomie bei p16	41
3.3.8. Korrelation der Auswertungsmuster von FHIT und p16	42

3.4.	Korrelationen in Bezug auf die Noxenanamnese	43
3.5.	Korrelation in Bezug auf die Lage der Leukoplakie	44
3.6.	Abbildungen zur <i>in-situ</i> -Hybridisierung	46
3.7.	Ergebnisse der Immunhistochemie für p16	47
4.	Diskussion	48
4.1.	Auswahl der Tumorsuppressorgene FHIT und p16.....	48
4.1.1.	FHIT-Gen / - Protein.....	50
4.1.2.	p16-Gen / - Protein.....	50
4.1.3.	Bezug der Tumorsuppressorgene FHIT und p16 auf die Genese von Oropharynxkarzinomen - Deletion und Polysomie.....	51
4.2.	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung und TMA-Technik.....	52
4.3.	Korrelation in Bezug auf Proliferationstendenz, Noxen-anamnese und Lage.....	54
4.4.	Verwendung der FISH zur Screening-Schnelldiagnostik bei Risikopatienten – ein Ausblick.....	56
5.	Zusammenfassung	58
6.	Anhang	60
6.1.	Abkürzungsverzeichnis	60
6.2.	Eigenständigkeitserklärung.....	61
6.3.	Abbildungsverzeichnis	62
7.	Danksagung	63
8.	Curriculum vitae	64
9.	Literaturverzeichnis	65

1. Einleitung

1.1. Einführung

Karzinome der Mundhöhle und angrenzender Strukturen stellen die mit Abstand bedeutendste Malignität im Kopf-Hals-Bereich dar, und zählen zu den zehn häufigsten Tumorarten weltweit [1]. Nikotin und Alkohol gelten dabei als Hauptrisikofaktoren [2]. Abgesehen von Fortschritten in Chirurgie und adjuvanter Therapie sind Erfolge in Bezug auf die 5-Jahres-Überlebensrate nach wie vor begrenzt [3]. Auch wenn Resektatgrenzen als *in sano* (R0; pathologisch unauffällig) gelten, ist die lokale Rezidivrate hoch [4,5].

Es gilt als wissenschaftlich gesichert, dass die Entstehung oraler Plattenepithelkarzinome von einer gemeinsamen Vorläuferzelle über verschiedene Stadien der histomorphologisch-pathologischen Progression erfolgt. Dabei kommt es zur Kumulation von Veränderungen auf genetischer Ebene und der Dominanz eines oder mehrerer so genannter Subklone [6], bei denen sich im Laufe der Zeit weitere Alterationen einstellen [7]. Zu nennen seien hier die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von Proto-Onkogenen durch Punkt-Mutation, Deletion, Hypermethylierung und Amplifikation [8-12]. Diese genetischen Alterationen können mit morphologischen Veränderungen der Schleimhaut einhergehen. Dabei gilt die orale Leukoplakie als erste makroskopisch sichtbare Veränderung. Sie durchläuft im Regelfall die Stadien der einfachen Hyperplasie (Keratose) über die Stufen leicht-, mittel- und hochgradiger Dysplasien zum Carcinoma-*in-situ* (CIS) und schließlich zum invasiven Plattenepithelkarzinom [13].

Die Entschlüsselung der Natur und der zeitlichen Komponente der genetischen Veränderungen gelten als wichtige Schritte zum Verständnis der Kanzerogenese, und bestimmen gegenwärtig die Forschung zu Kopf-Hals-Tumoren.

1.2. Anatomie und Physiologie der Mundhöhle

Die Mundhöhle (Abbildung 1) teilt sich in die *Cavitas oris propria* (eigentliche Mundhöhle) - dem Anteil innerhalb der Zahnbögen - und in das *Vestibulum oris*, den sogenannten Vorhof, auf. Dieser schließt den Bereich von den *Buccae* und *Labiae* nach außen, und von der *Gingiva* und den *Dentes* nach innen ein. Der dabei entstehende schlitzförmige Raum mündet nach oben und unten in Umschlagfalten der Schleimhaut. Die eigentliche Mundhöhle wird nach *apikal* durch den harten und weichen Gaumen mit dem Gaumensegel und nach *kaudal* durch den Mundboden begrenzt. Nach *dorsal* geht sie durch den *Isthmus faucium* (Schlundenge) in Höhe der vorderen Gaumenbögen in den Mundrachen (*Oropharynx*) über. Bei geschlossenem Mund ist die Mundhöhle nahezu vollständig von der Zunge ausgefüllt.

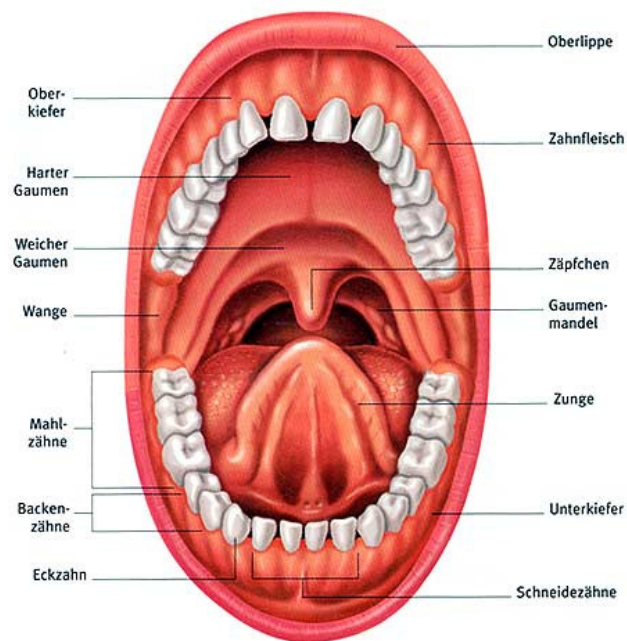


Abb. 1: Übersicht über die einzelnen anatomischen Strukturen der Mundhöhle. Man erkennt die Cavitas oris propria und das Vestibulum oris mit ihren anatomischen Grenzen, die Zunge sowie die Gaumenbögen als Abgrenzungen zum Oropharynx. (Quelle: www.wissen.de/.../KOERPER/img_speiseroehre_1.jpg)

Diese wiederum gliedert sich in Spitze (*Apex linguae*), Körper (*Corpus linguae*) und Wurzel (*Radix linguae*) und ist am Zungenrücken mit den *Papillae fungiformes*, *filiformes*, *foliatae* und *valatae*, besetzt, die die raue Oberfläche bilden und mit ihren *Calliculi gustatorii* für die Geschmackswahrnehmung verantwortlich sind. Am Zungengrund befindet sich die *Tonsilla lingualis*, die Teil des Waldeyer-Rachenringes ist. Die Struktur der Zunge ist vorwiegend muskulöser Art (*Mm. genioglossi*, *hyoglossi*, *palatoglossi*, *styloglossi* und autochtone Muskulatur).

Der muskuläre Anteil des Mundbodens wird durch die *Mm. genioglossi*, *geniohyoidei* und *mylohyoidei* gebildet. Nach Anheben der Zunge werden beidseits des sublingualen Zungenbändchens (*Frenulum linguae*) die *Plicae sublingualis* mit den *Carunculae sublinguales* sichtbar - die Mündungen der Ausführungsgänge der *Glandulae sublinguales* und der *Glandulae submandibulares*.

Die arterielle Versorgung der Strukturen der Mundhöhle wird durch die *A. carotis externa* über die *A. lingualis* (Zunge), *A. sublingualis* (Mundboden), *A. palatina ascendens* (Gaumen) und *A. facialis* (Wangen) gewährleistet. Über die *V. facialis* in die *V. jugularis interna* stellt sich der venöse Abfluss dar.

Der Lymphabfluss erfolgt ipsi- und kontralateral über ein dichtes Netz an Gängen zu den submentalen und submandibulären und weiter zu den Lymphknoten des jugulo-fazialen Venenwinkels (*Nodi lymphatici jugulares craniales*).

Sensibel ist die Mundhöhle durch die *Nn. palatini majores* und *minores* (aus V2, Gaumenschleimhaut), durch *N. lingualis* (aus V3, Zunge) und *Nn. glossopharyngeus* und

laryngeus superior (aus X) versorgt. Motorisch finden sich Anteile der Hirnnerven IX, X und XII (zu einem kleinen Anteil auch V). Die sensorische Innervation der Zunge (Geschmackswahrnehmung) erfolgt über die *Chorda tympani* (aus VII) im vorderen Bereich, und über den N. *glossopharyngeus* im hinteren Bereich.

Die unterschiedlichen Funktionen, die die Mundhöhle in sich vereint, zeigen sich zum einen in der Artikulation und Lautbildung für die Sprache, bei der Anteile der Lippen, der Zunge aber auch des Gaumens eine tragende Rolle spielen. Zum anderen dient sie der Nahrungsaufnahme, -verarbeitung und -erkennung, durch das Kauen, Schlucken und Schmecken mit der Zunge, das Zurückhalten des Speisebreies durch die Wangen und Lippen, sowie das Einspeicheln des Nahrungsbreies mithilfe der Speicheldrüsen. Außerdem findet hier der erste Kontakt der Nahrung mit dem Immunsystem statt.

Die Schleimhaut der Mundhöhle (Abbildung 2) besteht aus mehrschichtigem, unverhorntem Plattenepithel. Lokal kann dieses im Bereich des Zahnfleisches und des harten Gaumens unvollständige Spuren einer Verhornung aufweisen. Es zeigt mehrere Zellagen, die sich in ihrem Wachstum von *basal* nach *apikal* in der Morphologie kontinuierlich ändern. So sind die unteren Zellschichten hochprismatisch, die mittleren kubisch geprägt. Die obersten Zellschichten stellen sich abgeflacht dar. Der Zellkern verändert sich demnach von rundlich oder oval und euchromatinreich hin zu platt und heterochromatinreich. Gelegentlich kann er zerfallen, bleibt aber bis in die oberste Schicht erkennbar.

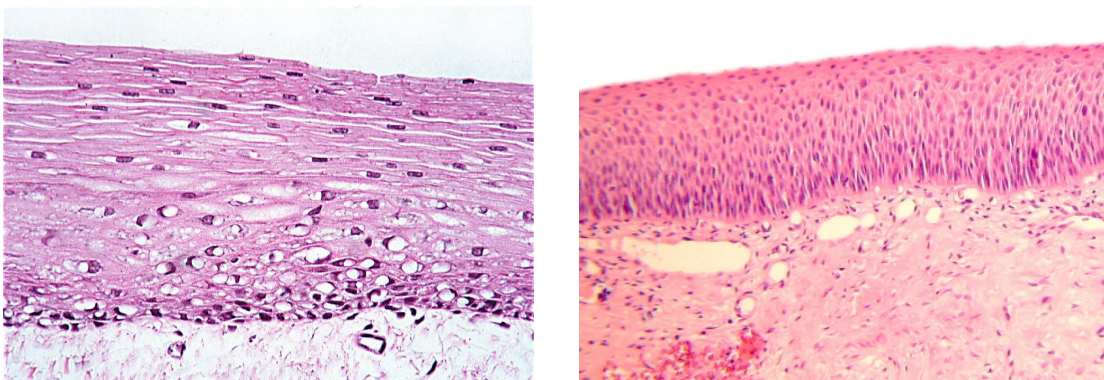


Abb.2: unverhorntes, mehrschichtiges (blandes) Plattenepithel in unterschiedlicher Vergrößerung in HE-Färbung. Man erkennt die homogene Gliederung in den einzelnen Schichten des Epithels mit kubisch-prismatischen Zellen die der *Lamina propria* aufsitzen, und abgeflachten Zellen im Bereich der Superfizialschicht. (Quelle: University of Kansas, www.kumc.edu/instruction/medicine/anatomy/histoweb)

Man unterscheidet drei Epithelschichten, die als *Stratum basale*, *Stratum intermedium* (*spinosum*) und *Stratum superficiale* bezeichnet werden, und der *Lamina propria* aufsitzen. Die einzelnen Zellen sind durch zahlreiche Desmosomen verknüpft und reich an Keratinfilamenten, was der starken Beanspruchung Rechnung trägt. Im Epithel verstreut sind Melanozyten (Pigmentzellen), Langerhans-Zellen (Immunzellen), Merkel-Zellen (Sinneszellen) und Meissner-Tastkörperchen anzutreffen. Seromuköse und überwiegend muköse Drüsen siedeln in der *Lamina propria*.

1.3. Orale Leukoplakie

1.3.1. Definition

„Orale Leukoplakie“, auch Weißschwienkrankheit genannt, ist die Bezeichnung für eine weiße, nicht abwischbare flache oder papillomatöse Schleimhautveränderung des Mund- und Schlundbereichs. Es handelt sich im eigentlichen Sinne um eine Hyperkeratose mit zellulären und epithelialen Atypien unterschiedlichen Ausmaßes, sowie vermehrten oder atypischen Mitosen, die überwiegend durch chronische Noxeneinwirkung, insbesondere durch Nikotin- und Alkoholabusus, entsteht [14]. Sie gilt als präkanzeröse Läsion, und somit als Vorstufe des oralen Plattenepithelkarzinoms. In der aktuellen WHO-Klassifikation von 2007 wird sie als potentiell maligne eingestuft („*potentially malignant disorders*“) [15]. *Per definitionem* entspricht eine epitheliale Vorläuferläsion einem morphologisch alterierten Gewebe, bei dem ein Karzinom mit höherer Wahrscheinlichkeit auftritt, als bei gesundem Vergleichsgewebe [16]. Die Mehrzahl der Leukoplakien zeigt keinerlei Dysplasiezeichen und lässt sich daher der einfachen Hyperplasie zuordnen [13]. (Im Folgenden werden einfache Hyperplasie und Keratose synonym verwendet.) Nur ein kleiner Anteil wandelt sich, und transformiert über Dysplasiestufen zum invasiven Plattenepithelkarzinom [17,18]. Cowan *et al.* fanden eine Progressionsrate von 3% bezogen auf epitheliale Läsionen mit oder ohne Dysplasiezeichen [19].

Die Bezeichnung „orale Leukoplakie“ enthält keinerlei Information über Dignität und Histopathologie, und findet daher lediglich in der Beschreibung des klinischen Befundes Beachtung.

1.3.2. Epidemiologie

Die Leukoplakie stellt die häufigste präkanzeröse oder potentiell maligne Läsion im Bereich der Mundhöhle dar. Aufgrund unterschiedlicher Definitionen und Evaluierungssysteme ist eine profunde Bestimmung der Epidemiologie nur unzureichend möglich. Weltweit treten lokal starke Unterschiede bei Inzidenz und Prävalenz auf, wobei die Zahlen für zweiteere zwischen 0,2 und 5% schwanken. Findet man in Indien Prävalenzen von 0,2 - 4 % [20], so beträgt sie in Schweden 3,5% [21], in den Niederlanden 1,4% [22]. Epidemiologische Studien weisen für Deutschland zum einen Prävalenzen zwischen 2,85% für beide Geschlechter [23], andere 2,3% für Männer und 0,9% für Frauen aus [23,24]. Dabei werden orale Leukoplakien weltweit verhältnismäßig am häufigsten bei Männern mittleren oder höheren Lebensalters, mit einer zunehmenden Altersprävalenz ab dem siebzigsten Lebensjahr (8%) beobachtet [25].

1.3.3. Ätiologie und Pathogenese

Fragen zur Ätiologie der oralen Leukoplakie können bis heute nicht vollständig geklärt werden. Nach wie vor gilt Tabakkonsum als Ursache Nummer eins bei der Entwicklung einer Läsion [2,26-28]. Eine Assoziation mit dem Genuss von Alkohol wird in entsprechenden Studien diskutiert. Vor allem bei Rauchern soll es zu synergistischen Effekten und somit zu einer Risikoerhöhung bezüglich der Entstehung kommen [29]. Die Wirkung besteht in einer Permeabilitätsveränderung des oralen Epithels, so dass Noxen des Tabaks leichter in die subepithelialen Kompartimente gelangen können [30]. Gerauchter Tabak hat einen wesentlich größeren Einfluss auf die Generierung einer Leukoplakie als Kautabak. Hier fällt die Transformationsrate in Dysplasiestufen signifikant geringer aus [31].

Neben Nikotin und Alkohol wird als weitere hochwahrscheinliche Ursache derzeit eine orale Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV), im Besonderen der Hochrisiko-Gruppen 16 und 18 angesehen. In mehreren internationalen Studien konnte eine Assoziation mit dem Mundhöhlenkarzinom belegt werden [32]. Beim Beispiel der Cervix-Karzinome ist eine ursächliche Wirkung auf die Kanzerogenese bereits nachgewiesen, und hat im Rahmen der Impfprophylaxe bei Mädchen in der Therapie Einzug gehalten [33].

Andere Faktoren, wie Ernährungsgewohnheiten, Vitaminmangel, Mundhygiene, traumatische Irritationen und genetische Prädisposition, sowie Infektionen mit *Candida albicans* sollen zusätzliche Rollen spielen [34].

Nicht zuletzt muss die Gruppe der Leukoplakien ohne objektivierbares, auslösendes Moment - die so genannte *idiopathische* Leukoplakie - in der Betrachtung berücksichtigt werden.

1.3.4. Morphologie

Die orale Leukoplakie wandelt sich während der malignen Transformation über die Stufen Keratose, leichtgradige und mittelgradige Dysplasie, hochgradige Dysplasie und Carcinoma-*in-situ* (CIS) zum invasiven Plattenepithelkarzinom [13]. Man unterscheidet zwischen homogenem und nicht-homogenem Erscheinungsbild [35,36]. Homogene Leukoplakien (Abbildung 3) haben ein einheitliches, flächiges und dünnes Erscheinungsbild mit glatter oder leicht faltiger Oberfläche von nahezu konsistenter Qualität. Sie sind meist asymptomatisch und bilden die größte Gruppe oraler Läsionen.



Abb. 3 + 4: homogene (links) und inhomogene (rechts) Leukoplakie an der Innenseite der rechten Wange (Quelle: Vogelstein et al.) sowie am lateralen Zungenrand. Man erkennt die unterschiedliche Erscheinung beider Formen mit der einerseits einheitlichen, glatten Ausprägung links, und der bereits makroskopisch sichtbaren Heterogenität rechts. (Quelle: sdm.buffalo.edu)

Eine inhomogene orale Leukoplakie (Abbildung 4) hingegen kann sowohl weißlich als auch weißlich-rötlich (Erythroleukoplakie) imponieren. Sie ist dabei unregelmäßig flach, nodulär oder exophytisch (verruköse Leukoplakie) und kann mit leichten Beschwerden wie Schmerzen oder Brennen einhergehen [30]. Darüber hinaus ist die proliferative verruköse Leukoplakie beschrieben worden [37]. Hierbei handelt es sich um eine aggressive Form der oralen Leukoplakie. Silverman *et al.* fanden eine Transformationsrate von über 70% [38]. Sie zeichnet sich durch ausgedehnte und multifokale, zunächst homogene, später verruköse Veränderungen aus. Nicht selten ist die Noxenanamnese blande. Im Allgemeinen unterliegen inhomogene Leukoplakien einer vier- bis fünffach höheren Transformationsrate als homogene [39]. Dennoch können sich von letzteren bis zu 5% maligne verändern [40]. Orale Plattenepithelkarzinome können sich prinzipiell aus jeder Form der Leukoplakie entwickeln [41], teilweise finden sich Anhaltspunkte für Vorläuferläsionen ohne Dysplasie [40].

Im Rahmen der mit dieser Arbeit vorliegenden Untersuchung beschränkt sich das Material auf die Form der homogenen Leukoplakie. Inhomogene Leukoplakien sind wesentlich seltener als homogene. Eine statistisch signifikante Auswertung wäre daher mit den im Institut für Pathologie der Universität Regensburg archivierten Exzisaten nicht möglich gewesen.

1.3.5. Leukoplakie und ihre histologischen Formen

Wie bereits eingangs beschrieben, dient die Bezeichnung „orale Leukoplakie“ lediglich der Beschreibung des makroskopischen Aspektes. Zur Einordnung der verschiedenen histomorphologischen Grade dysplastischer Veränderungen gibt es derzeit kein allgemeingültiges, histologisches Graduierungssystem. Im Besonderen fehlt eine Einteilung der Kopf-Hals-Region in Schwere und Transformationsneigung so genannter „intraepithelialer Läsionen“ des Plattenepithels (engl. „*squamous intraepithelial lesions*“, SIL) oder auch

„intraepithelialer Neoplasien“ (SIN). Es finden sich mehr als 20 verschiedene Klassifizierungen, von denen sich wiederum die Mehrzahl an der bereits für zervikale Läsionen bewährten Einteilung orientiert. Die WHO hat hierzu 2005 eine neue Orientierungshilfe publiziert, welche im Folgenden beschrieben ist [13]:

Hyperplasie / Keratose :

Die Hyperplasie (auch Keratose genannt) beruht auf einer - bezogen auf die Schichtdicke - vermehrten Anzahl an Epithelzellen. Dies hat eine Zunahme an Zellschichten der Mukosa auf sieben und mehr zur Folge, welches auch die makroskopisch weißliche Erscheinung bedingt. Die Dicke der Keratinisierung, also der Verhornung, hat dabei keinerlei Bedeutung. Je nach Lage des Fokus spricht man dann von Akanthose (*Stratum spinosum*) oder Basalzellhyperplasie (basale Zellagen). Es treten vermehrt Mitosen auf. Die Architektur des Epithels ist regelrecht, und Hinweise auf zelluläre Atypien fehlen.

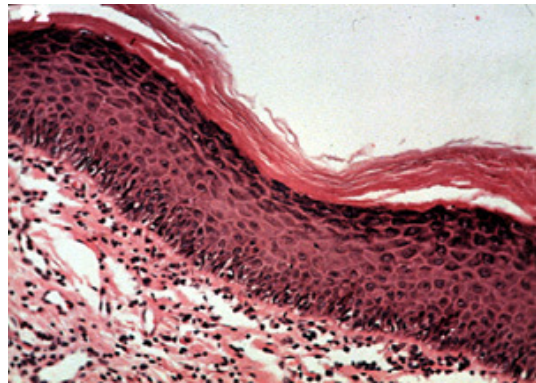


Abb. 5 : Hyperplasie / Keratose (Quelle: University of Southern California, www.usc.edu/hsc/dental)

Dysplasie :

Als Dysplasie wird im Allgemeinen Gewebe bezeichnet, welches sich durch verschiedene Alterationen von gesundem Vergleichsgewebe in seiner Architektur unterscheidet. Dazu zählen die irreguläre epitheliale Schichtung, der Verlust der Polarität der Basalzellen, die tropfenförmige Anordnung der Zellen, eine Zunahme an Mitosen - die zudem bis an die oberflächlichen Schichten reichen - Dyskeratosen und Keratinperlen. Zytologische

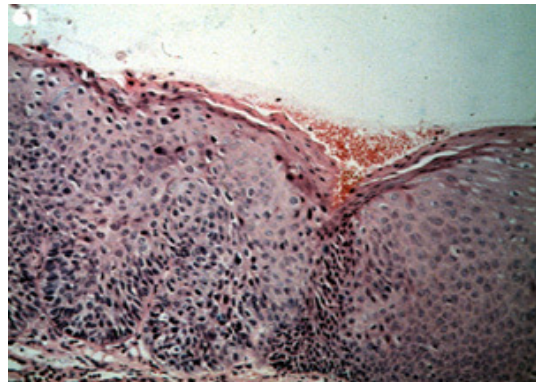


Abb. 6: Dysplasie (Quelle: University of Southern California, www.usc.edu/hsc/dental)

Unterschiede zeigen sich in Anisonukleose, Kernpleomorphismus, Anisozytose, zellulärem Pleomorphismus, erhöhtem Kern-Plasma-Verhältnis, atypischen Mitosen, erhöhter Anzahl und Größe der Nukleoli und Hyperchromatismus. Die Abgrenzung zur Hyperplasie stellt - vor allem bei schwach-dysplastischem Gewebe - eine Herausforderung an den Pathologen dar.

Es werden drei Dysplasiegrade, von leicht- über mittel- bis hochgradig differenziert, die wiederum ihre Entsprechung in der SIN-Klassifizierung (siehe oben) haben:

- leichtgradige Dysplasie / SIN 1 :

Die architektonische Störung beschränkt sich auf das untere Drittel des Epithels und wird von zytologischen Atypien begleitet.

- mittelgradige Dysplasie / SIN 2 :

Die architektonischen Störungen reichen bis in das mittlere Drittel und werden von verstärkten zytologischen Atypien begleitet.

- hochgradige Dysplasie / SIN 3 :

Die Störungen der Integrität des Epithels reichen über das mittlere Drittel hinaus.

Zusätzlich kommt es zu weit reichenden zytologischen Atypien unterschiedlichster Ausprägung.

Carcinoma-in-situ :

Die gesamte oder nahezu gesamte Epitheldicke zeigt architektonische Störungen mit deutlich hervortretenden zytologischen Atypien. Mitosen, unphysiologisch in Form und Anzahl, sind auch bis in die obersten Zellschichten zu sehen. Das Bild entspricht einer stattgehabten malignen Transformation auf genetischer Ebene und somit einem flächenhaft wachsenden Plattenepithelkarzinom. Mikroskopisch imponieren eine ausgeprägte Polymorphie, prominente Nukleoli mit Chromatinvergrößerungen und unterschiedliche Zytoplasmaausmaße mit einer daraus resultierenden uneinheitlichen Zellschichtung. Bezogen auf die SIN-Klassifizierung entspricht dieses Bild einer SIN 3.

Diese Einteilung trägt der Tatsache Rechnung, dass eine hochgradige Dysplasie und ein *Carcinoma-in-situ* nicht verlässlich voneinander unterschieden werden können.

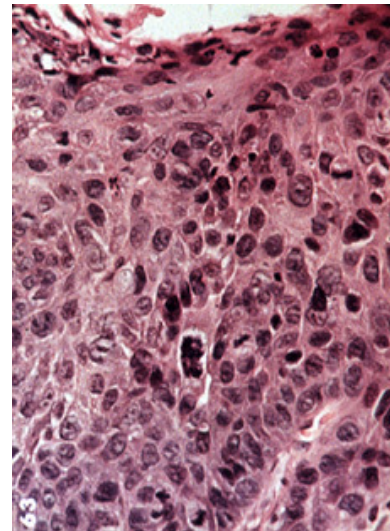


Abb. 7: Carcinoma-in-situ (CIS) (Quelle: University of Southern California, www.usc.edu/hsc/dental)

Invasives Plattenepithelkarzinom :

Beim invasiven Karzinom kommt es zur Aufhebung der Integrität der Basalmembran, einem dadurch bedingten Einwandern von malignen Epithelzellen in tiefere Bereiche des Gewebes, und einem maximalen Verlust an Ordnung im Zellverbund. Auf Zellebene bezogen sind alle Formen der Atypie ersichtlich. Das Wachstum ist in Größe, Form und Zeit unbestimmt.

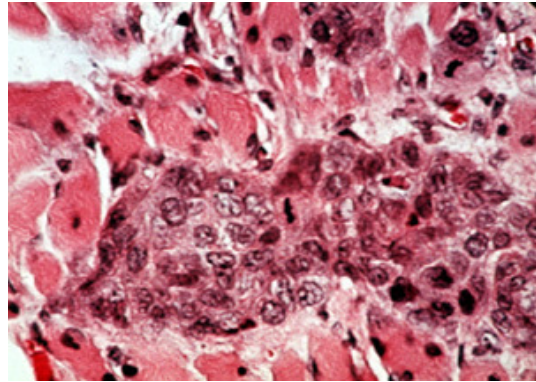


Abb. 8: Invasives Plattenepithelkarzinom (SCC) (Quelle: University of Southern California, www.usc.edu/hsc/dental)

1.3.6. Klinische Gesichtspunkte

Als derzeitiger diagnostischer Goldstandard gelten - neben dem Ausschluss ätiologischer Faktoren, Inspektion und Palpation (und damit Einbezug von Lage, Erscheinung und Größe) - Biopsie und mikroskopische Evaluierung durch den Pathologen [36,42]. Die orale Leukoplakie ist somit eine Ausschlussdiagnose [43]. Vor allem bei Stufen niedriger Dysplasie ist eine Prognosebeurteilung stark eingeschränkt und ein langes, abwartendes Beobachten („*follow-up*“) indiziert. Vorgeschlagen wird eine erneute Evaluation nach Eliminierung etwaiger Ursachen nach einem 2- bis 4-wöchigen Intervall. Im Falle einer ausbleibenden Regression ist eine Re-Biopsie angeraten [44]. Nimmt der Entdifferenzierungsgrad des Epithels zu, wird nicht selten die vollständige Resektion empfohlen, da mit Zunahme der Dysplasie die Wahrscheinlichkeit der malignen Transformation steigt [45]. In 10-20% der Fälle exzidiert Läsionen kommt es zu Rezidiven; 3-9% davon wandeln sich im Laufe der Zeit in invasive Karzinome [46-48]; im Vergleich zu Ergebnissen zwischen 0,9 und 18%, bezogen auf alle Läsionen [39,40,49,50].

Dennoch existieren bis heute auch hier keine allgemein-gültigen Therapie-Leitlinien [51]. Als wichtigste Initialmaßnahme sollte in den meisten Fällen die bereits erwähnte Eliminierung ätiologischer Faktoren (Nikotin, Alkohol) bzw. entsprechende Mundhygiene im Vordergrund stehen.

Differentialdiagnostisch müssen unter anderem Läsionen, wie Lichen planus, Lupus erythematoses, Leuködem, weißer Schwammnävus, friktionsbedingte Veränderungen, Wangen- oder Lippenbeißen sowie der sogenannte „Rauchergaumen“ abgegrenzt werden [36,41].

1.4. Fragestellung und Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit sollte sein, inwieweit sich mit Hilfe der Tumorsuppressorgene (TSG) *FHIT* (Genlokus 3p14) und *p16* (Genlokus 9p21) genetisch-chromosomale Aberrationen von oralen Leukoplakien mit frühesten mikroskopischen Veränderungen nachweisen lassen. Dabei waren sowohl Veränderungen in Form des Verlusts (= Deletion; engl. „*loss of heterozygosity*“ = LOH) als auch einer Amplifikation dieser Gene (= polysome Ereignisse) von Interesse. Die Klärung dieser Fragestellung sollte auf Basis der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erfolgen.

Vogelstein *et al.* haben in ihrer Arbeit an kolorektalen Läsionen aufgezeigt, dass die Zunahme der histomorphologischen Progression durch die Zunahme an genetischen Alterationen begleitet wird [7]. Zahlreiche Analysen konnten bisher bestätigen, dass die oben genannten Genloki in der malignen Entwicklung von der einfachen oralen Läsion zum invasiven Plattenepithelkarzinom frühzeitige Marker darstellen [52-54]. Weitere Forschungsanstrengungen wurden empfohlen [55].

Das *FHIT-Protein* induziert und reguliert Teile der Apoptose über apoptotische Signaltransduktion auf dem weitläufigen Feld der Tumornekrosefaktor-Superfamilie. *p16* kontrolliert und steuert im Rahmen der Phosphorylierung spezifischer Kinasen den Zellzyklus im Bereich des G1-S-Phase-Kontrollpunktes [56]. (Weitergehende Erläuterungen zu *FHIT* und *p16* folgen im Diskussionsteil der Arbeit.)

Ganz ausschließlich wurde das Augenmerk auf die Mundhöhle mit der hinteren Begrenzung durch die Gaumenbögen gelegt. Der Gedanke hierbei war es, Gewebe mit möglichst homogener Noxeneinwirkung zu evaluieren. Gewebe an den anatomischen - und somit zum Teil auch mikroskopischen - Grenzen sollte nicht mit einbezogen werden. Ebenso fand eine Zusammenlegung der beiden Histologieformen „hochgradige Dysplasie“ und „*Carcinoma-in-situ*“ zum „*Carcinoma-in-situ*“, aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten bei der definitiven histologischen Trennung, und in Analogie zum SIN-Konzept statt.

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ermöglicht es, zum einen einzelne Zellen in zytologischen Suspensionen, zum anderen *in-situ*-Gewebe auf spezifische Nukleinsäuresequenzen (DNA, RNA) zu untersuchen und mikroskopisch auszuwerten. Die grundlegende, formgebende Struktur der Zellen wird dabei nicht verwischt. Es lassen sich in kleinsten Zellpopulationen auch sogenannte Subklone detektieren.

In vorangegangenen Untersuchungen wurde zum Nachweis einer LOH größtenteils die Technik der Mikrosatelliten-Analyse mithilfe der PCR (*polymerase chain reaction*) eingesetzt. Dabei gilt eine chromosomale Veränderung erst als pathologisch und somit positiv, wenn für gewöhnlich mehr als 50% der chromosomalen Signale (hier: Allele) einer Versuchsreihe

auffällig sind [52]. Mit dieser vorliegenden Untersuchung sollte geklärt werden, ob sich auf Basis einer *in-situ*-Hybridisierung mit fluoreszentem Farbstoff und entsprechendem Vergleichsgewebe niedrigere Schwellenwerte für eine objektive Analyse erzielen lassen.

Parallel dazu sollten die gleichen Gewebeproben einer immunhistologischen Färbung mittels Antigen-Antikörper-Reaktion auf das Zellzyklusprotein p16 unterzogen werden, um die Interpretation der FISH-Auswertung für die Gensonde p16 (9p21) zu erleichtern und zu potenzieren. Eine Normabweichung in diesem Bereich wird im Allgemeinen als erster auffälliger Marker bei der Karzinogenese von zahlreichen Tumorentitäten, so auch bei Kopf-Hals-Tumoren, gesehen [57].

2. Material und Methoden

2.1. Probenmaterial

Seit 1989 erfolgt am Institut für Pathologie des Klinikums der Universität Regensburg die Archivierung aller histologischen Gutachten durch das elektronische „Patienten-Auskunft-System“ (PAS). Alle für die Versuchsreihe relevanten Gewebeproben im Zeitraum von 1989 bis 2005 wurden unter Zuhilfenahme dieser Elektronischen Datenverarbeitung ermittelt.

Für die Untersuchung relevante Präparate waren Biopsate / Exzisate der Mundschleimhaut (Mundhöhle) unterschiedlicher Dignität. Dabei handelte es sich, wie eingangs beschrieben, um alle Stufen der Entwicklung einer oralen Leukoplakie mit Keratose zum invasiven Plattenepithelkarzinom:

- Keratosen, leichtgradige und mittelgradige Dysplasien, Carcinomata-*in-situ* von Patienten *ohne* eine bekannte höhergradige Pathologie in der Vorgeschichte
- Keratosen, leichtgradige und mittelgradige Dysplasien sowie Carcinomata-*in-situ* bei *metachronem* Fall, d.h. als dokumentierte Verlaufsentwicklung der Pathologie
- Keratosen, leichtgradige und mittelgradige Dysplasien, sowie Carcinomata-*in-situ*, Tumorpräparate und blandes Gewebe des Tumorrandes von Patienten *mit* nachgewiesenem invasivem oralem Plattenepithelkarzinom.

Als Vergleichsgewebe dienten zum einen Schleimhautproben, die bei der Tonsillektomie von Kindern mit einem Höchstalter von 6 Jahren anfielen. Die zweite Kontrollgruppe bildeten Tonsillektomiepräparate von Erwachsenen ohne bekannte orale Leukoplakie.

Von den auf diese Weise ermittelten Fällen wurden im Archiv die entsprechenden Hämatoxylin-Eosin-Schnitte (HE-Schitte) eruiert, und zur genauen Beurteilung und Diagnoseüberprüfung durch einen Pathologen nach den Kriterien der WHO [13] erneut durchgesehen. Die für die Fragestellung wesentlichen Gewebebereiche wurden unter mikroskopischer Sicht mit einem Stift markiert. Aus dem Probenarchiv erfolgte dann die Zusammentragung der dazugehörigen Paraffin-Blöcke mit ausnahmslos Formalin-fixiertem Material.

Durch Studium der jeweiligen Patientenakten war es möglich, einen genauen Einblick in die persönliche Epidemiologie der Probanden (Nikotin- und / oder Alkoholabusus, Zahnstatus etc.) zu gewinnen. Hiermit sollten im Anschluss an die Versuchsreihe mögliche Korrelationen berechnen werden können.

2.2. Tissue - Multi - Array - Block - Technik (TMA)

Durch die „Tissue-Multi-Array“-Block-Technik (TMA) ist es möglich, unter sinnvoller Kosten- und Zeitersparnis eine größere Anzahl von Geweben in einem singulären Arbeitsgang auf ihre Pathologie hin zu differenzieren (FISH, Immunhistochemie etc.). Dabei besteht der Vorteil darin, dass für alle Gewebeproben eines angefertigten Blockes exakt gleiche Versuchsbedingungen herrschen. Die Vergleichbarkeit (Verringerung der systematischen Fehlerhäufigkeit) untereinander ist somit größtmöglich gewährleistet. Zudem erlaubt diese Art der Bearbeitung in Präparation und Auswertung die gezielte Konzentration auf den gewünschten Bereich, unter Ausschluss des nicht-relevanten Geweberests.

Die Anfertigung eines solchen TMA-Blockes (Abbildung 9) erfolgte unter Verwendung der vorher mikroskopisch durchgesehenen HE-Schnitte. Das dabei für die Fragestellung der Arbeit wichtige, festgelegte Areal wurde mittels eines schwarzen Markerstiftes auf den dazugehörigen Paraffinblock übertragen.

Stellte sich heraus, dass im Biopsat zu wenig Material für eine später ausreichende fluoreszenzmikroskopische Beurteilung vorhanden war, wurde auf die Verwendung verzichtet.

Im anschließenden Schritt wurde mithilfe einer Handstanze ein Stanzzylinder von ca. 5 mm Länge gewonnen. Die Stanze der Firma *Zytomed* besteht aus einer geschliffenen Hohnadel mit einem Innendurchmesser von 2 mm, in der ein Stempel steckt. Diese wird senkrecht, unter sanftem Druck, in den zu beurteilenden Bereich des bei Zimmertemperatur gelagerten Paraffinblockes eingestochen, bis der Anschlag an die Kunststoffkassette zu spüren ist. Nach leichtem Hin- und Herdrehen der Stanze - mit der Absicht des Ablösens des Gewebestanzzylinders vom Boden des Blockes - wird die Nadel senkrecht herausgezogen. Durch Drücken des Stempels in den Hohlzylinder kann das Gewebe aus der Stanze entfernt werden.

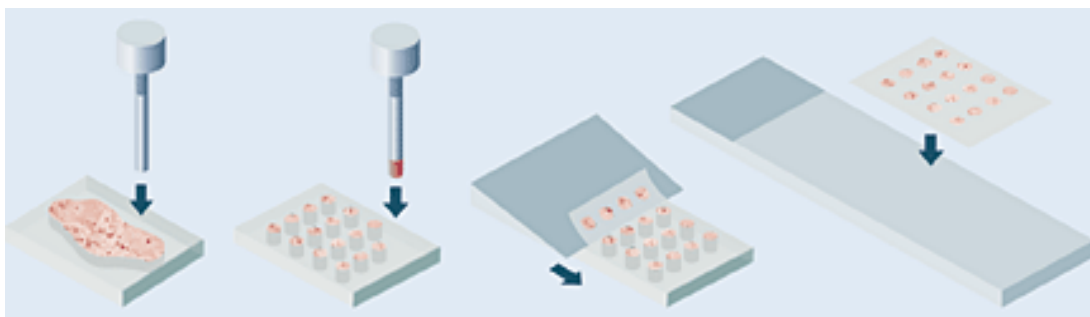


Abb. 9: Prinzip der Herstellung eines TMA-Block-Schnittes von links nach rechts: Gewinnung einer Gewebestanze an vorher markiertem Gewebe eines Paraffin-Blockes - Überführen der Stanze in ein Negativ - Anfertigung von 4µm-dünnen Schnitten mittels Mikrotom aus dem entstandenen TMA-Block - Aufbringen auf einen Objektträger zur Hybridisierung mittels FISH-Sonden (Quelle: NN)

In einem Vorschritt wurde aus einem Paraffin-Leerblock ein Negativ hergestellt, in den die gewonnenen Stanzen nun eingesetzt werden können. Dieses Negativ besteht aus 60 ausgestanzten Hohlzylindern. Unter exakter Dokumentation erfolgt die Einpassung der Stanzen in die vorgesehenen Hohlräume.

Um anschließend eine homogene Verbindung des Negativblockes mit den eingefügten Stanzen zu erhalten, werden die TMA-Blöcke in der wieder aufgesetzten Ausgussform des Blockes für 3 Minuten auf einer 60°C warmen Heizplatte inkubiert, und danach sofort auf die Kühlplatte zur Aushärtung gelegt.

Von den fertigen Multi-Array-Blöcken werden je 10 4µm dünne Schnitte angefertigt. Zur Beurteilung der Qualität erfolgt im Anschluss von jeder Schnittsequenz eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit erneuter histopathologischer Begutachtung.

Da durch teilweise mangelnde Gewebequalität und -masse eine Anzahl von 60 auswertbaren Stanzen je TMA-Block technisch nicht erreichbar war, erfolgte unter qualitativer Kontrolle und Dokumentation eine Nachbearbeitung der „verloren gegangenen“ Stanzen in Form von neu angefertigten Einzelschnitten des gesamten Gewebes vom ursprünglichen Paraffinblock. Diese wurden zu mehreren auf Objektträger aufgezogen, und der Versuchsreihe zugeführt.

2.3. Verwendete Materialien

2.3.1. Materialien

Schlittenmikrotom	Mikrom, Heidelberg
Objektträger 25 x 75 x 1,0mm SuperFrost® Plus	Mezel-Gläser, Braunschweig
Handstanze	Zytomed, Berlin
Metallständer	Wagner & Munz, München
Brutschrank B6060	Heraeus Sepatech, Osterode
Wasserbad Lo-boy	Lab-Line Instruments, USA
Glasküvetten	Dako Diagnostika, Hamburg
Heizplatte	Ika Labortechnik, Staufen i. Br.
Deckgläser 24 x 50mm	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Pepsin	
Fixogumm	
Entellan	Merck, Darmstadt
Glasfräse	
Gefrierschrank	Liebherr, Deutschland
NexES IHC Färbemodul	Ventana, USA

2.3.2. Reagenzien

Natriumcitrat-Lösung

0,490 g tri-C₆H₅Na₃O₇ x 2 H₂O

ad 500 ml Millipore-Wasser

pH-Werteinstellung auf 6,0 mit HCl

20 x SSC-Lösung

175,32 g NaCl

88,24 g Natriumcitrat-Dihydrat

ad 1,00 l Millipore-Wasser

pH-Werteinstellung auf 5,3 mit konzentrierter Salzsäure (HCl)

4 x SSC-Lösung

200 ml 20 x SSC-Lösung mit pH 5,3

ad 800 ml Millipore-Wasser

pH-Werteinstellung auf 7,0 bis 7,5 mit 1N NaOH

2 x SSC-Lösung

100 ml 20 x SSC-Lösung mit pH 5,3

ad 900 ml Millipore-Wasser

pH-Werteinstellung auf 7,0 bis 7,5 mit 1N NaOH

1 x SSC-Lösung

50 ml 20 x SSC-Lösung mit pH 5,3

950 ml Millipore-Wasser

pH-Werteinstellung auf 7,0 bis 7,5 mit 1N NaOH

NP40

0,3 % Nicht-Phenylpolyethylen-haltige Glycollösung

Ethanol

100 % Ethanol

80 % Ethanol (80 ml EtOH, 20 ml Millipore-Wasser)

70 % Ethanol (70 ml EtOH, 30 ml Millipore-Wasser)

Carnoy

3 Teile Methanol + 1 Teil Essigsäure

HCl

0,01 M (250 µl 2 M HCl, 50 ml Millipore-Wasser)

Pepsin

0,1% (1 mg / 1 ml 0,01 M HCl)

Xylol

Aceton

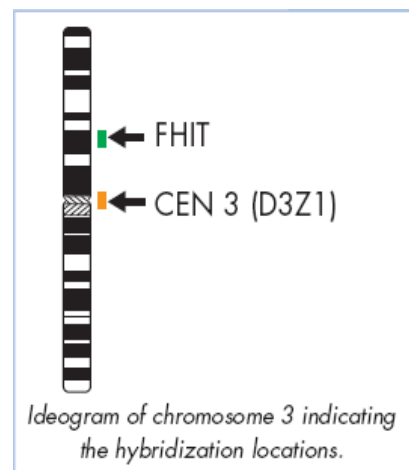
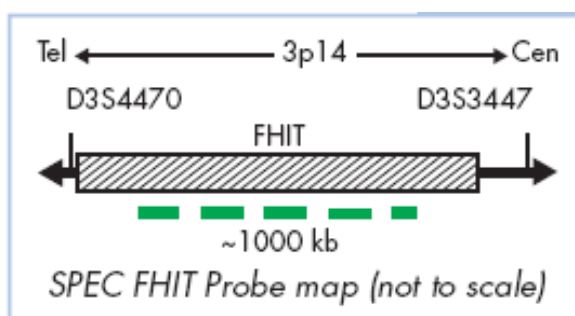
2.3.3. Verwendete FISH-Sonden

Für die Versuchsreihe kamen zwei unterschiedliche, auf die Genloki FHIT und p16 abgestimmte Farbkits der Firma *Zytovision* / Bremerhaven, zum Einsatz, die speziell für die Fragestellung des Versuches entwickelt wurden.

Dabei handelte es sich jeweils um Zwei-Farb-FISH-Kits mit den Sonden-Farben **grün** für das Gen, und **orange-rot** für das Zentromer:

- *SPEC FHIT / CEN 3 Dual Color Probe* für Zentromer und FHIT-Gen des Chromosoms 3
- *SPEC p16 / CEN 9 Dual Color Probe* für Zentromer und p16-Gen des Chromosoms 9

jeweils gelabelt mit *ZyGreen*TM (entsprechend Fluorescein-5-isothiocyanat, FITC) - Absorption bei 530nm, Emission bei 528nm - und *ZyOrange*TM (entsprechend Rhodamin) - Absorption bei 547nm, Emission bei 528. Dabei detektiert die FHIT-Sonde ca. 1000 Kilobasen im Bereich der Genloki *D3S3447* und *D3S4470*, die p16-Sonde ca. 300 Kilobasen im Bereich der Genloki *D9S1814* und *D9S736* unter Einbeziehung der Gene für die Methylthioadenosinphosphorylase (MTAP), p15 und p16 (Abbildung 10).



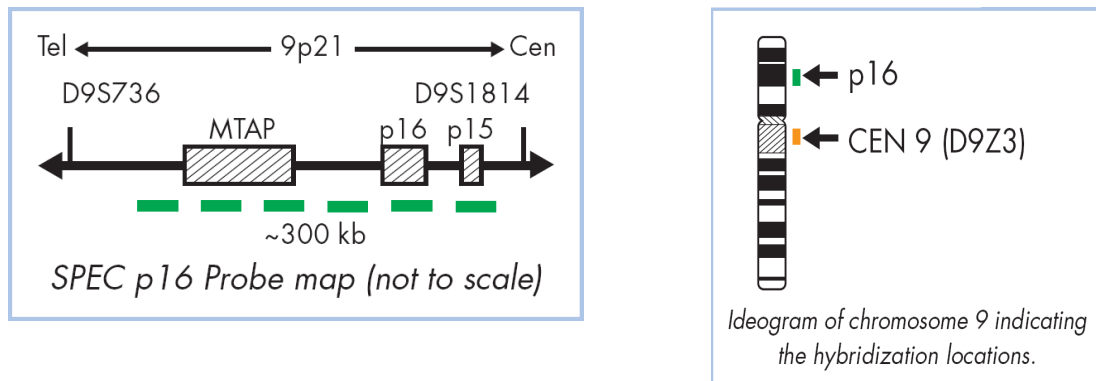


Abb. 10: Dargestellt sind die genannten Gensonden (linke Graphiken; oben: FHIT, unten: p16) mit ihren Genloki im Bereich spezifischer Basenpaare auf dem DNS-Strang, sowie ihr jeweiliger chromosomaler Hybridisierungsort in bildlicher Darstellung (rechte Graphiken; grün). Zusätzlich sind in den rechten Graphiken die Hybridisierungsorte der Zentromersonden (rot) markiert. (Quelle: Zytovision / Bremerhaven)

Versuchstechnisch bedingt waren dies zwei unabhängige Versuchsreihen, da in einer simultanen Anwendung eine qualitative Trennung der Signale aufgrund der verwendeten Farben nicht möglich gewesen wäre.

Zur Anfärbung der Zellkerne kam das mit der DNA interagierende Fluorochrom DAPI (4,6-Diamin-2-Phenylindolhydrochlorid) zum Einsatz, welches die genaue Zuordnung der Signale zum jeweiligen Kern durch den Einsatz eines speziellen optischen Filters ermöglicht.

2.3.4. Antikörper für p16-Immunhistochemie

Zudem wurde mittels Immunhistochemie die Expression des Zellzyklusprotein p16 untersucht, um eventuelle Korrelationen mit den Ergebnissen aus der FISH-Untersuchung zu ermitteln.

Der polyklonale Antikörper bindet an Epitope des Proteins. Im verwendeten Kit sind neben dem unverdünnten Primärantikörper der Firma *Ventana* enthalten:

- Biotinylierter Sekundärantikörper
- Enzymkonjugat HRP-Streptavidin, ein aus vier identischen Untereinheiten aufgebautes, Biotin-affines Protein (Tetramer)
- Chromogen DAB.

2.3.5. Geräte für histologische Begutachtung, Dokumentation und immunhistochemische Auswertung

Durchlichtmikroskop der Firma Leica, Objektive von Olympus Optical; Bilddokumentation mit Kamera und Software der Firma Visitron Systems, Puchheim, RT Color Diagnostic.

2.3.6. Geräte für die FISH-Auswertung

Mikroskop

- Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.Z1 der Firma Zeiss, Jena
- Anregungs- und Emissionsfilter:

	Anregung	Emission
- DAPI:	365 nm	445 nm $\pm$ 25 nm
- Oregon Green	500 nm $\pm$ 10 nm	535 nm $\pm$ 15
- Rhodamine	545 nm $\pm$ 15 nm	610 nm $\pm$ 37,5 nm
- Dualband FITC/TRITC		

Kamera zur Bilddokumentation

- AxioCam MRm mit ApoTome zur optischen Streulicht-Bildbearbeitung der Firma Zeiss

Soft- und Hardware

- AxioVision Rel. 4.6 der Firma Zeiss
- Intel Xeon Computer der Firma FujitsuSiemens

2.4. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

2.4.1. Prinzip der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureabschnitten (DNA / RNA) mittels künstlich erzeugter, farbkodierter (gelabelter) Oligonukleotide (Abbildung 11).

Durch Erhitzen der Gewebeschnitte auf 73°C kommt es zur Denaturierung der Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA, sodass einzelsträngige DNA entsteht (DNA-Schmelzvorgang). Lässt man diese nun langsam abkühlen, hybridisieren die komplementären Abschnitte wieder regelrecht. Im Experiment ist an dieser Stelle die Zugabe von Sonden möglich, die an spezifischen Abschnitten der DNA anstelle der Gegenstrang-DNA binden. Bei diesen handelt es sich um DNA-Sequenzen, die - je nach Fragestellung - einer bestimmten Basenfolge komplementär entsprechen, und diese detektieren sollen. Dabei ist es unerheblich, ob Zentromerregionen einzelner Chromosomen oder spezifische Genloki betrachtet werden.

Bei der Synthese dieser Oligonukleotide werden modifizierte Desoxynucleotidtriphosphate verwendet, denen fluorochrome Moleküle kovalent an Seitengruppen angelagert sind. Fluoreszierende Moleküle haben die Eigenschaft, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und dieses im Gegenzug mit einer für sie spezifischen zu emittieren. Dazu

kommt bei der mikroskopischen Betrachtung UV-Licht zum Einsatz, welches durch optische Filter verändert werden kann. Die Sonden werden angeregt, und durch die begrenzten Anregungsbereiche senden diese nun für sie spezifische Frequenzmuster aus. In einem einzigen Versuchsablauf können so verschiedene Sonden mit jeweils unterschiedlichen Spektren hybridisiert und mittels Doppelfiltern im Mikroskop zeitgleich evaluiert werden.

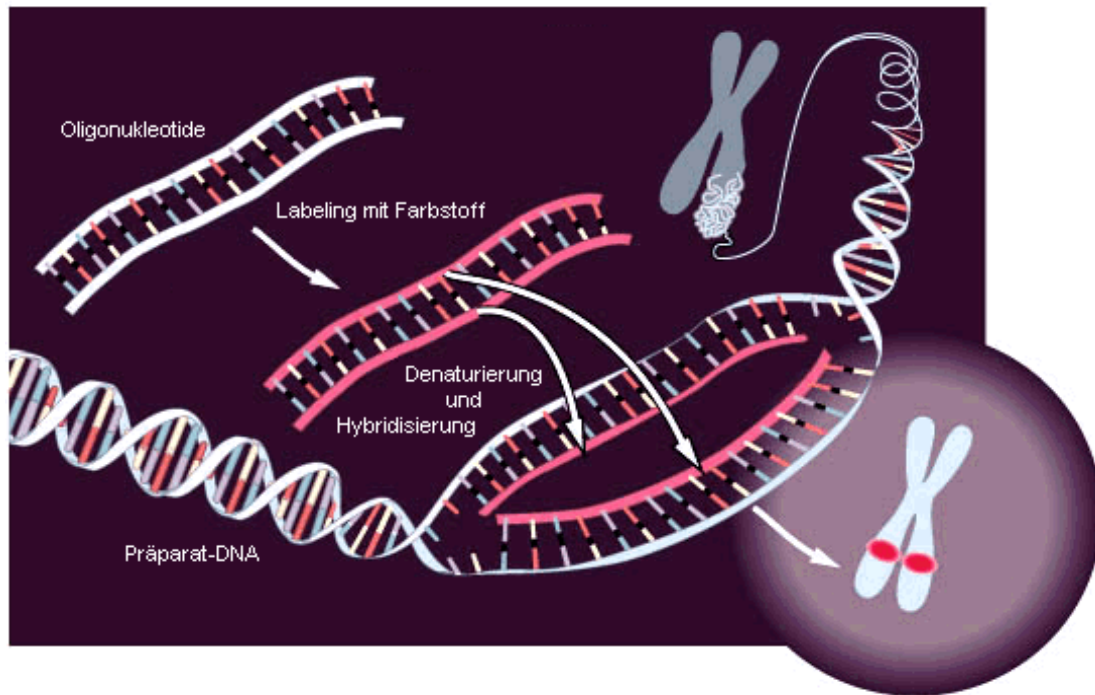


Abb. 11: Schema der DNA-Hybridisierung mit der Oligonukleotid-Sonde: Durch Erhitzen der DNA kommt es zur Unterbindung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Basenpaaren; nun können sich die gelabelten Sonden ihrer Kodierung entsprechend anlagern und bei Abkühlung erneut elektrostatische Bindungen eingehen. (Quelle: modifiziert nach 'National Human Genome Research Institute')

2.4.2. FISH-Protokoll: Gewebepräparation und Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wird an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt: die Schritte der Entparaffinierung bis zur Hybridisierung erfolgen am ersten, die Schritte DAPI-Färbung und Konservierung am zweiten.

Entparaffinierung und Nachfixierung :

- die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte werden mit einer Glasfräse rückseitig markiert, um sie unter dem Mikroskop leichter auffinden zu können
- Inkubation im Brutschrank bei 72°C für 35 Minuten
- für zweimal 10 Minuten in frischem Xylol bei Raumtemperatur waschen
- die Objektträger 20 Minuten in Carnoy bei Raumtemperatur inkubieren
- 20 Minuten jeweils in Aceton und anschließend in Methanol im Gefrierschrank baden

-
- Auswaschen des Xylols mittels absteigender Alkoholreihe: je 1 Minute in 100%, 80% und 70% Ethanol; Waschen mit Aqua destillata bis keinerlei Schlieren (Rückstände vom Alkohol) mehr erkennbar sind

Denaturierung :

- Vorbehandlung der Objektträger durch Inkubation im 95°C-Wasserbad für 40 Minuten in 0,01M Natriumcitrat -Lösung
- Einstellen der Schnitte in 0,1%ige Pepsin-Lösung (0,1% Pepsin mit 0,01M HCl, Küvette) für 10 Minuten im 37°C-Wasserbad
- Waschen der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe von 70, 80 und 100% Ethanol, und mit 2 x SSC-Lösung sowie mit Aqua destillata für eine Minute bei Raumtemperatur
- Trocknen der Objektträger mittels sanft zugeführter Druckluft

Hybridisierung :

- Auftragen des auf Raumtemperatur erwärmten Sondenkits (3µl) auf die Objektträger
- Aufbringen eines Deckglases und luftdichtes Verschließen mit Fixogumm
- Inkubierung der präparierten Schnitte zur Denaturierung auf einer Heizplatte für 5 Minuten bei 73°C und unter Lichtschutz
- Lagerung der Objektträger in einer feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank über Nacht

DAPI-Färbung und Konservierung :

- vorsichtige Entfernung des Deckglases
- Waschen der Schnitte in 4 x SSC-Lösung (+ NP40 0,3%), in 2 x SSC-Lösung und 1 x SSC-Lösung bei 50°C im Wasserbad für jeweils 10 Minuten
- Waschen der Schnitte in Aqua destillata für 1 Minute
- Trocknen der Objektträger mit sanft zugeführter Druckluft zur besseren DAPI-Färbung
- Aufbringen eines Tropfen DAPI in die Mitte des Objektträgers und Verschluss mit einem Deckglas
- mithilfe eines Pinsels Umranden des Deckglases zur Fixierung mit Entellan; Trockenzeit von ca. 90 Minuten beachten

2.4.3. Ergebnisevaluation der FISH

Je Stanze wurden - bei wenigen Ausnahmen - zwischen 46 und 56 Kerne untersucht, die eindeutig als einzeln und in ihrer Erscheinung als verhältnismäßig unbeschadet differenzierbar waren. Kam es zur Überlappung oder zum Teilverlust in der DAPI-Färbung von Zellkernen und Bestandteilen, wurde auf die Evaluation verzichtet. Signale wurden als geteilt und damit als einzeln gewertet, wenn sie näher als das Maß ihres entsprechenden Durchmessers nebeneinander lagen (Chromosomenzerfall). Für jeden Zellkern wurde das Signalmuster, d.h. die Anzahl von Gen- und Zentromersignalen je Kern, einzeln ermittelt und in einer Tabelle notiert (Abbildung 12). Um eine genaue Differenzierung nach Zentromer- und Gensignal zu erhalten, kamen die oben beschriebenen Anregungsfilter zum Einsatz.

Zu Beginn, während und am Ende der Auswertung erfolgte eine Kontrollbewertung durch einen unabhängigen, fachkundigen Assistenten (MTA).

Von besonders auffälligen beziehungsweise eindrucklichen Präparaten wurde eine Bilddokumentation vorgenommen (siehe Kapitel 3.6.).

Anzahl der Gene	Anzahl der Zentromere				
		1	2	3	4
	1	3			
	2		47		
	3				
	4				

Anzahl der Gene	Anzahl der Zentromere				
		1	2	3	4
	1	3			
	2		47		
	3				
	4				

Beispielauswertung der **Tonsillenschleimhaut** eines **Kindes** und eines **Erwachsenen**

Anzahl der Gene	Anzahl der Zentromere				
		1	2	3	4
	1	7	5		
	2		38		
	3				
	4				

Anzahl der Gene	Anzahl der Zentromere				
		1	2	3	4
	1	12	8	3	
	2		25	2	
	3				
	4				

Beispielauswertung einer **Keratose** und einer leicht- bzw. mittelgradigen **Dysplasie**

Anzahl der Gene	Anzahl der Zentromere				
		1	2	3	4
	1	12	12	4	
	2		17	5	
	3				
	4				

Anzahl der Gene	Anzahl der Zentromere				
		1	2	3	4
	1	10	9	6	3
	2		10	5	7
	3				
	4				

Beispielauswertung eines **Carcinomata in situ** und eines **invasiven Karzinoms**

Anzahl der Gene	Anzahl der Zentromere				
		1	2	3	4
	1	12	9	1	
	2		25	3	
	3				
	4				

Beispielauswertung **blander Tumorschleimhaut**

Abb. 12: beispielhafte, tabellarische, grobschematische Darstellungen der mikroskopischen Auswertung der einzelnen Entitätsgruppen einer FISH für FHIT. Die Zahlen stehen für die Anzahl an Kernen für entsprechende Gen-Zentromer-Kombinationen und somit für die Zahl an pathologischen Kernen. Dabei steht die Kombination ,2-2' für blande Kerne mit diploidem Chromosomensatz. Man erkennt eine Zunahme der Kumulation von pathologischen Kernen (Zunahme der Polysomie) bei Zunahme der Entität der jeweiligen Läsion. Die Auswertung der FISH für die Gensonde p16 wies eine weitaus geringere Zunahme der Polysomie auf, als die der Auswertung für FHIT.

2.4.4. Schwellenwert, Statistik und Auswertungskriterien

Als Kontrollgewebe dienten zum einen Biopsate (Schleimhaut von Tonsillektomie-Präparaten) von Kindern mit einem Höchstalter von 6 Jahren. Zum anderen wurde solches Gewebe von Erwachsenen ohne bekannte orale leukoplakische Veränderungen in ihrer Vita herangezogen. Noxenstatus, Alter und Geschlecht waren unbekannt. Damit sollte später das so genannte Fehlerrauschen - bedingt durch präparatorische Artefakte und statistische Ungenauigkeit - herausgerechnet und minimiert werden. Mit den erhobenen Daten wurde nun ein Schwellenwert (*cut-off*) zur statistischen Bestimmung einer Aberration definiert. Aufgrund der Tatsache, dass es durch die Gewebepräparation zu Verlusten von genetischem Material, und folglich zu einer Unterrepräsentierung von Chromosomen- und Genkopie-Anzahl kommt, wurden die Mittelwerte mittels der dreifachen Standardabweichung korrigiert. Der neue Wert galt als Schwellenwert für die Auswertung der TMA-Blöcke [58]. Lagen die Werte hinsichtlich des untersuchten Merkmals auf oder über diesem, so galt die Probe als pathologisch positiv (aberrant), darunter als negativ.

Gewebe mit Signalverlusten im Bereich der Zentromer- und/oder Gensonde wurde als Deletion, Gewebe mit Signalvermehrung als Polysomie betrachtet. Fehlten sämtliche Zentromersignale eines Kerns bei gleichzeitig vorhandenem positivem Gensignal, wurde auf eine Wertung aus fehlertechnischen Gründen (evtl. zu starker Anschnitt des Kerns bei der Präparation, hohe Wahrscheinlichkeit einer Fehlhybridisierung der Sonden, etc.) verzichtet. Statistischerseits fand eine prozentuale Gewichtung der Anteile von Deletion, Polysomie und der Gesamtzahl der pathologischen Kerne zur Gesamtzahl aller gezählten Kerne einer Stanze statt.

Zu untersuchen galt auch, ob pathologisch positive oder negative Ergebnisse im Bereich der FHIT-Sonde Niederschlag auf Seiten der p16-Sonde fanden und umgekehrt.

Alle ermittelten Werte zeigten eine mathematische Normalverteilung, wodurch beim Vergleich der Mittelwerte zur Erhebung der statistischen Signifikanz der Mann-Whitney-U-Test angewandt werden konnte.

2.5. Immunhistochemie

2.5.1. Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie nutzt die Spezifität immunologischer Reaktionen zur präzisen Auffindung von Epitopen (Antigene). Dabei hilft die Eigenschaft, dass Antikörper mit hoher Affinität an ihr passendes Antigen binden (Antigen-Antikörper-Reaktion). Hinsichtlich der Detektion dieses entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes gibt es immunhistochemisch einen direkten und einen indirekten Weg. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode handelte es sich um die indirekte Avidin-Biotin-Methode, aus der Gruppe der Immunperoxidase-Färbungen: Die nicht-bindende Seite des Antikörpers wird selbst als Bindungsstelle für weitere, entsprechende Antikörper verwendet, und dient somit der Detektion mithilfe von Chromogenen.

Zuerst erfolgt die Entparaffinierung des auf Objektträger aufgezogenen Gewebes (TMA-Block-Schnitte). Die somit freigelegten Antigene werden mit dem ersten Antikörper in Kontakt gebracht (Primärantikörper), der spezifisch an seinem Epitop bindet. In einem zweiten Schritt wird der Sekundärantikörper aufgetragen, der seinerseits spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und mit Biotin konjugiert ist.

Biotin wird charakteristischerweise vom Glykoprotein Avidin gebunden, das pro Molekül je viermal Biotin binden kann (Tetramer).

Es wird ein Avidin-Biotin-Komplex hinzugegeben, der mit Peroxidase (Enzym zur chemischen Freisetzung von Sauerstoff) konjugiert ist, und freie Biotin-Bindungsstellen aufweist. Dieser lagert sich an das mit dem Sekundärantikörper gekoppelte Biotin an. Nun folgt die Visualisierung des Antikörperkomplexes, bei der man die Peroxidase mit Wasserstoffperoxid und einem passenden Chromogen (hier: 3,3'-Diaminobenzidin = DAB) reagieren lässt. Nach langem Spülen - zur Entfernung von überschüssigen Komplexen - unter fließendem Leitungswasser, imponieren die Antigensignale farbstoffbedingt bräunlich. Die Gegenfärbung, zur besseren Differenzierung der Zellen und Zellstrukturen, erfolgt mit Hämalun (ein dunkelblau-violetter Farbstoff).

2.5.2. Immunhistochemieprotokoll für p16: Gewebepräparation

Das Protokoll der p16-Immunhistochemie erfolgt nach der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB), und wird am Institut für Pathologie der Universität Regensburg halbautomatisch durchgeführt. Dazu steht das NexES IHC Färbemodul der Firma *Ventana* / USA zu Verfügung.

Entparaffinierung :

- Waschen der Objektträger für zweimal 5 Minuten in frischer Xylol-Lösung
- Waschen in Alkohollösungen absteigender Konzentration für je eine Minute in 100% Propanol, 96% und 70% Ethanol
- anschließendes Waschen in Aqua destillata bis keinerlei Schlieren mehr ersichtlich sind

Vorbereitung der Färbung / Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen :

- Inkubation der Objektträger in Citratpuffer (pH 7,3) für 30 Minuten in der Mikrowelle bei 320 Watt
- Schnitte in Puffer abkühlen lassen
- Waschen in Aqua destillata

Färben der Gewebeproben :

- Die Färbung erfolgt mithilfe des NexES IHC Färbemodul halbautomatisch. Nach der manuellen Auftragung des unverdünnten Primärantikörpers (Firma: Ventana) werden die Schnitte dem Färbeautomaten zugeführt und vollautomatisch nach dem LSAB-Protokoll gefärbt (siehe Anhang).

Konservieren der Präparate :

- Reinigen mit Aqua destillata für fünf Minuten
- Gegenfärbung mittels Hämatoxylin
- Bläuen durch Reinigung für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser
- Waschen der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe: 70% und 96% Ethanol, 100% Propanol
- Inkubation in Xylol für zweimal 5 Minuten
- Konservieren der Präparate mit Deckgläsern und Entellan

2.5.3. Ergebnisevaluation der immunhistochemischen Färbung

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer prozentualen Flächenfärbung ausgewertet und dokumentiert. Dabei wurde in Schritten von 10% vorgegangen. Auch hier wurde von unabhängiger, fachkundiger Seite (MTA) kontrolliert.

Als Normalgewebe und somit Vergleichsprobe diente abermals Tonsillektomie-Schleimhaut von Kindern im Alter von höchstens 6 Jahren und von Erwachsenen ohne bekannte orale Pathologie, sowie unbekanntem Noxenstatus.

3. Ergebnisse

3.1. Präparation der TMA-Blöcke und Färbeprotokoll

Der FISH-Kit der Firma *Zytovision* / Bremerhaven wurde speziell für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit entwickelt. Dabei war von Interesse, ob sich bereits an frühesten Läsionen im Bereich der Mundschleimhaut - den sogenannten Keratosen oraler Leukoplakien - erste chromosomale Veränderungen unter Verwendung der Fluoreszenzhybridisierung detektieren lassen. Der Schwerpunkt lag auf den beiden Tumorsuppressorgen FHIT (Genlokus 3p14) und p16 (Genlokus 9p21). Die Untersuchung erfolgte an in Paraffin eingebettetem Gewebe.

Im Zusammenhang mit der Stanzeneinpassung (Verschmelzung der Paraffin-Gewebe-Zylinder mit dem Trägermaterial) in die Negativblöcke, kam es bei der Herstellung der TMA-Blöcke zum teilweisen horizontalen beziehungsweise vertikalen Abschwimmen der Stanzen. Dadurch musste entweder die verlegte Stanze auf die entsprechende Höhe / Stelle durch Ausstanzung und neuerliche Einpassung zurückgeholt werden. Oder von verloren gegangenem Material wurden Einzelschnitte des gesamten Blockes angefertigt, und anschließend als Ganzes der Färbung im FISH-Protokoll zugeführt.

Zu Beginn der Arbeit war der Einsatz eines Vier-Farb-FISH-Kits, und somit eine synchrone Versuchsdurchführung für die beiden Sonden FHIT und p16, geplant. Aufgrund technischer Schwierigkeiten ließ sich diese Idee jedoch nicht realisieren, und es wurde auf eine parallele Versuchsanordnung mit zwei einzelnen Hybridisierungen und identischen Farben für Zentromer und Gen (orange-rot bzw. grün) zurückgegriffen.

Mit dem in der Arbeitsgruppe üblichen FISH-Protokoll gelangen hinsichtlich der Signale zufrieden stellende Ergebnisse. Problematisch war meist die Identifizierung der Kerngrenzen, da häufig eine Störung durch autofluoreszierendes Gewebe auftrat.

Die optimale Denaturierungsdauer mittels Pepsin lag bei 10 Minuten. Bei kürzerer Einwirkungszeit war zuviel autofluoreszentes Material um die Zellkerne versammelt; bei längerer die Morphologie der Kerne durch zu starken Verdau nicht mehr ausreichend nativ, um eine spätere mikroskopische Differenzierung zu gewährleisten.

Mit der Modifikation der Vorbehandlungszeit im Natrium-Citrat-Wasserbad bei 95°C für 40 Minuten und der Proteinase-Einwirkzeit (Pepsin) von 10 Minuten konnten die besten Ergebnisse erzielt werden: entsprechend gute Signalqualität, wenig störendes autofluoreszentes Material bei noch ausreichend gut erhaltenen Zellkernen.

Unterschiede in der Signalqualität der FISH gab es bei den Sonden für die Reihe der p16-Färbung für Zentromer und Gen. Dabei stellten sich im Vergleich zu den FHIT-Sonden leicht

abgeschwächte Signale dar, was die Detektion - im Besonderen der Gensonde - erschwerte. Dennoch war eine eindeutige Zuordnung der Signale möglich.

3.2. Statistische Zusammenfassung der einzelnen Entitäten

Die im Zusammenhang mit der Arbeit untersuchten unterschiedlichen Entitäten (siehe oben) wurden zur erleichterten statistischen Betrachtung und Auswertung in sieben verschiedenen Dignitätskategorien zusammengefasst, von denen ausgegangen werden konnte, dass sie ähnliche Pathologiemuster aufweisen:

- Unter Kategorie 0 bzw. 1 wurden alle juvenilen bzw. adulten Tonsillenbiopsate subsumiert.
- Kategorie 2 bestand aus sämtlichen Keratosen von Patienten ohne weitere synchrone, orale Pathologie bzw. solche im weiteren Verlauf auftretende.
- In Kategorie 3 befanden sich alle dysplastischen Ereignisse (leichtgradige und mittelgradige Dysplasien) [59] von Patienten, die entweder nur diese Entität oder eine weitere (z.B. Karzinom) aufwiesen, sowie Keratosen von Patienten mit metachronem, invasivem Karzinom.
- Kategorie 4 bestand aus Carcinomata-*in-situ*, unerheblich ob metachron oder synchron.
- Als fünfte Gruppe wurden alle invasiven Karzinome und als sechste sämtliche blanden Tumorschleimhaut-Biopsate von Patienten mit Karzinom zusammen gefasst.

3.3. Numerische Chromosomenaberrationen in der FISH

3.3.1. Allgemeine Übersicht zu FHIT

Mikroskopisch wurde evaluiert, *wie viele Zellkerne* einer Stanze ein von der Normalzelle abweichendes Signalmuster (Aneuploidien) aufwiesen, und *in welcher Form* (Abbildung 2). Dabei wurde einerseits auf genetische, andererseits auf chromosomale Deletionen beziehungsweise Polysomien geachtet.

Eine Deletion ist der Verlust von Information im Genom auf „qualitativer“ (Gen) oder „quantitativer“ (Chromosom) Ebene, eine Polysomie ein numerischer Zugewinn [14]. Als normal und somit physiologisch galt die Kombination „2 - 2“, d.h. je Zellkern imponieren zwei Gen- sowie zwei Zentromersignale (Abbildung 13).

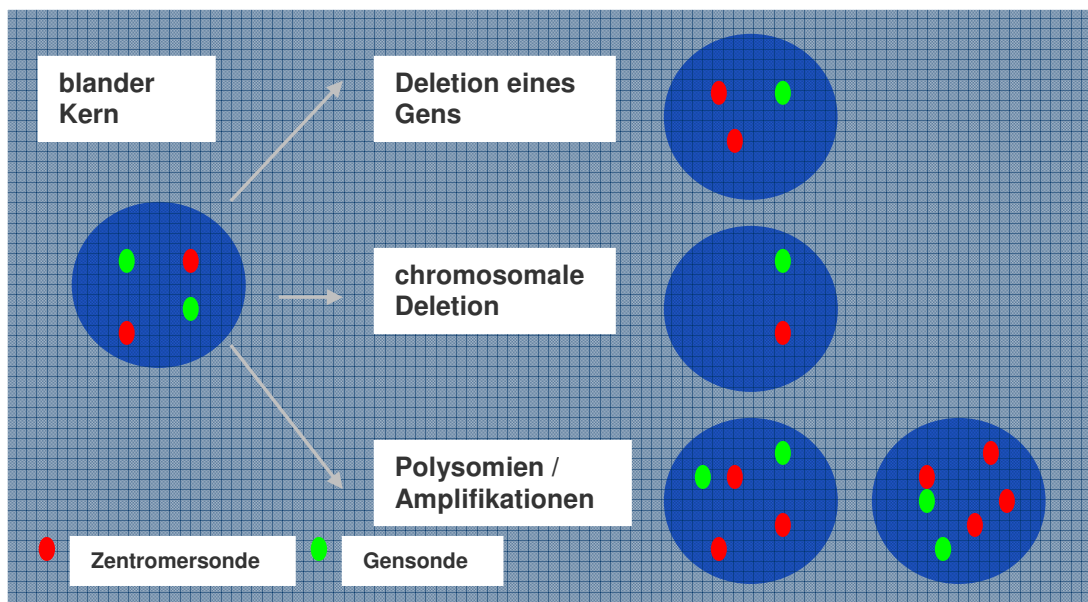
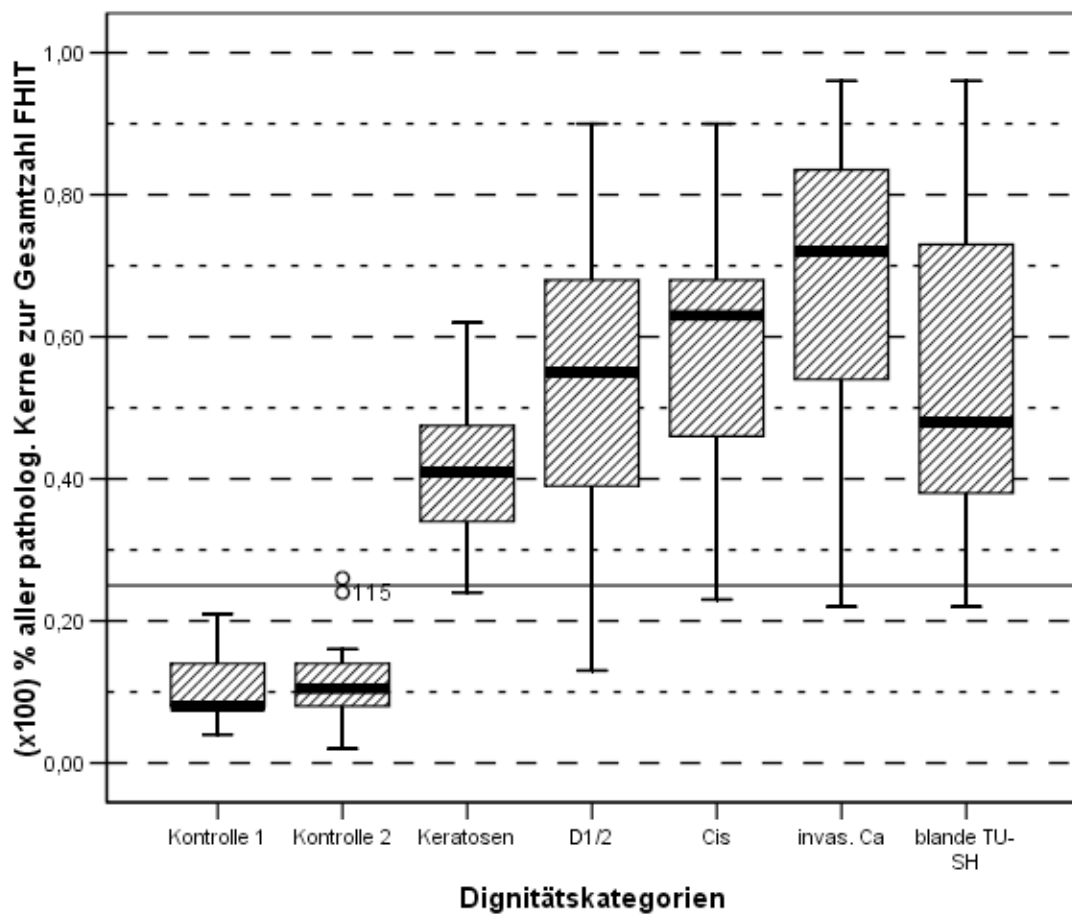


Abb. 13: Schematische Darstellung des mikroskopischen Blickes auf eine Auswahl der unterschiedlichen Pathologievarianten. Die roten und grünen Punkte entsprechen dabei den fluoreszierenden Sonden einer FISH. Durch verschiedene äußere Einflüsse wandelt sich ein gesunder, diploider Zellkern im Laufe der Zeit durch Mutationen und Deletionen auf genetischer Ebene zu einem aberranten Kern (Modell der genetischen Alteration nach Vogelstein *et al.* [7]).

In der folgenden Übersicht (Grafik 1) wurden alle vom Normalmuster abweichenden Zellkerne zusammengefasst und der Gesamtzahl der gezählten Kerne einer Stanze gegenübergestellt. Dabei steht die Bezeichnung „Kontrolle 1“ für tonsilläre Schleimhaut von Kindern, „Kontrolle 2“ für tonsilläre Schleimhaut von Erwachsenen ohne orale Leukoplakie, „Keratosen“ für Leukoplakien ohne jegliche bekannte Dignitätsentwicklung, „D1/2“ für Dysplasien leichten bzw. mittleren Grades, „Cis“ für Carcinomata-*in-situ*, „invasive Ca“ für Karzinome mit nachgewiesener Invasivität und „blande TU-SH“ für histologisch unauffällige Schleimhaut von Patienten mit bestätigtem Tumor.



Grafik 1: Boxplot des prozentualen Anteils aller von der Norm abweichenden Zellen, d.h. Polysomien und Deletionen gemeinsam betrachtet. Schwellenwert (Cut-off) bei 0,25. Die Werte auf der Abszisse entsprechen: Kontrolle 1 = juvenile Tonsillen-Schleimhaut, Kontrolle 2 = adulte Tonsillen-Schleimhaut, Keratosen, D1/2 = leicht-/mittelgradige Dysplasien, Cis = Carcinoma in situ, invasive Ca = invasive Karzinome, blande Tumorschleimhaut; Cut-off bei 0,25. Die Ordinate gibt den Prozentrang an.

Bei den tonsillären Kontrollgeweben zeigen sich artefaktbedingt (durch Zell-Kern-Anschnitte, Fehlhybridisierungen) auffällige Zellkerne. Dem von der Kontrollgruppe 1 ermittelten prozentualen Mittelwert von 0,1028 wird, wie wissenschaftlich üblich [60], die dreifache Standardabweichung von hier 0,1462 hinzuaddiert, und der erhaltene Wert gerundet auf 0,25 als *Cut-off* zur Bewertung der einzelnen Dignitätsklassen definiert. Dabei gilt eine Probe als pathologisch positiv, wenn der Prozentsatz ihrer aberranten Zellen gleich 25% oder mehr beträgt; negativ, wenn die Probe kleiner ist.

Es fällt auf (Tabelle 1), dass in nahezu allen Dignitätskategorien - mit Ausnahme der Kategorie der blanden Tumorschleimhaut - über 90% der Stansen über dem Cut-off liegen und somit als pathologisch positiv gelten. Grafisch zeigt sich eine Progression in einem Ansteigen der Mittelwerte der Boxplots.

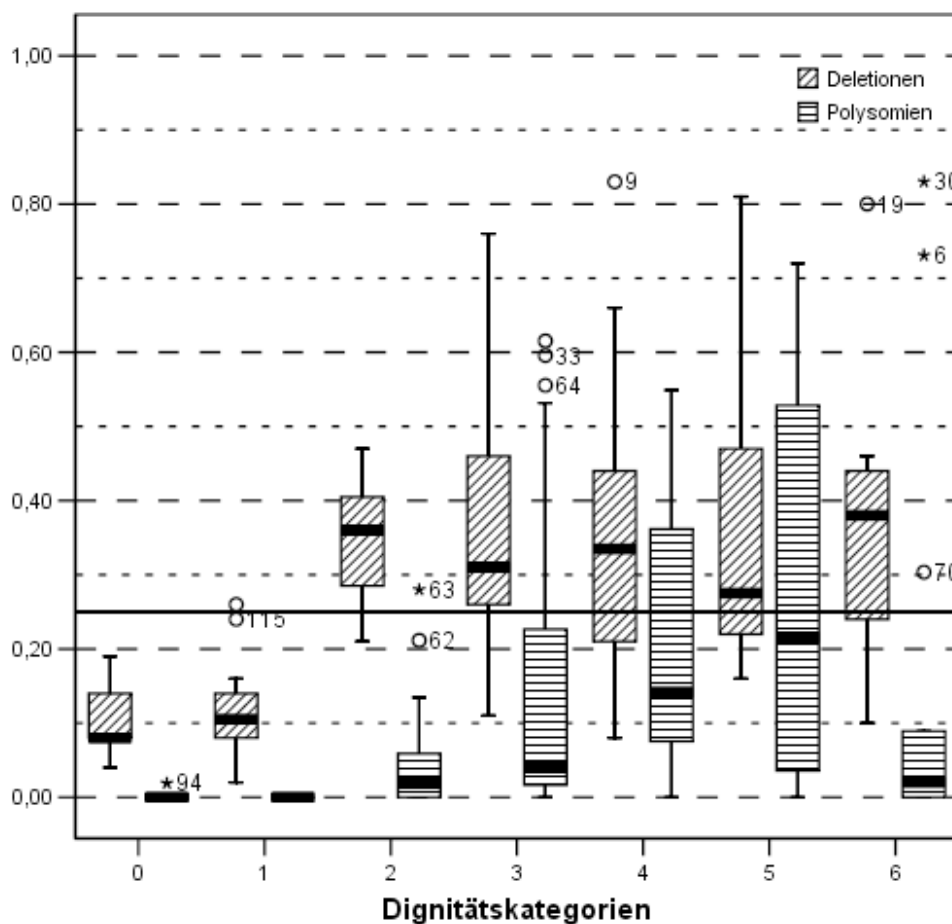
Die Signifikanzwerte (p-Werte) ergeben für die Unterscheidung von Kontrollgewebe und Keratosen $p < 0,001$.

Tabelle 1 : Anzahl bzw. Prozent der pathologisch positiven Stenzen je Entität bei einem Cut-off von 0,25 bei FHIT

	Anzahl n / n gesamt	Prozentsatz > 0,25
Kontrolle 1	0 / 18	0 %
Kontrolle 2	0 / 20	0 %
Keratosen	23 / 24	95,8 %
Dysplasien	30 / 33	90,9 %
Cis	9 / 10	90,0 %
invas. Ca	11 / 12	91,7 %
blande TU-SH	11 / 13	84,6 %

3.3.2. Vergleich Deletion und Polysomie bei FHIT

In den oben dargestellten Abbildungen ist es möglich, pathologische Zellkerne von gesunden zu unterscheiden. Jedoch erhält man keine Aussage über die Ausprägung von Deletion und Polysomie der jeweiligen Entität. Die folgende Grafik wird dieser Einteilung gerecht (Grafik 2).



Grafik 2: Gegenüberstellung von Deletion (schräg schraffiert) und Polysomie (horizontal schraffiert) der einzelnen Entitäten bei FHIT. Die Werte auf der Abszisse entsprechen: 0= Kontrolle 1, 1= Kontrolle 2, 2= Keratosen, 3= Dysplasien, 4= Cis, 5= invasive Ca, 6= blande Tumorschleimhaut; Cut-off bei 0,25. Die Ordinate gibt den Prozentrang an.

Setzt man den mithilfe der Kontrollgewebeproben ermittelten *Cut-off* wie in der Gesamtübersicht bei 0,25 an, so zeigt sich, dass bereits bei der überwiegenden Mehrheit der Keratosen Deletionen auftreten. Dieses Niveau hält sich im Verlauf der Dignitätszunahme. Polysomien nehmen in der Tendenz dagegen zu, können aber erst ab der Stufe der Dysplasien teilweise als positiv und somit statistisch signifikant gewertet werden. In der Kontrollgruppe 2 erweist sich eine Stanze als positiv in Bezug auf Deletion (Tabelle 2).

Tabelle 2 : Verteilung von Deletion und Polysomie auf die jeweiligen Entitäten bei einem Cut-off von 25% bei FHIT, absolut und in Prozent				
	Deletion		Polysomie	
Kontrolle 1	0 / 18	0%	0 / 18	0%
Kontrolle 2	1 / 20	5%	0 / 20	0%
Keratosen	22 / 24	92%	1 / 24	4%
Dysplasien	25 / 33	76%	10 / 33	30%
Cis	7 / 10	70%	4 / 10	40%
invasive Ca.	7 / 12	58%	7 / 12	58%
blande TU-SH	8 / 13	62%	3 / 13	23%

In der folgenden Tabelle zeigt sich die Deletions-Verteilung der pathologisch-positiven Stanzen für den Fall einer Anhebung des Cut-off auf 50% - wie in der Mikrosatellitenanalyse üblich. Keratosen gelten damit komplett als pathologisch blande.

Tabelle 3 : Verteilung der Deletionen auf die jeweiligen Entitäten bei einem Cut-off von 50% bei FHIT, absolut und in Prozent		
	Deletion	
Kontrolle 1	0 / 18	0%
Kontrolle 2	0 / 20	0%
Keratosen	0 / 24	0%
Dysplasien	8 / 33	24%
Cis	2 / 10	20%
invasive Ca.	2 / 12	17%
blande TU-SH	1 / 13	8%

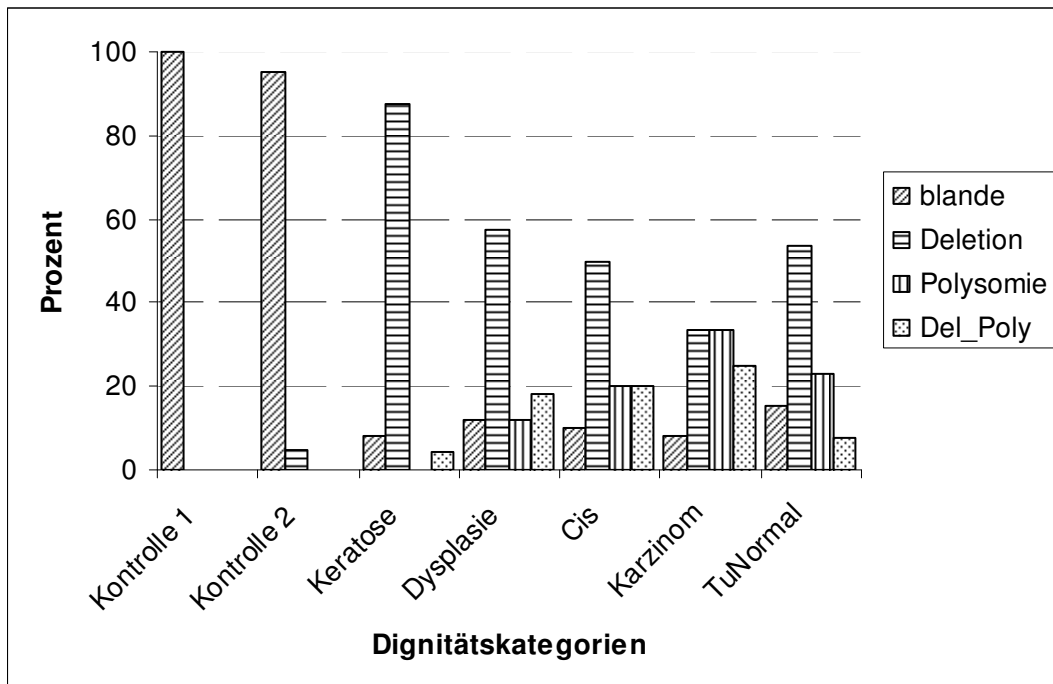
3.3.3. Einzel-Abhängigkeit von Deletion und Polysomie bei FHIT

Zur genaueren Differenzierung des pathologischen Schweregrades einer Stanze wurde untersucht, wie viele Stanzen einer Entität bei gleichzeitiger Deletion eine Polysomie besitzen, bzw. wie hoch der Anteil der Stanzen ist, die entweder nur eine Deletion oder eine Polysomie aufweisen (Tabelle 3).

Tabelle 3 : Anteil in Prozent der Stanzen pro Entität mit Einzelereignis Deletion oder Polysomie oder Deletion und Polysomie. Die Kontrollgruppe 1 hat dabei naturgemäß - als Bezugspunkt für die Ermittlung des Cut-offs - keinerlei aberrante Ereignisse aufzuweisen.

	blande	nur Deletion	nur Polysomie	Del + Poly	gesamt absolut
Kontrolle 1	100 %	0 %	0 %	0 %	18
Kontrolle 2	95 %	5 %	0 %	0 %	20
Keratosen	8,3 %	87,5 %	0 %	4,2 %	24
Dysplasien	12,1 %	57,6 %	12,1 %	18,2 %	33
Cis	10,0 %	50,0 %	20,0 %	20,0 %	10
invasive Ca.	8,3 %	33,3 %	33,3 %	25 %	12
blande TU-SH	15,4 %	53,8 %	23,1 %	7,7 %	13

Es zeigt sich, dass der Anteil der Zellkerne mit einer Deletion als singulärem Ereignis zugunsten der Kerngruppe mit variablen Deletionen und Polysomien sowie der lediglich polysomen Kerne bei gleichzeitiger Dignitätszunahme abnimmt (Grafik 3).

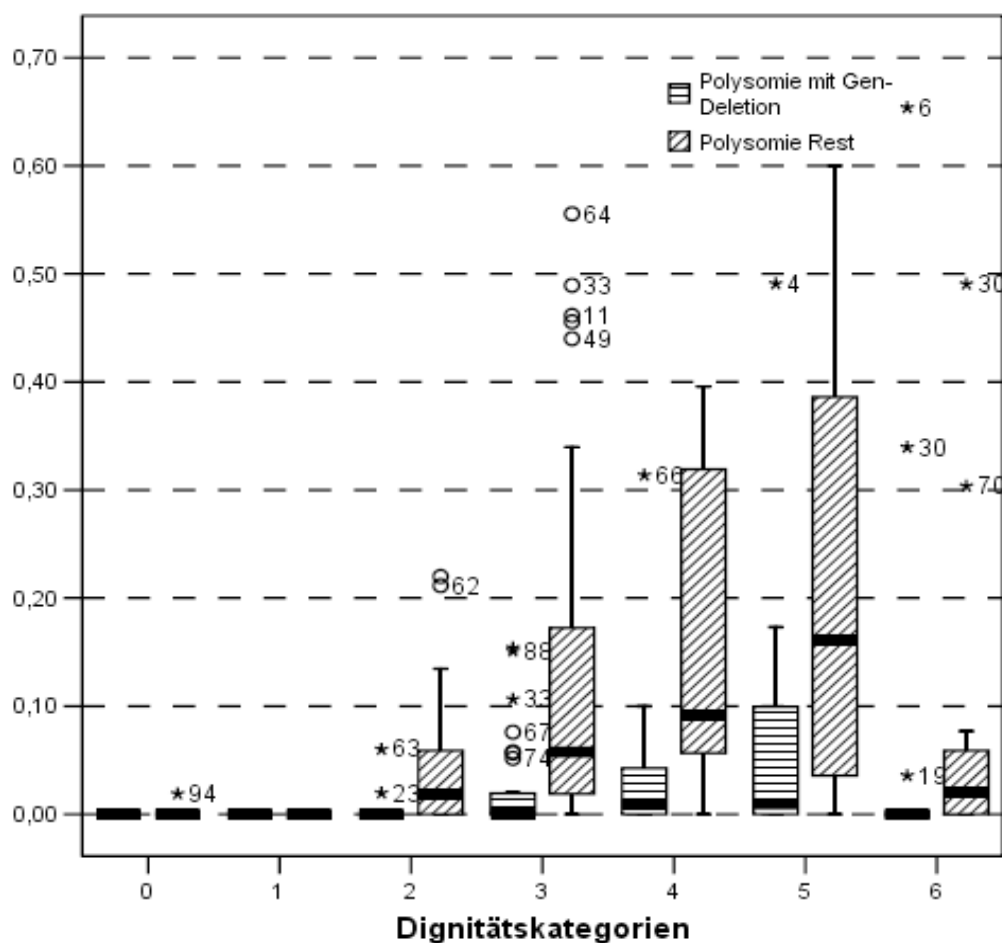


Grafik 3: Grafische Übersicht bezüglich der Aufteilung nach Deletion, Polysomie und Deletion plus Polysomie der jeweiligen Entitätsgruppen bei FHIT. Die Werte auf der Abszisse entsprechen wieder den einzelnen Entitätsgruppen, die Ordinatenwerte dem Prozentrang.

3.3.4. Polysome Subpopulation bei FHIT

Zur genaueren Differenzierung einer möglichen polysomen Subpopulation wurden die Polysomiedaten von Zellkernen mit Gendeletion in zwei Gruppen gesondert untersucht. Dabei stellte sich die Frage, welche der beiden zuerst proliferiert, und somit eventuell ausschlaggebend für die spätere Dignitätsentwicklung sein könnte (Grafik 4).

Gruppe 1 enthielt polysome Kerne mit nur einem einzigen Signal für das Gen (FHIT), unabhängig von der Anzahl der gezählten Zentromersignale. In Gruppe 2 befanden sich alle restlichen Kerne, d.h. Kerne mit mindestens zwei Gen- und mehr als drei Zentromersignalen.



Grafik 4: Aufteilung der Gruppe der Polysomien in zwei unterschiedliche Subpopulationen bei FHIT. Gruppe 1 („Polysomie mit Gendeletion“ = horizontal schraffiert) sind Polysomien mit nur einem Gensignal jedoch variablen Zentromersignalen; Gruppe 2 („Polysomie Rest“ = schräg schraffiert) sind alle Kerne, die mindestens 2 Gensignale in der Polysomie aufweisen. Die Werte auf der Abszisse entsprechen: 0= Kontrolle 1, 1= Kontrolle 2, 2= Keratosen, 3= Dysplasien, 4= Cis, 5= invasive Ca, 6= blande Tumorschleimhaut; Cut-off bei 0,25. Die Ordinate gibt den Prozentrang an.

Die Grafik beweist, dass die Gruppe mit Zellkernen, die mindestens zwei Gensignale aufweisen (schräge Schraffierung), im Gegensatz zur Vergleichsgruppe, einer eindeutigen, quantitativen Progression unterliegt, und somit als ausschlaggebendes Moment in der Entwicklung einer Malignität sowie als Ursprung eines polysomen Klons gelten darf.

3.3.5. Übersicht von Chromosomen-Index und Polysomie-Index bei FHIT

Bei der Gewebepräparation kann es zwangsläufig zum Anschneiden von Zellkernen kommen, und damit zu einem Verlust an genetischer Information. Um dieser Tatsache zu begegnen, erfolgte einerseits der Vergleich mit Normalgewebe, andererseits die Etablierung eines sogenannten Chromosomenindex (Tabelle 4). Dabei wurde die gesamte Anzahl an detektierten Signalen durch die Anzahl an gezählten Kernen geteilt. Bei gesunden Kernen sollte an dieser Stelle die Zahl 2 stehen.

Der Polysomie-Index wurde erhoben als das Verhältnis an Kernen, die drei oder mehr Chromosomenkopien enthielten, verglichen mit gesunden Kernen. Hiermit gelingt eine leichtere Vergleichsziehung zwischen den einzelnen Dignitätskategorien.

Tabelle 4: Chromosomen-Index (CI) und Polysomie-Index (PI) als Maß des pathologischen Progress; Cut-off bei 25% resp. 13%

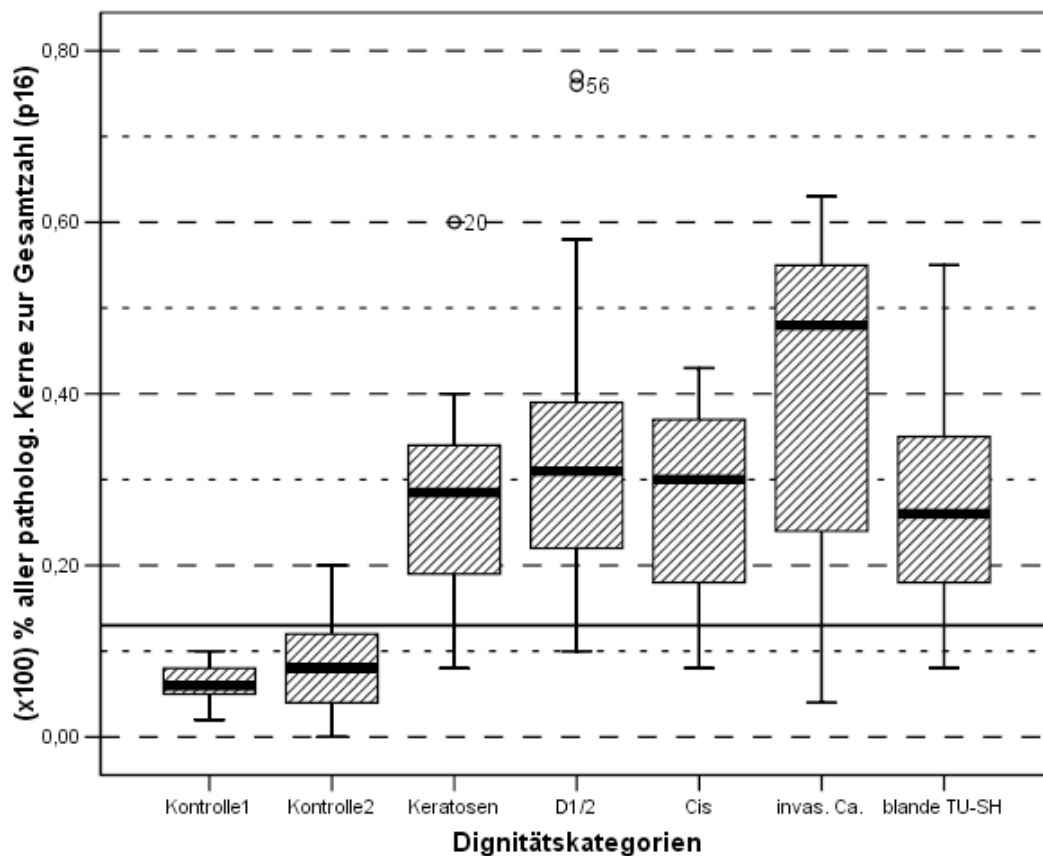
	Dignitätskategorien						
	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Keratosen	Dysplasien	Cis	Karzinome	blonde
Polysomie 3	n = 24	20	24	33	10	12	13
CI	1,92	1,91	1,82	2,0	2,18	2,27	2,05
PI	0	0	0,05	0,15	0,22	0,29	0,16
Häufigkeit Polysomie 3 in %	0	0	4	30	40	58	23
Polysomie 9	n = 24	14	24	31	8	9	13
CI	1,94	1,91	1,83	1,88	1,82	2,01	1,92
PI	0	0	0,03	0,11	0,02	0,16	0,06
Häufigkeit Polysomie 9 in %	0	0	4	13	0	33	8

Es zeigt sich vor allem bei den Polysomie-Indizes eine Zunahme der Verhältniszahlen. Auffallend ist, dass blandes Gewebe im Bereich von invasiven Karzinomen ähnliche Polysomiemuster bei 3p14 aufweist, wie es bei Dysplasien der Fall ist (0,16 zu 0,15).

3.3.6. Allgemeine Übersicht zu p16

So eindeutig die Evaluation der FHIT-Sonde ist, so abweichend sind die Ergebnisse bei der p16-Sonde. Auch hier gelten die oben geschilderten Vorgaben für Kontrollgewebe, Signalmuster - d.h. Deletion und Polysomie - und Ausschlusskriterien.

In der gezeigten Übersicht (Grafik 5) wurden alle vom Normalmuster abweichenden Zellkerne zusammengefasst und der Gesamtzahl der gezählten Kerne einer Stanze gegenübergestellt.



Grafik 5: Boxplot des prozentualen Anteils aller von der Norm abweichenden Zellen, d.h. Polysomien und Deletionen gemeinsam betrachtet, für p16. Schwellenwert (Cut-off) bei 0,13. Die Werte auf der Abszisse entsprechen: Kontrolle 1 = juvenile Tonsillen-Schleimhaut, Kontrolle 2 = adulte Tonsillen-Schleimhaut, Keratosen, D1/2 = leicht-/mittelgradige Dysplasien, Cis = Carcinoma in situ, invasive Ca = invasive Karzinome, blande Tumorschleimhaut; Cut-off bei 0,25. Die Ordinate gibt den Prozentrang an.

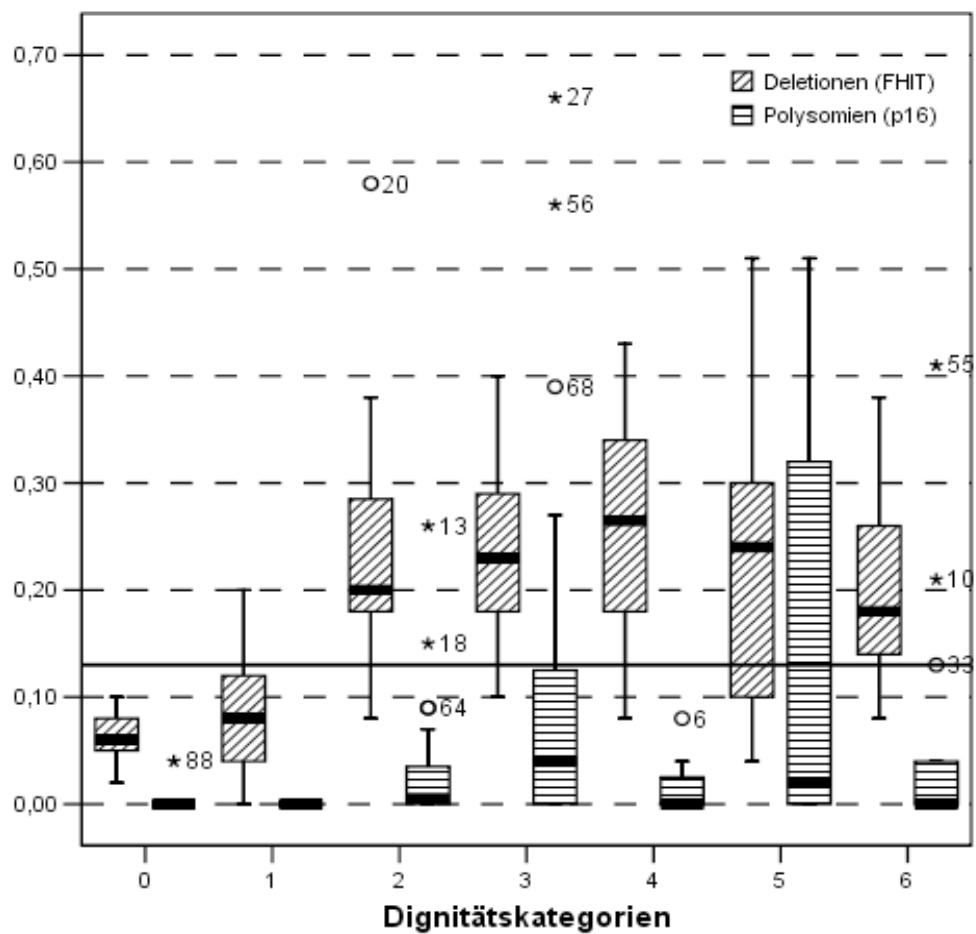
Der hier mithilfe der Kontrollgruppe 1 ermittelte *Cut-off* zur Differenzierung der positiven und negativen Stenzen (siehe oben) wurde durch die Addition der dreifachen Standardabweichung (0,0717) zum Mittelwert (0,0663) und Rundung auf 0,13 festgelegt. Es zeigt sich, dass - wie im Fall der FHIT-Sonde - zum überwiegenden Teil alle verschiedenen Leukoplakiegrade über dem Schwellenwert liegen (Tabelle 5). Auffallend ist, dass bereits 21% der in der Kontrollgruppe 2 enthaltenen Biopsate im Bereich der Deletionen positiv sind (zum Vergleich: 0% bei FHIT). Die treppenartige Steigung/Zunahme ist hingegen, bis auf einen positiven Ausschlag bei den invasiven Karzinomen, nicht ersichtlich. Somit scheint die Bedeutung der Progression von p16-Abberationen in der Progredienz von oralen Plattenepithelkarzinomen eine wohl untergeordnete Rolle zu spielen.

Tabelle 5 : Anzahl bzw. Prozent der pathologisch positiven Stansen je Entität bei einem Cut-off von 0,13 bei p16, absolut und in Prozent

	Anzahl n / n gesamt	Prozentsatz > 0,13
Kontrolle 1	0 / 16	0 %
Kontrolle 2	3 / 14	21 %
Keratosen	22 / 24	92 %
Dysplasien	29 / 31	94 %
Cis	6 / 8	75 %
invasive Karzinome	7 / 9	78 %
blande TU-SH	11 / 13	85 %

3.3.7. Vergleich Deletion und Polysomie bei p16

Nach Aufteilung aller pathologischen Zellkerne einer Entität nach Deletion und Polysomie, ergibt sich folgende Darstellung (Grafik 6).



Grafik 6: Gegenüberstellung von Deletion und Polysomie der einzelnen Entitäten bei p16. Die Werte auf der Abszisse entsprechen: 0= Kontrolle 1, 1= Kontrolle 2, 2= Keratosen, 3= Dysplasien, 4= Cis, 5= invasive Ca, 6= blande Tumorschleimhaut; Cut-off bei 0,13. Die Ordinate gibt den Prozentrang an.

Legt man auch hier den *Cut-off* bei 0,13 fest, sind nahezu alle Keratosen bezogen auf das Ereignis der Deletion als positiv zu bewerten. In den anderen Dignitätsklassen hält sich dieses Niveau. Auffallend im Vergleich zu den Ergebnissen der FHIT-Auswertung ist, dass bei den Polysomien kein eindeutig progressiver Verlauf zu erkennen ist.

Tabelle 6 : Verteilung von Deletion und Polysomie auf die jeweiligen Entitäten bei p16

	Deletion		Polysomie	
Kontrolle 1	0 / 16	0%	0 / 16	0%
Kontrolle 2	3 / 14	21%	0 / 14	0%
Keratosen	22 / 24	92%	2 / 24	8%
Dysplasien	26 / 31	84%	6 / 31	19%
Cis	6 / 8	75%	0 / 8	0%
invasive Ca.	6 / 9	67%	4 / 9	44%
blonde TU-SH	12 / 13	92%	2 / 13	15%

3.3.8. Korrelation der Auswertungsmuster von FHIT und p16

Methodisch war eine simultane Untersuchung der Proben nach dem Signalmuster von FHIT und p16 in einer Stanze - wie oben beschrieben - nicht möglich. Daher wurden beide Sondenkits in zwei voneinander unabhängigen Versuchsreihen ausgewertet. Die nun direkt - also die gleichen Stenzen betreffend - miteinander vergleichbaren Proben, fallen technisch bedingt geringer aus, als die einzelnen Kohorten in sich Fälle haben.

Es soll im Folgenden betrachtet werden, ob Stenzen (und somit Zellkerne) bei positivem oder negativem *FHIT-Muster* ein ebenso positives oder entsprechend negatives *p16-Muster* aufzeigen, und umgekehrt. Wichtig ist hier die Übereinstimmung beim Vergleich von Deletion und Polysomie. Die folgende Tabelle soll die Untersuchung verdeutlichen (Tabelle 7).

Je stärker die Entdifferenzierung des Gewebes zunimmt, desto geringer ist die Übereinstimmung bezogen auf simultane Abberationsmuster bei FHIT und p16. Somit ist auch in dieser tabellarischen Darstellung die untergeordnete Rolle von p16 nachzuweisen.

Tabelle 7: Übereinstimmungsgrade der Signalmuster zwischen FHIT und p16 bei direktem Vergleich der entsprechenden Fälle. Angegeben sind die Fälle, bei denen sich bei beiden Sondentests Werte für ein und dieselbe Stanze ergeben. Vergleich absolut und in Prozent

	Übereinstimmung FHIT / p16 absolut	Übereinstimmung in Prozent
Kontrolle 1	16 / 16	100%
Kontrolle 2	14 / 14	100%
Keratosen	15 / 19	79%
Dysplasien	15 / 30	50%
Cis	3 / 7	43%
invasive Ca.	4 / 9	44%
blande TU-SH	3 / 9	33%

3.4. Korrelationen in Bezug auf die Noxenanamnese

Im Folgenden soll gezeigt werden, inwieweit es einen Zusammenhang zwischen der Noxenanamnese und dem Grad der Dignität gibt. Von maximal 92 Patienten, deren Biopsate ausgewertet wurden, konnte aufgrund der teilweise unzureichenden Datenlage nur von 74 (80%, Nikotinabusus) bzw. 58 (63%, Alkoholabusus) eine Aussage getroffen werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Noxenstatus der maximal 92 untersuchten Patienten bezogen auf den Konsum von Nikotin und Alkohol anhand der unterschiedlichen Entitätsklassen; absolut und in Prozent; (n.b. = nicht bekannt)

		Dignitätskategorien					
	Status	Keratosen	Dysplasien	Cis	Karzinome	blande	gesamt
Nikotinabusus	ja	12	24	9	7	7	59 (64%)
	nein	7	2	0	3	3	15 (16%)
	n.b.	5	7	1	2	3	18 (20%)
	gesamt	24	33	10	12	13	92
Alkoholabusus	ja	2	15	8	6	6	37 (40%)
	nein	8	6	1	3	3	21 (23%)
	n.b.	14	12	1	3	4	34 (37%)
	gesamt	24	33	10	12	13	92

In Tabelle 9 sind drei verschiedene Gruppen gebildet, und mit den jeweiligen Dignitätsklassen verglichen worden. Durch den Mangel an Patienten mit alleinigem Alkoholabusus kann eine solche Gruppe nicht ausgewertet werden.

Tabelle 9 : Gruppenbildung über Status der Noxenassoziation; für fehlende Prozent keine Daten

	Dignitätskategorien					
	Keratosen	Dysplasien	Cis	Karzinome	blande	gesamt
Nikotin- und Alkoholabusus	2	15	8	6	6	37 (40%)
nur Nikotin- ohne Alkoholabusus	2	4	1	1	1	9 (10%)
nur Alkohol- ohne Nikotinabusus	0	0	0	0	0	0 (0%)

Aufgrund der geringen Fallzahlen im Bereich der Noxenassoziation lassen sich keine statistisch verwertbaren Ergebnisse in Bezug auf einen verschiedenen schweren Grad der Pathologie der einzelnen Dignitätskategorien finden. Lediglich Tendenzen sind abzulesen: Nikotin spielt in der Entstehen von Abberationen und der Tumorprogredienz eine stärkere Rolle als Alkohol.

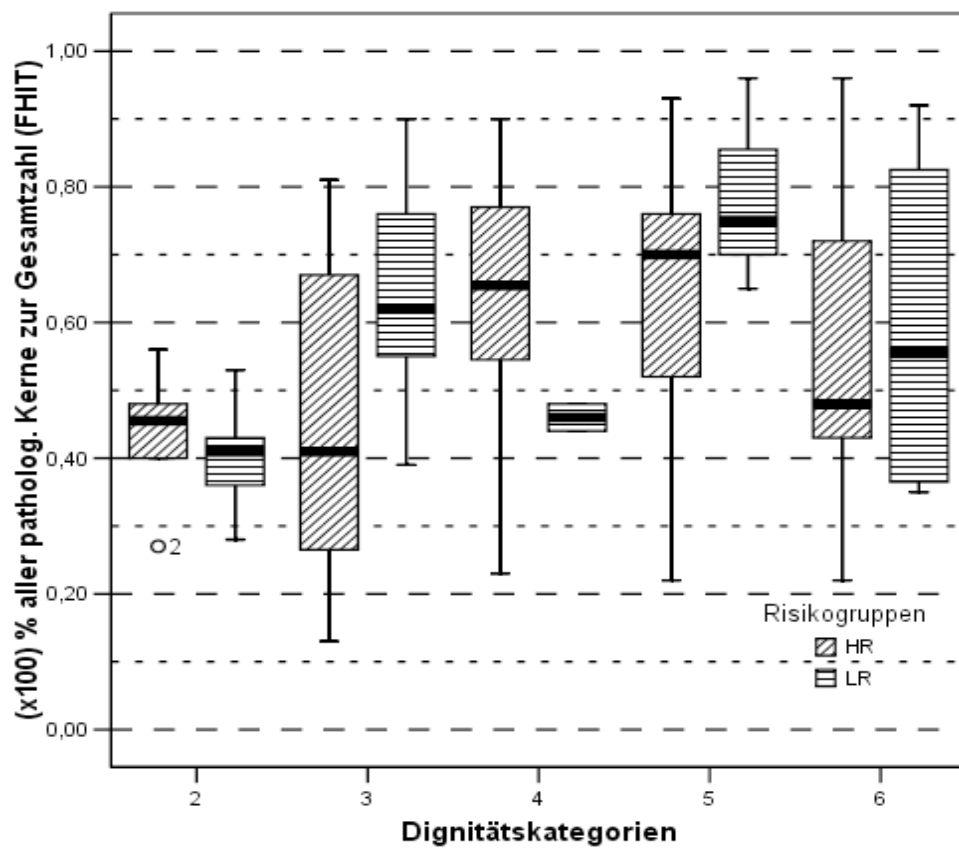
3.5. Korrelation in Bezug auf die Lage der Leukoplakie

Teilt man die untersuchten Gewebestanzten nach ihrer präbiptischen Lage in der Cavitas oris in zwei Gruppen mit „*high risk*“ (n = 55, 60%) und „*low risk*“ (n = 31, 34%; n = 8, 9%; Rest = unbekannt) - wobei „*high risk*“ für Biopsate an Mundboden oder Zunge, und „*low risk*“ für Biopsate von davon differierenden Bereichen gilt (ausführliche Erklärung für diese Einteilung siehe im Diskussionsteil) [61] - ein, ergibt sich folgende Tabelle:

Tabelle 10 : Vergleich der Gruppen „*high risk*“ (HR, n = 55) und „*low risk*“ (LR, n = 31) in Bezug auf die Anzahl der pathologischen Stanzen innerhalb der Gruppen; n.b. = nicht bekannt

	Dignitätskategorien					
Status	Keratosen	Dysplasien	Cis	Karzinome	blande	gesamt
LR	13	9	2	3	4	31
HR	6	23	8	9	9	55
n.b.	7	1	0	0	0	8
gesamt	24	33	10	12	13	92

Keratosen finden sich statistisch häufiger in „*low risk*“-, Dysplasiegrade häufiger in „*high risk*“-Bereichen. Grafik 7 stellt die Ergebnisse in einer Boxplot-Analyse dar.



Grafik 7: Aufteilung der einzelnen Entitätsklassen nach „high risk“ und „low risk“ (FHIT); Die Werte auf der Abszisse entsprechen dabei: 2= Keratosen; 3= Dysplasien; 4= Carcinoma in situ; 5= invasives Karzinom; 6= blande Tumorschleimhaut

3.6. Abbildungen zur *in-situ*-Hybridisierung

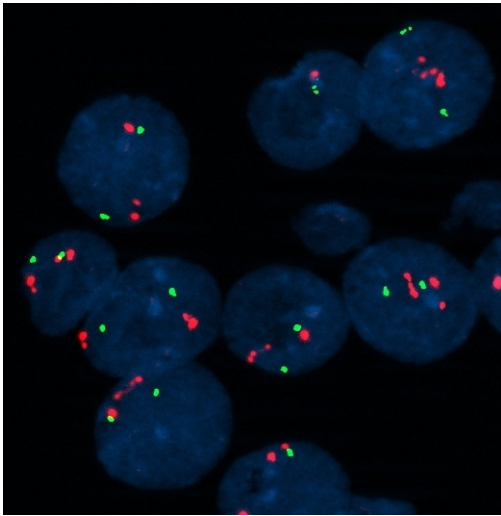


Bild 1: FISH an Keratose mit relativem Normalbefund (FHIT-Sonde)

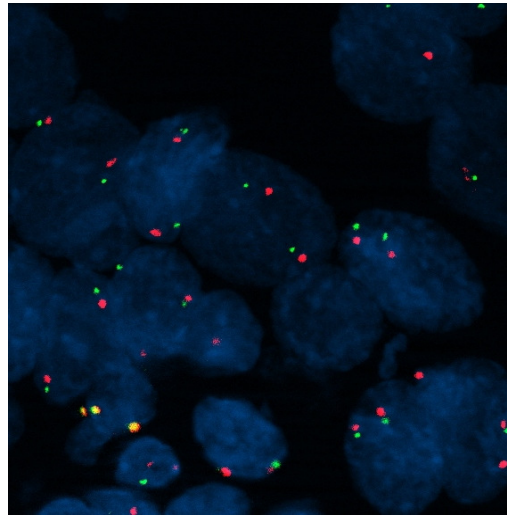


Bild 2: FISH an Keratose mit relativem Normalbefund (p16-Sonde)

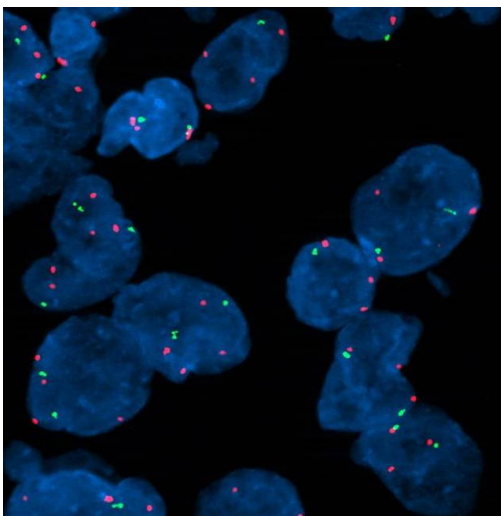


Bild 3: FISH an invasivem Karzinom mit Aberration des Genoms (FHIT-Sonde)

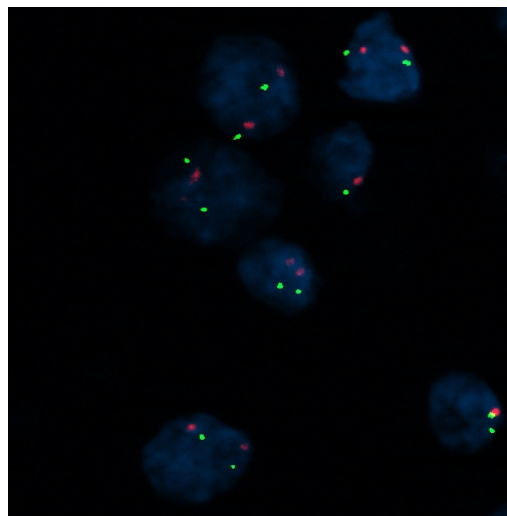
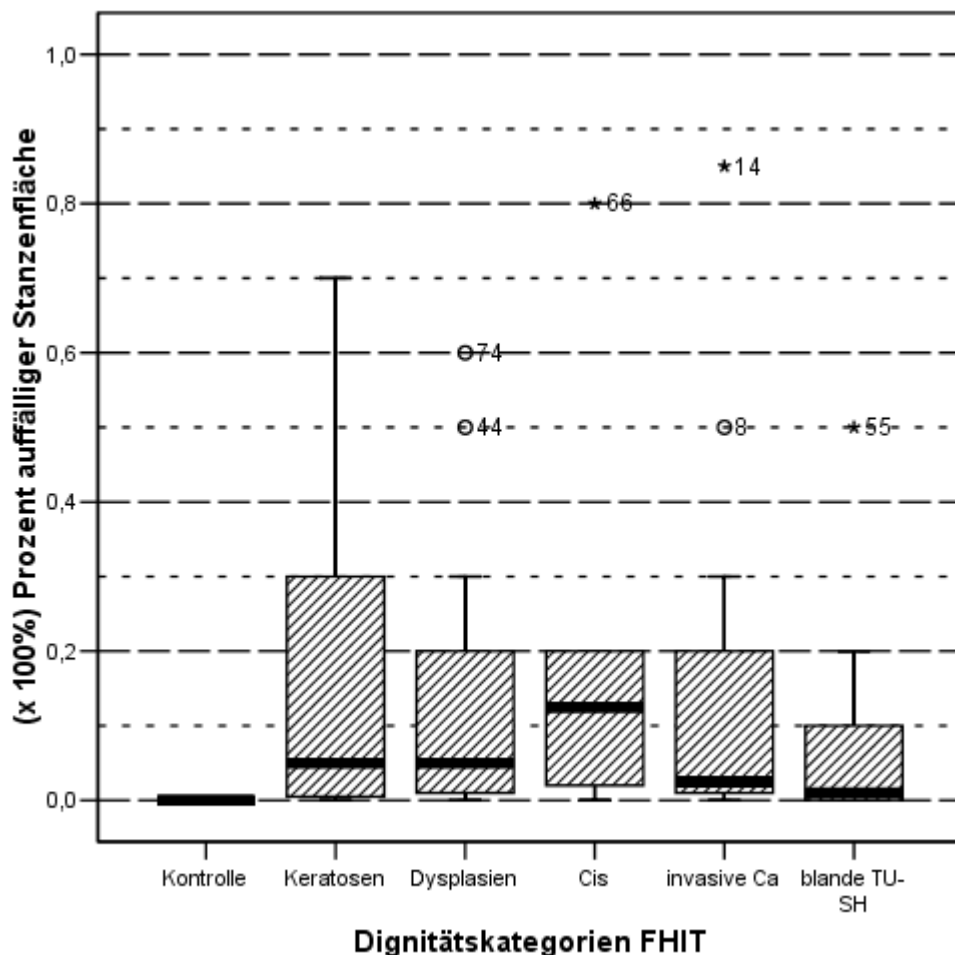


Bild 4: FISH an Keratose mit relativem Normalbefund (p16-Sonde)

3.7. Ergebnisse der Immunhistochemie für p16

Mithilfe der Immunhistochemie wurde das Expressionsmuster des Tumorsuppressorgenes p16 untersucht und der prozentuale, epitheliale Flächenanteil ermittelt, der sich durch die Färbung als positiv darstellte. Dabei wurde in 10%-Schritten vorgegangen. Als negativ und somit physiologisch galt keine mikroskopisch sichtbare Färbung.

In Grafik 8 zeigt sich, dass bezüglich der Korrelation von Färbung und Dignität keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden konnten. Alle Dignitätskategorien weisen eine relativ gleichmäßige Verteilung auf. Es lässt sich kein spezifisches Muster erkennen. Auffallend ist zumindest, dass bereits Keratosen eine Expression des p16-Proteins aufweisen. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen zur Untersuchung der p16-in-situ-Hybridisierung (siehe oben). Eine Signifikanz kann jedoch nicht abgeleitet werden.



Grafik 8: Anteil der positiven, mit p16-Expression belegten Fläche der Stenzen in der Summe; Abszisse mit Aufzählung der Dignitätsstufen (Kontrolle = juvenile Tonsillen-Schleimhaut, Cis = Carcinoma in situ, invasive Ca = invasive Karzinome, blande TU-SH = blande Tumor-Schleimhaut); Ordinate mit Prozentrang

4. Diskussion

Welche Läsion verhält sich dysplastisch progredient, welche nicht? Einen weiteren Mosaikstein hierfür zu finden, galt dem Ziel dieser Arbeit. Dazu wurde der Genstatus der beiden Tumorsuppressorgene FHIT und p16 an oralen Leukoplakiestufen mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung untersucht. Zukünftig soll diese Technik als Routinediagnostikum bei präkanzerösen Läsionen (Risikopatienten) etabliert werden. Zudem war begleitend eine mögliche, korrelierende Expression von p16 in der Immunhistochemie von Interesse. Dabei kam in Paraffin konserviertes Material (FFPE = *formalin fixed paraffin embedded*) zum Einsatz. Die Antigenität war somit nicht beeinträchtigt, und konnte stellvertretend für natives Gewebe stehen [62].

4.1. Auswahl der Tumorsuppressorgene FHIT und p16

Laut aktuellem, wissenschaftlichem Konsens ist die Kanzerogenese von Kopf-Hals-Tumoren von der blanden Schleimhaut über Vorläuferstadien (Dysplasiestufen) hin zum Plattenepithelkarzinom charakterisiert durch eine Akkumulation von genetischen Veränderungen [52]. Ein dem zugrunde liegendes Modell wurde erstmals 1990 von Fearon und Vogelstein am Beispiel des kolorektalen Karzinoms diskutiert [7]. Dabei wird auf die zentrale Bedeutung von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen resp. Proto-Onkogenen hingewiesen [63-65].

Proto-Onkogene stellen positive Regulatoren wichtiger Zellprozesse, wie der Proliferation und der Zelldifferenzierung dar. Eine Mutation bewirkt daher den Verlust der Kontrolle über diese Fähigkeiten, und es wird für gewöhnlich die Apoptose eingeleitet. Im Fall der Karzinogenese wandelt sich durch maligne Transformation das Proto-Onkogen jedoch zum Onkogen („Tumorpromotor-Gen“). Dies kann nun eine unkontrollierte Synthese von Proteinen und die Vermehrung der Zelle bewirken. Es kommt im Laufe der Zeit zur Aufsummierung von weiteren Veränderungen. Die derzeit gängige Einschätzung ist, dass zwischen sieben und zehn Ereignisse auf genetischer Ebene ursächlich für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms sind [66].

Tumorsuppressorgene wirken dagegen Zellzyklus-hemmend, und leiten ihrerseits bei irreversiblen Schaden in der Proliferation der Zelle die Apoptose ein. Sollen Tumorsuppressorgene ursächlich für die Entwicklung einer Neoplasie sein, muss entweder eine Mutation in eine funktionslose Kopie, oder ein Verlust vorliegen. Die Folge ist die so genannte „*loss of heterozygosity*“ (engl. für „Verlust der Heterozygotie“), oder auch LOH [65]. Es kommt also zur Deletion eines Allels. Mithilfe der Analyse solcher LOHs wurden bis heute zahlreiche Tumorsuppressorgene, wie Rb, MEN1, APC, NFI, NFII und BRCA2, entdeckt [67,68].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gen-Loki sind nach neuesten Erkenntnissen assoziiert mit der Entstehung von oralen Plattenepithelkarzinomen. Eine Aberration der Chromosomenarme 3p und 9p geht mit einem erhöhten Risiko der malignen Entartung einher [65]. Hier finden sich die beiden Tumorsuppressorgene FHIT (3p14) resp. p16 (9p21). Nach Rosin *et al.* ist das Risiko zur Entwicklung eines invasiven Karzinoms bei einer auf 3p und/oder 9p beschränkten Pathologie um das 3,8-fache erhöht. Kommt es zu einem zusätzlichen Verlust eines weiteren TSG (4q, 8p, 11q, 13q, 17p), erhöht sich das Risiko bereits auf das 33-fache. Diese Einschätzung hat zu der Hypothese der genetischen Progression von Lippman und Hong geführt, bei dem der Verlust der Tumorsuppressorgene FHIT und p16 zu den frühestmöglichen Ereignissen zählt, und als kritischer Schritt für den Beginn der Kanzerogenese oraler Plattenepithelkarzinome gelten kann [69].

4.1.1. FHIT-Gen / -Protein

FHIT (für *fragile histidine triade*; bestehend aus 147 Aminosäuren) gilt als *Protein*, welches die Apoptose über apoptotische Signaltransduktion auf dem weitläufigen Feld der Tumornekrosefaktor-Superfamilie induziert und reguliert [70,71]. Spezifisch werden DR-Gene (= *death receptor*, engl. für Todesrezeptoren) besetzt und gesteuert. Das dazugehörige *Gen* ist dabei anfällig für umweltbedingte Kanzerogene, und häufig in Allel-Verlust, genomische Re-Kombination und zytogenetische Abnormalitäten bei humanen Tumoren involviert [72]. Als bisher eingehend untersuchte Entität in Bezug auf Aberrationen bei FHIT gilt hierbei das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom mit seiner Assoziation zum Nikotinkonsum. Hier zeigt sich, dass der Verlust des Chromosomenarms 3p das häufigste und zudem erste Ereignis darstellt [73].

Durch exogene Stimulation einer FHIT-Exprimierung konnten nicht nur die DR-Gene hoch reguliert, sondern auch die Apoptose induziert werden [70]. Zudem wird vermutet, dass FHIT durch hemmenden Einfluss auf Inhibitoren, eine Stabilisierung des p53-Proteins im Zellzyklus bewirkt. Dieses wiederum gilt als wichtigster Wächter gegenüber unkontrolliertem Wachstum, und ist regelmäßig bei Tumoren mutiert [74].

Unterschiedlichste Alterationen bzw. der Verlust der Expression von FHIT finden sich beispielsweise auch bei Untersuchungen von Analkarzinomen oder normaler bzw. hyperplastischer Endometriumsschleimhaut [75,76].

4.1.2. p16-Gen / -Protein

Das Tumorsuppressorgen auf 9p21 kodiert für das Protein p16. Dieses ist Teil einer Phosphorylierungskaskade im Zellzyklus, und fungiert als Zyklin-abhängiger-Kinasen-Inhibitor. Das Zyklin D1 und die zyklin-abhängige Kinase 4 (CDK 4) bilden einen Komplex, der die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) im Bereich des G1-S-Phase-Kontrollpunktes steuert [56]. p16 hemmt diese Funktion [77]. Die Phosphorylierung von Rb führt zu einer Dissoziation des Rb-E2F-Komplexes, welches wiederum die Weiterleitung der Zelle in die S-Phase bewirkt. Die Freisetzung von E2F aktiviert aber die p16-Transkription

[78]. Daraus resultiert, dass die Phosphorylierung von Rb in einer Aktivierung von p16, eine Hypophosphorylierung von Rb in einer Hemmung von p16 mündet. Findet nun durch eine Mutation ein Verlust der steuernden Funktion des Tumorsuppressorgens p16 statt, kommt es zu einem unkontrollierten Eintreten der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus und somit zu einer ungerichteten Proliferation [79].

4.1.3. Bezug der Tumorsuppressorgene FHIT und p16 auf die Genese von Oropharynxkarzinomen – Deletion und Polysomie

Califano *et al.* stellten als erste ein Modell der genetischen Progression bei Kopf-Hals-Tumoren auf [52]. Demnach sind Verluste bei 9p (hier also der Kontrollverlust von p16 gegenüber seiner Cyclin-abhängigen-Kinase CDK im Zellzyklus) die frühesten Ereignisse, die mit der Wandelung von normaler Schleimhaut zur einfachen Keratose einhergehen. Verluste bei 3p (FHIT) und 17p zeigten sich überwiegend bei leicht- und mittelgradigen Dysplasien, wohingegen Deletionen bei 4q, 6p, 8p, 11q, 13q und 14q eher bei Carcinomata-*in-situ* und Plattenepithelkarzinomen vorkamen.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen jedoch die Deletion von 3p14 bereits bei 92% (22/24) aller *Keratosen* – also der morphologischen Veränderung, die als erste histologisch differenziert werden kann. Durch den Einsatz der FISH als Detektionsmethode gelingt dabei die Festsetzung eines deutlich niedrigeren Schwellenwertes (FHIT = 0,25), als es mit Mikrosatellitenanalysen (0,50 und mehr) möglich ist. Um die ermittelten Daten mit der gängigen Methode der Mikrosatellitenanalyse zu vergleichen, erfolgte eine Auswertung mit einem angepassten Schwellenwert von 50% (siehe Tabelle 3). Hiermit wird zwar bestätigt, dass Deletionen bei Dysplasien auftreten (24%, 8/33). Eine Sensitivität für Keratosen ist aber nicht gegeben: Keine einzige Keratose kann als positiv gewertet werden (0/24). Die Deletion des FHIT-Gens ist somit ein viel früheres Ereignis, als in der Literatur bisher beschrieben [52].

Im Laufe des histopathologischen Progresses kommt es zu einer Potenzierung dieser Veränderungen. Einerseits nimmt der absolute Anteil von FHIT-Gen-*Deletionen* im Verhältnis ab, doch zeigt sich eine Zunahme an FHIT-Gen-*Polysomien*. Das heißt also, polysome, proliferierende Subpopulationen gewinnen zunehmend an Bedeutung. Der entscheidende Schritt von der Keratose zur Dysplasie sollte somit als quantitative Verschiebung durch die Proliferation eines Subklones betrachtet werden [80,81]. Diese Einschätzung ist erstmals auf Basis der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung möglich, da hier zwischen Deletion und Polysomie klar unterschieden werden kann. Steigende Polysomie-Indizes belegen dies: 0,05 für Keratosen, 0,15 für Dysplasien, 0,22 für Carcinomata-*in-situ* und 0,29 für invasive Karzinome.

Ähnliche Daten zeigen sich für Vorläuferläsionen von Blasentumoren [82].

Diese Erkenntnisse unterstreichen die Rolle von FHIT als Zellzyklus-steuerndes Moment im Rahmen der Aktivierung, und im Sinne einer hyperplastischen/dysplastischen Veränderung [52].

Eine frühzeitige Deletion von 9p21 (p16), wie sie vorbeschrieben ist [52,53], lässt sich mit den Daten der hier vorliegenden Analyse bestätigen. Es findet sich bereits bei der Transformation von Schleimhaut zu unspezifischen Keratosen eine signifikante Veränderung, die 92% (22/24) der Läsionen betrifft.

Das Polysomienmuster bei Dysplasien betreffend, können ebenso vergleichende Schlüsse gezogen werden. In der Literatur werden weniger als 10% der Zellen als polysome Subklone angegeben [83]. In dieser Studie liegen diese bei 11%. Eine klar erkennbare Zunahme, wie bei den Ergebnissen der FHIT-Auswertung, ist jedoch nicht zu sehen. In der Literatur gibt es hierfür bisher keine Daten [52,54].

Die Evaluation der immunhistochemischen Expression von p16 weist in dieser Arbeit keine wesentlichen Unterschiede zu bisher bekannten Ergebnissen in der Literatur auf (Grafik 8). Es zeigen sich positive Muster bereits ab dem Stadium der Keratose. In Hinblick auf die pathologische Progression kommt es zu einer Abnahme: Die Ausprägung bei Keratosen scheint tendenziell stärker zu sein, als bei Karzinomen (unter Berücksichtigung der jeweiligen Fallzahlen). In der Literatur zeigen sich passend zu diesen Ergebnissen kontroverse Erkenntnisse: zum einen gibt es Hinweise auf eine starke Korrelation von p16 zur Zunahme der Dignität [84]. Andere Quellen bestätigen die Daten dieser Arbeit: ein Zusammenhang zwischen p16-Expression und Dignität lässt sich nicht herstellen [85]. Bradley et al. untersuchten die Expressierung von p16 in oralen prä-malignen Läsionen. Die hier gefundenen Ergebnisse zeigten Verluste der p16-Expressierung von 36% bei Keratosen, 39% bei leichtgradigen Dysplasien, 66% bei mittel-/schwergradigen Dysplasien. Die Autoren vermeiden einen direkten Zusammenhang herzustellen, da man nach neuen Erkenntnissen eine Infektion mit humanen Papilloma-Viren (HPV) - insbesondere der Hochrisikogruppen 16 und 18 - mit in Betracht ziehen sollte [85]. Bei unterschiedlichen Infektionsmustern, und somit unterschiedlicher viraler Beeinflussung, muss somit eine mögliche unterschiedliche Expressierung von p16 berücksichtigt werden [86,87]. Dabei soll es durch das HPV-Onkoprotein E7 zu einer Interaktion und proteolytischen Dedifferenzierung des Retinoblastoma-Proteins pRb kommen, welches wiederum zu einer vermehrten Expressierung von p16 führt [88,89].

Normalgewebe dieser Arbeit wies, wie in diversen publizierten Untersuchungen, keine p16-Expressierung auf [90]. Dies erklärt sich bedingt dadurch, dass Gewebe von Kindern mit einem maximalen Alter von sechs Jahren untersucht wurde. Hier sind keine Infektionen mit HPV-Viren der Hochrisikogruppen bei normalerweise oro-genitalem Infektionsweg zu erwarten.

Ein interessanter Aspekt ergibt sich in der Betrachtung von blander Schleimhaut, welche sich in Lagebeziehung zu Tumorgewebe befindet. Das mikroskopische Bild ist unauffällig, doch zeigt der Polysomie-Index ähnliche genomische Veränderung, wie sie bei Dysplasien zu finden sind. Dieser lag bei 0,16 (Dysplasien 0,15). Demnach scheint solches Gewebe bereits den Weg der malignen Transformation eingeschlagen zu haben.

Stoehr et al. haben am Beispiel von Harnblasen-Karzinomen das Modell der Migrationstheorie etabliert [91]. Dabei wird davon ausgegangen, dass nicht, wie bei der Theorie der Feldkanzerisierung, durch Noxeneinwirkung bedingte Veränderungen an unterschiedlichen Stellen entstehen [92]. Durch PCR-Untersuchungen des p53-Gens konnte gezeigt werden, dass in den entsprechenden Sequenzen sich exakt gleichende Klone transversal-horizontal im Gewebe migrieren. Bekannt ist, dass p53 an unterschiedlichen Stellen anfällig ist für karzinogen-induzierte Transformationen. Für Harnblasen-Karzinome sind solche Stellen trotz genauester Untersuchungen jedoch bisher nicht beschrieben [93]. Daher dient dieses Zellzyklus-steuernde Gen besonders gut zur Detektion von Klonen. Tabor et al. [94] haben ähnliche Veränderungen für Kopf-Hals-Tumoren beschrieben.

4.2. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und TMA-Technik

Bei den derzeit gängigen Methoden werden für die Detektierung von genetischen Zugewinnen oder Verlusten (LOH) die komparative genomische Hybridisierung oder die Mikrosatellitenanalyse angewandt. Bei Ungleichgewichten auf chromosomaler Ebene kommt die Durchflusszytometrie oder chromogene resp. fluoreszente *in-situ* Hybridisierung zum Einsatz. Studien, die sich der LOH-Detektion bedienen, sind primär quantitativer Natur und benötigen DNA-Extrakte, bei denen mindestens 50% der Zellen positiv für eine Veränderung sind; zum Teil mehr als 80% [52]. (vgl. Schwellenwert bei FISH von 13 – 25%)

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ist hingegen eine Technik, bei der ohne einschneidende Affektion der Zell- und Gewebestruktur eine Visualisierung chromosomaler Veränderungen möglich ist. Sie ist in der zytologischen Forschung und Diagnostik weithin angewandt und evaluiert. Diverse Arbeiten zur Pathogenese von Tumoren beziehen sich auf diese Methodik [95-97]. Im Besonderen ist die Detektion von Subklonen möglich. Es lassen sich jedoch bisher nur wenige Daten über den Einsatz bei Vorläuferstufen oraler Plattenepithelkarzinome finden [63,98].

Die beiden Sondenkits der Firma Zytovision GmbH/ Bremerhaven enthielten je eine Gen- und eine Zentromersonde, hybridisierend für die Gensequenz des entsprechenden Tumorsuppressorgens (FHIT resp. p16) sowie für das Zentromer der Chromosomen 3 resp. 9. Diese Aufteilung ermöglicht bereits genannte Unterscheidung zwischen Deletion und Polysomie.

Technisch gelang eine synchrone Anwendung der beiden Sondenkits in einem Versuchsansatz nicht, da in beiden Fällen die Zentromersonde mit der Farbe „Rot“ und die Gensonde mit der Farbe „Grün“ besetzt waren. Zu Beginn der Arbeit wurde noch der Einsatz einer 4-Farben-FISH diskutiert. Dieser ließ sich jedoch aufgrund von Problemen beim Labeln mit dem farbgebenden Fluoreszenz nicht weiter verfolgen.

Ein 4-Farben-Kit wäre in Bezug auf die mikroskopische Auswertung von Vorteil, da eine spezifischere Aussage über jede einzelne Stanze getroffen werden könnte. Nicht nur die Artefakterkennung, sondern auch die Beurteilung durch den Pathologen wäre objektiver. Im Vergleich zwischen dem Genstatus von FHIT und p16 handelt es sich somit um indirekte Assoziationen (siehe oben). Die jeweilige Stanze konnte zwar für 3p14 resp. 9p21 evaluiert, nicht aber jeder einzelne Zellkern für beide Sonden gleichzeitig betrachtet werden.

Andererseits kann mit steigender Anzahl der spezifischen Sonden pro FISH-Kit die Fehlerquote zunehmen, und folglich die Nicht-Verwertbarkeit der einzelnen Ergebnisse. Es kommt zu einer Summation der Artefakt-Häufigkeiten bei den Signalen.

Die Hybridisierung mit dem FHIT-Kit zeigte eine bessere optische Darstellung als für p16. Die Signale imponierten bei Zentromer und Gen deutlicher, und waren von längerer Dauer. Ursächlich hierfür könnte die Qualität der Sonden sein (größere Stabilität in der molekularen Bindung, längere Halbwertszeit), da beide Färbungen mit ein und demselben Versuchsprotokoll durchgeführt wurden. Zudem kann eine unterschiedliche Signalintensität auf eventuelle Irritationen während der Einbettung mit Paraffin zurückzuführen sein [99]. Zukünftige Untersuchungen sollten dies bei der Wahl der Sonden berücksichtigen [100,101].

Eine weitere Schwierigkeit stellte die Tatsache dar, dass Stenzen teilweise durch die massive Ansammlung von schlecht denaturiertem Material (Pepsin-Denaturierung der Zellstrukturen) im Auswertungsfokus nicht beurteilt werden konnten. Für zukünftige Untersuchungen müßte hierzu entweder das Versuchsprotokoll modifiziert werden, mit Anpassung beispielsweise der Proteinase-Einwirkdauer. (Dies birgt jedoch die Gefahr, dass der optimale Verdau des Zellkernes und somit die Hybridisierungsfähigkeit des genetischen Materials u. U. beeinträchtigt wäre). Oder aber die Fixierung und Einbettung des Gewebes erlaubt weitere Änderungen. Fraglich ist, ob das Alter der Gewebeblöcke eine Rolle spielt (Gewebeblöcke waren bis zu 10 Jahre alt).

Die Versuchsreihe wurde an Tissue-Multi-Arrays (TMA) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es, in einem einzigen Versuchsablauf 60 und mehr verschiedene Gewebeproben zu präparieren. Von großem Vorteil ist hier die hohe intraexperimentelle Vergleichbarkeit aufgrund gleicher Versuchsbedingungen [102].

Die anfänglich aufwendige Herstellung der Blöcke durch genaue mikroskopische Auswahl, Markierung und Stanzung wird einerseits durch eine schnellere Versuchsdurchführung (Hybridisierung), andererseits durch eine schnellere mikroskopische Auswertung relativiert.

Zudem lassen sich die Versuchskosten durch einen gezielteren und wesentlich sparsameren Einsatz der Chemikalien und Sonden auf ein Minimum reduzieren.

Nachteilig wirkt sich die Endgültigkeit der Stanzung des Präparates aus: Beinhaltet das gestanzte Gewebe die gewünschten Bereiche nicht, ist eine Ausweitung der Betrachtung auf ursprünglich benachbarte Areale im selben Versuchsablauf nicht mehr möglich.

Entscheidend hierbei ist aber, ob die gewonnenen Stanzen repräsentativ für den gesamten pathologischen Ausgangsbefund (entsprechend dem Gewebeblock) sind. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Stanzen aus heterogenen Tumoren signifikant repräsentativ für die Ursprungsläsion sind [103,104]. In diesen Studien wurden Tissue-*Micro*-Arrays (vgl. zu oben: Tissue-*Multi*-Arrays) verwendet. Der Unterschied zur in dieser Arbeit verwendeten Technik ist der Innendurchmesser der Stanzen. Dieser ist kleiner und somit der Logik entsprechend anfälliger für falsch negative Ergebnisse. Wenn aber bereits in diesen Fällen Repräsentativität gegeben ist, dann unabdingbar auch für die hier eingesetzte Stanzmethode. Die verwendeten Leukoplakien waren in ihrem Gewebeausmaß jedoch ohnehin sehr klein, sodass der Vergleich vernachlässigbar erscheint.

Im Gegensatz zur Technik der PCR-Analyse kann eine direkte *in-situ*-Untersuchung vorgenommen werden: die Gewebearchitektur wird belassen und nicht im Reagenzglas durch Aufreinigung zerstört.

4.3. Korrelation in Bezug auf Proliferationstendenz, Noxen-anamnese und Lage

Vorweg muss generell angemerkt werden, dass sich die individuelle, patientenspezifische Datenerhebung als schwierig darstellte. Im Besonderen bei der Frage nach dem Alkoholabusus ließen sich nur in 73% aller Fälle Aufzeichnungen rekonstruieren. Dies ist deswegen problematisch, als dass die Fallzahlen in den einzelnen Vergleichsgruppen teilweise sehr niedrig sind. Immerhin ergibt sich aber eine Tendenz, die die bisherigen Aussagen in der Literatur bestätigt [2,26,27]: Vor allem bei Dysplasien scheint ein starker Bezug zur Nikotinanamnese gegeben. 73% sind positiv, und nur 6% negativ. In der Gruppe der Keratosen ist die Beurteilung dagegen etwas indifferenter. Hier liegt das Verhältnis bei 50% zu 29%. Es lässt sich also schlussfolgern, dass einerseits die Ursache einer oralen Leukoplakie nicht zwingend durch die Noxenanamnese determiniert wird. Eine erworbene Läsion kann aber offensichtlich in ihrer pathologischen Progredienz begünstigt sein. Dennoch ist es fragwürdig, ob eine Unterteilung nach der Noxenanamnese derzeit sinnvoll ist. Verwertbare, zuverlässige Informationen über die Qualität und Quantität des Konsums karzinogener Noxen ist in den meisten Fällen nicht ermittelbar [44]. Zudem sind, wie oben beschrieben, zahlreiche Parameter aufgrund des aktuellen Wissenstandes in ihrer Wertigkeit nicht sicher einzuschätzen (z.B. virale Faktoren, Lebens- und Ernährungsgewohnheiten) [105]. Gleichwohl sollte die Einhaltung einer gesunden Lebensweise Grundprinzip einer jeden Therapie sein.

Als Differenzierungsmerkmal für eine mögliche Progredienz oraler Leukoplakien hat sich auch die jeweilige Lagebeziehung in der Cavitas oris erwiesen [42,106]. Dabei wird unterschieden, ob sich eine Läsion am Mundboden, der ventralen respektive lateralen Zungenoberfläche und am weichen Gaumen, oder in der restlichen Mundschleimhaut befindet. Kramer *et al.* haben aufgezeigt, dass Läsionen im Bereich des Mundbodens und der ventralen Oberfläche der Zunge (HR-Gruppe für „*high risk*“) ein höheres malignes Potential besitzen, als Leukoplakien in anderen Regionen der oralen Mukosa (LR-Gruppe für „*low risk*“) [107]. In dieser Untersuchung entwickelten 24% von 29 Patienten der HR-Gruppe, in einem Zeitraum von 1 bis 19 Jahren, ein Karzinom. Argumentiert wird dabei, dass, je nach Gruppe, eine unterschiedliche Einwirkung der im Speichel gelösten Noxen (hier: Nikotin und Alkohol) vorherrscht [108]. Ebenso soll eine erhöhte Permeabilität [109] bei verminderter Epitheldicke [110] in diesem Bereich der Mundschleimhaut ursächlich sein. Folglich zeige sich ein unterschiedlicher Genstatus. Diese Aussage wird durch eine Studie von Zhang *et al.* unterstützt, die in Ihrer Arbeit postulierten, dass leicht- und mittelgradige epitheliale Dysplasien der HR-Gruppe eine höhere LOH-Frequenz und zusätzlich eine größere Assoziation zur malignen Progression besaßen, als Gewebe der LR-Gruppe [106]. Des Weiteren zeigen ältere Studien, dass der Großteil der oralen Plattenepithelkarzinome „*high-risk*“-Bereichen entstammt [61,111].

Da für eine signifikante Aussage die Fallzahlen in den einzelnen Gruppen dieser Arbeit zu gering ausfallen, lässt sich hierfür nur eine Tendenz beobachten: Zum einen sind lediglich 25% der Keratosen, zum anderen 70% der leichten bis mittelgradigen Dysplasien und 80% der Carcinomata-*in-situ* mit der HR-Kategorie assoziiert. Es lässt sich also bestätigen, dass die Lage einer leukoplakischen Läsion Einfluss auf das Risiko einer malignen Transformation hat.

Auch die Dauer der Einwirkung einer Noxe auf die Mundschleimhaut kann ein wichtiges Einflusskriterium sein.

Rosin *et al.* untersuchten orale Leukoplakien, indem sie Vergleiche zwischen progressiven und nicht-progressiven Läsionen anstellten. Sie fanden heraus, dass der Verlust der Heterozygotie (LOH) an den Genloki 3p und 9p eine unterschiedliche, den klinischen Verlauf betreffende Determinierung zur Folge hat [53]. Nahezu alle *progressiven* Läsionen waren positiv in Bezug auf dieses Genmuster (Hyperplasien 100%, Dysplasien 96%). Bei den *nichtprogressiven* Läsionen waren es lediglich 17% bzw. 56%.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse stellen jedoch eine solche Klassifizierung bzw. Einteilung in Frage, da nahezu *alle* Keratosen positive Expressionsmuster aufweisen; und das unter Berücksichtigung der epidemiologischen Verteilung, d.h. nicht-progressive Läsionen bezeichnen die überwiegende Mehrzahl [13,17-19].

4.4. Verwendung der FISH zur Screening-Schnelldiagnostik bei Risikopatienten – ein Ausblick

Die epitheliale Dysplasie wird als wichtiger Prognoseparameter in der Entwicklung einer prämaligen Läsion zum invasiven Karzinom angesehen. Diese Annahme basiert neben oben genannten Ergebnissen auf prospektiven Untersuchungen von Richart *et al.* [112] zur Karzinogenese. Orale Leukoplakien mit Dysplasien entwickeln sich häufiger zu invasiven Karzinomen, als solche ohne [19,20,40,107,113]. Nicht jede Läsion wandelt sich jedoch zwangsläufig zu einem Karzinom, und nicht wenige zeigen in ihrem Verlauf gar regrediente Bestrebungen [20,49,50,114]; besonders, wenn ätiologische Faktoren unterbunden werden [13].

Bei hochgradigen Dysplasien und Carcinomata-*in-situ* sind die derzeitigen histologischen Kriterien bei der Einschätzung des malignen Potentials aussagekräftig genug: Diese Läsionen haben zweifelsohne eine starke Entartungstendenz.

Probleme bereitet jedoch immer noch die Beurteilung von Leukoplakien *ohne* oder mit geringgradiger Dysplasie. Diese repräsentieren den weitaus größten Teil [53].

Die Herausforderung ist also die Entwicklung eines zuverlässigen diagnostischen Werkzeuges, um eine progrediente von einer nicht-progredienten Läsion unterscheiden zu können. Vor allem aber muss selbiges eine frühzeitige Anwendung mit frühzeitiger prognostischer Aussage erlauben, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen: Bereits einfache Keratosen der Mundschleimhaut ohne dysplastische Veränderungen zeigen zu über 90% mikroskopisch nicht sichtbare Veränderungen.

Die Exzision von makroskopisch auffälligen Arealen mag bei persistentem Befund sinnvoll erscheinen. Eine hundertprozentige Sicherheit gegenüber einem Rezidiv stellt sie nicht dar. Erklärungsmodelle, wie die beschriebene Migrationstheorie, zeigen, dass klonierte bzw. transformierte Zellen bereits in blander Schleimhaut vorhanden sein können [91].

Daher bietet sich als sinnvolle Ergänzung die regelmäßige Kontrolle auf chromosomaler Ebene - im Fall dieser Arbeit mittels FISH - zur Risiko-Typisierung des jeweiligen Patienten an. Ein erstes entsprechendes histologisch-genomisches System wurde von Zhang *et al.* propagiert (Tabelle 10). Dabei werden drei Risikogruppen gebildet, die sich des histologischen Dysplasiegrades und der pathologischen Genexpression bedienen [65] (allerdings auf Basis der Mikrosatelliten-Analyse). Entscheidend ist die grundlegende Festlegung auf die Tumorsuppressorgene FHIT (3p14) und p16 (9p21) als zentrale Bezugspunkte für die Kategorisierung:

- Orale Leukoplakien mit keinem bzw. niedrigem Dysplasiegrad und zusätzlich blandem Allelmuster bei 3p14 und 9p21 zeigen die geringste Wahrscheinlichkeit der kanzerösen Progression, und bilden somit die Gruppe 1.

- Das Auftreten mittleren Risikos bei Histologie und Genstatus (mittelgradige Dysplasie und Verlust von 3p oder 9p) wird der Gruppe 2 zugewiesen.
- Schlussendlich bilden Gruppe 3, und somit die Hoch-Risiko-Gruppe, Läsionen, die zum einen schwere Dysplasiegrade, zum anderen den Verlust von 3p und/oder 9p sowie eines weiteren Tumorsuppressorgenes (4q, 8p, 11q, 13q oder 17p) aufweisen [53].

Tabelle 10: Staging von oralen prä malignen Läsionen anhand von Histologie und LOH-Sequenz

Risikograd	Histologie und LOH-Sequenz
1	P1 + G1
2	P1 + G2 P2 + G1 P2 + G2
3	P3 + G1 P3 + G2 P1 + G3 P2 + G3 P3 + G3

Histologie : P1 : keine oder geringgradige Dysplasie; P2 : mittelgradige Dysplasie; P3 : hochgradige Dysplasie/Cis. **LOH-Sequenz :** G1 : Erhalt von 3p und 9p (geringes Risiko); G2 : LOH bei 3p oder 9p (mittleres Risiko); G3 : LOH bei 3p und/oder 9p und Verlust von 4q, 8p, 11q, 13q oder 17p (hohes Risiko). Quelle: [65]

Anhand dieser Einteilung soll für den Kliniker im Rahmen des Stagings eine Entscheidungsfindung möglich sein, ob und in welchem Ausmaß eine orale Läsion einer Therapie zugeführt werden muss.

5. Zusammenfassung

Leukoplakien gelten als präkanzeröse Läsionen auf dem Weg zum oralen Plattenepithelkarzinom (*oral squamous cell carcinoma* / OSCC) - dem häufigsten Tumor im Kopf-Hals-Bereich. Ihre Entstehung ist überwiegend auf den Konsum von Nikotin und Alkohol zurückzuführen. Nach wie vor ist es nicht möglich zu differenzieren, wann und wodurch es hierbei zu einem irreversiblen Schaden auf genomischer Ebene und zur ungerichteten Proliferation kommt. Der histopathologische Befund allein bietet keine ausreichende Informationsbasis. Es bedarf zusätzlich des genetischen Musters, wie Vorarbeiten postulieren. In der gegenwärtigen Diskussion finden daher zwei Tumorsuppressorgene viel versprechende Beachtung: FHIT (Lokus 3p14) und p16 (Lokus 9p21).

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass genetische Veränderungen bei FHIT schon auf Ebene der Keratosen zu 95% auftreten. Entscheidend ist, dass bei bis zu 92% eine Deletion nachzuweisen ist. Bisherige Studien geben erst für Dysplasien eine beginnende Alteration an.

Polysome Subpopulationen gewinnen mit zunehmender Dignität an Einfluss, und sind offenbar für die Wandlung der Keratose zur Dysplasie von wichtiger Bedeutung. Es gilt den Begriff der „*quantitativen Verschiebung polysomer Subpopulationen*“ zu prägen.

Erstmalig wurde für genannte Sonden die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bei oralen Leukoplakien verwendet. Der Vorteil gegenüber etablierten Methoden (z.B. Mikrosatellitenanalyse) ist eine frühzeitige Detektierung von Subklonen bei signifikant niedrigeren Schwellenwerten. Durch die deutlich höhere Sensitivität wird belegt, dass der Beginn der genomischen Transformation einen neuen zeitlichen Rahmen erhalten muss.

Außerdem konnte mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung der Einfluss von p16 auf die frühzeitige genomische Transformation bestätigt werden. Es finden sich nach Literaturrecherche vergleichbare Werte. Polysome Subpopulationen spielen hier, verglichen mit FHIT, jedoch eine deutlich geringere Rolle. Herauszustellen ist, dass der klare Vorteil in der Anwendung der FISH liegt: mit einem Schwellenwert von 13% besitzen 92% der Keratosen eine Deletion für 9p21.

Die Überprüfung der histologischen Schnitte auf Expression von p16-Protein mittels immunhistochemischer Färbung, und Vergleich mit den Ergebnissen der FISH-Untersuchung, ergänzt korrelierend das auffällige Bild: Es zeigt sich eine entsprechende Expressionsverstärkung, wobei diese unabhängig von der Dignitätsklasse erscheint. Eine spezifischere Auswertung gelingt damit jedoch nicht.

Die hier genannten neuen Erkenntnisse belegen und ergänzen den Ansatz der genomischen Transformation bei Kopf-Hals-Tumoren. Für ein konsistentes Modell der Karzinogenese müssen jedoch noch weitere genomische Marker ermittelt und klassifiziert werden. Ziel muss eine präzise Kartographisierung von Dysplasien sein, um zukünftig frühzeitig Patienten nach ihrem Risikomuster zu erkennen und einer adäquaten Behandlung zuführen zu können.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

Ca	Karzinom
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i> = Zyklin-abhängige Kinase
CIS	Carcinoma-in-situ
D1/2	Dysplasien leichten und mittleren Grades
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamin-2-Phenylindolhydrochlorid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
FFPE	<i>formalin fixed paraffin embedded</i> = Formalin-fixiertes paraffiniertes Material
FHIT	<i>fragile histidine triade</i> = fragile Histidin Triade
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HR	<i>high risk</i> = hohes Risiko
LOH	<i>loss of heterozygosity</i> = Verlust der Heterozygotität
LR	<i>low risk</i> = niedriges Risiko
MTA	Medizinisch-Technischer-Assistent
OSCC	<i>oral squamous cell carcinoma</i> = orales Plattenepithelkarzinom
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Ketten-Reaktion
PAS	Patienten-Auskunft-System
Rb	Retinoblastom
RNA	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
SSC	<i>saline sodium citrate</i> = Lösungspuffer bei Hybridisierungen
TMA	<i>Tissue-Multi-Array</i> = Stanzblock im Rahmen der FISH-Untersuchung
TU-SH	Tumor-Schleimhaut
TSG	Tumorsuppressorgen
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation

6.2. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die bei der humanmedizinischen Fakultät der Universität Regensburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

***"Zytogenetische Untersuchungen an
oralen Leukoplakien der Mundhöhle
zur Identifizierung präaligner Läsionen"***

am Institut für Pathologie der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn PD Dr. rer. nat. Gero Brockhoff ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt, und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Weiter habe ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile dieser Arbeit wurden unter dem Titel *„Losses of 3p14 and 9p21 as shown by fluorescence in situ hybridisation are early events in tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma and already occur in simple keratosis“* in Cytometry Part A publiziert (Cytometry Part A, 73A: 305-311, 2008)

Regensburg, den 06. Januar 2011

Johannes Christian Bier

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über die einzelnen anatomischen Strukturen der Mundhöhle. Man erkennt die Cavitas oris propria und das Vestibulum oris mit ihren anatomischen Grenzen, die Zunge sowie die Gaumenbögen als Abgrenzungen zum Oropharynx. (Quelle: www.wissen.de/.../KOERPER/img_speiseroehre_1.jpg)

Abb. 2: unverhorntes, mehrschichtiges (blandes) Plattenepithel in unterschiedlicher Vergrößerung in HE-Färbung. Man erkennt die homogene Gliederung in den einzelnen Schichten des Epithels mit kubisch-prismatischen Zellen die der *Lamina propria* aufsitzen, und abgeflachten Zellen im Bereich der Superfizialschicht. (Quelle: University of Kansas, www.kumc.edu/instruction/medicine/anatomy/histoweb)

Abb. 3 + 4: homogene (links) und inhomogene (rechts) Leukoplakie an der Innenseite der rechten Wange (Quelle: Vogelstein et al.) sowie am lateralen Zungenrand (Quelle: sdm.buffalo.edu). Man erkennt die unterschiedliche Erscheinung beider Formen mit der einerseits einheitlichen, glatten Ausprägung links, und der bereits makroskopisch sichtbaren Heterogenität rechts.

Abb. 5 : Hyperplasie / Keratose (Quelle: University of Southern California, www.usc.edu/hsc/dental)

Abb. 6: Dysplasie (Quelle: University of Southern California, www.usc.edu/hsc/dental)

Abb. 7: Carcinoma-*in-situ* (CIS) (Quelle: University of Southern California, www.usc.edu/hsc/dental)

Abb. 8: Invasives Plattenepithelkarzinom (SCC) (Quelle: University of Southern California, www.usc.edu/hsc/dental)

Abb. 9: Prinzip der Herstellung eines TMA-Block-Schnittes von links nach rechts: Gewinnung einer Gewebestanze an vorher markiertem Gewebe eines Paraffin-Blockes - Überführen der Stanze in ein Negativ - Anfertigung von 4µm-dünnen Schnitten mittels Mikrotom aus dem entstandenen TMA-Block - Aufbringen auf einen Objektträger zur Hybridisierung mittels FISH-Sonden

Abb. 10: Dargestellt sind die genannten Gensonden (linke Graphiken; oben: FHIT, unten: p16) mit ihren Genloki im Bereich spezifischer Basenpaare auf dem DNS-Strang, sowie ihr jeweiliger chromosomaler Hybridisierungsort in bildlicher Darstellung (rechte Graphiken; grün). Zusätzlich sind in den rechten Graphiken die Hybridisierungsorte der Zentromersonden (rot) markiert. (Quelle: Zytovision / Bremerhaven)

Abb. 11: Schema der DNA-Hybridisierung mit der Oligonukleotid-Sonde: Durch Erhitzen der DNA kommt es zur Unterbindung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Basenpaaren; nun können sich die gelabelten Sonden ihrer Kodierung entsprechend anlagern und bei Abkühlung erneut elektrostatische Bindungen eingehen. (Quelle: modifiziert nach 'National Human Genome Research Institute')

Abb. 12: beispielhafte, tabellarische, grobschematische Darstellungen der mikroskopischen Auswertung der einzelnen Entitätsgruppen einer FISH für FHIT. Die Zahlen stehen für die Anzahl an Kernen für entsprechende Gen-Zentromer-Kombinationen und somit für die Zahl an pathologischen Kernen. Dabei steht die Kombination ,2-2' für blande Kerne mit diploidem Chromosomensatz. Man erkennt eine Zunahme der Kumulation von pathologischen Kernen (Zunahme der Polysomie) bei Zunahme der Entität der jeweiligen Läsion. Die Auswertung der FISH für die Gensonde p16 wies eine weitaus geringere Zunahme der Polysomie auf, als die der Auswertung für FHIT.

Abb. 13: Schematische Darstellung des mikroskopischen Blickes auf eine Auswahl der unterschiedlichen Pathologievarianten. Die roten und grünen Punkte entsprechen dabei den fluoreszierenden Sonden einer FISH. Durch verschiedene äußere Einflüsse wandelt sich ein gesunder, diploider Zellkern im Laufe der Zeit durch Mutationen und Deletionen auf genetischer Ebene zu einem aberranten Kern (Modell der genetischen Alteration nach Vogelstein et al. [7]).

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst Herrn Dr. Stephan Schwarz, der mich nicht nur zu dem Thema der hier vorliegenden Arbeit führte, sondern auch zu jeder Zeit ein äußerst hilfreicher, konstruktiver aber auch kritischer Mentor war, und mir immer wieder das Gefühl der absoluten Wertschätzung vermitteln konnte.

Nicht weniger möchte ich Herrn PD Dr. Gero Brockhoff danken, der mit seinen Ideen immer wieder für neue Impulse gesorgt hat. Seine motivierende Art sei an dieser Stelle im Besonderen erwähnt.

Marietta Bock und Rudi Jung danke ich für die Einführung in die Techniken der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, der Laborarbeit, des Mikroskopierens und für die immer mögliche Frage nach Hilfestellung.

Allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Pathologischen Instituts sei für die unzähligen Hilfestellungen gedankt, ohne die diese Arbeit sicherlich nicht so ohne weiteres entstanden wäre.

Nicht zuletzt möchte ich meinen lieben Eltern einen herzlichen Dank aussprechen, für das Vertrauen in mich und den Glauben an mich.

8. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Johannes Christian Bier
Geburtsdatum	05. Februar 1981
Geburtsort	Halle / Saale
Familienstand	ledig

Schulbildung

1987 - 2001	Grundschule in Zeuthen bei Berlin Gymnasium in Pocking / Lkr. Passau
-------------	---

Wehrdienst

07/01 - 03/02	Sanitäter in Kempten, Ulm, Kirchham / Lkr. Passau
---------------	---

Hochschulausbildung

2002 - 2008	Studium der Humanmedizin / Universität Regensburg
-------------	---

Famulaturen

04/02 - 06/02	John-Radcliffe-Hospital, Oxford, England, Pflegepraktikum; Station für " <i>acute medicine</i> "
02/05 - 03/05	Prof. Dr. Pratschke, Abteilung für Chirurgie KKH Bad Reichenhall
03/06 - 04/06	Prof. Dr. Santini, „ <i>Oto-Rhino-Laryngologie</i> “ CHU de Nice, Nizza, Frankreich
08/2006	Prof. Dr. Strutz, Klinik und Poliklinik für HNO Universitätsklinikum Regensburg
02/07 - 03/07	Prof. Dr. Schölmerich, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Abteilung für Infektiologie, Notaufnahme Universitätsklinik Regensburg
08/07 - 10/08	Prof. Dr. Probst, Klinik für Ohren-, Nasen-, Hals- und Gesichtschirurgie, Universitätsspital Zürich
10/07 - 12/07	Prof. Dr. Millat, „ <i>Chirurgie Digestive A</i> “, Hôpital Saint-Eloi, CHU de Montpellier, Frankreich
12/07 - 02/08	Prof. Dr. Steinhagen, „ <i>Department of Surgery</i> “, Mount Sinai School of Medicine, New York City, USA
02/08 - 04/08	Prof. Dr. Strutz, Klinik und Poliklinik für HNO Universitätsklinikum Regensburg
04/08 - 07/08	Prof. Dr. Wiedmann, Medizinische Klinik II, Innere Medizin Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg

Praktisches Jahr

Regensburg, den 06. Januar 2011

9. Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
- [2] Reibel J. Tobacco or oral health. *Bull World Health Organ* 2005; 83(9): 643.
- [3] Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 1996; 46(1): 5-27.
- [4] Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van dW, I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 1994; 73(1): 187-90.
- [5] Sutton DN, Brown JS, Rogers SN, Vaughan ED, Woolgar JA. The prognostic implications of the surgical margin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32(1): 30-4.
- [6] Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis* 2007; 13(2): 126-33.
- [7] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759-67.
- [8] Peng H, Shintani S, Kim Y, Wong DT. Loss of p12CDK2-AP1 expression in human oral squamous cell carcinoma with disrupted transforming growth factor-beta-Smad signaling pathway. *Neoplasia* 2006; 8(12): 1028-36.
- [9] Squarize CH, Castilho RM, Sriuranpong V, Pinto DS, Jr., Gutkind JS. Molecular cross-talk between the NFkappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 2006; 8(9): 733-46.
- [10] Noutomi Y, Oga A, Uchida K, Okafuji M, Ita M, Kawauchi S et al. Comparative genomic hybridization reveals genetic progression of oral squamous cell carcinoma from dysplasia via two different tumourigenic pathways. *J Pathol* 2006; 210(1): 67-74.
- [11] Banerjee AG, Bhattacharyya I, Vishwanatha JK. Identification of genes and molecular pathways involved in the progression of premalignant oral epithelia. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(6): 865-75.
- [12] Lopez M, Aguirre JM, Cuevas N, Anzola M, Videgain J, Aguirregaviria J, Martinez de PM. Gene promoter hypermethylation in oral rinses of leukoplakia patients--a diagnostic and/or prognostic tool? *Eur J Cancer* 2003; 39(16): 2306-9.
- [13] Gale N., Westra W., Califano J., Pilch B.Z., Sidransky D. Epithelial precursor lesions. IARC Press, Lyon, pp.140-143 . 2005. Tumors of the Oral Cavity and Oropharynx, WHO Classification of Tumors. Ref Type: In Press
- [14] Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Leukoplakie. [258]. de Gruyter. Ref Type: Generic
- [15] Warnakulasuriya S, Johnson NW, van dW, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; 36(10): 575-80.

-
- [16] World Health Organisation. World Health Organization. Report of a meeting of investigators on the histological definition of precancerous lesions. Geneva: World Health Organization, 1973, Can .731. 2007.
Ref Type: Report
- [17] Bouquot JE. Oral leukoplakia and erythroplakia: a review and update. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1994; 6(6): 9-17.
- [18] Wright JM. A review and update of oral precancerous lesions. *Tex Dent J* 1998; 115(6): 15-9.
- [19] Cowan CG, Gregg TA, Napier SS, McKenna SM, Kee F. Potentially malignant oral lesions in northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral Dis* 2001; 7(1): 18-24.
- [20] Gupta PC, Mehta FS, Daftary DK, Pindborg JJ, Bhonsle RB, Jalnawalla PN et al. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dent Oral Epidemiol* 1980; 8(6): 283-333.
- [21] Axell T. Occurrence of leukoplakia and some other oral white lesions among 20,333 adult Swedish people. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15(1): 46-51.
- [22] Hogewind WF, van dW, I. Prevalence study of oral leukoplakia in a selected population of 1000 patients from The Netherlands. *Community Dent Oral Epidemiol* 1988; 16(5): 302-5.
- [23] Reichart PA. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000; 28(5): 390-8.
- [24] Splieth CH, Sumnig W, Bessel F, John U, Kocher T. Prevalence of oral mucosal lesions in a representative population. *Quintessence Int* 2007; 38(1): 23-9.
- [25] Bouquot JE, Gorlin RJ. Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986; 61(4): 373-81.
- [26] Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med* 2004; 33(9): 525-32.
- [27] Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol* 2004; 40(3): 304-13.
- [28] EU Working Group on Tobacco and Oral Health Consensus Meeting. Copenhagen, 23-26 October 1997. Abstracts. *Oral Dis* 1998; 4(1): 48-67.
- [29] Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(4): 774-81.
- [30] Reichart PA. Wissenschaftliche Stellungnahme - Orale Leukoplakie / Erythroplakie. 26-2-2007. Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde.
Ref Type: Report
- [31] Warnakulasuriya S. Smokeless tobacco and oral cancer. *Oral Dis* 2004; 10(1): 1-4.

-
- [32] Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis* 2005; 11(6): 350-9.
- [33] Astbury K, Turner MJ. Human papillomavirus vaccination in the prevention of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19(9): 1610-3.
- [34] Kabat GC, Hebert JR, Wynder EL. Risk factors for oral cancer in women. *Cancer Res* 1989; 49(10): 2803-6.
- [35] Axell T, Holmstrup P, Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. International seminar on oral leukoplakia and associated lesions related to tobacco habits. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 1984; 12(3 A): 145-54.
- [36] Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ, van dW, I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco- related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med* 1996; 25(2): 49-54.
- [37] Reichart PA, Philipsen HP. [Proliferative verrucous leukoplakia. Report of five cases]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2003; 7(3): 164-70.
- [38] Silverman S Jr, Gorsky M. Proliferative verrucous leukoplakia: a follow-up study of 54 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 84(2): 154-7.
- [39] Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van dW, I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol* 1998; 34(4): 270-5.
- [40] Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984; 53(3): 563-8.
- [41] van dW, I, Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol* 1997; 33(5): 291-301.
- [42] Schepman KP, van dW, I. A proposal for a classification and staging system for oral leukoplakia: a preliminary study. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B(6): 396-8.
- [43] Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52(4): 195-215.
- [44] van dW, I, Axell T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol* 2002; 38(6): 521-6.
- [45] Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. Pathology and Genetics of Tumours of the Head and Neck, World Health Organization. IARC Press Lyon (2005): 2005.
- [46] Holmstrup P, Vedtofte P, Hjorting-Hansen E, Pindborg JJ. [Surgical treatment of premalignant lesions of the oral mucosa]. *Tandlaegebladet* 1985; 89(14): 532-8.
- [47] Chiesa F, Boracchi P, Tradati N, Rossi N, Costa L, Giardini R et al. Risk of preneoplastic and neoplastic events in operated oral leukoplakias. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1993; 29B(1): 23-8.
- [48] Schoelch ML, Sekandari N, Regezi JA, Silverman S Jr. Laser management of oral leukoplakias: a follow-up study of 70 patients. *Laryngoscope* 1999; 109(6): 949-53.
- [49] Pindborg JJ, Daftary DK, Mehta FS. A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977; 43(3): 383-90.

-
- [50] Silverman S, Bhargava K, Smith LW, Malaowalla AM. Malignant transformation and natural history of oral leukoplakia in 57,518 industrial workers of Gujarat, India. *Cancer* 1976; 38(4): 1790-5.
- [51] Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Interventions for treating oral leukoplakia. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(4): CD001829.
- [52] Califano J, van der RP, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56(11): 2488-92.
- [53] Rosin MP, Cheng X, Poh C, Lam WL, Huang Y, Lovas J et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2): 357-62.
- [54] Rosin MP, Lam WL, Poh C, Le ND, Li RJ, Zeng T et al. 3p14 and 9p21 loss is a simple tool for predicting second oral malignancy at previously treated oral cancer sites. *Cancer Res* 2002; 62(22): 6447-50.
- [55] Hirshberg A, Yarom N, Amariglio N, Yahalom R, Adam I, Stanchesu R et al. Detection of non-diploid cells in premalignant and malignant oral lesions using combined morphological and FISH analysis - a new method for early detection of suspicious oral lesions. *Cancer Lett* 2007; 253(2): 282-90.
- [56] Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368(6473): 753-6.
- [57] van der RP, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994; 54(5): 1156-8.
- [58] Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, Borell TJ, Brown JA, Lieber MM, Jenkins RB. Comparison of fluorescence in situ hybridization analysis of isolated nuclei and routine histological sections from paraffin-embedded prostatic adenocarcinoma specimens. *Am J Pathol* 1996; 149(4): 1193-9.
- [59] Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer* 1975; 36(4): 1386-92.
- [60] Bartlett JM, Adie L, Watters AD, Going JJ, Grigor KM. Chromosomal aberrations in transitional cell carcinoma that are predictive of disease outcome are independent of polyploidy. *BJU Int* 1999; 84(7): 775-9.
- [61] Mashberg A, Meyers H. Anatomical site and size of 222 early asymptomatic oral squamous cell carcinomas: a continuing prospective study of oral cancer. II. *Cancer* 1976; 37(5): 2149-57.
- [62] Laborda RA, Vallmanya LF, Cortadellas AR, Lloreta TJ, Gelabert MA. [Histopathologic validation of the tissue-microarray technology of urothelial cancer. Our experience]. *Actas Urol Esp* 2004; 28(3): 215-20.
- [63] Lenz CF, Pfuhl A, Finckh M, Weidauer H, Bosch FX. Oral leukoplakias show numerical chromosomal aberrations detected by fluorescence in situ hybridization. *Laryngoscope* 1998; 108(6): 917-22.
- [64] Mao L, Lee JS, Fan YH, Ro JY, Batsakis JG, Lippman S et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med* 1996; 2(6): 682-5.

-
- [65] Zhang L, Rosin MP. Loss of heterozygosity: a potential tool in management of oral premalignant lesions? *J Oral Pathol Med* 2001; 30(9): 513-20.
- [66] Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993; 7(3): 139-46.
- [67] Ah-See KW, Cooke TG, Pickford IR, Soutar D, Balmain A. An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res* 1994; 54(7): 1617-21.
- [68] Fearon ER. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997; 278(5340): 1043-50.
- [69] Lippman SM, Hong WK. Molecular markers of the risk of oral cancer. *N Engl J Med* 2001; 344(17): 1323-6.
- [70] Deng WG, Nishizaki M, Fang B, Roth JA, Ji L. Induction of apoptosis by tumor suppressor FHIT via death receptor signaling pathway in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355(4): 993-9.
- [71] Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996; 84(4): 587-97.
- [72] Ji L, Fang B, Yen N, Fong K, Minna JD, Roth JA. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res* 1999; 59(14): 3333-9.
- [73] Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene* 2002; 21(45): 6915-35.
- [74] Nishizaki M, Sasaki J, Fang B, Atkinson EN, Minna JD, Roth JA, Ji L. Synergistic tumor suppression by coexpression of FHIT and p53 coincides with FHIT-mediated MDM2 inactivation and p53 stabilization in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(16): 5745-52.
- [75] Ozkara SK, Corakci A. FHIT expression in neoplastic, hyperplastic, and normal endometrium. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15(6): 1081-8.
- [76] Zucchini C, Concu M, Martini F, Morelli C, Salfi N, Carinci P et al. FHIT oncosuppressor gene expression profile in human anal cancers. *Int J Biol Markers* 2007; 22(1): 39-42.
- [77] Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366(6456): 704-7.
- [78] Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374(6518): 131-4.
- [79] Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* 1994; 54(23): 6078-82.
- [80] Di VA, Infusini E, Peveri C, Sciutto A, Orecchia R, Geido E et al. Intratumor heterogeneity of chromosome 1, 7, 17, and 18 aneusomies obtained by FISH and association with flow cytometric DNA index in human colorectal adenocarcinomas. *Cytometry* 1999; 35(4): 369-75.

-
- [81] Farabegoli F, Santini D, Ceccarelli C, Taffurelli M, Marrano D, Baldini N. Clone heterogeneity in diploid and aneuploid breast carcinomas as detected by FISH. *Cytometry* 2001; 46(1): 50-6.
- [82] Junker K, Fritsch T, Hartmann A, Schulze W, Schubert J. Multicolor fluorescence in situ hybridization (M-FISH) on cells from urine for the detection of bladder cancer. *Cytogenet Genome Res* 2006; 114(3-4): 279-83.
- [83] Kim J, Shin DM, El-Naggar A, Lee JS, Corrales C, Lippman SM et al. Chromosome polysomy and histological characteristics in oral premalignant lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(4): 319-25.
- [84] Vairaktaris E, Yapijakis C, Psyrri A, Spyridonidou S, Yannopoulos A, Lazaris A et al. Loss of tumour suppressor p16 expression in initial stages of oral oncogenesis. *Anticancer Res* 2007; 27(2): 979-84.
- [85] Bradley KT, Budnick SD, Logani S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol* 2006; 19(10): 1310-6.
- [86] Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de Oliveira MR, Soares CP. p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem* 2003; 51(10): 1291-7.
- [87] Konig F, Krekeler G, Honig JF, Cordon-Cardo C, Fischer G, Korabiowska M. Relation between human papillomavirus positivity and p16 expression in head and neck carcinomas--a tissue microarray study. *Anticancer Res* 2007; 27(1A): 283-8.
- [88] Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WN, Ramaekers FC et al. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* 2003; 107(3): 394-400.
- [89] Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002; 21(10): 1510-7.
- [90] Buajeeb W, Poomsawat S, Punyasingh J, Sanguansin S. Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med* 2009; 38(1): 104-8.
- [91] Stoehr R, Knuechel R, Boecker J, Blaszyk H, Schmitt R, Filbeck T et al. Histologic-genetic mapping by allele-specific PCR reveals intraurothelial spread of p53 mutant tumor clones. *Lab Invest* 2002; 82(11): 1553-61.
- [92] Slaughter D.P., Southwick H.W., Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 6(5): 963-8.
- [93] Sorlie T, Martel-Planche G, Hainaut P, Lewalter J, Holm R, Borresen-Dale AL, Montesano R. Analysis of p53, p16MTS, p21WAF1 and H-ras in archived bladder tumours from workers exposed to aromatic amines. *Br J Cancer* 1998; 77(10): 1573-9.
- [94] Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Van Der Wal JE, Snow GB, Leemans CR, Braakhuis BJ. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol* 2002; 161(3): 1051-60.
- [95] Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, Pettay JD, Biscotti CV, Liou LS et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the

-
- majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J Urol* 2003; 169(6): 2101-5.
- [96] Tapia C, Savic S, Wagner U, Schoenegg R, Novotny H, Grilli B et al. HER2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases. *Breast Cancer Res* 2007; 9(3): R31.
- [97] Hermesen MA, Joenje H, Arwert F, Braakhuis BJ, Baak JP, Westerveld A, Slater R. Assessment of chromosomal gains and losses in oral squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridisation. *Oral Oncol* 1997; 33(6): 414-8.
- [98] Lenz C, Dietz A, Pfuhl A, Finckh M, Conradt C, Weidauer H, Bosch FX. [Detection of numerical chromosome aberrations in leukoplakia and squamous epithelial carcinomas of the head-neck area using fluorescence in situ hybridization]. *HNO* 2000; 48(5): 367-71.
- [99] Kruger S, Mess F, Bohle A, Feller AC. Numerical aberrations of chromosome 17 and the 9p21 locus are independent predictors of tumor recurrence in non-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Int J Oncol* 2003; 23(1): 41-8.
- [100] Saunier K, Rouge C, Lay C, Rigottier-Gois L, Dore J. Enumeration of bacteria from the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota using Clep1156 16S rRNA probe in combination with helper and competitor oligonucleotides. *Syst Appl Microbiol* 2005; 28(5): 454-64.
- [101] Zwirgmaier K. Fluorescence in situ hybridisation (FISH)--the next generation. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 246(2): 151-8.
- [102] Fa.Zytomed B. Handbuch "Erstellung eines Paraffinblockes mit multiplen Gewebeprobe". 200.
Ref Type: Generic
- [103] Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol* 2001; 8(1): 14-20.
- [104] Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 2001; 159(6): 2249-56.
- [105] Shiu MN, Chen TH, Chang SH, Hahn LJ. Risk factors for leukoplakia and malignant transformation to oral carcinoma: a leukoplakia cohort in Taiwan. *Br J Cancer* 2000; 82(11): 1871-4.
- [106] Zhang L, Cheung KJ, Jr., Lam WL, Cheng X, Poh C, Priddy R et al. Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites: potential impact on staging and clinical management. *Cancer* 2001; 91(11): 2148-55.
- [107] Kramer IR, El-Labban N, Lee KW. The clinical features and risk of malignant transformation in sublingual keratosis. *Br Dent J* 1978; 144(6): 171-80.
- [108] Lederman M. The anatomy of cancer. With special reference to tumours of the upper air and food passages. *J Laryngol Otol* 1964; 78: 181-208.
- [109] Lesch CA, Squier CA, Cruchley A, Williams DM, Speight P. The permeability of human oral mucosa and skin to water. *J Dent Res* 1989; 68(9): 1345-9.
- [110] Mashberg A, Samit AM. Early detection, diagnosis, and management of oral and oropharyngeal cancer. *CA Cancer J Clin* 1989; 39(2): 67-88.

-
- [111] Moore C, Catlin D. Anatomic origins and locations of oral cancer. *Am J Surg* 1967; 114(4): 510-3.
- [112] Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 105(3): 386-93.
- [113] Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Mao L, Lotan R, Shin DM et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1702-10.
- [114] Mincer HH, Coleman SA, Hopkins KP. Observations on the clinical characteristics of oral lesions showing histologic epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972; 33(3): 389-99.