

Aus der Klinik und Poliklinik für
Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Matthias Goebeler

**Immunhistochemische Analyse von P16 in obligaten
und potentiellen Präkanzerosen und Tumoren der
Mundhöhle**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Chris Jakob Erdem
aus Nürnberg

Würzburg, Dezember 2011

Referentin: Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker

Koreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A.C. Kübler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

21.Mai 2012

Der Promovend ist Zahnarzt.

In großer Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	EPITHELIALE MUNDSCHLEIMHAUTLÄSIONEN	1
1.1.1	ORALE LEUKOPLAKIE (OL)	1
1.1.1.1	Definition	1
1.1.1.2	Ätiologie und Epidemiologie	2
1.1.1.3	Klinik	3
1.1.2	ORALE PLATTENEPITHELKARZINOME	5
1.1.2.1	Definition	5
1.1.2.2	Ätiologie und Epidemiologie	6
1.1.2.3	Klinik	6
1.1.3	LICHEN PLANUS (LP)	7
1.1.3.1	Definition	7
1.1.3.2	Ätiologie und Epidemiologie	7
1.1.3.3	Klinik	8
1.2	DAS P16-PROTEIN UND SEINE FUNKTION	9
1.3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	11
<u>2</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	12
2.1	MATERIAL	12
2.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE DARSTELLUNG P16^{INK4A}	13
2.2.1	PRÄPARATEGEWINNUNG UND HERSTELLUNG DER PARAFFINSCHNITTE	13
2.2.2	ENTPARAFFINIERUNG UND REHYDRATISIERUNG	13
2.2.3	WÄRMEBEHANDLUNG MIT EPITOPDEMASKIERUNGSLÖSUNG	14
2.2.4	HEMMUNG DER ENDOGENEN PEROXIDASE	14
2.2.5	AUFTRAGEN DES MAUS ANTI-HUMAN P16 ^{INK4A} -ANTIKÖRPERS	14
2.2.6	ENTWICKLUNGSVORGANG MIT SUBSTRATCHROMOGENLÖSUNG (DAB)	14
2.2.7	GEGENFÄRBUNG MIT HÄMATOXYLIN UND EINDECKEN	15
2.3	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG UND INTERPRETATION	15
2.4	STATISTIK	16

3	<u>ERGEBNISSE</u>	17
3.1	PATIENTENKOLLEKTIV	17
3.2	AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN P16^{INK4A} FÄRBUNG	20
3.2.1	ERGEBNISSE DER P16-EXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT DER FARBINTENSITÄT	21
3.2.2	P16-EXPRESSION INNERHALB DER ZELLKOMPARTIMENTE	23
3.2.2.1	P16-Expression im Zellkern	28
3.2.2.2	P16-Expression im Zellkern und Zytoplasma	31
3.2.2.3	P16-Expression im Zytoplasma	33
3.3	HISTOLOGISCHE ANALYSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN P16^{INK4A}-FÄRBUNG	35
3.3.1	ORALE LEUKOPLAKIE	35
3.3.2	ORALES PLATTENEPIHELKARZINOM	36
3.3.3	LICHEN PLANUS	37
3.3.4	ENTZÜNDLICHE DERMATOSEN	39
4	<u>DISKUSSION</u>	40
4.1	ALLGEMEINER TEIL	40
4.2	ORALE LEUKOPLAKIEN	41
4.3	ORALE PLATTENEPIHELKARZINOME	43
4.4	LICHEN PLANUS	46
4.5	SCHLUSSFOLGERUNG	48
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	49
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	50
6.1	LITERATURVERZEICHNIS	50
6.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	58
	<u>DANKSAGUNG</u>	
	<u>LEBENS LAUF</u>	

Abkürzungen

Aqua dest.	destilliertes Wasser
Bzw.	beziehungsweise
Ca.	Circa
Cdk	Zyclin-abhängige Kinase
HPV	Humanes Papillomavirus
kDa	Kilo Dalton
LP	Lichen planus
µl	Mikroliter
OL	Orale Leukoplakie
OPEK	Orales Plattenepithelkarzinom
OLP	Oraler Lichen planus
pRb	Retinoblastomprotein
PEK	Plattenepithelkarzinom

1 Einleitung

In Ländern der westlichen Welt ist Krebs statistisch gesehen die häufigste Todesursache. Im Jahr 2008 erkrankten weltweit schätzungsweise 12,7 Millionen Menschen an Krebs und circa 7,6 Millionen Menschen verstarben daran. Den Statistiken zufolge werden diese Zahlen noch weiter ansteigen, insbesondere sowohl durch die immer höher werdende Lebenserwartung als auch durch einen Krebs fördernden Lebensstil, der sich durch Tabakkonsum, mangelnde körperliche Bewegung und schlechte Ernährung auszeichnet. Die Prävalenz von Neuerkrankungen durch Tumoren in der Mundhöhle lag weltweit bei 263.900 Fällen im Jahr 2008 und macht damit einen beträchtlichen Anteil der Tumorleiden aus. (Jemal, Bray et al. 2011) Durch die besondere Lokalisation der Tumoren und die vielen unterschiedlichen Einflüsse, mit denen die Mundhöhle konfrontiert ist, geht man von einer multifaktoriellen Pathogenese der oralen Tumoren aus, wobei außer karzinogenen Chemikalien und Viren auch entzündliche Erkrankungen, wie der orale Lichen planus eine Rolle spielen. Um die Genese von verschiedenen Mundschleimhautläsionen und Tumoren besser zu verstehen, wurden diese histologisch und immunhistologisch untersucht und statistisch miteinander verglichen. Bei der immunhistologischen Untersuchung wurde ein besonderes Augenmerk auf die Expression des p16-Tumorsuppressorgens gerichtet. P16^{INK4a} spielt eine besondere Rolle in der Entstehung von bösartigen Tumoren und könnte daher als wichtiger Biomarker von dysplastischen Veränderungen der Schleimhaut oder anderen potentiellen Präkanzerosen dienen. (Bradley, Budnick et al. 2006)

1.1 Epitheliale Mundschleimhautläsionen

1.1.1 Orale Leukoplakie (OL)

1.1.1.1 Definition

Der ungarische Dermatologe Ernst Fischer beschrieb erstmals im Jahre 1877 den Begriff orale Leukoplakie (griech. leukos = weiß, plakos = Platte). (Schwimmer 1877) Da es in der Vergangenheit viele Unstimmigkeiten bezüglich der Definition gab, wurde von einer internationalen Gruppe von

Epidemiologen, Klinikern und Pathologen in Malmö 1983 und in Uppsala 1994 eine Definition der Leukoplakie entwickelt. Der Begriff orale Leukoplakie beschreibt eine klinische Diagnose. Die OL ist eine vorwiegend weiße Läsion der Mundschleimhaut, die keiner anderen definierbaren Erkrankung zugeordnet werden kann. Leukoplakien können in maligne Karzinome entarten, daher werden sie als Präkanzerosen angesehen. (Axell, Pindborg et al. 1996)

1.1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Die globale Prävalenz der OL variiert zwischen 0,2% und 24,4 %. Diese erheblichen Schwankungen erklären sich durch das unterschiedliche Patientengut, durch geographische Unterschiede und die damit verbundenen kulturellen Sitten und Bräuche der jeweiligen ethnischen Gruppe. Hier ist besonders wichtig außer Alkoholkonsum und Kauen von Betelnüssen die Art und Menge des Tabakkonsums hervorzuheben. Des Weiteren spielt es eine Rolle, welche Definition der Leukoplakie verwendet wurde. (Bornstein, Benguerel et al. 2004) Für westliche Industrienationen wurden Werte zwischen 1,4 % in den Niederlanden, 2,9% in den USA und 3,6% in Schweden als repräsentativ betrachtet. (Scheifele and Reichart 1998; Reichart 2007) Bei Männern treten orale Leukoplakien zumeist im Alter zwischen 45 und 64 Jahren auf, bei Frauen zwischen 35 und 64 Jahren. Mit dem Altersanstieg steigt auch die Tendenz zur malignen Transformation. Männer sind 1,3 - 3 mal häufiger von Leukoplakien betroffen als Frauen, vor allem tabakassoziierte Läsionen und homogene Leukoplakien sind bei Männern viel häufiger zu sehen. (Bànòczy J 1972)

Die Ätiologie der OL ist bis dato noch nicht hinreichend geklärt. Als Hauptfaktoren werden jedoch Tabak und Alkoholkonsum angenommen, diese können jedoch nicht mit allen Fällen assoziiert werden. Alkohol ist ein Co-Faktor, der vor allem zu einer Permeabilitätsveränderung des oralen Epithels führt, so dass toxische Produkte des Tabaks, der bis zu 90 verschiedene Karzinogene enthält, leichter in die epithelialen und subepithelialen Kompartimente übertreten können. Andere Risikofaktoren, die die Ätiopathogenese beeinflussen können, sind Virusinfektionen, vor allem HPV 16 und HPV 18, Candida albicans-Infektionen, Immunsuppression, das

Patientenalter, verstärkte UV-Strahlenexposition und entzündliche Erkrankungen, wie z.B. der Lichen planus mucosae. Weitere Faktoren wie schlechte Mundhygiene, schlechte Ernährungsgewohnheiten, Vitaminmangel, Betelnuss, unterschiedliche Mundspülungen, chronisch traumatisierende Irritationen und genetische Dispositionen sind als potentielle Begleitfaktoren einzustufen (Reichart 2000; Dietrich 2004; Reichart 2007)

1.1.1.3 Klinik

OL können aufgrund ihres Erscheinungsbildes in homogene und inhomogene aufgeteilt werden.

- Homogene Leukoplakien sind meist asymptomatisch und treten als weißliche Plaques in Erscheinung. Die Oberflächenbeschaffenheit ist glatt, faltig oder wellig und hat ein überwiegend flaches und dünnes Erscheinungsbild.
- Inhomogene Leukoplakien sind in ihrer Oberflächenbeschaffenheit hingegen verändert, zeigen eine unregelmäßige weiße Verfärbung und zeichnen sich durch dysplastische Veränderungen aus. Sie können weiter unterteilt werden in noduläre, exophytische und erythrogene Leukoplakien, falls die Läsionen auch rötliche Areale beinhalten. (Bornstein, Benguerel et al. 2004)

Im deutschsprachigen Raum wird hauptsächlich die Unterteilung nach J.Bánóczy verwendet. Hierbei werden drei verschiedene Formen unterschieden (Bánóczy J 1972):

- Typ I: Leukoplakia simplex (homogene Leukoplakie)
- Typ II: Leukoplakia verrucosa (inhomogene Leukoplakie)
- Typ III: Leukoplakia erosiva (inhomogene Leukoplakie)

OL treten am häufigsten auf der Schleimhaut der Mandibula mit 25,2% und der bukkalen Mundschleimhaut mit 21,9% auf. OL, die am Mundboden (42,9%) und in der Lippenregion (24,2%) lokalisiert sind besitzen das höchste Risiko zur malignen Entartung bzw. den höchsten Dysplasiegrad. (Neville and Day 2002)

Darüber hinaus ist auch die proliferative verruköse Leukoplakie beschrieben worden. (Reichart 2003) Diese Form der OL ist eine sich langsam entwickelnde, multifokal auftretende Läsion, die sich zunächst oftmals als homogene Leukoplakie manifestiert. Die Rezidivgefahr ist bei dieser Form sehr hoch und besitzt ein Risiko der malignen Entartung zwischen 63,3 und 100%. Am häufigsten findet sich die Läsion an der Gingiva des Unterkiefers und am Gaumen. (Lindenmuller and Lambrecht 2006)

Die Bezeichnung OL sollte nur für die klinische Diagnostik verwendet werden. Für die histologische Diagnose sollten die Präparate nach Dysplasiegrad und anderen spezifisch histologischen Merkmalen befundet werden. Es wird zwischen vier Dysplasiegraden bei der Untersuchung von biopsierten OL unterschieden. (Bornstein, Benguerel et al. 2004)

- Keine Dysplasie
- Leichte Dysplasie
- Mäßige Dysplasie
- Carcinoma in situ

Die histologische Untersuchung ist neben dem klinischen Erscheinungsbild unabdingbar um das Entartungsrisiko einschätzen zu können.

Es können unterschiedliche therapeutische Wege eingeschlagen werden, doch bis dato hat sich keine einschlägige Therapie durchgesetzt. Keine der heute gebräuchlichen Therapien kann das Risiko einer malignen Entartung grundsätzlich ausschließen. Initial müssen alle eventuellen ätiologischen Faktoren wie Tabak, Alkohol, Candida albicans-Infektionen beseitigt werden. Ein Stopp des Tabakkonsums sollte für den Patienten als obligat gelten. Allen Fällen mit Epitheldysplasien wird eine chirurgische Entfernung *in toto* empfohlen, um die Rezidivgefahr einer sekundären dysplastischen Veränderung möglichst gering zu halten. (Lodi, Sardella et al. 2002) Bei Fällen ohne dysplastische Veränderungen hängt die Entscheidung, ob chirurgisch interveniert werden soll, vom Allgemeinzustand des Patienten und vom Ausmaß der Leukoplakie ab. Neben der konventionellen chirurgischen Therapie haben sich andere Methoden zur Entfernung oder Behandlung der OL etabliert, wie

die CO₂-Laserchirurgie, die Kryochirurgie, die photodynamische Therapie sowie die systemische Behandlung mit Retinoiden und Betakarotin. (Reichart 2007)

1.1.2 Orale Plattenepithelkarzinome

1.1.2.1 Definition

Das Plattenepithelkarzinom (PEK) im oberen Kopf-und Halsbereich wird von der WHO als maligner epithelialer Tumor mit plattenepithelialer Differenzierung definiert, das die Fähigkeit zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung besitzt. Dieses ist charakterisiert durch ein vom histologischen Malignitätsgrad abhängiges Ausmaß an Hornbildung und Vorhandensein von Interzellularbrücken.

Um das PEK histologisch beurteilen zu können, wurde das histologische Grading eingeführt. Beurteilungsgrundlage sind Zellreichtum, Mitoserate, Zellpleomorphie, Vorliegen von Nekrosen und das Verhältnis von Zellen zu Interzellularsubstanz im Tumorgewebe. (Schwenzer 2010)

G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3/4	Schlecht differenziert
Gx	Differenzierungsgrad nicht beurteilbar

Tabelle 1: Histologisches Grading

- Grad 1: Das Gewebe ähnelt histologisch gesehen einer regulär differenzierten Plattenepithelschleimhaut mit häufiger Verhornung und leicht identifizierbaren Interzellularbrücken. Mitosen sind selten und atypische Mitosen fehlen vollkommen
- Grad 2: Die Verhornung des Gewebes fällt geringer aus, Interzellularbrücken sind nur selten nachweisbar und es liegt eine höhere Mitoserate der Zellen vor.
- Grad 3/4: Die plattenepitheliale Differenzierung ist nur noch gering vorhanden und es liegt eine hohe Mitoserate mit atypischen

Mitosen vor. Es kann ein schmalsträngiges Infiltrationsmuster vorliegen.

- Grad X: Es kann kein Differenzierungsgrad mehr nachgewiesen werden.

1.1.2.2 Ätiologie und Epidemiologie

In Deutschland lag die Prävalenz von malignen Neuerkrankungen in der Mundhöhle und Rachenraum bei Männern bei einem relativen Anteil von 3,5% und ist damit die siebthäufigste Krebserkrankung. Bei Frauen betrug der Anteil der Neuerkrankungen 1,5% und steht an 16. Stelle. Im Mittel erkranken Männer im Alter von 60 Jahren an Karzinomen im Mund und Rachenraum, Frauen dagegen im Alter von 64 Jahren. (RKI 2010) Global betrachtet sind Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle die fünfthäufigste Tumorerkrankung. Verglichen mit Ländern aus dem asiatischen Raum, fällt die Anzahl der Neuerkrankungen an PEK in westlichen Nationen gering aus. (Mast 2009)

Die Risikofaktoren der PEK stimmen weitestgehend mit denen der OL überein. Alkoholkonsum und Tabakrauch sind bedeutsame Faktoren der Kanzerogenese, insbesondere wenn diese kombiniert vorliegen. Hier ist das Risiko 6 bis 15 mal höher an einem PEK zu erkranken als bei einem Nichtraucher und Nichttrinker. Weitere Co-Faktoren, die die Entstehung eines Karzinoms begünstigen, sind eine schlechte Mundhygiene, Vitaminmangel (Vit. A und Vit. C), chronische Entzündungen, starke Bakterienbesiedelung und schlecht sitzender Zahnersatz. (Reichart 2000)

1.1.2.3 Klinik

Mundhöhlenkarzinome kommen prinzipiell überall im Bereich der Schleimhaut vor, am häufigsten jedoch in der unteren Mundhöhlenetage, speziell im Bereich des anterioren und lateralen Mundbodens. Klinisch imponieren sie zumeist als schmerzlose Schleimhautveränderungen, die exophytisch oder endophytisch wachsen können. (Schwenzer 2010) Intraorale PEK können sich erstmals über Sprachstörungen, Schluckbeschwerden oder gegebenenfalls durch eine erschwerte Atmung bemerkbar machen. Alle Tumoren werden nach dem TNM-Schema klassifiziert. (Mast 2009)

In der initialen Behandlungsphase muss entschieden werden, ob eine kurative oder lediglich eine palliative Therapie möglich ist. Des Weiteren muss ermittelt werden, ob der Tumor operabel ist und gegebenenfalls eine Kombinationstherapie eingeleitet werden soll. Die Standardtherapie bei Operabilität ist die Tumoresektion mit lokaler Lymphknotenausräumung. Die weitere Therapie ist abhängig von der anschließenden obligaten histologischen Untersuchung (pTNM-Stadium). Ein entscheidendes Element der chirurgischen Therapie ist die plastische Wiederherstellungschirurgie. Diese Maßnahmen können prinzipiell zeitgleich mit der Tumoresektion erfolgen. Die Kombinationstherapie besteht aus einer chirurgischen Therapie, Chemotherapie oder Radiochemotherapie. Die Behandlungsreihenfolge ist abhängig vom Ausmaß der kanzerogenen Struktur und des Behandlungskonzepts. (Schwenzer 2010)

1.1.3 Lichen planus (LP)

1.1.3.1 Definition

Der Lichen Planus (LP) ist eine Haut und Schleimhaut betreffende Erkrankung mit unbekannter Pathogenese, die erstmals 1869 von Wilson beschrieben worden ist. (Wilson 1869) Es wird angenommen, dass der Lichen Planus eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung ist, die oftmals mit anderen systemischen Erkrankungen auftritt. (Eisen, Carrozzo et al. 2005)

Der orale Lichen planus (OLP) ist eine weitere Form der oralen Leukoplakie und wird zu den potentiellen Präkanzerosen der Mundhöhle gezählt. Im Gegensatz zum kutanen Lichen planus weist dieser ein viel höheres Risiko zur malignen Transformation auf. Es gibt unterschiedliche Ergebnisse über das maligne Transformationspotential des OLP. Die Werte können zwischen 0,4 und 5% variieren, abhängig davon, welcher Typ des oralen LP bzw. vorliegt. (van der Meij, Schepman et al. 1999; Mattsson, Jontell et al. 2002)

1.1.3.2 Ätiologie und Epidemiologie

Es wurden einige Faktoren beschrieben, die eine Entstehung eines OLP verursachen können. Zum einen gibt es eine genetische Disposition des Patienten, zum anderen sollen zahntechnische Materialien, Medikamente,

bakterielle und virale Infektionen, Autoimmunerkrankungen, ein schwaches Immunsystem, Lebensmittelallergien, Stress, Traumata und Diabetes eine Rolle spielen. (Sugerman, Savage et al. 2002) Es gibt viele Unstimmigkeiten über die Pathogenese des Lichen planus. Es wird vermutet, dass es sich entweder um eine Antigen-spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort, eine Autoimmunreaktion oder um eine humorale Autoimmunreaktion handelt. (Roopashree, Gondhalekar et al. 2010) Es wurde gezeigt, dass der orale Lichen planus mit anderen Autoimmunerkrankungen, wie der Myasthenia gravis, Alopecia areata, Vitiligo und der ulzerierenden Kolitits vorliegen kann. (Sugerman and Savage 2002) Des Weiteren wurde bei Patienten, die an einem OLP erkrankt waren, Antikörper gegen Desmogleine beschrieben. Dies könnte auf eine weitere Autoimmunerkrankung (Pemphigus vulgaris) deuten. (Lukac, Brozovic et al. 2006)

Die Prävalenz des oralen Lichen planus liegt bei 1 bis 2,2 % der Bevölkerung, im Vergleich dazu liegt die Prävalenz des kutanen LP bei 0,9 bis 1,2%. (Scully and el-Kom 1985) Die Erkrankung tritt am häufigsten in der fünften bis sechsten Lebensdekade auf. Frauen sind doppelt so oft wie Männer betroffen. (Bagan-Sebastian, Milian-Masanet et al. 1992; Eisen 2002) Zudem wurden auch Fälle bei Kindern und Jugendlichen beschrieben. (Jungell 1991)

1.1.3.3 Klinik

Klinisch kann sich der LP extraoral und intraoral manifestieren. Bei 15% der Patienten, die intraorale Läsionen aufweisen, konnte auch ein extraoraler Lichen planus diagnostiziert werden. (Eisen 1999) Kutane Lichen planus-Läsionen sind meist selbstlimitierend, verursachen jedoch starken Juckreiz. Der OLP hingegen weist ein chronisches Krankheitsbild auf, heilt sehr selten spontan aus und ist daher schwieriger zu therapieren.

Der OLP kann in jedem Bereich der Mundhöhle auftreten, am häufigsten jedoch auf der bukkalen Mukosa, gefolgt von der Zunge und Gingiva. Eine Läsion am Gaumen oder am Mundboden ist eher unüblich und kann daher von einer oralen Leukoplakie in dieser Region bereits klinisch abgegrenzt werden. (Silverman, Gorsky et al. 1985) Nach der klinischen Klassifikation von Andreasen kann der OLP in den retikulären, papulären, plaqueförmigen,

atrophischen, ulzerativen und bullösen Typ unterschieden werden. Diese Typen können auch kombiniert auftreten. (Andreasen 1968)

Der kutane LP tritt häufig erst mehrere Monate nach dem Auftreten oralen LP auf und ist charakterisiert durch violette Papeln auf der Haut die von feinen Streifen durchzogen sind, die sogenannten *Wickhamstreifen*.

Die histologischen Merkmale des oralen Lichen planus wurden erstmals 1906 von Dubreuilh beschrieben. (Dubreuilh 1906; Jungell 1991) Histologisch sind beide Formen (OLP und LP) durch identische Merkmale charakterisiert. Typische Befunde sind eine epidermale Hyperorthokeratose mit einer Verbreiterung des Stratum granulosum und ein subepidermales, auf die basale Epidermis übergreifendes bandförmiges lymphozytäres Entzündungsinfiltrat. Das Oberflächenepithel ist durch eine Akanthose mit inter- und intrazellulären Ödemen gekennzeichnet. Die frühe Phase des LP ist durch eine erhöhte Anzahl epidermaler Langerhanszellen charakterisiert. Differentialdiagnostische Schwierigkeiten können bei der Abgrenzung vom kutanen Lupus erythematosus, aber auch von Karzinomen ohne Dysplasien und Lupus erythematosus bestehen. (Jungell 1991)

1.2 Das p16-Protein und seine Funktion

Bei dem p16^{INK4a}-Protein handelt es sich um das Produkt eines Tumorsuppressorgens. Es besteht aus 156 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 16 kDa. (Serrano, Hannon et al. 1993) Durch die Immunopräzipitation konnte das p16^{INK4a}-Protein erstmals isoliert und mit der Zyklin D-abhängigen Kinase Cdk4 in Verbindung gebracht werden. (Serrano 1997) Ferner gehört es zur Familie der INK4- Familie, die aus den Proteinen p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d} besteht. (Guan, Jenkins et al. 1994; Hannon and Beach 1994; Hirai, Roussel et al. 1995)

Diese haben, allen voran p16, die Fähigkeit die Cdk4 und Cdk6-Kinasen zu inhibieren. (Xiong, Zhang et al. 1993) Das P16^{INK4a}-Gen ist im menschlichen Genom auf dem Chromosomenabschnitt 9p21 lokalisiert ist. (Serrano 1997) In dieser Region des menschlichen Genoms wurden zuvor bereits Tumorsuppressorgene vermutet. Diese Annahme wurde durch den Verlust

dieses Genabschnitts in etlichen humanen Tumoren begründet. Man findet das $p16^{\text{INK4a}}$ -Gen in einer Reihe von Tumorzellen in einem inaktivierten Zustand vor. (Nobori, Miura et al. 1994)

Das p16-Protein hemmt die im G_1 -Zyklus vorkommenden Zyklin D-abhängigen Cdk4 und Cdk6-Kinasen. Diese Inhibition verhindert die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins, das wiederum den Übergang von der G_1 -Phase in die S-Phase des Zellzyklus verhindert. (Todd, Hinds et al. 2002) Mutationen von p16 können einen Funktionsverlust dieses Schrittes bedeuten, der sich negativ auf die Wachstumskontrolle der Zelle auswirken kann. (Lukas, Aagaard et al. 1995)

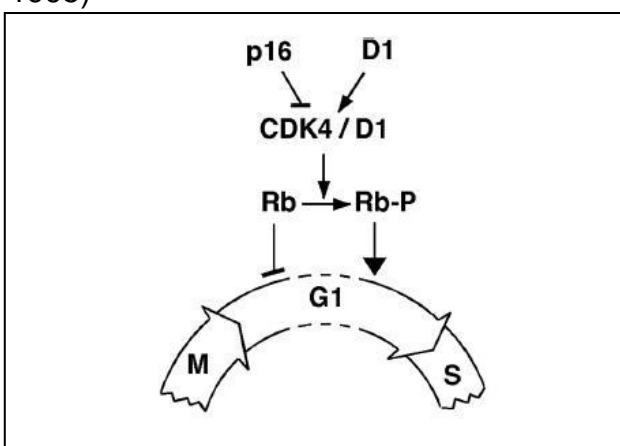


Abbildung 1: $P16^{\text{INK4a}}$ / Cdk4/Rb -Zyklus und dessen Einfluss auf die Zellzyklusregulation der G_1 -Phase (Serrano 1997)

Eine Überexpression von $p16^{\text{INK4a}}$ in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle könnte auf das humane Papillomavirus (HPV) zurückgeführt werden. Diese Hypothese hat ihren Ursprung in der Forschung über Zervixkarzinome. Hier konnte bereits die Rolle des HPV-Virus in der Kanzerogenese demonstriert werden. Die Inaktivierung des pRb durch das HPV Onkoprotein E7 und die stetige Überexpression von $p16^{\text{INK4a}}$ konnte in nahezu allen untersuchten Fällen von invasiven neoplastischen Karzinomen gezeigt werden. (Klaes, Friedrich et al. 2001), (Klaes, Benner et al. 2002) Ferner konnte nachgewiesen werden, dass $p16^{\text{INK4a}}$ schon Jahre vor der Entartung in ein malignes Karzinom im Plattenepithel der Zervix präsent ist. Daher ist die immunhistochemische Analyse von p16 zu einem außerordentlich wichtigen Faktor der

Tumordiagnostik im Bereich der Gebärmutter herangereift. (Murphy, Ring et al. 2005)

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf den Ergebnissen der Zervixkarzinomdiagnostik sollte untersucht werden, ob p16^{INK4a} als Biomarker von potenziell malignen epithelialen Mundschleimhautläsionen fungieren kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war, die immunhistochemisch bestimmbare Expression von p16^{INK4a} in Zellen von oralen Leukoplakien, Plattenepithelkarzinomen und Lichen planus miteinander zu vergleichen, um zu ermitteln, ob die p16-Expression Rückschlüsse auf die Dignität einer Mundschleimhautleukoplakie erlaubt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten Präparate stammen aus den histologischen Archiven der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitäts-Klinikums Würzburg und aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg. Alle Tumoren wurden im Gesunden exzidiert, somit konnten die tumorfreien Bereiche als Kontrolle für die immunhistologische Färbung benutzt werden.

Die zur Untersuchung verwendeten Probenbiopsien und Exzidate mit den dazugehörigen histologischen und klinischen Befunden stammen aus dem Zeitraum Mai 2000 bis Januar 2011. Hierzu gehören 50 Präparate aus der Mundschleimhautregion und 30 Präparate der äußeren Haut. Die Präparate der Mundschleimhaut gliedern sich in 15 orale Leukoplakien, 20 Plattenepithelkarzinome und in 15 Biopsien von oralem Lichen planus. Die Biopsien der epithelialen Hautoberfläche umfassen 20 Fälle des kutanen Lichen planus und 10 andere entzündliche Dermatosen wie chronische Ekzeme und Psoriasis.

Für die immunhistochemische Färbung wurde das CINtec® Histology Kit von mtm laboratories AG (Heidelberg) verwendet, das die in Tabelle 3 angeführten Reagenzien enthielt.

1	<p>Peroxidase-Blockierungsreagenz</p> <p>2 x 11,5 ml, gebrauchsfertig</p> <p>3 % Wasserstoffperoxid, enthält 15 mmol/l Natriumazid (NaN₃).</p>
2	<p>Maus Anti-Human p16</p> <p>11,5 ml, gebrauchsfertig</p> <p>Monoklonaler Maus-Antikörper, Klon E6H4 , gegen das Humanprotein p16 geliefert in 50 mmol/L Tris-Puffer, pH 7,2, enthält 15 mmol/l Natriumazid (NaN₃) und eine stabilisierende Proteinkomponente.</p>
3	<p>Visualisierungsreagenz</p>

	2 x 11,5 ml, gebrauchsfertig Polymer-Reagenz konjugiert mit Meerrettichperoxidase und affinitätsgereinigten Ziege-Anti-Maus-Antikörperfragmenten, geliefert in Stabilisatorlösung mit Konservierungsmittel und stabilisierender Proteinkomponente.
4	Negative Reagenzienkontrolle 11,5 ml, gebrauchsfertig. Monoklonaler Maus-Anti-Ratte, Oxytocin-verwandtes Neurophysin Antikörper, geliefert in 50 mmol/L Tris-Puffer, pH 7,2; enthält 15 mmol/l Natriumazid (NaN ₃) und Stabilisatorprotein.
5	DAB Substratlösung, gepuffert 31 ml Substratpufferlösung, pH 7,5, enthält < 0,1 % Wasserstoffperoxid, Stabilisatoren, Beschleuniger und eine antimikrobielle Substanz.
6	DAB Chromogen 0,85 ml, 3,3'-Diaminobenzidin-Chromogenlösung.
7	Epitop-Demaskierungslösung 10 x 500 mL, 100 mmol/L Tris-Puffer pH 9, enthält 10 mmol/L EDTA und 15 mmol/L Natriumazid (NaN ₃).

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien des CINtec Histology Kits (mtm laboratories AG Heidelberg)

2.2 Immunhistochemische Darstellung p16^{JNK4a}

2.2.1 Präparategewinnung und Herstellung der Paraffinschnitte

Nach der 18 – 24 Stunden dauernden Fixierung der Biopsieproben in neutral-gepuffertem Formalin und der sich anschließenden Herstellung von 3-4 mm dicken Blöcken werden diese in einer Reihe von Alkoholen und Xylol dehydriert und anschließend bei höchstens 60°C mit geschmolzenem Paraffin infiltriert. Ausgehend von diesen Paraffinblöcken werden 4µm dicke Schnitte hergestellt und auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgebracht.

2.2.2 Entparaffinierung und Rehydratisierung

Da die Präparate zunächst in Paraffin eingebettet vorlagen, müssen diese vor dem Färbevorgang entparaffiniert werden. Dafür müssen die Objektträger vorher mindestens 20 Minuten bei maximal 60°C im Trockenschrank gelegen

haben. Hierbei werden einerseits alle Wasserreste entfernt, so dass die Anhaftung auf dem Objektträger verbessert wird. Des Weiteren wird dadurch das Paraffin geschmolzen. Um das Paraffin vollständig zu entfernen, werden die Schnitte bei Umgebungstemperatur (20-25°C) zweimal für fünf Minuten in eine Xyloalküvette gestellt und anschließend werden diese in der absteigenden Alkoholreihe für jeweils fünf Minuten rehydratisiert. Nachdem alle Paraffinreste vollständig entfernt worden sind, werden die Schnitte für 30 Sekunden in Aqua dest. getaucht.

2.2.3 Wärmebehandlung mit Epitopdemaskierungslösung

Die Epitopdemaskierungslösung wird 1:10 verdünnt und in einem Wasserbad auf 95-99°C erwärmt. Alle vorhandenen entparaffinierten Schnitte werden in vorgewärmte Demaskierungslösung getaucht und dabei 20 Minuten lang in einem Wasserbad gekocht. Anschließend werden die Schnitte in einem Waschpuffer der Firma CINtec gewaschen.

2.2.4 Hemmung der endogenen Peroxidase

Durch Inkubation der Gewebeproben mit dem Peroxidase-Blockierungsreagenz wird die Gewebeeigende Peroxidase blockiert, sodass eine diffuse Färbung der Schnitte verhindert wird. Dieser Vorgang dauert fünf Minuten, anschließend werden die Objektträger erneut für fünf Minuten im Waschpuffer gelagert und gewaschen.

2.2.5 Auftragen des Maus Anti-Human p16^{INK4a}-Antikörpers

Hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper, Klon E6E4[®], das gegen das Humanprotein p16^{INK4a} gerichtet ist. Die Proben werden mit 200 µl Primärantikörper bedeckt und damit für 30 Minuten inkubiert. Anschließend werden die Schnitte erneut für fünf Minuten in einem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird die Probe mit 200 µl des Visualisierungsreagenz für 30 Minuten inkubiert und erneut gewaschen.

2.2.6 Entwicklungsvorgang mit Substratchromogenlösung (DAB)

Um die Reaktion des Visualisierungsreagenz sichtbar machen zu können, werden die Präparate mit DAB für 10 Minuten mit 200µl inkubiert. Dabei bildet sich ein brauner in Alkohol und H₂O unlöslicher Farbstoff, der die positiven

Zellen anfärbt. Die Objektträger werden nun vorsichtig mit Aqua dest. gespült und für die Gegenfärbung mit Hämatoxylin vorbereitet.

2.2.7 Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eindecken

Die Schnitte werden in ein Hämatoxylinbad getaucht und für zwei Minuten inkubiert. Die Objektträger werden nun in Leitungswasser vorsichtig gespült, bis alle Hämatoxylinreste vollständig entfernt sind. Je nach Stärke können die Zellkerne eher hell oder dunkel angefärbt werden, was zu einer Beeinträchtigung der Ergebnisse führen kann. Anschließend werden die Objektträger mit Aquatex[®] wässrig eingedeckt.

2.3 Mikroskopische Auswertung und Interpretation

Die immunhistologische p16^{INK4a}-Färbung wurde in den Laboratorien für Histologie und Autoimmundiagnostik der Universitätshautklinik Würzburg selbstständig von mir durchgeführt und ausgewertet. Durch die heterogene Färbung der Präparate wurde die Auszählung der pro 1000 gefärbten Zellen auf drei verschiedene Flächen ausgeweitet. Um einen Durchschnittswert zu erzielen, wurden die Werte summiert und durch die Anzahl der ausgewerteten Flächen dividiert. Hatte ein Schnitt weniger als 1000 Zellen, wurden die Werte proportional hochgerechnet. Wurden beispielsweise nur 30 Zellen von 500 angefärbt, wurden 60 pro 1000 Zellen angenommen. Hierbei wurde auf folgende histologische Merkmale Wert gelegt. Es wurde zwischen einer nukleären und einer zytoplasmatischen Färbung unterschieden. Eine Färbung wurde als positiv bewertet, wenn eine p16-Expression im Zellkern oder im Zytoplasma mikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wurden alle Tumoren nach dem unterschiedlich starken Ausmaß der p16-Expression unterteilt. Wies ein Präparat in der epidermalen Zellschicht überhaupt keine Färbung auf, wurde es als negativ bewertet. Abhängig von der Anzahl und Stärke der gefärbten Zellen wurden noch drei weitere Färbegrade bestimmt, die sich wie folgt unterteilen: Es wurde zwischen einer schwachen, einer starken und einer sehr starken p16-Expression unterschieden. Bei allen Präparaten wurden die angefärbten Zellen der Epidermis untersucht.

Diese Kriterien wurden für die einzelnen Tumoren statistisch ausgewertet und miteinander verglichen. Um Fehlinterpretationen der p16-Diagnostik zu

verhindern, wurde von allen angefertigten Schnitten eine HE-Färbung angefertigt und angesehen.

Zur mikroskopischen Auswertung wurde ein binokulares Mikroskop der Firma Olympus verwendet (Typ BH-2). Die Präparate wurden unter 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Ergänzend wurden alle Präparate mit Herrn Dr. med Hermann Kneitz, Facharzt für Pathologie und Dermatologie, besprochen. Einzelne Fälle wurden in der pathohistologischen Konferenz (PHK) mit Frau Prof. Bröcker diskutiert.

2.4 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS, Version 18.0 und Microsoft Excel 2007.

Für die graphischen Darstellungen wurden hauptsächlich Boxplots verwendet. Boxplot-Diagramme dienen dazu, die Lage und Verteilung der Werte einer Variablen zu beschreiben. Hierbei gibt ein Boxplot nicht die gesamte Verteilung im Detail wieder, sondern kennzeichnet lediglich die Lage ausgewählter Kenngrößen wie den Median, das 25%- und das 75%-Perzentil sowie einzelne Ausreißer. Diese Art von Darstellung ist besonders hilfreich um Verteilungen miteinander zu vergleichen. (Felix 2010)

Für die tabellarische Darstellung der Fälle wurden die Mittel der deskriptiven Statistik herangezogen. Hierzu wurden Kreuztabellen benutzt, die tabellarisch die Ergebnisse mit verschiedenen Variablen vergleichen.

Um die einzelnen Tumoren untereinander auf Signifikanz zu prüfen, wurden der Kruskal-Wallis-Test und der Chi-Quadrat-Test verwendet. Die Interpretation des Kruskal-Wallis-Test ist grundsätzlich mit der parametrischen einfaktoriellen ANOVA identisch, bis auf die Tatsache, dass der Kruskal-Wallis-Test auf Rängen statt Mittelwerten basiert. Jeder statistische Test liefert einen p-Wert, die sogenannte Irrtumswahrscheinlichkeit p . Bei welcher Irrtumswahrscheinlichkeit man sich entschließt, einen Test als signifikant gelten zu lassen, ist arbiträr. Es ist üblich, Aussagen von $p \leq 0,05$ als signifikant zu bezeichnen.

Für die durchgeführten Versuche wurde somit ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Die Fälle von benignen und malignen Haut- und Schleimhautläsionen stammen aus dem Zeitraum von Mai 2000 bis Januar 2011. Der jüngste Patient war bei der Untersuchung 8 Jahre und der Älteste 89 Jahre alt. Im Mittel lag das Alter bei 62,13 Jahren (Standardabweichung $\pm 16,23$) von insgesamt 80 verwendeten Fällen. Bei den männlichen Patienten lag das Durchschnittsalter bei 58,00 Jahren (Standardabweichung $\pm 16,00$) und bei den weiblichen Patienten lag das Mittel bei 64,60 Jahren (Standardabweichung $\pm 16,02$). Es wurden insgesamt 30 männliche Patienten und 50 weibliche Patienten für die Auswertung der Ergebnisse untersucht, sodass insgesamt 80 immunhistochemische Färbungen erstellt wurden. Die untersuchten Fälle bestehen aus 15 oralen Leukoplakien, von denen 11 gering dysplastische und 4 hochdysplastische Veränderungen aufwiesen. Ferner wurden 20 Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle untersucht und zusätzlich 35 Präparate des Lichen planus. Von diesen waren 15 aus der oralen Region und 20 stammten von der epithelialen Hautoberfläche. Um den kutanen Lichen planus von anderen entzündlichen Dermatosen abzugrenzen, wurden daraufhin 10 entzündliche Veränderungen der Hautoberfläche immunhistochemisch mit untersucht.

Patientenkollektiv p16-Untersuchung

Geschlecht	Diagnose	N	Alter	Alter	Standardabweichung
			Median	Mittelwert	
männlich	Oraler Lichen planus	7	60,00	61,43	$\pm 7,635$
	Kutaner Lichen planus	10	57,50	51,70	$\pm 19,760$
	Dysplasie I	4	61,00	61,50	$\pm 13,178$
	Dysplasie II III	3	69,00	66,00	$\pm 15,716$
	Plattenepithelkarzinom	2	64,00	64,00	$\pm 2,828$
	Entzündliche Dermatose	4	62,00	55,25	$\pm 23,908$
	Insgesamt	30	62,00	58,00	$\pm 16,000$
weiblich	Oraler Lichen planus	8	59,50	61,00	$\pm 16,886$
	Kutaner Lichen planus	10	64,00	62,00	$\pm 12,046$

	Dysplasie I	7	57,00	58,14	±17,771
	Dysplasie II III	1	49,00	49,00	
	Plattenepithelkarzinom	18	70,50	71,50	±10,645
	Entzündliche Dermatose	6	70,50	63,17	±27,838
	Insgesamt	50	67,50	64,60	±16,019
Insgesamt	Oraler Lichen planus	15	60,00	61,20	±12,946
	Kutaner Lichen planus	20	60,50	56,85	±16,781
	Dysplasie I	11	57,00	59,36	±15,635
	Dysplasie II III	4	59,00	61,75	±15,392
	Plattenepithelkarzinom	20	70,00	70,75	±10,351
	Entzündliche Dermatose	10	69,00	60,00	±25,254
	Insgesamt	80	64,00	62,13	±16,232

Tabelle 3: Patientenkollektiv zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchung (n=80, Altersmittel 62,13 ±16,23)

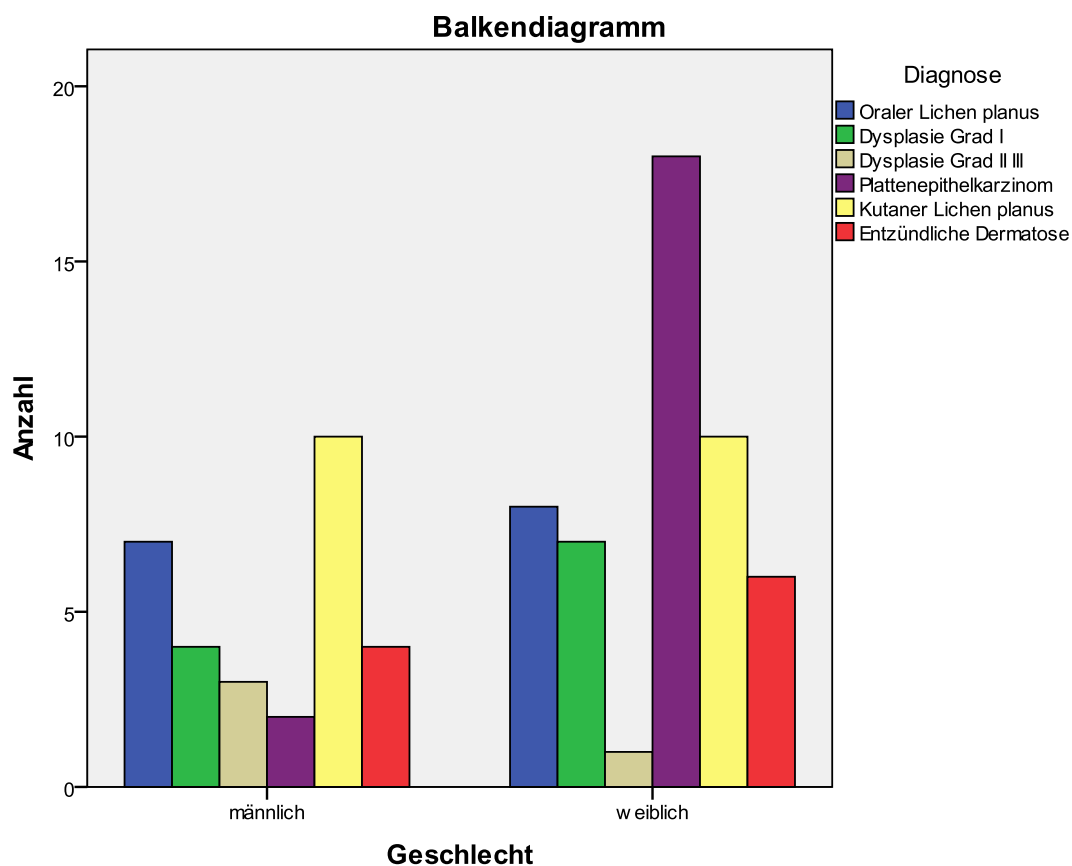


Abbildung 2: Balkendiagramm – Verteilung der untersuchten Erkrankungen abhängig vom Geschlecht des Patientenkollektivs

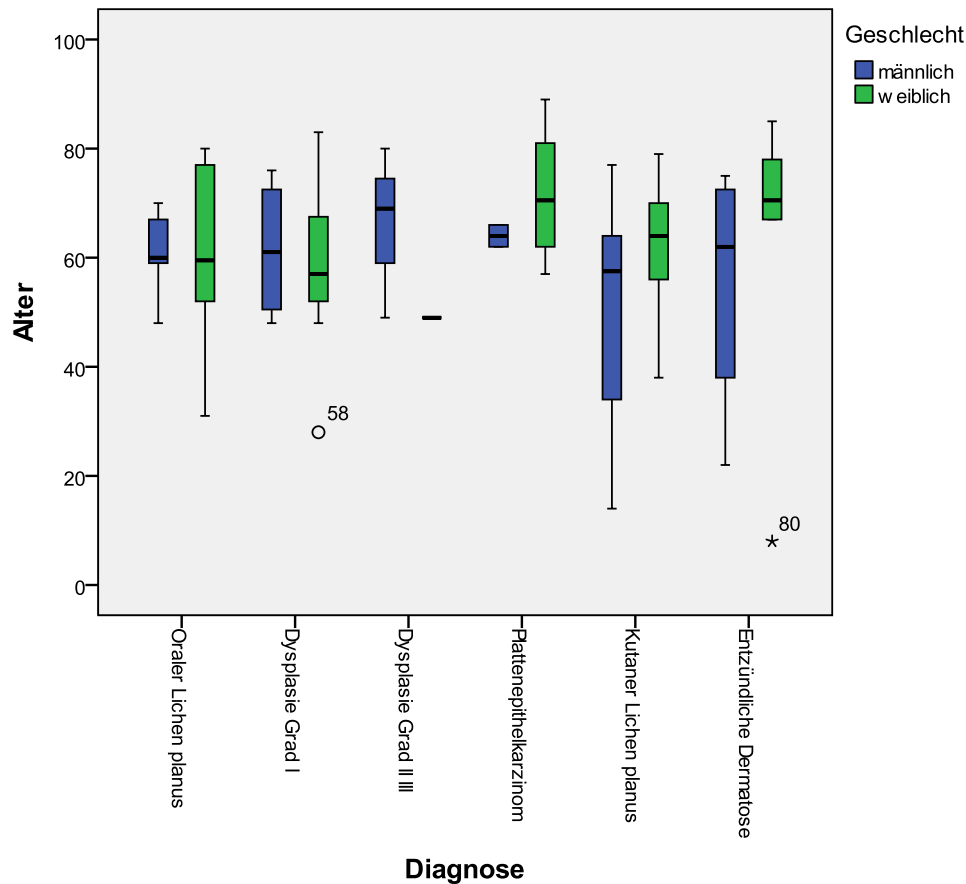


Abbildung 3: Boxplot – Verteilung männlicher und weiblicher Patienten im Bezug zum Erkrankungsalter

Wie oben beschrieben, lag das Mittel der untersuchten Patienten bei 62,13 Jahren. Bei der Beschreibung der einzelnen Tumoren fällt in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht auf, dass Patienten beider Geschlechter am oralen Lichen etwa im selben Alter von circa 61 Jahren ($\pm 12,94$) erkrankten.

Beim Lichen planus fällt auf, dass Männer durchschnittlich 10 Jahre früher an einem oralen Lichen planus erkranken bzw. ein Lichen planus der Haut diagnostiziert wird.

Die Auswertung der Plattenepithelkarzinome ergab ein ähnliches Bild wie das des Lichen planus. Hier erkrankten die männlichen Patienten im Schnitt sieben Jahre früher an einem Karzinom der Mundhöhle als die weiblichen Patienten.

Das mittlere Erkrankungsalter bei Männern lag bei 64 Jahren und bei Frauen bei 71,8 Jahren.

Die oralen Leukoplakien zeigten eine ausgeglichene Altersverteilung beider Geschlechter. Im Mittel erkrankten beide Geschlechter im Alter von circa 60 Jahren an einer dysplastischen Veränderung der Mundhöhle. Der Gesamtdurchschnitt betrug 59,36 Jahre ($\pm 15,64$).

Das Auftreten von entzündlichen Dermatosen kam bei männlichen Patienten im Schnitt acht Jahre früher vor als bei weiblichen Patienten. Männer erlitten im Mittel im Alter von 55,25 Jahren an einer ED und Frauen im Schnitt mit 63,17 Jahren. Der Gesamtdurchschnitt betrug 60 Jahre ($\pm 25,25$).

Um die Ergebnisse auf ihre Signifikanz zu überprüfen, wurde eine Diskriminanzanalyse durchgeführt.

Gleichheitstest der Gruppenmittelwerte					
	Wilks-Lambda	F	df1	df2	Signifikanz
Geschlecht	,866	2,299	5	74	,053
Alter	,895	1,737	5	74	,137

Tabelle 4: Gleichheitstest der Gruppenmittelwerte in Abhängigkeit der Variablen Geschlecht und Alter

Der Test ergab, dass die unterschiedlichen Diagnosen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht im Vergleich nicht signifikant waren. Der Vergleich Alter mit Diagnose ergab eine Signifikanz von 0,137 und der Vergleich Geschlecht mit Diagnose ergab eine Signifikanz von 0,053.

3.2 Auswertung der immunhistochemischen p16^{INK4a} Färbung

Die Färbungen wurden anhand zweier Kriterien untersucht. Zum einen wurden die Tumoren nach ihrer Färbeintensität eingestuft und zum anderen wurden die einzelnen Kompartimente der Zelle anhand ihrer p16-Expression begutachtet. Bei der Färbeintensität wurden vier Grade unterschieden.

- Grad 0: negativen p16-Expression
- Grad 1: schwache p16-Expression
- Grad 2: starke p16-Expression
- Grad 3: sehr starke p16-Expression

3.2.1 Ergebnisse der p16-Expression in Abhängigkeit der Farbintensität

		P16-Expression * Diagnose Kreuztabelle								Gesamt	
		P16-Expression									
		negativ		schwach		stark		sehr stark			
		n	%	N	%	n	%	n	%	n	%
Diagnose	Oraler Lichen planus	1	6,7%	3	20,0%	6	40,0%	5	33,3%	15	1,0E2%
	Kutaner Lichen planus	1	5,0%	6	30,0%	6	30,0%	7	35,0%	20	1,0E2%
	Dysplasie I	7	63,6%	4	36,4%	0	,0%	0	,0%	11	1,0E2%
	Dysplasie II III	1	25,0%	3	75,0%	0	,0%	0	,0%	4	1,0E2%
	Plattenepithelkarzinom	15	75,0%	1	5,0%	0	,0%	4	20,0%	20	1,0E2%
	Entzündliche Dermatose	9	90,0%	1	10,0%	0	,0%	0	,0%	10	1,0E2%
Gesamt		34	42,5%	18	22,5%	12	15,0%	16	20,0%	80	1,0E2%

Tabelle 5: Intensität der epidermalen P16-Expression der untersuchten Erkrankungen

Anhand von Tabelle 6 lässt sich die unterschiedlich starke p16-Expression der einzelnen Diagnosegruppen ablesen. Insgesamt stellt sich die p16-Expression als inhomogen dar. Den geringsten Anteil an negativen Färbungen stellen die Präparate des oralen und des kutanen Lichen planus. Hier wies jeweils ein Fall keine Expression des p16-Proteins auf. Die gering dysplastischen Veränderungen haben mit 63,6% einen sehr großen Anteil negativer Färbung, im Gegensatz dazu weisen die hoch dysplastischen Mundschleimhautläsionen mit 25% an negativen Fällen eine vergleichsweise geringe Anzahl auf. Etwa 75% der 20 untersuchten Plattenepithelkarzinome wiesen eine negative p16-

Expression im invasiven Anteil des Tumors auf (Abb.12 und 13). Die entzündlichen Dermatosen waren alle bis auf einen untersuchten Fall negativ und zeigten keine epidermale Expression des p16-Proteins in der epidermalen Zellschicht nicht exprimieren. Den höchsten Anteil an starker bis sehr starker p16-Expression wiesen die Fälle des Lichen planus beider untersuchter Regionen auf. Die Plattenepithelkarzinome zeigten nach dem Lichen planus den zweitstärksten Anteil an sehr starker p16-Expression. Die dysplastischen Veränderungen zeichneten sich insgesamt in allen positiven Fällen durch eine schwache p16-Expression aus. In der nachfolgenden Abbildung wurde die Verteilung graphisch anhand eines Balkendiagramms dargestellt.

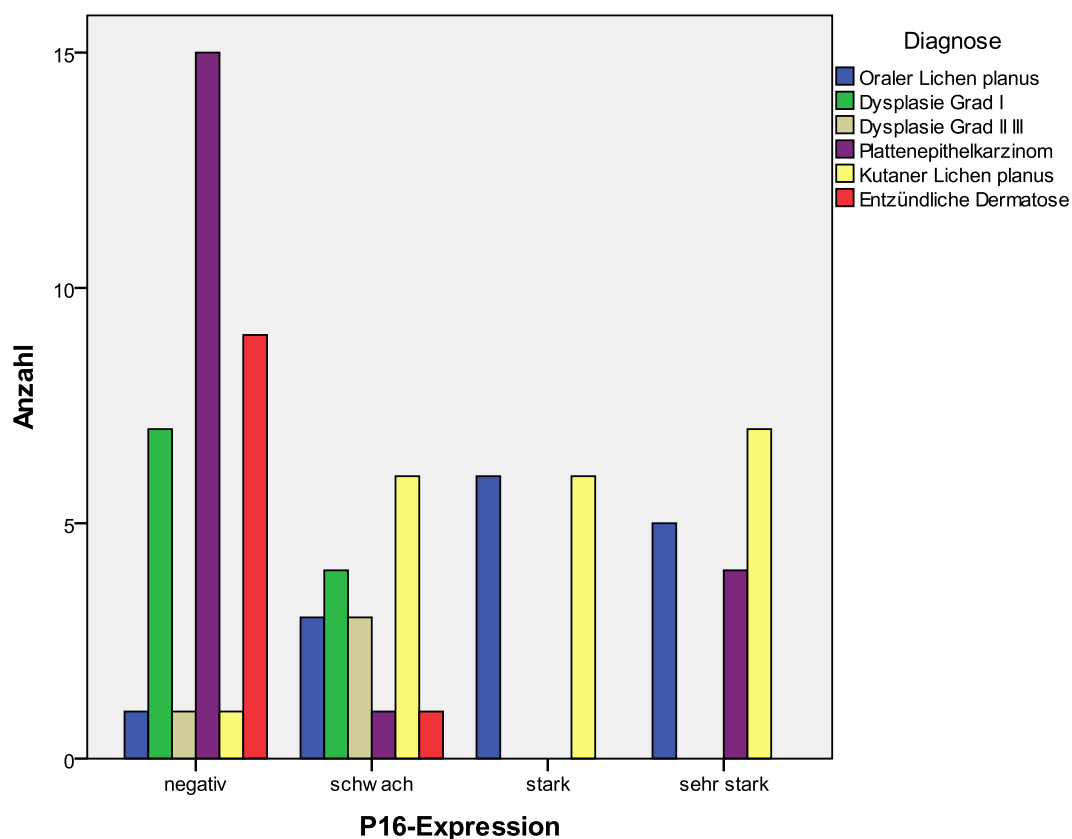


Abbildung 4: Stärke der epidermalen p16-Expression bei den untersuchten Erkrankungen

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	Df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	57,255 ^a	15	,000
Likelihood-Quotient	69,361	15	,000
Zusammenhang linear-mit-linear	24,253	1	,000
Anzahl der gültigen Fälle	80		

a. 21 Zellen (87,5%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,60.

Tabelle 6: Chi-Quadrat-Test der Farbintensität in Abhängigkeit zu der Diagnose

Um die Signifikanz der verschiedenen Diagnosen in Abhängigkeit zur Farbintensität der p16-Expression zu überprüfen, wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Mit einer asymptotischen Signifikanz von $p=0,000$ waren die immunhistochemischen p16-Färbungen in Abhängigkeit der oben genannten Kriterien signifikant.

3.2.2 P16-Expression innerhalb der Zellkompartimente

Die nachfolgende Tabelle (Tab.7) zeigt eine Übersicht aller immunhistochemisch untersuchten Fälle. Bei dieser Auswertung wurden die Zellen der epidermalen Zellschicht ausgezählt, die das p16-Protein exprimiert haben. Hierbei wurde die Färbung nicht anhand der Intensität, sondern anhand der Anzahl der gefärbten Zellen untersucht. Ferner wird zwischen einer zytoplasmatischen, einer nukleären und einer Färbung beider Zellkompartimente unterschieden.

Auszählung pro 1000 untersuchter Zellen

Diagnose		Nr	Zellkern	Zytoplasma Zellkern	Zytoplasma
Oraler Lichen planus	1	21	3	60	590
	2	22	2	12	420
	3	23	3	13	180
	4	24	5	17	206
	5	25	2	10	120
	6	26	3	5	83
	7	27	1	32	156
	8	28	2	10	223
	9	29	3	22	148
	10	30	0	22	78
	11	31	0	4	12
	12	32	5	150	668
	13	33	3	140	325
	14	34	2	87	274
	15	35	5	12	440
	Insgesamt		15	15	15
Kutaner Lichen planus	1	1	0	5	80
	2	2	0	3	40
	3	3	0	3	164
	4	4	3	15	267
	5	5	8	80	520
	6	6	3	75	450
	7	7	0	5	15
	8	8	5	82	145
	9	9	2	25	220
	10	10	5	264	424
	11	11	4	20	680
	12	12	2	22	180
	13	13	0	10	44
	14	14	5	65	70
	15	15	10	60	650
	16	16	5	37	370
	17	17	6	140	260
	18	18	2	20	87
	19	19	0	10	25
	20	20	2	56	346
	Insgesamt		20	20	20
Dysplasie I	1	56	0	0	0

	2	57	1	12	36
	3	58	0	0	0
	4	59	0	2	2
	5	60	0	6	65
	6	61	0	2	60
	7	62	0	10	45
	8	63	0	0	0
	9	64	0	0	10
	10	65	0	0	0
	11	66	0	0	5
	Insgesamt		11	11	11
Dysplasie II III	1	67	0	0	45
	2	68	0	0	0
	3	69	0	0	60
	4	70	0	0	55
	Insgesamt		4	4	4
Plattenepithelkarzinom	1	36	17	150	402
	2	37	22	324	412
	3	38	18	280	552
	4	39	0	10	13
	5	40	1	12	15
	6	41	15	21	23
	7	42	3	12	10
	8	43	2	15	18
	9	44	3	12	16
	10	45	0	5	5
	11	46	0	6	8
	12	47	8	325	452
	13	48	2	11	12
	14	49	0	3	5
	15	50	3	12	17
	16	51	3	15	20
	17	52	2	12	10
	18	53	0	3	6
	19	54	0	5	8
	20	55	3	22	52
	Insgesamt		20	20	20
Entzündliche Dermatose	1	71	0	0	2
	2	72	0	0	2
	3	73	0	0	7

	4	74	0	0	4
	5	75	0	12	62
	6	76	0	0	3
	7	77	0	0	3
	8	78	0	0	4
	9	79	0	0	5
	10	80	0	0	6
	Insgesamt		10	10	10
Insgesamt	N		80	80	80

Tabelle 7: Auszählung der gefärbten Zellen

Die Auswertung der angefärbten Zellen wurde in der nachfolgenden Tabelle so zusammengefasst, dass sich pro Diagnosetyp und Art der Färbung ein Mittelwert und Medianwert ergibt. Der Median wurde zusätzlich angegeben, um Ausreißer in der Statistik zu kompensieren.

Zusammenfassung der untersuchten Fälle

Diagnose		Zellkern	Zytoplasma und Zellkern	Zytoplasma
Oraler Lichen planus	N	15	15	15
	Mittelwert	2,60	39,73	261,53
	Median	3,00	17,00	206,00
	Standardfehler des Mittelwertes	,412	12,453	49,634
Kutaner Lichen planus	N	20	20	20
	Mittelwert	3,10	49,85	251,85
	Median	2,50	23,50	200,00
	Standardfehler des Mittelwertes	,644	13,867	46,354
Dysplasie I	N	11	11	11
	Mittelwert	,09	2,91	20,27
	Median	,00	,00	5,00
	Standardfehler des Mittelwertes	,091	1,331	7,836
Dysplasie II III	N	4	4	4
	Mittelwert	,00	,00	40,00

	Median	,00	,00	50,00
	Standardfehler des Mittelwertes	,000	,000	13,693
Plattenepithelkarzinom	N	20	20	20
	Mittelwert	5,10	62,75	102,80
	Median	2,50	12,00	15,50
	Standardfehler des Mittelwertes	1,559	24,877	40,861
Entzündliche Dermatose	N	10	10	10
	Mittelwert	,00	1,20	9,80
	Median	,00	,00	4,00
	Standardfehler des Mittelwertes	,000	1,200	5,823
Insgesamt	N	80	80	80
	Mittelwert	2,55	36,15	143,71
	Median	1,00	11,50	48,50
	Standardfehler des Mittelwertes	,473	7,844	21,220

Tabelle 8: Zusammenfassung der Mittelwerte und Mediane pro 1000 ausgezählte Zellen.

Die Tabellen 8 und 9 beschreiben die unterschiedliche Verteilung der p16 gefärbten Zellen innerhalb der verwendeten Tumoren und Läsionen. Im Folgenden werden die untersuchten Fälle miteinander auf Signifikanz verglichen und in den einzelnen Färbereichen getestet. Hierzu wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Um die Färbungen in den einzelnen Zellkompartimenten graphisch darzustellen, wurden Boxplots verwendet.

3.2.2.1 P16-Expression im Zellkern

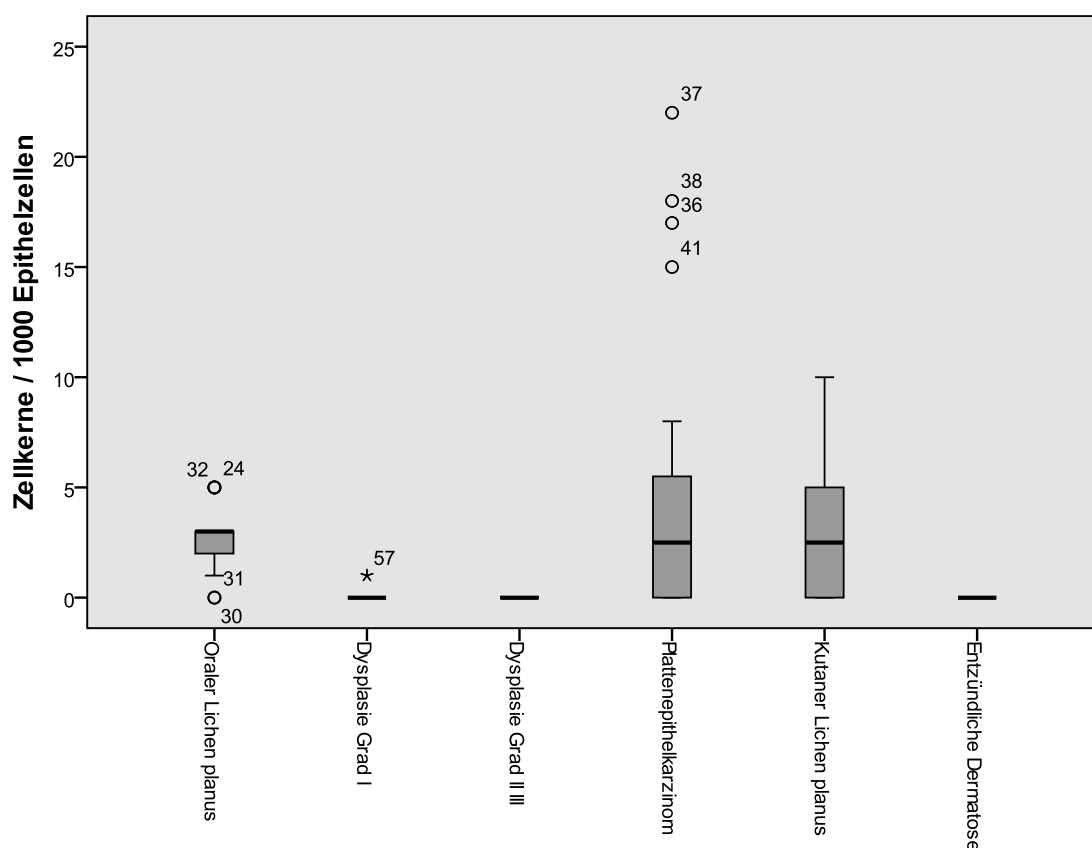


Abbildung 5: Boxplot - Zellkernfärbung pro 1000 Zellen aller Biopsien

Die dysplastischen Läsionen der Mundhöhle zeichnen sich durch eine sehr schwache bis gar keine p16-Expression im Bereich der Zellkerne aus. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Untersuchung der entzündlichen Dermatosen. Auffällig sind jedoch die in Relation dazu stehenden Befunde des kutanen Lichen planus und der Plattenepithelkarzinome. Anhand der grafischen Darstellung des Boxplots in Abbildung 4 lässt sich herauslesen, dass in den Fällen der Plattenepithelkarzinome Nr. 36, 37, 38 und Nr. 41 die Zellkernexpression vergleichsweise erhöht ist. (Abb.14b) Beim genaueren Betrachten der Lokalisation fiel auf, dass sich die ersten drei genannten Fälle in der Unterlippenregion befanden. Bei den Plattenepithelkarzinomen ist darauf hinzuweisen, dass hier der invasive Anteil des Tumors untersucht wurde. Lichen planus wiesen im Allgemeinen unabhängig von ihrer Lokalisation eine sehr starke p16-Expression auf. (Abb.16a und 16b) Hier fiel besonders auf, dass Lichen planus mit einer ausgeprägten dysplastischen Veränderung p16

stärker exprimiert haben. Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse lässt sich im Allgemeinen sagen, dass die p16 Expression im Zellkern, verglichen mit anderen Kompartimenten der Zelle, sehr gering ausfällt. Es muss jedoch auch darauf hingewiesen werden, dass die Zellkerne in der zytoplasmatisch-nukleären Auszählung ebenso mit angefärbt sind und sich diese Auszählung ausschließlich auf Zellen beschränkt, die p16 nur im Zellkern exprimiert haben.

Um die Signifikanz zwischen den einzelnen Diagnosen zu prüfen, wurde der Kruskal-Wallistest verwendet.

Ränge		
Diagnose	N	Mittlerer Rang
Zellkern Oraler Lichen planus	15	51,10
Kutaner Lichen planus	20	49,33
Dysplasie I	11	21,36
Dysplasie II III	4	19,50
Plattenepithelkarzinom	20	48,95
Entzündliche Dermatose	10	19,50
Gesamt	80	

Statistik für Test ^{a,b}	
	Zellkern
Chi-Quadrat	31,079
Df	5
Asymptotische Signifikanz	,000

a. Kruskal-Wallis-Test

b. Gruppenvariable: Tumor

Tabelle 9: Kruskal-Wallis-Test Zellkernfärbung

Nach Durchführung des Kruskal-Wallis-Test konnte anhand der asymptotischen Signifikanz gezeigt werden, dass die Ergebnisse dieses Vergleiches signifikant waren ($p=0,000$).

ONEWAY ANOVA

Zellkern

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	293,691	5	58,738	3,887	,003
Innerhalb der Gruppen	1118,109	74	15,110		
Gesamt	1411,800	79			

Tabelle 10: Einfaktorielle Anova der Zellkernmittelwerte innerhalb der Diagnosegruppen

Des Weiteren wurden die Mittelwerte der einzelnen Gruppen auf ihre Signifikanz überprüft. Hier fand die einfaktorielle ANOVA Anwendung. Der Test ergab eine Signifikanz von $p= 0,003$ und daher werden die Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosegruppen als signifikant bewertet.

3.2.2.2 *P16-Expression im Zellkern und Zytoplasma*

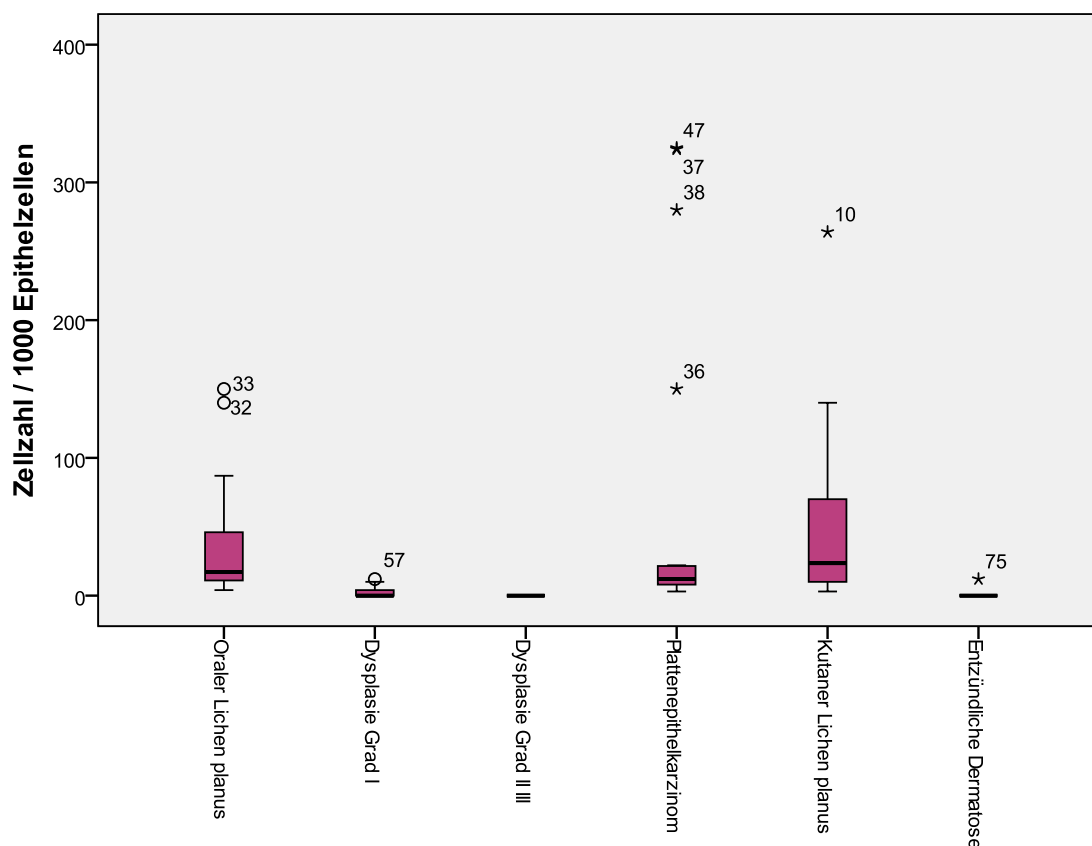


Abbildung 6: Boxplot - Zellkern und Zytoplasmafärbung pro 1000 Zellen aller Biopsien

Wie bereits bei der Expression der Zellkerne beschrieben, zeigen die dysplastischen Veränderungen in beiden Zellkompartimenten so gut wie keine p16-Expression. Die entzündlichen Dermatosen sind nahezu alle negativ, bis auf einen untersuchten Fall, der eine leichte p16-Expression aufweist. Der Lichen planus der Haut und Mundschleimhaut zeigt im Gegensatz dazu eine außerordentlich starke Färbung der Zellen. Bei den untersuchten Fällen stellen die Plattenepithelkarzinome die drittstärkste Fraktion. Auffällig ist hier, dass die vier oben genannten Karzinome die höchste p16-Expression von allen untersuchten Biopsien haben (Abb. **14a** und **14b**). Die restlichen Fälle der Plattenepithelkarzinome weisen eine sehr schwache bis negative Färbung im maligne infiltrierten Bereich des Präparates auf.

Ränge		N	Mittlerer Rang
Diagnose			
Zytoplasma Zellkern	Oraler Lichen planus	15	52,77
	Kutaner Lichen planus	20	54,33
	Dysplasie I	11	19,55
	Dysplasie II III	4	10,00
	Plattenepithelkarzinom	20	48,60
	Entzündliche Dermatose	10	13,50
	Gesamt	80	

Statistik für Test ^{a,b}	
	Zytoplasma Zellkern
Chi-Quadrat	43,713
Df	5
Asymptotische Signifikanz	,000

a. Kruskal-Wallis-Test

b. Gruppenvariable: Tumor

Tabelle 11: Kruskal-Wallis Test Zytoplasma und Zellkernfärbung

Die Ergebnisse des Kruskal-Wallis Test zeigen, dass die unterschiedliche Zytoplasma- und Zellkernfärbung signifikant ist ($p=0,000$).

ONEWAY ANOVA

Zytoplasma Zellkern

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	47694,458	5	9538,892	2,069	,039
Innerhalb der Gruppen	341137,742	74	4609,969		
Gesamt	388832,200	79			

Tabelle 12: Einfaktorielle ANOVA der Zellkern und Zytoplasmafärbung

Der ANOVA-Test ergab eine Signifikanz von $p= 0,039$ und daher werden die Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosegruppen als signifikant bewertet.

3.2.2.3 *P16-Expression im Zytoplasma*

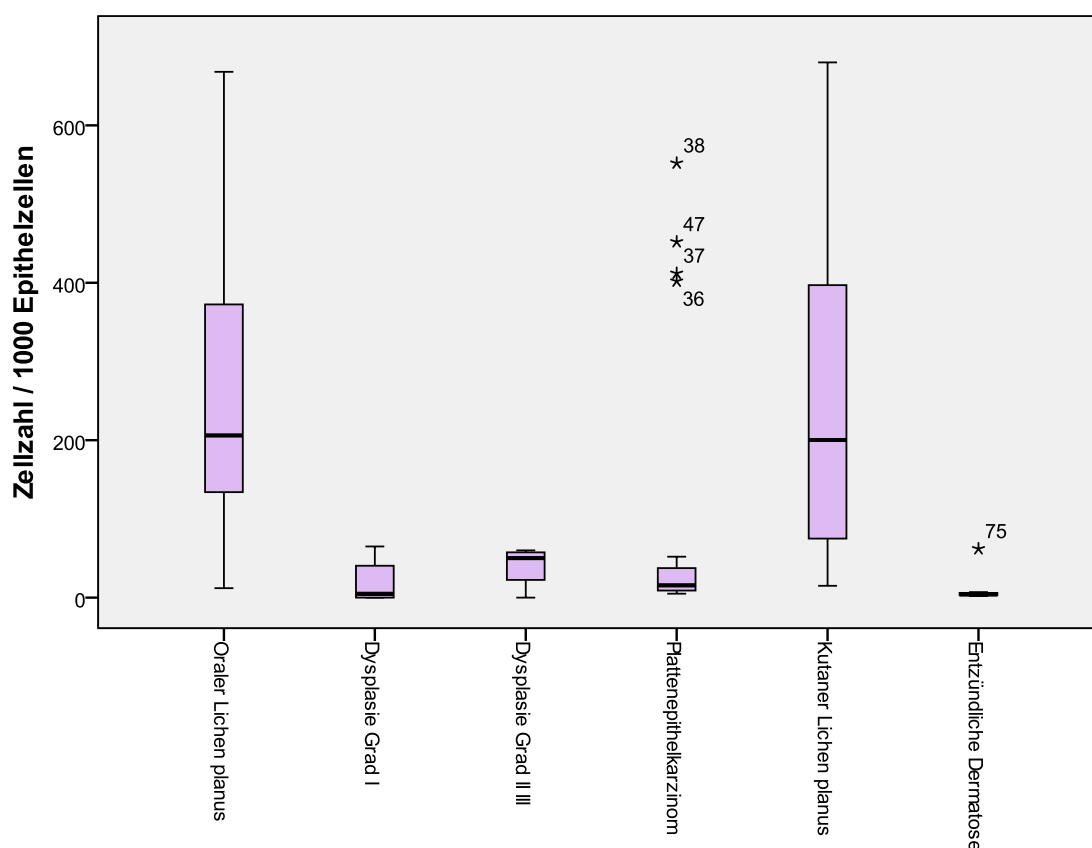


Abbildung 7: Boxplot - Zytoplasmafärbung pro 1000 Zellen aller Biopsien

Die graphische Darstellung zeigt eine außerordentliche hohe p16-Expression im Zytoplasma des oralen Lichen planus und des kutanen Lichen planus. Ca. 25% der ausgezählten Zellen weisen eine zytoplasmatische Färbung auf. In der grafischen Darstellung werden Fälle beschrieben, die eine Färbung von mehr als 650 Zellen besitzen. Bei der rein zytoplasmatischen Färbung ist ein Großteil der Plattenepithelkarzinome negativ, ähnlich der vorherigen Darstellung. Erneut zeigen die Fälle 36, 37, 38 und 47 eine sehr hohe Anzahl von angefärbten Zellen. Die dysplastischen Veränderungen sind vergleichsweise schwach angefärbt und zeigen keine Fälle mit einer sehr starken p16-Expression im Zytoplasma. Nur die entzündlichen Dermatosen sind nahezu alle bei dieser Darstellung negativ (Abb.18 und 19) Daher wurden diese in Kapitel 3.2.1 zu 90% als negativ beschrieben.

Ränge		
Diagnose	N	Mittlerer Rang
Zytoplasma		
Oraler Lichen planus	15	59,27
Kutaner Lichen planus	20	57,35
Dysplasie I	11	20,14
Dysplasie II III	4	32,00
Plattenepithelkarzinom	20	35,13
Entzündliche Dermatose	10	15,20
Gesamt	80	

Statistik für Test ^{a,b}	
	Zytoplasma
Chi-Quadrat	42,228
Df	5
Asymptotische Signifikanz	,000

a. Kruskal-Wallis-Test

b. Gruppenvariable: Tumor

Tabelle 13: Kruskal-Wallis Test Zytoplasmafärbung

Der Unterschied zwischen den einzelnen Diagnosetypen konnte auch in der zytoplasmatischen Färbung als signifikant nachgewiesen werden ($p=0,000$).

ONEWAY ANOVA

Zytoplasma

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	865539,122	5	173107,824	6,469	,000
Innerhalb der Gruppen	1980349,265	74	26761,477		
Gesamt	2845888,388	79			

Tabelle 14: Einfaktorielle ANOVA der Zytoplasmafärbung

Im Falle der einfaktoriellen ANOVA konnte im Vergleich der Zytoplasmafärbung der verschiedenen Mittelwerte eine Signifikanz mit $p=0,000$ festgestellt werden.

3.3 Histologische Analyse der immunhistochemischen p16^{INK4a}-Färbung

3.3.1 Orale Leukoplakie

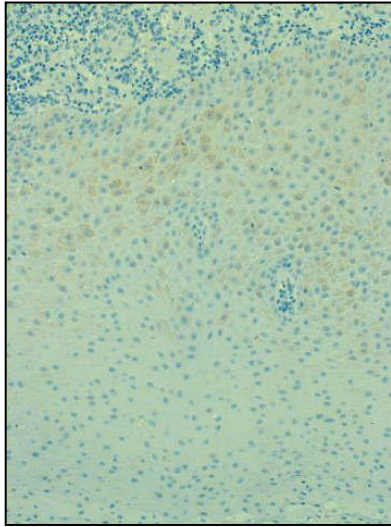


Abbildung 8: Orale
Leukoplakie – schwach
positive p16^{INK4a}-
Expression
(40xVergrößerung)

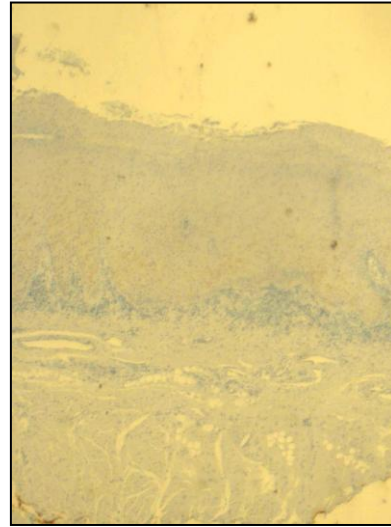


Abbildung 9: Orale
Leukoplakie – schwach
positive p16^{INK4a}-
Expression
(40xVergrößerung)

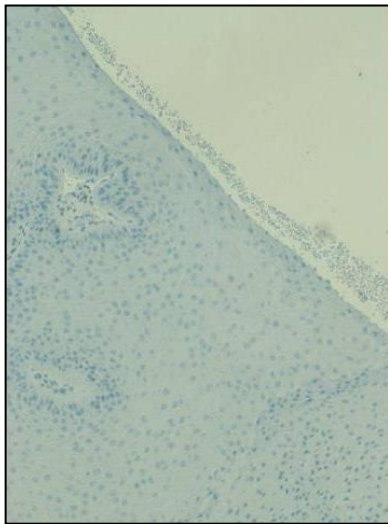


Abbildung 10: Orale
Leukoplakie – negative
p16^{INK4a}-Expression
(40xVergrößerung)

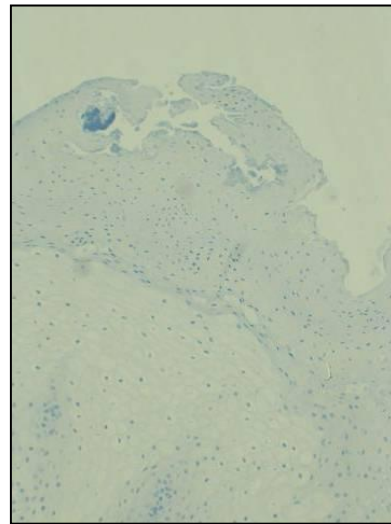


Abbildung 11: Orale
Leukoplakie – negative
p16^{INK4a}-Expression
(4xVergrößerung)

3.3.2 Orales Plattenepithelkarzinom

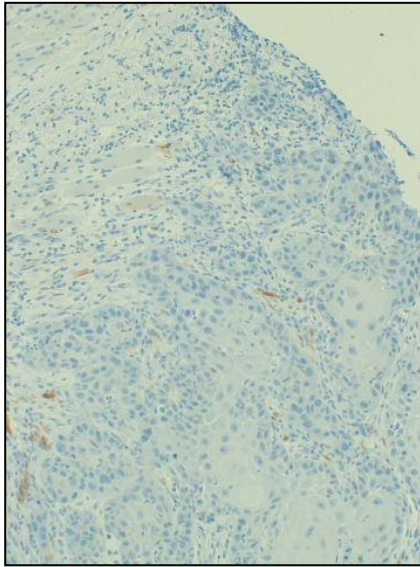


Abbildung 12:
Plattenepithelkarzinom (10x
Vergrößerung) – negative
p16^{INK4a}-Expression im
invasiven Anteil des Tumors

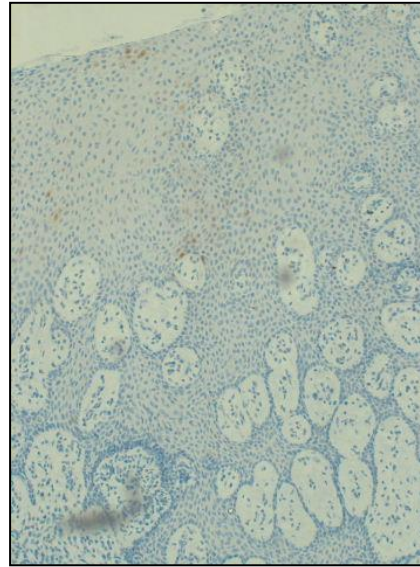


Abbildung 13:
Plattenepithelkarzinom (10x
Vergrößerung) – negative
p16^{INK4a}-Expression im
invasiven Anteil des Tumors

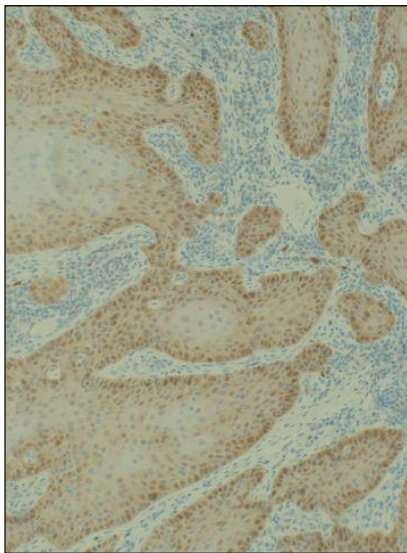


Abbildung 14:
Plattenepithelkarzinom extraoral
(40x Vergrößerung) – p16^{INK4a}-
Expression in den Zellkernen

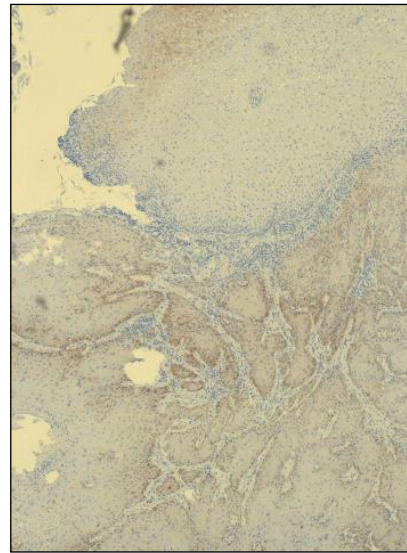


Abbildung 15:
Plattenepithelkarzinom
extraoral (4x Vergrößerung)
– positive p16^{INK4a}-
Expression im invasiven
Anteil des Tumors.

3.3.3 Lichen planus

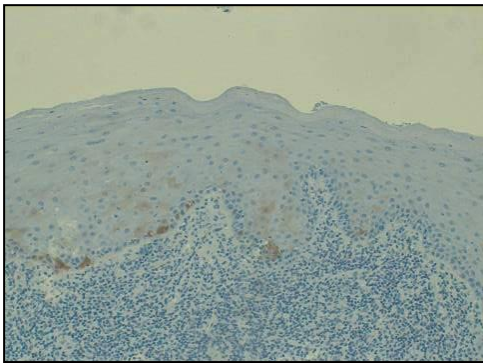


Abbildung 16: Oraler Lichen planus –p16^{INK4a} Färbung (40x Vergrößerung)

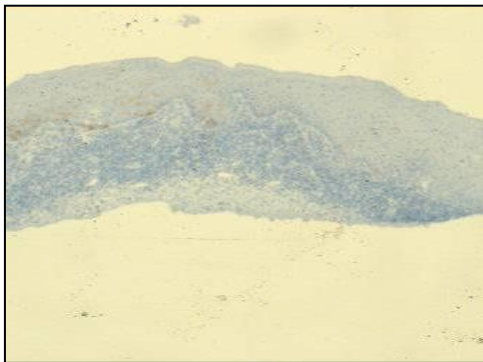


Abbildung 17: Oraler Lichen planus –p16^{INK4a} Expression im Zellkern und Zytoplasma (4x Vergrößerung)



Abbildung 18: Oraler Lichen planus – HE-Färbung (4x Vergrößerung)

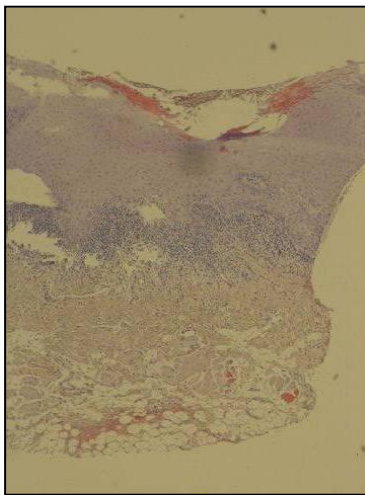


Abbildung 19: Oraler Lichen planus – HE-Färbung (4xVergrößerung)

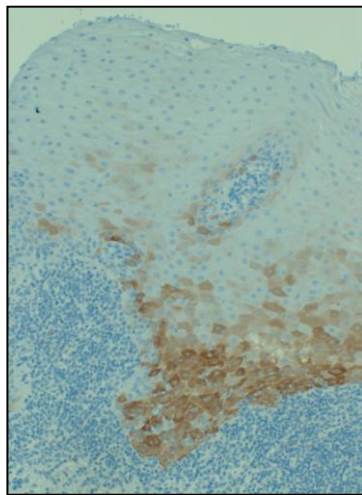


Abbildung 20: Oraler Lichen planus –p16^{INK4a}-Färbung (40xVergrößerung)

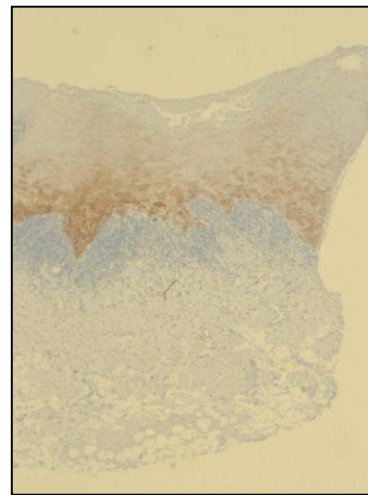


Abbildung 21: Oraler Lichen planus – starke p16^{INK4a} Expression (4x Vergrößerung)

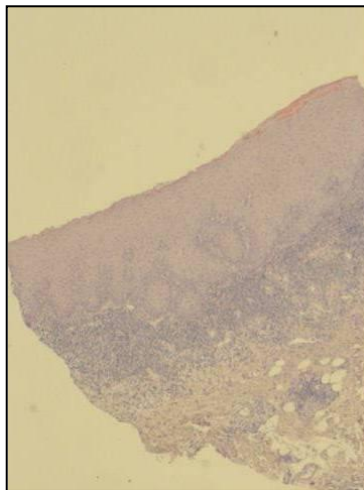


Abbildung 22: Lichen planus – HE-Färbung (4x Vergrößerung)

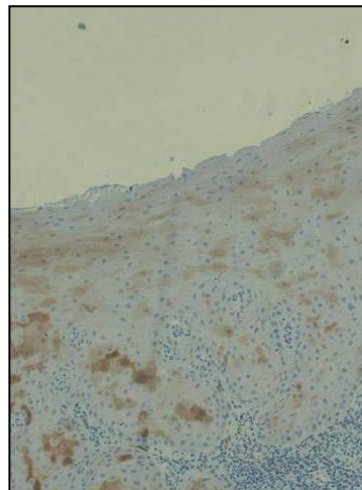


Abbildung 23: Lichen planus – starke p16^{INK4a}-Expression (40x Vergrößerung)

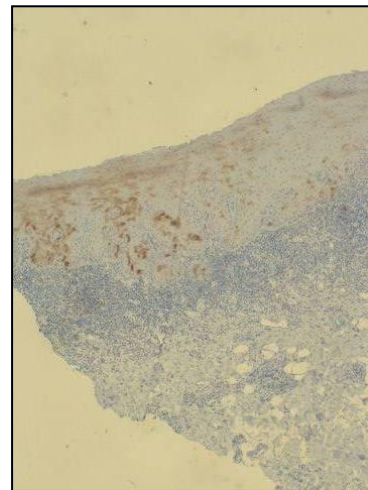


Abbildung 24: Lichen planus – starke p16^{INK4a}-Expression (4x Vergrößerung)

3.3.4 Entzündliche Dermatosen

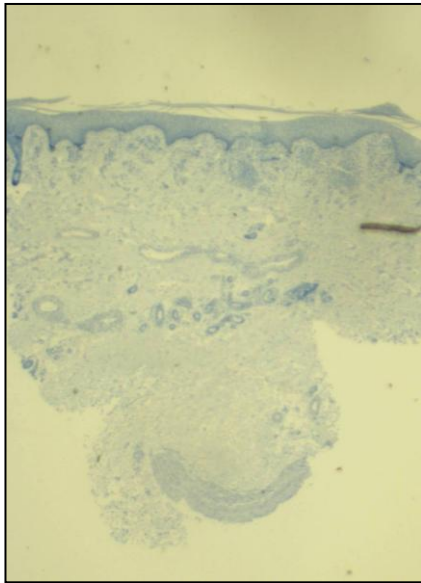


Abbildung 25: Entzündliche Dermatose – chronisches Ekzem.
P16^{INK4a}-Färbung negativ
(4xVergrößerung)

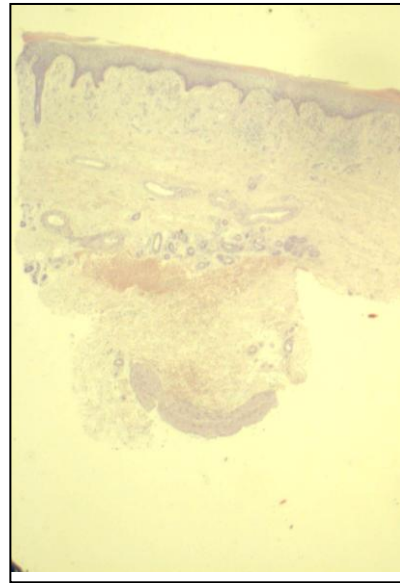


Abbildung 26: Entzündliche Dermatose – chronisches Ekzem.
HE-Färbung
(4xVergrößerung)

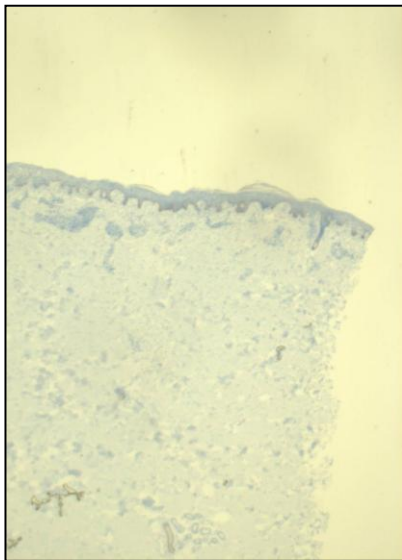


Abbildung 27: Entzündliche Dermatose – chronisches Ekzem.
P16^{INK4a}-Färbung negativ
(4xVergrößerung)

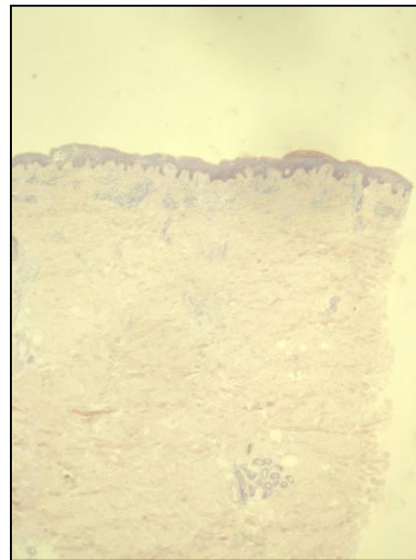


Abbildung 28: Entzündliche Dermatose – chronisches Ekzem
HE-Färbung (4xVergrößerung)

4 Diskussion

4.1 Allgemeiner Teil

Das Ziel dieser Arbeit war, anhand der p16-Expression in Tumoren und Präkanzerosen der Mundschleimhaut zu prüfen, ob sich p16 als Biomarker für obligate (Dysplasien) und potentielle Präkanzerosen (Oraler Lichen planus) eignet. Der Lichen planus, eine Manifestation einer noch nicht hinreichend erforschten Autoimmunerkrankung, wurde sowohl auf der Haut als auch in der Mundschleimhaut untersucht. Der orale Lichen planus zählt zu den potentiellen Präkanzerosen der Mundhöhle. Er besitzt ein malignes Transformationsrisiko und hat verglichen mit der kutanen Form des LP einen chronischen Krankheitsverlauf.

Des Weiteren wurden zehn andere entzündliche Dermatosen immunhistochemisch analysiert um die unerwartet hohe Expression von p16^{INK4a} im Lichen planus der Haut zu vergleichen. Insgesamt wurden 80 Präparate der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitäts-Klinikums Würzburg und des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg verwendet.

Die immunhistologische Untersuchung der Expression des p16^{INK4a}- Proteins hat bereits eine außerordentlich wichtige Bedeutung in der Zervixkarzinomfrühdagnostik erlangt. P16-Überexpression wurde in nahezu allen hochgradig-dysplastischen Präkanzerosen und Karzinomen der Zervix nachgewiesen. In geringgradig dysplastischen Läsionen konnte eine Expression von p16 in 30- 60% der Fälle gezeigt werden. (Klaes, Friedrich et al. 2001; Negri, Egarter-Vigl et al. 2003; Wang, Trunk et al. 2004)

Klaes et al. untersuchten 152 hochgradig dysplastische Zervixpräkanzerosen und Karzinome. Dabei beschrieben sie bei 150 der Fälle eine sehr starke Expression des p16^{INK4a}-Proteins in den Zellen. (Klaes, Friedrich et al. 2001) Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von pRb durch das HPV induzierte Onkoprotein E7 zu einer Überexpression von p16^{INK4a} geführt hat. (Sano, Masuda et al. 2002) In nicht neoplastischen Zellen wird der Zellzyklus durch eine Reihe von Proteinen gesteuert. Falls nötig, können diese

in den Prozess eingreifen und Fehler beheben. Eines dieser komplexen Proteine beinhaltet die Zyklin-abhängigen Kinasen (Cdk), die die Aktivität des Retinoblastomprotein (pRb) steuern. Das Tumorsuppressorgen p16 (CDKN2) hemmt die Phosphorylierung von pRb und verhindert somit den Übergang in die S-Phase. (Worsham, Pals et al. 2003)

Im Kopf und Halsbereich wird die onkogene Bedeutung des HPV kontrovers diskutiert. Das HPV wurde, abhängig von der verwendeten Methode, in 10 – 40% der untersuchten Plattenepithelkarzinome gefunden. (Wong, Man et al. 2003) Dies lässt jedoch schlussfolgern, dass die restlichen Läsionen auch ohne HPV-Einfluss in der Lage waren p16^{INK4a} zu exprimieren. (Nemes, Deli et al. 2006)

Daher sollte auf die Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse ein besonderes Augenmerk gelegt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle p16-immunhistochemisch angefertigten Präparate mit der dazugehörigen HE-Färbung ausgewertet. In einer Studie von Bergeron et al. konnte gezeigt werden, dass sich durch eine zusätzliche HE-Färbung die klinische Diagnostik signifikant verbessern lässt. (Bergeron, Ordi et al. 2010) Dennoch können durch verschiedene Färbechargen unterschiedlich ausgeprägte Ergebnisse der p16-Expression auftreten. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde bei jedem Färbvorgang eine Positiv und eine Negativprobe mit gefärbt um diagnostische Fehlinterpretationen zu vermeiden.

4.2 Orale Leukoplakien

Orale Leukoplakien haben ein Risiko der malignen Transformation, welches mit dem Grad der Dysplasie zusammenhängt. Bei hochgradig dysplastischen Veränderungen der Schleimhaut wurde eine hohe Wahrscheinlichkeit der malignen Entartung beschrieben. (Schepman, van der Meij et al. 1998) Im Umkehrschluss haben 16 bis 62% der Plattenepithelkarzinome ihren Ursprung in einer Leukoplakie. (Reibel 2003)

In der Literatur gibt es bis dato noch keine genaue Übereinkunft über die Interpretation der Ergebnisse der p16^{INK4a}- Immunhistochemie. Einige Studien definieren, dass nur eine Zellkernfärbung für die positive Evaluation von Fällen

relevant ist. (Koo, Kok et al. 2009) Andererseits gibt es auch Studien zur p16-Expression in der Mundhöhle, die eine zytoplasmatische oder eine nukleäre immunhistochemische Reaktion als positiv bewerten. (Gologan, Barnes et al. 2005; Bradley, Budnick et al. 2006; Cunningham, Pagano et al. 2006)

In der vorliegenden Arbeit wurden jene Fälle als p16-positiv bewertet, die eine ausreichende zytoplasmatische oder nukleäre Färbung aufwiesen. Evangelou et al. untersuchten elektronenmikroskopisch, inwiefern die zytoplasmatische Expression von p16 in Zellen von Lungenkarzinomen spezifisch oder nur ein Artefakt ist. Die Mehrheit der Zellen zeigte ein klares nukleäres Signal. Das zytoplasmatische Signal hatte eine schwächere Wirkung, da p16 hier auf den Membranen des rauen endoplasmatischen Retikulums lokalisiert war. Anhand dieser Beobachtungen gehen sie von einer für das Zytoplasma spezifischen p16-Expression aus, da alle Negativkontrollen keine nukleären sowie zytoplasmatischen Expressionen von p16^{INK4a} elektronenmikroskopisch aufwiesen. Der genaue Mechanismus, der zu einer p16-Expression im Zytoplasma führt bleibt jedoch unklar. Es wird angenommen, dass Mutationen von p16 den Austausch zwischen Zellkern und Zytoplasma derart beeinflussen können, dass eine Störung des Gleichgewichts zwischen diesen Kompartimenten resultieren kann. Dies könnte ein Grund für die Akkumulierung von p16 im Zytoplasma sein. (Evangelou, Bramis et al. 2004)

Gologan et al. verwendeten die p16-Immunhistochemie zur Untersuchung von 60 Mundschleimhautläsionen, die eine unveränderte Epitheloberfläche aufwiesen, sowie Keratosen ohne Dysplasien, mit geringen Dysplasien, moderaten und hochgradig-dysplastischen Veränderungen. Das Ergebnis der Untersuchung zeigte eine starke Immunreaktivität des p16-Antikörpers in dysplastischen Läsionen. Die Präparate mit unverändertem Epithel und Keratosen ohne dysplastische Veränderungen zeigten keine p16-Expression oder waren nur geringgradig positiv in der basalen Zellschicht. Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch Cunningham et al. beschrieben. (Montebugnoli, Cervellati et al. 2010) Im Gegensatz dazu beschrieben Bradley et al. nach einer Untersuchung von 119 Mundschleimhautläsionen eine abfallende p16-Expression bei Zunahme des Schweregrades der Dysplasie. (Bradley, Budnick

et al. 2006) Diese auffallend voneinander abweichenden Ergebnisse können durch unterschiedliche Färbemethoden und nicht einheitlich verwendete Antikörper zustande kommen.

Für die vorliegende Untersuchung der oralen Leukoplakien wurden 11 Präparate mit einem geringen Dysplasiegrad und 4 Präparate mit hochdysplastischen Veränderungen untersucht. Um die p16-Expression genau zu bestimmen, wurden jeweils 1000 Zellen auf ihre Färbung hin untersucht. Auffallend war, dass Zellkerne nur schwer oder überhaupt nicht p16 exprimiert haben. Alle positiven Präparate wiesen eine schwach bis mittelstarke Färbung des Zytoplasmas auf. Die vorliegenden Ergebnisse der Färbungen lassen sich mit denen von Buajeeb et al. vergleichen. Bradley et al. gingen davon aus, dass ein Verlust der p16-Expression nicht nur auf dysplastische Läsionen bezogen werden kann, da auch ein signifikanter Anteil an nichtdysplastischer Mundschleimhaut negativ war. Daher ist anzunehmen, dass p16 nur schwer normale Mukosa von dysplastisch veränderter Mukosa unterscheiden kann.

4.3 Orale Plattenepithelkarzinome

Die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle beschreibt eine Abfolge von Schritten, die zu einem Untergang der Zellzykluskontrolle führen. Dabei konnten einige Abweichungen in der Zusammensetzung der Chromosomen bei Fällen von Plattenepithelkarzinomen festgestellt werden. Ein Verlust des Chromosomenabschnitts 9p ist eine der häufigsten genetischen Abweichungen und wird als einer der ersten Schritte in der Tumorgenese beschrieben. (van der Riet, Nawroz et al. 1994)

Bei oralen Plattenepithelkarzinomen wurden in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der p16-Expression beschrieben. Yuen PW et al. und Ai L. et al. berichteten von einem Verlust oder einer sehr schwachen p16-Expression in Plattenepithelkarzinomen. (Yuen, Man et al. 2002; Ai, Stephenson et al. 2003)

Dies wurde auf drei Hauptmechanismen zurückgeführt. Erstens über homozygote Deletionen (Cairns, Polascik et al. 1995), zweitens inaktivierende Mutationen und drittens durch eine nicht korrekte Promotormethylierung.

(Zhang, Klein-Szanto et al. 1994; Merlo, Herman et al. 1995) Matsuda et al. untersuchten bei 20 Plattenepithelkarzinomen und 20 Präkanzerosen diese genetischen Veränderungen in den Exons 1 bis 3 im p16^{INK4a}/CDKN2-Gen. Das Ergebnis ihrer Untersuchung zeigte ein gänzlich Fehlen von Mutationen in den präkanzerösen Läsionen. Bei den Karzinomen konnte bei 10% ein Fehlen des Gens festgestellt werden und bei weiteren 10% wurden Mutationen festgestellt. Es wird angenommen, dass genetische Veränderungen erst spät im Prozess der Karzinogenese auftreten. (Matsuda, Konishi et al. 1996) Papadimitrakopoulou et al. beschrieben jedoch, dass der Verlust von p16 und dessen genetische Abschaltung mit Mundhöhlenkarzinomen und Präkanzerosen assoziiert sind. Es wird angenommen, dass die Inaktivierung von p16 ein frühes Ereignis der Tumorgenese darstellt. (Papadimitrakopoulou, Izzo et al. 1997)

So wurde auch durch Bova et al. beschrieben, dass ein Verlust der p16-Expression auch ein Sinken der Fünfjahresüberlebensrate zur Folge hat. Des Weiteren zeigten sie, dass eine Überexpression von Zyklin D1 und ein Verlust der p16-Expression unabhängige prognostische Parameter der Mortalität bei Karzinomen der Zunge sind. (Bova, Quinn et al. 1999)

Neben der Expression von p16 haben einige Autoren versucht, eine Relation zu anderen exprimierten Proteinen zu finden, wie zum Beispiel pRB, p53, p21, CD44s, p27, p14 und Cdk4. (Perez-Sayans, Suarez-Penaranda et al. 2011) Chen et al. fanden eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der p16 und der Cdk4-Expression heraus. 82,14% der positiven p16-Proben exprimierten auch Cdk4. (Chen, Luo et al. 1999)

Ferner führten Hall et al. eine Langzeitstudie mit Patienten durch, die an einer histologisch diagnostizierten dysplastischen Mundschleimhautläsion erkrankt waren. Bei 26% dieser Patienten fand man eine Promotormethylierung, auf die eine maligne Entartung in ein Plattenepithelkarzinom folgte, bei nur einem 1% dieser Patienten folgte keine maligne Entartung. (Hall, Shaw et al. 2008) Folglich könnte die Untersuchung einer Promotormethylierung als prognostisches Mittel für maligne Präkanzerosen dienen.

Buajeeb et al. untersuchten 16 orale Plattenepithelkarzinome auf ihre immunhistochemische Expression von p16. Als positiv wurde eine Zellkern- oder Zytoplasmafärbung bewertet. Bei drei Plattenepithelkarzinomen konnte eine p16-Expression festgestellt werden, die restlichen Schnitte wiesen keine p16-Expression auf. (Buajeeb, Poomsawat et al. 2009) Aus der Studie war jedoch nicht ersichtlich, an welcher Stelle die Tumoren in der Mundhöhle genau lokalisiert waren.

Bei unseren Untersuchungen wurden 20 Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle untersucht. Die immunhistochemische Färbung ergab 4 positive Fälle und 16 negative. Alle Proben exprimierten das p16^{INK4a}-Protein im dysplastischen Anteil des Tumors, jedoch wurden nur Fälle als positiv bewertet, in denen der invasive Anteil des Tumors p16 exprimiert hat. Wie bereits oben durch Cairns et al. beschrieben, gehen wir von einer vollständigen Entfernung des p16-Proteins im invasiven Anteil aus. Jedoch kann durch die solitäre immunhistochemische Untersuchung nicht gezeigt werden, welcher der drei Mechanismen für die p16-Deletion verantwortlich ist.

Bezüglich der Lokalisation der Tumoren fiel auf, dass drei der vier positiven Karzinome an der extraoralen Seite der Unterlippe lokalisiert waren. Conscience et al. untersuchten immunhistochemisch in einer Studie die p16-Expression an Tumoren der Hautoberfläche. Unter anderem wurden 30 Plattenepithelkarzinome, 30 Basalzellkarzinome, 10 seborrhoische Keratosen und 10 gesunde Präparate der epithelialen Hautoberfläche untersucht. Sie beschrieben, dass 60% der Plattenepithelkarzinome und 50% der Basalzellkarzinome p16 exprimierten. Seborrhoischen Keratosen und Haut ohne pathologischen Befund zeigten alle keine p16-Expression. Ferner fanden sie heraus, dass 68% der Karzinome, die in sonnenexponierten Arealen lokalisiert waren p16^{INK4a} exprimiert haben. (Conscience, Jovenin et al. 2006) Dieses Ergebnis konnte mit vorausgegangenen Studien in Einklang gebracht werden, die zeigten, dass UVB-Strahlung eine p16-Überexpression in von Menschen kultivierten Melanozyten und Keratinozyten induzieren. (Pavey, Conroy et al. 1999) Diese Ergebnisse könnten eine Erklärung für die drei stark p16-positiven Plattenepithelkarzinome unserer Untersuchungen sein.

4.4 Lichen planus

Der orale Lichen planus wird in der Literatur als eine T-Zell-assoziierte chronisch-entzündliche Mundschleimhauterkrankung mit unbekannter Pathogenese beschrieben. (Roopashree, Gondhalekar et al. 2010) Bei circa 15% der Patienten, die an einem oralen Lichen planus leiden, manifestiert sich dieser zusätzlich an einer extraoralen Stelle. (Eisen 1999) Aufgrund des Potenzials einer malignen Transformation wird der orale Lichen planus von der WHO als potenziell maligne Präkanzerose angesehen. (Mignogna, Fedele et al. 2004) In der Literatur wird eine maligne Transformationsrate zwischen 0,4 und 5% beschrieben. (van der Meij, Schepman et al. 1999; Mattsson, Jontell et al. 2002) Gonzalez-Moles et al. fanden Veränderungen der internen Zellzykluskontrolle in oralen Lichen planus und beschrieben, dass diese zur Entstehung von malignen Tumoren beitragen können. Ähnliche Abweichungen im Zellzyklus konnten in vielen Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle beobachtet werden. (Gonzalez-Moles, Bascones-Ilundain et al. 2006) Angelehnt an andere Untersuchungen von Präkanzerosen, wird davon ausgegangen, dass Mutationen und eine Überexpression des p16-Gens bei der Entstehung von malignen Tumoren eine Hauptrolle spielen. (Bradley, Budnick et al. 2006; Buajeeb, Poomsawat et al. 2009)

Wie unter 4.1 beschrieben, ist die Hauptaufgabe des p16-Tumorsuppressorgens, den Übergang der G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus zu verhindern. Durch Mutationen von p16 kann der Zellzyklus nicht mehr koordiniert werden und es kann zu einer nicht geplanten Zellproliferation kommen. Bisher wurde die p16-Expression im Lichen planus noch nicht hinreichend untersucht. Poomsawat et al. untersuchten erstmals immunhistologisch 23 Fälle des oralen Lichen planus auf die Expression von Cdk4, Cdk6 und p16. 15 Fälle (65,22%) der oralen Lichen wiesen eine positive p16-Expression auf. 13 der positiven Fälle zeichneten sich durch eine Färbung des Zytoplasmas und der Zellkerne aus. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass beim oralen Lichen planus Veränderungen im Zellzyklus der Epithelzellen auftreten. Des Weiteren zeigten sie in ihrer Studie, dass 18 (78,27%) der Fälle stark Cdk4 exprimierten. Eine Überexpression von Cdk4 weist auf eine Erhöhung der Zellproliferation hin. (Poomsawat, Buajeeb et al. 2011) In

verschiedenen Studien konnte auch gezeigt werden, dass der orale Lichen planus, verglichen mit unauffälliger Mundschleimhaut, eine erhöhte Mitoserate der Zellen und damit ein vermehrtes Vorkommen des KI-67-Proteins aufweist. (Gonzalez-Moles, Bascones-Ilundain et al. 2006) Gonzalez-Moles et al. stellten ferner die These auf, dass eine Zellhyperproliferation des Epithels im Lichen planus ein Mechanismus ist, der die Architektur des Oberflächenepithels vor den massiven Angriffen der Lymphozyten schützen soll. (Gonzalez-Moles, Bascones-Ilundain et al. 2006)

Des Weiteren stellen Poomsawat et al. die These auf, dass eine p16-Überexpression eine Antwort auf die Cdk4-Expression im Lichen planus ist. Indem p16 einen Komplex mit Cdk4 bildet, verhindert p16 den Übertritt in die S-Phase, stoppt somit den Zellzyklus und damit eine maligne Transformation der Zelle. Damit findet man zwar eine Hyperproliferation der Zellen vor, die jedoch dazu dient, den DNA-Reparaturmechanismen Raum zu schaffen. (Poomsawat, Buajeeb et al. 2011) Verglichen mit oralen Leukoplakien zeigt der orale Lichen planus ein geringeres Risiko einer malignen Entartung. Daraufhin untersuchten Poomsawat et al. in einer anderen Studie die p16 und Cdk4-Expression in oralen Präkanzerosen und konnten nur eine Überexpression von Cdk4 zeigen. (Poomsawat, Buajeeb et al. 2010) Daher kann gefolgert werden, dass eine mangelnde p16-Expression zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der malignen Entartung führen kann. In Kombination mit einer erhöhten Cdk4-Expression könnte p16 als nützlicher Biomarker fungieren, um eine maligne Transformation des oralen Lichen planus vorauszusagen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 35 Fälle des Lichen planus auf epidermale p16-Expression untersucht und mit 10 Fällen von anderen entzündlichen Dermatosen verglichen. 15 Fälle waren aus der Mundschleimhautregion und 20 Fälle waren extraoral lokalisiert. 14 Fälle (93,3%) der Mundhöhle sowie 19 Fälle (95%) der extraoralen Lichen planus wiesen eine positive p16-Expression auf.

Bei den entzündlichen Dermatosen konnte nur bei einem Fall eine schwach positive Reaktion nachgewiesen werden, alle übrigen Fälle zeigten keine p16-Expression und verhielten sich im Übrigen wie Haut ohne pathologischen Befund.

4.5 Schlussfolgerung

Zunächst sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, wie sich der orale Lichen planus, der eine potentielle Präkanzerose darstellt, im Vergleich zu anderen Leukoplakien, welche aber ein höheres Risiko einer malignen Transformation aufweisen, hinsichtlich seiner p16-Expression verhält. Daneben sollte die Hypothese einer negativen p16-Expression der kutanen Lichen planus, die ebenso bei anderen entzündlichen Dermatosen vorliegt, nachgewiesen werden. Dabei überraschte das Ergebnis einer außerordentlich stark positiven p16-Expression beider Typen des LP. Trotz des unterschiedlichen klinischen Krankheitsverlaufs und der unterschiedlichen Manifestation der zu vergleichenden Formen der Erkrankung, kann folglich auf eine gemeinsame Veränderung oder Mutation des p16-Tumorsuppressorgens in den Zellen beider Formen des LP geschlossen werden.

Insbesondere lassen sich die vorliegenden Ergebnisse des oralen LP auch mit denen von Poomsawat et al. vereinbaren und bieten daher eine Grundlage für weitere Untersuchungen. Dies lässt die Vermutung zu, dass eine ausreichend hohe p16-Expression in Kombination mit einer erhöhten Cdk4-Expression ein geringes Risiko einer malignen Transformation des Lichen planus bedeutet. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in einem Großteil der oralen Plattenepithelkarzinome (75%) die p16-Expression heruntergefahren wurde und dies ein Resultat der malignen Entartung ist. Für die übrigen positiven Fälle von Plattenepithelkarzinomen, die extraoral lokalisiert waren, stellen wir die Hypothese auf, dass UVB-Strahlung Mutationen des p16-Gens verursachen und es dadurch zu einer Überexpression im invasiven Anteil des Tumors kommen kann. Es konnte gezeigt werden, dass sich die p16-Expression in Präkanzerosen der Mundhöhle nicht wie im Bereich der Zervix uteri verhält. In der Zervix wurde bewiesen, dass das humane Papillomavirus HPV 16 und 18 eine Rolle in der Kanzerogenese spielen. Im Bereich der Mundschleimhaut spielt das HPV eine untergeordnete Rolle, da hier die Kanzerogenese als multifaktoriell angesehen werden muss.

5 Zusammenfassung

Die Expression des p16-Tumorsuppressorgens spielt in der Früherkennung von Gebärmutterhalskrebs eine außerordentlich wichtige Rolle. Hier dient p16^{INK4a} als immunhistochemisch evaluierter Biomarker für präkanzeröse Läsionen der Zervix. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des p16-Proteins immunhistologisch anhand obligaten Präkanzerosen, potentiell präkanzeröser Entzündungen und Karzinomen der Mundhöhle untersucht. Hierzu wurden 80 Fälle aus dem histologischen Archiv der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitäts-Klinikums Würzburg sowie aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg verwendet. Die Fälle stammen aus dem Zeitraum von 2000 bis 2011. Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, inwiefern das p16^{INK4a}-Protein als Biomarker für prämaligne und maligne Läsionen fungieren kann. Die untersuchten Präparate beinhalteten orale Leukoplakien mit geringen und hoch dysplastischen Veränderungen sowie orale als auch extraorale Lichen planus und orale Plattenepithelkarzinome. Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass die p16-Expression der oralen Leukoplakien nicht mit dem vorliegenden Dysplasiegrad korrelierte und ausgesprochen schwach ausfiel. Die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle zeigten größtenteils (75%) keine p16-Expression im invasiven Anteil des Tumors. Hier geht man davon aus, dass durch homozygote Deletionen, inaktivierende Mutationen sowie durch eine nicht korrekt ausgeführte Promotormethylierung die p16-Expression ausgeschaltet wird. Darüber hinaus wiesen die Fälle des Lichen planus eine zumeist stark positive Expression von p16^{INK4a} auf, da 93,3 % der oralen und 95% der extraoralen Lichen planus positiv ausfielen. Verglichen mit oralen Leukoplakien weisen der orale und kutane Lichen planus ein sehr viel geringeres Risiko der malignen Transformation auf. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier demonstrierten Ergebnisse die Hypothese zulassen, dass eine Überexpression des p16-Proteins das Risiko einer malignen Entartung niedrig hält. Ein Herunterfahren des p16-Tumorsuppressorgens kann somit ein erster Schritt der Genese eines malignen Tumors sein. Die Diskussion dieser Hypothesen sollte jedoch durch weiterführende Untersuchungen bestätigt werden.

6 Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis

Ai, L., K. K. Stephenson, et al. (2003). "The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases." Mod Pathol **16**(9): 944-950.

Andreasen, J. O. (1968). "Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **25**(1): 31-42.

Axell, T., J. J. Pindborg, et al. (1996). "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 **25**(2): 49-54.

Bagan-Sebastian, J. V., M. A. Milian-Masanet, et al. (1992). "A clinical study of 205 patients with oral lichen planus." J Oral Maxillofac Surg **50**(2): 116-118.

Bànòczy J, S. L. (1972). "Longitudinal studies in oral leukoplakias." J Oral Pathol Med **1**: 265-272.

Bergeron, C., J. Ordi, et al. (2010). "Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia." Am J Clin Pathol **133**(3): 395-406.

Bornstein, M. M., M. C. Benguerel, et al. (2004). "[Oral leukoplakia. A retrospective study of clinical and histological data]." Schweiz Monatsschr Zahnmed **114**(7): 680-686.

Bova, R. J., D. I. Quinn, et al. (1999). "Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue." Clin Cancer Res **5**(10): 2810-2819.

Bradley, K. T., S. D. Budnick, et al. (2006). "Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity." Mod Pathol **19**(10): 1310-1316.

Buajeeb, W., S. Poomsawat, et al. (2009). "Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions." J Oral Pathol Med **38**(1): 104-108.

Cairns, P., T. J. Polascik, et al. (1995). "Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours." Nat Genet **11**(2): 210-212.

Chen, Q., G. Luo, et al. (1999). "Expression of p16 and CDK4 in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: a semi-quantitative immunohistochemical study." J Oral Pathol Med **28**(4): 158-164.

Cunningham, L. L., Jr., G. M. Pagano, et al. (2006). "Overexpression of p16INK4 is a reliable marker of human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **102**(1): 77-81.

Dietrich, T., Reichart, P.A., Scheifele, C (2004). "Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population." Oral Oncol **40**(2): 158-160.

Dubreuil (1906). "Histologie du lichen plan des muqueuses." Ann Dermatol **7**: 123-129.

Eisen, D. (1999). "The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **88**(4): 431-436.

Eisen, D. (2002). "The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients." J Am Acad Dermatol **46**(2): 207-214.

Eisen, D., M. Carrozzo, et al. (2005). "Number V Oral lichen planus: clinical features and management." Oral Dis **11**(6): 338-349.

Evangelou, K., J. Bramis, et al. (2004). "Electron microscopy evidence that cytoplasmic localization of the p16(INK4A) "nuclear" cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) in tumor cells is specific and not an artifact. A study in non-small cell lung carcinomas." Biotech Histochem **79**(1): 5-10.

Felix, B. (2010). SPSS 18 für Dummies. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.

Gologan, O., E. L. Barnes, et al. (2005). "Potential diagnostic use of p16INK4A, a new marker that correlates with dysplasia in oral squamoproliferative lesions." Am J Surg Pathol **29**(6): 792-796.

Gonzalez-Moles, M. A., C. Bascones-Ilundain, et al. (2006). "Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus: molecular bases in epithelium predisposed to malignant transformation." Arch Oral Biol **51**(12): 1093-1103.

Guan, K. L., C. W. Jenkins, et al. (1994). "Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function." Genes Dev **8**(24): 2939-2952.

Hall, G. L., R. J. Shaw, et al. (2008). "p16 Promoter methylation is a potential predictor of malignant transformation in oral epithelial dysplasia." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(8): 2174-2179.

Hannon, G. J. and D. Beach (1994). "p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest." Nature **371**(6494): 257-261.

Hirai, H., M. F. Roussel, et al. (1995). "Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6." Mol Cell Biol **15**(5): 2672-2681.

Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin.

Jungell, P. (1991). "Oral lichen planus. A review." Int J Oral Maxillofac Surg **20**(3): 129-135.

Klaes, R., A. Benner, et al. (2002). "p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia." Am J Surg Pathol **26**(11): 1389-1399.

Klaes, R., T. Friedrich, et al. (2001). "Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri." Int J Cancer **92**(2): 276-284.

Koo, C. L., L. F. Kok, et al. (2009). "Scoring mechanisms of p16INK4a immunohistochemistry based on either independent nucleic stain or mixed cytoplasmic with nucleic expression can significantly signal to distinguish between endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray study." J Transl Med **7**: 25.

Lindenmuller, I. H. and J. T. Lambrecht (2006). "[Proliferative verrucous leukoplakia]." Schweiz Monatsschr Zahnmed **116**(5): 508-520.

Lodi, G., A. Sardella, et al. (2002). "Systematic review of randomized trials for the treatment of oral leukoplakia." J Dent Educ **66**(8): 896-902.

Lukac, J., S. Brozovic, et al. (2006). "Serum autoantibodies to desmogleins 1 and 3 in patients with oral lichen planus." Croat Med J **47**(1): 53-58.

Lukas, J., L. Aagaard, et al. (1995). "Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control." Cancer Res **55**(21): 4818-4823.

Mast, G. (2009). Manual- Kopf-Halsmalignome, Zuckschwerdt Verlag.

Matsuda, H., N. Konishi, et al. (1996). "Alterations of p16/CDKN2, p53 and ras genes in oral squamous cell carcinomas and premalignant lesions." J Oral Pathol Med **25**(5): 232-238.

Mattsson, U., M. Jontell, et al. (2002). "Oral lichen planus and malignant transformation: is a recall of patients justified?" Crit Rev Oral Biol Med **13**(5): 390-396.

Merlo, A., J. G. Herman, et al. (1995). "5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers." Nat Med **1**(7): 686-692.

Mignogna, M. D., S. Fedele, et al. (2004). "Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence?" Oral Oncol **40**(2): 120-130.

Montebugnoli, L., F. Cervellati, et al. (2010). "Immunohistochemical expression of p16(INK4A) protein as a helpful marker of a subset of potentially malignant oral epithelial lesions: study on a series with long-term follow-up." Histopathology **57**(4): 528-534.

Murphy, N., M. Ring, et al. (2005). "p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer." J Clin Pathol **58**(5): 525-534.

Negri, G., E. Egarter-Vigl, et al. (2003). "p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations." Am J Surg Pathol **27**(2): 187-193.

Nemes, J. A., L. Deli, et al. (2006). "Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **102**(3): 344-352.

Neville, B. W. and T. A. Day (2002). "Oral cancer and precancerous lesions." CA Cancer J Clin **52**(4): 195-215.

Nobori, T., K. Miura, et al. (1994). "Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers." Nature **368**(6473): 753-756.

Papadimitrakopoulou, V., J. Izzo, et al. (1997). "Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions." Oncogene **14**(15): 1799-1803.

Pavey, S., S. Conroy, et al. (1999). "Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin." Cancer Res **59**(17): 4185-4189.

Perez-Sayans, M., J. M. Suarez-Penaranda, et al. (2011). "p16(INK4a)/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough?" Cancer Lett.

Poomsawat, S., W. Buajeeb, et al. (2010). "Alteration in the expression of cdk4 and cdk6 proteins in oral cancer and premalignant lesions." J Oral Pathol Med **39**(10): 793-799.

Poomsawat, S., W. Buajeeb, et al. (2011). "Overexpression of cdk4 and p16 in oral lichen planus supports the concept of premalignancy." J Oral Pathol Med **40**(4): 294-299.

Reibel, J. (2003). "Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics." Crit Rev Oral Biol Med **14**(1): 47-62.

Reichart, P. (2003). "Proliferative verruköse Leukoplakie: Bericht über 5 Fälle." Mund Kiefer Gesichtschirurgie **7**: 164-170.

Reichart, P. A. (2000). "[Primary prevention of mouth carcinoma and oral precancerous conditions]." Mund Kiefer Gesichtschir **4**(6): 357-364.

Reichart, P. A. (2007). "Orale Leukoplakie/Erythroplakie." DZZ **62**.

Reichart, P. A. (2007). "Orale Leukoplakie/Erythroplakie." Deutsche Gesellschaft für Zahn-Mund und Kieferheilkunde.

RKI (2010). "Angaben zur Inzidenz und Mortalität für die BRD 2006." Robert Koch Institut.

Roopashree, M. R., R. V. Gondhalekar, et al. (2010). "Pathogenesis of oral lichen planus--a review." J Oral Pathol Med **39**(10): 729-734.

Sano, T., N. Masuda, et al. (2002). "Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia." Pathol Int **52**(5-6): 375-383.

Scheifele, C. and P. A. Reichart (1998). "[Oral leukoplakia in manifest squamous epithelial carcinoma. A clinical prospective study of 101 patients]." Mund Kiefer Gesichtschir **2**(6): 326-330.

Schepman, K. P., E. H. van der Meij, et al. (1998). "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 **34**(4): 270-275.

Schwenzer, N. (2010). Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. Stuttgart, Thieme Verlag.

Schwimmer, E. (1877). "Die idiopathische Schleimhautplaques der Mundhöhle (Leukoplakia buccalis)." Arch Dermat Syph **9**: 570-611.

Scully, C. and M. el-Kom (1985). "Lichen planus: review and update on pathogenesis." J Oral Pathol **14**(6): 431-458.

Serrano, M. (1997). "The tumor suppressor protein p16." Exp Cell Res **1997**(237): 7-13.

Serrano, M., G. J. Hannon, et al. (1993). "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." Nature **366**(6456): 704-707.

Silverman, S., Jr., M. Gorsky, et al. (1985). "A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: persistence, remission, and malignant association." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **60**(1): 30-34.

Sugerman, P. B. and N. W. Savage (2002). "Oral lichen planus: causes, diagnosis and management." Aust Dent J **47**(4): 290-297.

Sugerman, P. B., N. W. Savage, et al. (2002). "The pathogenesis of oral lichen planus." Crit Rev Oral Biol Med **13**(4): 350-365.

Todd, R., P. W. Hinds, et al. (2002). "Cell cycle dysregulation in oral cancer." Crit Rev Oral Biol Med **13**(1): 51-61.

van der Meij, E. H., K. P. Schepman, et al. (1999). "A review of the recent literature regarding malignant transformation of oral lichen planus." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **88**(3): 307-310.

van der Riet, P., H. Nawroz, et al. (1994). "Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression." Cancer Res **54**(5): 1156-1158.

Wang, S. S., M. Trunk, et al. (2004). "Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **13**(8): 1355-1360.

Wilson, E. (1869). "On lichen planus." J Cutan Med Dis Skin **3**: 117-132.

Wong, T. S., M. W. Man, et al. (2003). "The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR." Eur J Cancer **39**(13): 1881-1887.

Worsham, M. J., G. Pals, et al. (2003). "Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **129**(7): 702-708.

Xiong, Y., H. Zhang, et al. (1993). "Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation." Genes Dev **7**(8): 1572-1583.

Yuen, P. W., M. Man, et al. (2002). "Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas." J Clin Pathol **55**(1): 58-60.

Zhang, S. Y., A. J. Klein-Szanto, et al. (1994). "Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck." Cancer Res **54**(19): 5050-5053.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: P16 ^{INK4a} / Cdk4/Rb –Zyklus und dessen Einfluss auf die Zellzyklusregulation der G ₁ -Phase (Serrano 1997)	10
Abbildung 2: Balkendiagramm – Verteilung der untersuchten Erkrankungen abhängig vom Geschlecht des Patientenkollektivs	18
Abbildung 3: Boxplot – Verteilung männlicher und weiblicher Patienten im Bezug zum Erkrankungsalter	19
Abbildung 4: Stärke der epidermalen p16-Expression bei den untersuchten Erkrankungen	22
Abbildung 5: Boxplot - Zellkernfärbung pro 1000 Zellen aller Biopsien	28
Abbildung 6: Boxplot - Zellkern und Zytoplasmafärbung pro 1000 Zellen aller Biopsien	31
Abbildung 7: Boxplot - Zytoplasmafärbung pro 1000 Zellen aller Biopsien	33
Abbildung 8: Orale Leukoplakie – schwach positive p16 ^{INK4a} -Expression (40xVergrößerung)	35
Abbildung 9: Orale Leukoplakie – schwach positive p16 ^{INK4a} -Expression (40xVergrößerung)	35
Abbildung 10: Orale Leukoplakie – negative p16 ^{INK4a} -Expression (40xVergrößerung)	35
Abbildung 11: Orale Leukoplakie – negative p16 ^{INK4a} -Expression (4xVergrößerung)	35

Abbildung 12: Plattenepithelkarzinom (10x Vergrößerung) – negative p16 ^{INK4a} - Expression im invasiven Anteil des Tumors _____	36
Abbildung 13: Plattenepithelkarzinom (10x Vergrößerung) – negative p16 ^{INK4a} - Expression im invasiven Anteil des Tumors _____	36
Abbildung 14: Plattenepithelkarzinom extraoral (40x Vergrößerung) –p16 ^{INK4a} - Expression in den Zellkernen _____	36
Abbildung 15: Plattenepithelkarzinom extraoral (4x Vergrößerung) – positive p16 ^{INK4a} -Expression im invasiven Anteil des Tumors. _____	36
Abbildung 16: Oraler Lichen planus –p16 ^{INK4a} Färbung (40x Vergrößerung) _	37
Abbildung 17: Oraler Lichen planus –p16 ^{INK4a} Expression im Zellkern und Zytoplasma (4x Vergrößerung)_____	37
Abbildung 18: Oraler Lichen planus – HE-Färbung (4x Vergrößerung) _____	37
Abbildung 19: Oraler Lichen planus – HE-Färbung (4xVergrößerung) _____	38
Abbildung 20: Oraler Lichen planus –p16 ^{INK4a} -Färbung (40xVergrößerung) _	38
Abbildung 21: Oraler Lichen planus – starke p16 ^{INK4a} Expression (4x Vergrößerung)_____	38
Abbildung 22: Lichen planus – HE-Färbung (4x Vergrößerung)_____	38
Abbildung 23: Lichen planus –starke p16 ^{INK4a} -Expression (40x Vergrößerung)	38
Abbildung 24: Lichen planus –starke p16 ^{INK4a} -Expression (4x Vergrößerung)	38
Abbildung 25: Entzündliche Dermatose – chronisches Ekzem. P16 ^{INK4a} -Färbung negativ (4xVergrößerung) _____	39
Abbildung 26: Entzündliche Dermatose – chronisches Ekzem. HE-Färbung (4xVergrößerung) _____	39
Abbildung 27: Entzündliche Dermatose – chronisches Ekzem. P16 ^{INK4a} -Färbung negativ (4xVergrößerung) _____	39
Abbildung 28: Entzündliche Dermatose – chronisches Ekzem HE-Färbung (4xVergrößerung) _____	39
 Tabelle 1: Histologisches Grading _____	5
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien des CINtec Histology Kits (mtm laboratories AG Heidelberg) _____	13
Tabelle 3: Patientenkollektiv zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchung (n=80, Altersmittel 62,13 ±16,23) _____	18

Tabelle 4: Gleichheitstest der Gruppenmittelwerte in Abhängigkeit der Variablen Geschlecht und Alter _____	20
Tabelle 5: Intensität der epidermalen P16-Expression der bei den untersuchten Erkrankungen _____	21
Tabelle 6: Chi-Quadratstest der Farbtintensität in Abhängigkeit zu der Diagnose _____	23
Tabelle 7: Auszählung der gefärbten Zellen _____	26
Tabelle 8: Zusammenfassung der Mittelwerte und Mediane pro 1000 ausgezählte Zellen. _____	27
Tabelle 9: Kruskal-Wallis-Test Zellkernfärbung _____	29
Tabelle 10: Einfaktorielle Anova der Zellkernmittelwerte innerhalb der Diagnosegruppen _____	30
Tabelle 11: Kruskal-Wallis Test Zytoplasma und Zellkernfärbung _____	32
Tabelle 12: Einfaktorielle ANOVA der Zellkern und Zytoplasmafärbung _____	32
Tabelle 13: Kruskal-Wallis Test Zytoplasmafärbung _____	34
Tabelle 14: Einfaktorielle ANOVA der Zytoplasmafärbung _____	34

Danksagung

Mein herzlichster und ausdrücklicher Dank gilt meiner Doktormutter Frau Universitätsprofessor Dr. med. Eva-Bettina Bröcker für die Bereitstellung des Themas und für die außerordentlich gute und kompetente Betreuung der Dissertation. Ich danke Ihnen für Ihren immerwährenden Einsatz und für jegliche Hilfe rund um meine Arbeit. Des Weiteren bedanke ich mich bei der sehr freundlichen Einführung und Aufnahme als Doktorand.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Kübler bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Von Herzen möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Oberarzt Dr. med. Hermann Kneitz bedanken. Ich bedanke mich für die Geduld und das zu jeder Zeit offene Ohr, das mir entgegengebracht wurde. Es hat mir sehr viel Freude gemacht die Dissertation in den Räumlichkeiten der Dermatologie zu erstellen.

Bei Herrn Prof. Dr. Rosenwald bedanke ich mich für die problemlose Bereitstellung der Präparate aus Ihrem Institut.

An dieser Stelle möchte ich mich auch sehr bei den lieben Damen aus der Histologie bedanken, allen voran Christa Knaus und Silvana Noll. Es hat mir sehr viel Freude bereitet mit Ihnen zusammen zu arbeiten und ich bin immer dankbar gewesen für jede Unterstützung und Hilfestellung bei der Färbung der Präparate.

Besonders hervorheben möchte ich auch die Unterstützung durch meine Eltern und meinen Bruder Thomas. Ich habe immer großen Rückhalt erfahren bis zum heutigen Tag und ich danke für jedes aufbauende Wort und jedes Gebet, ihnen ist meine Dissertation gewidmet.

Meiner Verlobten Ann-Kristin danke ich von Herzen für das Korrekturlesen, die Geduld dabei und für ihre Liebe.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Chris Jakob Erdem
Geburtsdatum: 29. Dezember 1986
Geburtsort: Nürnberg
Eltern: Safak Erdem, Orthopädieschuhmacher und
Schuhmachermeister
Ayhan Erdem geb. Mete, Hausfrau
Familienstand: Ledig

Schulbildung

09/1993 bis 07/1997 Georg-Paul-Amberger Grundschule in Nürnberg
09/1997 bis 07/2006 Sigena Gymnasium in Nürnberg
07/2006 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

10/2006 bis 11/2011 Studium der Zahnheilkunde an der Bayer. Julius-
Maximilians Universität Würzburg
09/2007 Naturwissenschaftliche Vorprüfung der
Zahnheilkunde
03/2009 Zahnärztliche Vorprüfung der Zahnheilkunde
11/2011 Zahnärztliche Prüfung

11/2009 bis heute Promovend in der Klinik und Poliklinik für
Dermatologie, Venerologie und Allergologie der
Universität Würzburg

Praktika

03/2008	Praktikum in der Praxis für Kieferorthopädie Dr. Stiemke
09/2008	Praktikum in der Praxis für Kieferorthopädie Dr. Stiemke
04/2009	Praktikum in der Praxis für Kieferorthopädie Dr. Stiemke
09/2009	Praktikum in der Praxis für Kieferorthopädie Dr. Stiemke
04/2010	Praktikum in der Praxis für Oralchirurgie S.Klassen