

Aus der Klinik und Poliklinik
für
Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

**Analyse von Bürstenbiopsien oraler Läsionen hinsichtlich der Expression
von melanom-assoziierten Antigenen A und Hypoxie-induziertem-Faktor 1
sowie deren Bedeutung in der Diagnostik**

Inaugural - Dissertation

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

vorgelegt von
Romy Ursula Nina Kanofsky geb. Kipke
aus Chemnitz

Würzburg 2019

Referent: Professor Dr. med. Dr. med. dent. Urs D. A. Müller-Richter

Korreferent: Professor Dr. med. dent. Gabriel Krastl

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29. September 2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

In memoriam meinem Vater

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis	
1	Einleitung 1
1.1	Orale Präkanzerosen und orale Plattenepithelkarzinome 1
1.2	Definition oraler Vorläuferläsionen 2
1.2.1	Leukoplakie 3
1.2.2	Oraler Lichen planus 4
1.2.3	Carcinoma <i>in situ</i> 5
1.2.4	Orales Plattenepithelkarzinom 5
1.2.5	Kanzerogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms 7
1.2.6	Feldkanzerisierung 8
1.3	Methoden in der Diagnostik oraler Läsionen 8
1.3.1	Intravitalfärbung mit Toluidinblau 9
1.3.2	Photodynamische Diagnostik 9
1.3.3	Die Bürstenbiopsie 10
1.3.4	Die Skalpellbiopsie 11
1.4	Melanom-assoziierte-Antigene Typ A (MAGE-A) 12
1.4.1	Allgemeines und Expression der MAGE-A Proteine 12
1.4.2	Struktur und Funktion der MAGE-Antigene 13
1.5	Funktion von MAGE I während der Tumorgenese 14
1.6	Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1) 14
1.6.1	Funktion von HIF-1 während der Tumorgenese 15
1.7	Fragestellungen 17
2	Material und Methoden 18
2.1	Studiendesign 18
2.1.1	Patientenkollektiv 18
2.1.2	Datenschutz und Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission 18

2.1.3	Studienbeschreibung	18
2.2	Geräte und Chemikalien	19
2.2.1	Geräte.....	19
2.2.2	Chemikalien	20
2.3	Methode der Immunhistochemie	21
2.3.1	Anfertigung und Färbung von Kryoschnitten.....	23
2.3.2	Standardfärbeprotokoll	23
2.4	Datenakquise und Datenauswertung.....	26
2.4.1	Angaben zur Statistik.....	26
3	Ergebnisse	29
3.1	Auswertbarkeit der Proben und Probandengruppen.....	29
3.2	Nachweis der Biomarker MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α	29
3.2.1	Positiver Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 stehen im Zusammenhang mit einem oralen PECA.....	30
3.2.2	Positiver Nachweis von HIF-1 α zeigt Zusammenhang mit einem oralen PECA	31
3.2.3	Der Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α zeigt eine hohe Übereinstimmung.....	32
3.2.4	Sensitivität und Spezifität von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α	33
3.3	TNM-Klassifikation und UICC-Stadium der an oralen PECA erkrankten Probanden	34
3.3.1	Ein positiver MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α Nachweis steht in keinem Zusammenhang mit einer bestimmten TNM-Klassifikation	36
3.3.2	Keine Korrelation zwischen Risikofaktoren und TNM-Klassifikation	37
3.4	Alter und Geschlecht in Bezug auf die Diagnose.....	38

3.5	Eine Korrelation zwischen Nikotin- und Alkoholkonsum mit einer oralen Vorläuferläsion und PECA ist nicht erkennbar	40
3.5.1	Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α in Bezug auf das Alter und Geschlecht.....	42
3.5.2	Es besteht keine Korrelation zwischen Tabakkonsum und dem Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α	43
3.6	Multivariate Zusammenhänge	44
3.6.1	Ein positiver MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α Nachweis zeigen einen univariaten Zusammenhang mit einer Erkrankung an einem oralen PECA	45
3.6.2	Logistische Regression: MAGE-A 1-4, 6, 12 positive Probanden zeigten eine hohe Wahrscheinlichkeit an einem oralen PECA zu leiden ...	47
4	Diskussion	49
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis	65
7	Abkürzungsverzeichnis	75
8	Abbildungsverzeichnis	77
9	Tabellenverzeichnis	79
10	Veröffentlichung	84
11	Anhang	85
11.1	TNM Klassifikation	85
11.2	Abbildungen Färbeergebnisse	87
11.3	Standardisierter Fragebogen	90
12	Lebenslauf	
13	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Orale Präkanzerosen und orale Plattenepithelkarzinome

Das orale Plattenepithelkarzinom ist das häufigste Malignom der Mundhöhle [1]. In Deutschland lag laut dem Robert-Koch Institut die Anzahl der Neuerkrankungen von Malignomen der Mundhöhle und des Rachens im Jahr 2011 bei 13.720. Seit Beginn des 21. Jahrhunderts gehen die Erkrankungs- und Sterberaten für Männer zurück. Gleichzeitig tritt bei Frauen ein gegenteiliger Trend auf [2]. Weltweit kann pro Jahr von 200.000 bis 350.000 Neuerkrankungen für beide Geschlechter ausgegangen werden [3]. Der Erkrankungsgipfel liegt bei Männern zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr, bei Frauen zwischen dem 50. und 75. Lebensjahr [4]. Orale Plattenepithelkarzinome entstehen meist aus bereits bestehenden Vorläuferläsionen (Präkanzerosen). Eine *de novo*-Entstehung ist selten. Die Zunahme von Präkanzerosen und in deren Folge Krebserkrankungen steht in Zusammenhang mit dem Alter der Gesellschaft sowie Tabak- und Alkoholkonsum. Die Kombination aus Beidem gilt als kritisch, da es zu einer Addition des Risikos kommt [5-7].

Humane Papillomviren (HPV) sind als Auslöser von Plattenepithelkarzinomen im Mund-Rachen-Raum bekannt [8]. Insbesondere werden die Hoch-Risiko-Subtypen 16, 18 und 33 für die Entstehung der Malignome verantwortlich gemacht. Für die Mundhöhle spielt diese Ätiopathogenese eine untergeordnete Rolle. Weitere Faktoren, die die Entstehung eines oralen Karzinoms begünstigen, sind eine einseitige und vitaminarme Ernährung, mechanische Reizungen der Mundschleimhaut, genetische Alterationen und schlechte Mundhygiene. Auch das Vorliegen einer parodontalen Erkrankung kann zu einer Entartung führen [9].

In Deutschland liegt die 5-Jahres-Überlebensrate eines oralen Plattenepithelkarzinoms (PECA) bei zirka 53% [10]. Patienten kommen häufig erst zu Untersuchung, wenn bereits ausgedehnte Tumoren die Mundhöhle einnehmen (Stadium T3/T4). Durch eine Diagnose im Stadium T1/T2 kann eine 5-Jahres-

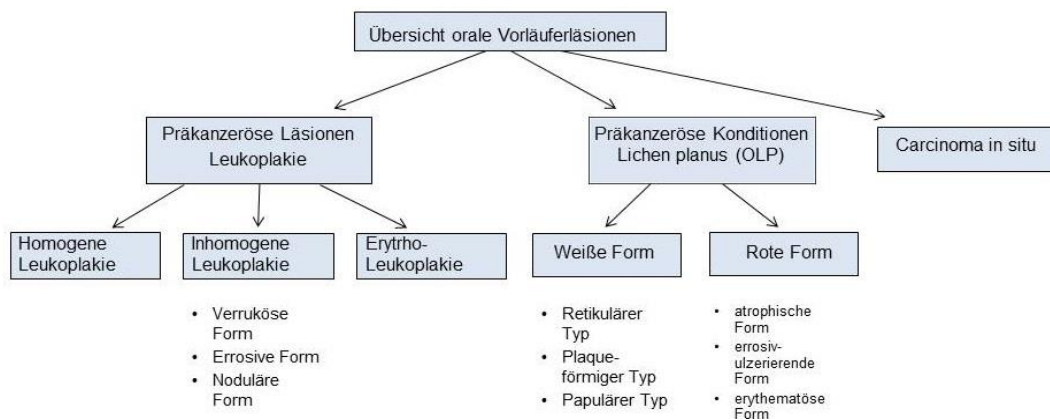
Überlebensrate von zirka 70 % erreicht werden [4]. McLeod *et al.* und Onizawa *et al.* zeigten, dass eine frühzeitige Diagnose eines oralen Malignoms die Prognose des Patienten positiv beeinflusst [11, 12].

Die Inspektion der oralen Mukosa ist wesentlicher Bestandteil der hauszahnärztlichen Patientenversorgung. Die zeitnahe Befundung von suspekten Läsionen, beispielsweise über die orale Bürstenbiopsie, ist an dieser Stelle von besonderem Interesse.

1.2 Definition oraler Vorläuferläsionen

Eine orale Vorläuferläsion ist definiert als ein morphologisch verändertes Gewebe in dem ein Karzinom vermehrt auftritt. Bei Erkrankungen, welche mit einem erhöhten Entartungsrisiko einhergehen, werden präkanzeröse Läsionen von präkanzerösen Konditionen unterschieden [13, 14]. Als präkanzeröse Läsion wird eine konkrete Manifestation an einer umschriebenen Mundschleimhautstelle bezeichnet. Die Leukoplakie und Erythroplakie gelten als typische Beispiele einer präkanzerösen Läsion. Im Gegensatz dazu beschreibt eine präkanzeröse Kondition eine Erkrankung, welche mit einem signifikant erhöhtem Krebsrisiko verbunden ist, z.B. der orale Lichen planus [15, 16] (siehe Abbildung 1). Klinisch zeigen sich Mundschleimhautveränderungen als Verlust des Oberflächenglanzes, Verhornung, Erosionen, Ulzerationen, Blasenbildung, Desquamation, Atrophie und Veränderung der Pigmentierung. Begleitend klagen Patienten häufig über Schmerzen oder Brennen in betroffenen Arealen [17].

Abbildung 1: Übersicht über orale Vorläuferläsionen und Carcinoma in situ, dargestellt sind Präkanzeröse Läsionen bzw. Konditionen und deren Untergruppen.



1.2.1 Leukoplakie

Die Leukoplakie ist eine weiße, nicht abwischbare Veränderung der Schleimhaut. Sie ist keiner definierten anderen Erkrankung zuzuordnen und stellt damit lediglich eine deskriptive Ausschlussdiagnose dar. Die Dignität wird bei der Leukoplakie nicht berücksichtigt [18]. Histologisch ist die Epithelschichtung in einer Leukoplakie regelrecht. Eine Hyperkeratose bedingt die charakteristische weiße Farbe des betroffenen Mundschleimhautareals. Die Einteilung oraler Leukoplakien erfolgt anhand der Klassifikation der World Health Organization (WHO) [16, 19]. Sie unterscheidet die homogene und inhomogene Leukoplakie. Die homogene und inhomogene Leukoplakie unterscheiden sich in ihre Oberflächenbeschaffenheit. Die homogene Form kann flach, korrigiert, bimssteinartig sein und eine flache Auffächerung aufweist. Die homogene Leukoplakie ist meist asymptomatisch. Die inhomogene Form, unterteilt sich in eine verruköse, erosive, noduläre Form und in die Erythroplakie. Die Erythro-Leukoplakie stellt eine besondere Form der Leukoplakie dar. Sie ist eine Kombination aus glatten, weißen Flächen und roten, meist ulzerierten Bereichen [20].

Die Ätiopathogenese der oralen Leukoplakie ist nicht vollständig geklärt. Im Geschlechtervergleich erkranken Männer häufiger an oralen Leukoplakien als Frauen. Der Erkrankungsgipfel liegt im sechsten Dezennium [21]. Auf molekularer Ebene kommt es zum Verlust der Heterozygotie [22-24]. Tabakkonsum gilt als Hauptrisiko insbesondere in Kombination mit Alkoholkonsum. Beide Substanzen verstärken sich in ihrer Wirkung [25]. Daneben gibt es idiopathische Formen. Die Entartungswahrscheinlichkeiten beträgt zwischen 0,9 % bis 17,5 % [14]. Bei zirka zwei Prozent findet innerhalb von fünf Jahren eine Entartung zu einem oralen Plattenepithelkarzinom statt [26]. Weitere Faktoren, die die Entartungswahrscheinlichkeit positiv beeinflussen sind Tabak- und Alkoholgenuss, Alter, Geschlecht, Größe und Homogenität des betroffenen Areals.

Gemäß Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) besteht die Initialtherapie der Leukoplakie in der Entfernung von Noxen, wie Tabak, Alkohol oder Candidainfektionen [27]. Medikamentöse Therapien können mit Retinoiden, Bleomycin und Calcipotriol durchgeführt

werden. Ob eine Exzision notwendig ist, richtet sich nach dem Dysplasiegrad. Liegt bereits eine dysplastische Veränderung vor, ist eine Exzision *in toto* obligat [27, 28].

1.2.2 Oraler Lichen planus

Der Lichen planus der Mundhöhle ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des oralen Epithels [29]. Die klinische Symptomatik variiert, sie kennzeichnet sich durch Phasen der Exazerbation und Remission [30]. Die Krankheit kann einerseits beschwerdefrei verlaufen, andererseits mit starkem Brennen und Schmerzen im betroffenen Bereich einhergehen. Das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung variiert. Der retikuläre, plaqueförmige und papuläre Typ werden zu den weißen Formen des Lichens gezählt. Dem gegenüber stehen die roten Formen: die atrophische, erosiv-ulzerierende und erythematöse Form [31]. Der retikuläre Typ tritt am häufigsten auf. Er wird durch eine netzartige weiße Streifung, der sog. Wickhamschen Streifung, charakterisiert. Bevorzugte Lokalisation dieses Typus ist das Planum buccale. Die plaqueförmige Form ist häufig mit Tabakkonsum assoziiert. Die papulöse Form zeigt meist einen akuten Verlauf, ist selten und geht vermehrt in andere Formen des Lichen planus über [32].

Die Ätiopathogenese ist nicht geklärt. Vermutlich liegt dem Lichen planus eine Autoimmunerkrankung zu Grunde, wobei eine T-Zellvermittelte Entzündungsreaktion auftritt. Zytotoxische CD8⁺-T-Lymphozyten induzieren hierbei die Apoptose basaler Keratinozyten in der Mukosa [33]. Multiple Faktoren stimulieren das Auftreten oder die Exazerbation des Lichen planus. Auslöser können psychischer Stress, genetische Faktoren, Diabetes mellitus, chronische Hepatitis-C-Infektion, Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen nach Knochenmarkstransplantation, mechanische Reizungen durch Zahnersatz oder diverse Medikamente (β -Blocker, Angiotensinkonversionsenzym-Hemmer, Thiazid-Diuretika, Tetracykline, Sulfonylharnstoffe, Phentothiazine, Penicillamine, Goldsalze und antiretrovirale Medikamente beim Humanen Immundefizienz-Virus (HIV)) sein [34-36].

Patienten mit einem Lichen planus erkranken häufiger an einem oralen Plattenepithelkarzinom [22, 37, 38]. Besonders gefährdet sind Patienten, die einen erosiv-ulzerierenden oder erythematösen Lichen planus aufweisen [37, 39]. Für einen oralen Lichen planus werden Entartungsraten zwischen 11 % und 67 % angegeben [14, 40].

Für die Therapie des Lichen planus existiert aktuell keine Leitlinie. Primär sollen irritative Faktoren beseitigt werden. Lichen planus mit Epitheldysplasie sollte *in toto* im Gesunden exzidiert werden. Weitere Therapieoptionen stellen die CO₂-Laserchirurgie, die Kryochirurgie, die photodynamische Therapie und eine systemische Pharmakotherapie mit Kortikosteroiden, Retinoiden und Betakarotin dar. Häufig treten nach Absetzen einer systemischen Therapie Rezidive auf [41].

1.2.3 Carcinoma *in situ*

Als Carcinoma *in situ* werden auf das Gewebe ihres Ursprungs begrenzte Karzinome ohne die Fähigkeit der Metastasierung bezeichnet. Die reguläre Schichtung des Epithels ist aufgehoben, es hat noch keine Invasion in die Basalmembran stattgefunden und der Tumor wächst nicht invasiv [13].

1.2.4 Orales Plattenepithelkarzinom

Orale Plattenepithelkarzinome können sich aus gesunder Mundschleimhaut oder aus Präkanzerosen entwickeln [42]. Es wächst diffus infiltrierend, ulzerierend und stellt sich klinisch meist mit einem derben Randwall dar. Am häufigsten ist es im Mundboden lokalisiert [43].

Histologisch wird das orale Plattenepithelkarzinom in vier Differenzierungsgrade eingeteilt. G1 gilt als hochdifferenziert und G4 als undifferenziert. Die weitere Einteilung erfolgt nach Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen durch die TNM-Klassifizierung der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (siehe im Anhang:Tabelle 10) [13]. In 20-40 % kommt es zu Metastasierungen in die Halslymphknoten [4, 44]. Fernmetastasen durch ein orales Plattenepithelkarzinom sind selten zu beobachten.

Ätiopathogenetisch stellen Tabak und Alkohol die schwerwiegendsten Faktoren für die Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms dar [43, 45]. Insbesondere die Kombination aus beidem, so gilt Alkohol als Kokarzinogen. Tabakrauch enthält spezifische N-Nitrosamine (TSNA) und durch die Kombination mit Alkohol wird das Eindringen dieser Giftstoffe in die Mundschleimhaut erleichtert [46-48]. Schlechte Mundhygiene, insuffizienter Zahnersatz, Mangelernährung [49], Immunsuppression, sowie das HPV [50, 51] und das Epstein-Barr-Virus (EBV) gelten ebenfalls als Risikofaktoren bei der Entstehung von Karzinomen der Mundhöhle [17, 43].

Laut dem Leitlinienprogramm Onkologie, S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom, sollten verschiedene Kriterien zur Therapiewahl beachtet werden. Die Therapiemöglichkeiten des oralen Karzinoms sind die chirurgische Intervention, die Strahlen- und Chemotherapie. Kleinere Karzinome der Mundhöhle (T1 und T2) können durch Operation, sowie Strahlentherapie geheilt werden [52, 53]. Fortgeschrittene Malignome der Mundhöhle (T3 oder T4) sollten kombiniert chirurgisch und strahlentherapeutisch behandelt werden. Da sie bei alleiniger Strahlentherapie eine höhere Rezidivrate aufweisen [54-56].

Die Wahl der Therapie sollte immer in Abhängigkeit des Patienten getroffen werden. Bei der Entscheidung zur Operation sollte immer die Erreichbarkeit tumorfreier Resektionsgrenzen und die Möglichkeit der Rekonstruktion und der erreichbaren postoperativen Lebensqualität ausschlaggebend sein [57]. Ebenfalls spielen der Wunsch des Patienten, sowie dessen körperliche Verfassung eine wesentliche Rolle. Bei Patienten mit operablen Tumoren sollte eine Tumoresektion mit Rekonstruktion erfolgen. Sollte keine R0-Resektion erfolgen, verschlechtert dies die Prognose signifikant [58, 59]. Bei knappen oder nicht tumorfreien Resektionsrändern empfiehlt die S3-Leitlinie eine postoperative Strahlentherapie mit einer effektiven Tumordosis von mindestens 60 Gray. Ebenfalls bei fortgeschrittenen Tumoren (T3 oder T4) sollte eine postoperative Radio- oder Radiochemotherapie erfolgen. Die Entscheidung zur Chemotherapie mit Cisplatin sollte in Abhängigkeit zum histopathologischen Risikokriterien eines Tumor-

rezidiv gestellt werden - bei knappen Resektionsrändern oder extrakapsulären Tumorwachstum [60, 61].

Im Anschluss sind regelmäßige Kontrolluntersuchungen, sowie psychosoziale Betreuung angeraten.

1.2.5 Kanzerogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms

Gesunde Mundschleimhaut besteht aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, das teils unverhornt, teils verhornt ist. Neben Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und Melanozyten besteht das Epithel der Mundhöhle hauptsächlich aus Keratinozyten [62]. Aufgrund des Differenzierungsgrads der Keratinozyten lässt sich das orale Epithel in drei bzw. vier Schichten (keratinisiertes Epithel) gliedern. Das *Stratum basale*, welches sich an die Basalmembran anschließt, enthält mitotisch aktive Zellen, von denen die physiologische Regeneration des oralen Epithels ausgeht. Sie replizieren sich vier- bis achtmal, bevor sie die Basalzellschicht verlassen. Die Zellen durchlaufen auf dem Weg vom *Stratum basale* zum *Stratum corneum* verschiedene Differenzierungsstufen, welche mit Änderung der Physiologie und Morphologie einhergehen [63].

Als Kanzerogenese wird der Prozess der Tumorentstehung bezeichnet [46]. Maligne Tumoren entstehen kumulativ durch mehrere Faktoren. Zur Transformation einer gesunden Zelle müssen mehrere genetische Veränderungen zusammentreffen. Solche Veränderungen finden in Schlüsselgenen der Stammzellen, die für die Wachstumsregulation und Signaltransduktion verantwortlich sind, statt. Durch diese Veränderungen entstehen Funktionsverluste von Antionkogenen. Durch Akkumulation diverser genetischer Aberrationen entwickeln sich über mehrere Zwischenschritte (Dysplasie und Carcinoma *in situ*) invasive Karzinome. Als Vorläufer gelten immer Zelldysplasien. Dysplasien sind veränderte Zellstrukturen [64]. Histologisch können die Unterschiede die Architektur der Epithelschichtung oder die Zytologie (verschobene Kern-Plasma Relationen, abnorme Zellgrößen) betreffen. Auf zellulärer Ebene besteht ein Zusammenhang zwischen dem klinischen Erscheinungsbild und feingeweblicher Veränderung. Unterschieden werden Epitheldysplasien, welche die Basalzellhyperplasie, Zellpolymorphie oder eine Störung der Epithelschichtung mit sich

bringen, von Epithelhyperplasien, welche sich durch Hyperkeratose, Akanthose, Hyperparakeratose und lymphozytäre Infiltrationen des Stromas auszeichnen (siehe Tabelle 1) [65].

Tabelle 1: Kriterien einer Zelldysplasie; Zytologische Veränderungen in der Zellmorphologie und der Architektur des Epithels [66]. Linke Spalte: Veränderungen der Zellmorphologie; rechte Spalte: Veränderungen der Architektur des Epithels

Kriterien einer Zelldysplasie: Merkmale der Veränderungen der	
Zellmorphologie	Architektur des Epithels
Zunahme der Zellkerngröße, Zellgröße	Verlust der Basalzellpolarität
Variationen der Zellkerngröße	Abnorme oberflächliche Mitosen
Atypische Mitosefiguren	Zunahme der Mitoserate
Verschobene Kern-Plasma-Relation	Dyskeratose
Kernpleomorphismus	Keratin in Retezapfen

1.2.6 Feldkanzerisierung

Slaughter *et al.* beschrieben die Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms aus histologisch veränderten Zellen [67]. Erwirbt eine Stammzelle eine genetische Veränderung, so entstehen im umliegenden lokal begrenzten Bereich aus diesen Tochterzellen; Slaughter spricht von einem Feld. Durch schnelles Wachstum, dem sogenannten „*growth advantage*“, werden benachbarte Felder zügig mit einbezogen. Es entstehen weitere Konglomerate genetisch veränderter Zellen. Schädliche Einflüsse, wie das Rauchen, können in dieser Phase weitere Mutationen auslösen. Diese Felder konnten aufgrund nachgewiesener Mutationen von Tumorsuppressor Protein 53 (TP53) als ursächlich für Entartungen im Kopf- und Halsbereich nachgewiesen werden. TP53 gilt als einer der wichtigsten Tumorsuppressoren und kontrolliert das Zellwachstum. Die karzinogene Potenz steigt mit Zunahme der mutierten Zellen [68].

1.3 Methoden in der Diagnostik oraler Läsionen

Orale Läsionen werden durch Inspektion und Palpation beurteilt. Jedoch ist die klinische Beschreibung der Läsionen durch Inspektion und Palpation bedingt aussagekräftig. Maligne Entartungen können sich hinter harmlos wirkenden Läsionen verbergen. Zur Einschätzung der Gefährdungspotenz einer Läsion stehen verschiedene diagnostische Methoden zu Verfügung, die unten weiter be-

schrieben werden. Als Goldstandard in der Befundung oraler Läsionen gilt die Skalpellbiopsie mit anschließender histologischer Begutachtung [27, 69]. Zur Verlaufskontrolle eignet sich eine Fotodokumentation. Die Zeitintervalle zwischen den Untersuchungssitzungen werden nach Größe und Ausprägung gewählt. Die klinische Akzeptanz der Verfahren variiert [70, 71].

1.3.1 Intravitalfärbung mit Toluidinblau

Eine 1%-ige Toluidinblau Lösung wird auf die orale Schleimhaut aufgetragen. Nach zweiminütiger Einwirkzeit, wird die überschüssige Lösung via zweiprozentiger Essigsäure wieder entfernt [72]. Toluidin färbt Kernstrukturen blau und ermöglicht eine vergrößerte Kern-Plasma-Relation in suspekten Läsionen zu detektieren [73]. Proliferationsstarke Areale können eine erhöhte Farbintensität aufweisen. Der Nachteil dieser Methode liegt in der geringen Spezifität. Intravitalfärbungen mit Toluidinblau zeigen eine Spezifität zwischen 25-81 % und für die Sensitivität 67-100 % [74-77]. Eine Darstellung symptomarmer Karzinome ist möglich, die klinische Relevanz ist gering.

1.3.2 Photodynamische Diagnostik

Die photodynamische Diagnostik basiert auf der Anregung fluoreszierender Vitalfarbstoffe, welche in dysplastischen Zellen vermehrt aufgenommen werden. Als photosensibler Farbstoff wird dem Patienten 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) topisch verabreicht. 5-ALA ist die körpereigene Ausgangssubstanz der Häm-Synthese. Dies führt zur Akkumulation von fluoreszierendem Protoporphyrin IX in dysplastischen und maligne entarteten Gewebe. Fluoreszenzbefunde gelten als suspekt und sollten biopsiert werden. Protoporphyrin IX kann durch Lichteinwirkung (405 nm) angeregt werden. Diese Methode zeigt eine Sensitivität zwischen 84-99 %. Die Spezifität liegt zwischen 60-89 % [78-80]. Als problematisch stellen sich falsch positive Befunde bei Prothesenträgern und vorbestrahlten Personen dar [79]. Auch Bakterien können die Spezifität negativ beeinflussen [81].

1.3.3 Die Bürstenbiopsie

Die Bürstenbiopsie ist eine gering invasive, einfach durchführbare und patientenverträgliche Untersuchungsmethode. Sie gilt als schmerzarm und erleichtert regelmäßige Untersuchungen [70, 82]. Sie erlaubt, durch Reproduzierbarkeit, engmaschige Kontrollen oraler Läsionen. Mittels rigiden Borsten werden dabei Zellen aus allen Zellschichten geerntet. Besonders Zellen des *Stratum basale*, in welchem mitotische Aktivität stattfindet, müssen entnommen werden [83]. Die Bürste wird mit leichtem Druck rotiert. Kleine Blutungspunkte markieren die korrekte Eindringtiefe. Auf diese Weise geerntete Zellen werden auf Objektträgern ausgestrichen und fixiert. Nach einer Grundfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) erfolgt die Diagnostik durch einen Facharzt für Pathologie. Entsteht daraus ein Verdacht auf ein Malignom, ist eine Skalpellbiopsie obligat [27]. Eine reine zytomorphologische Untersuchung oraler Läsionen konnte studienabhängig eine Sensitivität zwischen 79–94,5 % erreichen. Für die Spezifität konnten Werte zwischen 95-100 % ermittelt werden [84-87]. Um die Bürstenbiopsie zu verbessern wurden unterstützende Färbungen und Verfahren evaluiert:

1.3.3.1 Computergestützte Bildanalyse (OralCDx[®])

Ergänzend zur oralen Bürstenbiopsie können die Biopsate einer computergestützten Bildanalyse (OralCDx[®]; CDx Diagnostics[®], Inc.; New York, USA) zugeführt werden. Sie erleichtert die Detektion abnormer Mundschleimhautzellen. Nach der Entnahme von Mundschleimhautzellen durch eine Bürstenbiopsie werden die Zellen mit Papanicolaou gefärbt und computergestützt auf atypische Zellen untersucht. Die 192 am stärksten von der Norm abweichenden Zellen werden detektiert und dem Pathologen vorgelegt. Der Pathologe teilt die Proben qualitativ in eine Kategorie ein, DNA-diploid, DNA-polyploid und DNA-aneuploid. Diese Einteilung entscheidet über das weitere Procedere. Computergestützte Bildanalysen erreichen eine Sensitivität von bis zu 92,3 %. Ihre Spezifität liegt bei 94,3 % [88, 89].

1.3.3.2 Immunzytologie

Orale Bürstenbiopsate können mit einer immunzytologischen Untersuchung ergänzt werden. Hierbei werden Oberflächenantigene gezielt für die weitere

Diagnostik genutzt. Driemel *et al.* untersuchte bspw. die Verwendung eines monoklonalen Antikörper gegen die gamma 2-Kette von Laminin-5 (Laminin 5-y2-Kette) [90, 91]. In oralen Plattenepithelkarzinomen findet sich eine erhöhte Synthese von Laminin-5 durch invasive Karzinomzellkomplexe mit Deposition des Proteins im benachbarten Stroma, somit wurde Laminin-5 als eine mögliche Leitschiene für die Invasion benannt [92]. Hiermit konnte die Sensitivität auf 93-95 % und die Spezifität auf annähernd 100 % gesteigert werden [90, 93].

1.3.3.3 Die orale DNA Bildzytometrie

Die orale DNA-Bildzytometrie wird ebenfalls als ergänzende Methode zur konventionellen Bürstenbiopsie angewendet. Auf einen Objektträger aufgebrachte Zellen werden mit DNA-spezifischen Feulgenfarbstoff markiert. Dieser Farbstoff kann durch Messung der optischen Dichte der Kern-DNA quantifiziert werden [94]. Die Quantifizierung dient der Erkennung einer DNA-Aneuploidie. Eine Aneuploidie gilt als früher Marker für eine neoplastische Transformation [95, 96]. Es ist zu beachten, dass nicht alle Tumoren aneuploide Stammlinien aufweisen, diese gelten als prospektiv maligne [97]. Zusätzlich können Chromosomengewinne oder Verluste von unter 10 % des gesamten DNA-Gehaltes nicht identifiziert werden. In Kombination mit der oralen Bürstenbiopsie konnten Werte von 83,3-100 % für die Sensitivität und für die Spezifität Werte zwischen 95,8-100 % erreicht werden [98-100].

1.3.4 Die Skalpelliopsie

Zur Sicherung der Dignität ist die Skalpelliopsie verdächtiger Läsionen der Goldstandard [27, 101]. Die Skalpelliopsie wird an repräsentativen Stellen der suspekten Mundschleimhautläsion vorgenommen und anschließend einer histopathologischen Begutachtung zugeführt. Als Nachteil der Skalpelliopsie gilt das Eingreifen in bereits suspekten Läsionen der Mundschleimhaut. In der Folge können unerwünschte Vernarbungen entstehen. Sie können eine spätere Beurteilung erschweren. Multiple Skalpelliopsien verringern die Bereitschaft des Patienten zur aktiven Mitwirkung und können rechtzeitige Diagnosestellungen erschweren [70, 71].

1.4 Melanom-assoziierte-Antigene Typ A (MAGE-A)

1.4.1 Allgemeines und Expression der MAGE-A Proteine

Die *melanoma-associated-antigens Typ A* (MAGE-A) wurden erstmals 1991 von Boon *et al.* beschrieben [102]. Sie wurden aus einer humanen Melanomzelllinie kloniert. MAGE-A Antigene werden durch Humane Leukozyten Antigene (HLA) HLA-A1 oder HLA-A2 auf der Oberfläche von malignen Zellen präsentiert. Dies ermöglicht eine T-Lymphozyten-vermittelte Immunantwort [103]. MAGE-A Antigene werden von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen erkannt und könnten darüber einen therapeutischen Angriffspunkt bieten [102]. Alle Mitglieder der MAGE-Familie haben eine 170 bis 200 Aminosäuren umfassende homologe Region gemein (MAGE homology domain) [104]. Jedes MAGE-Gen weist eine 73-88 % Homologie mit MAGE-1 auf [105]. Die physiologische Funktion der MAGE-Antigene ist nicht vollständig geklärt. MAGE-Proteine werden in Gruppe I und II unterteilt [106].

MAGE Antigene der Gruppe I werden ausschließlich in Keimzellen (Hoden, Ovar und Plazenta), fetalem Gewebe oder Tumorzellen exprimiert [107]. Müller-Richter *et al.* zeigte 2008 die Expression von MAGE I in fetalen Keratinozyten [108].

Die Gruppe I wird in die Untergruppen A, B und C unterteilt. Sie werden auch Cancer/Testis Antigene genannt. Die MAGE-A-Subgruppe ist auf dem langen Arm des X-Chromosom 28 kodiert [109]. Die MAGE-A-Subgruppe unterteilt sich in zwölf verschiedene MAGE-A Antigene [106]. Die jeweiligen Antigene unterscheiden sich in ihrem Einfluss auf das Tumorstadium. Eine Sonderrolle nimmt MAGE-A7 ein. Es gilt als Pseudogen und wird nicht translatiert. Die elf MAGE-Antigene werden in wechselnder Frequenz und Stärke von Tumoren exprimiert [110, 111].

Die Proteine der Gruppe II umfassen 15 Gene. MAGE-II-Familienmitglieder spielen während der Embryogenese, der Keimzellgenese und der Apoptose eine physiologische Rolle. Über die Rolle der MAGE-Familienmitglieder in Be-

zug auf die Zellaktivität ist wenig bekannt. Sie werden ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben im menschlichen Organismus exprimiert [106, 112].

1.4.2 Struktur und Funktion der MAGE-Antigene

Die meisten MAGE-Gene weisen drei Exone auf. Eine Ausnahme bilden MAGE-A2 und MAGE-A9. Sie besitzen ein viertes Exon [113]. Im letzten Exon des jeweiligen Gens befindet sich die kodierende Region, das zur Bildung eines 309 bis 319 Aminosäuren langen Proteins führt [111]. MAGE-A7 bildet mit der Länge von 80 Aminosäuren als Pseudogen eine Ausnahme. Die MAGE-A-Gene weisen in ihrer Nukleinsäuresequenz eine Homologie von 73-88 % auf. MAGE-A1 verhält sich hier different. Es weist eine Homologie von 57-77 % im Vergleich zu anderen MAGE-A-Genen auf [111]. Die MAGE-A-Gene besitzen trotz ihrer großen Homologie eine Varianz an Promotoren. MAGE-A4 und MAGE-A6 weisen acht alternative Promotoren auf. Die anderen Gene hingegen jeweils nur einen Promoter [114].

Die meisten der 12 verschiedenen MAGE-Gene weisen drei Exons auf [111]. MAGE-A2 und MAGE-A9 besitzen vier Exons [111]. MAGE-A4 und MAGE-A6 weisen weitere Exons auf, wobei durch alternatives Spleißen das jeweils erste Exon ausgetauscht wird. Über unterschiedliche regulatorische Elemente im Promotor wird die entsprechende Exonkombination bestimmt [114]. Im letzten Exon der verschiedenen MAGE-Transkripte befindet sich der *open reading frame*, der für die Translation des 309 bis 319 Aminosäuren langes Protein führt [111]. Eine Ausnahme hierfür bildet MAGE-A7. Das nicht transkribierte Pseudogen enthält einen *open reading frame* mit einer Länge von 80 Aminosäuren [111]. Die MAGE-A-Gene weisen in ihrer Nukleinsäuresequenz eine Homologie von 73-88 % auf. MAGE-A1 verhält sich hier different. Es weist eine Homologie von 57-77 % im Vergleich zu anderen MAGE-A-Genen auf [111].

MAGE-A-Gene werden über Methylierungsvorgänge reguliert. Unter DNA-Methylierung wird das Anhängen einer Methylgruppe an das Kohlenstoffatom im Cytosinring verstanden. In der Folge entsteht hier 5-Methylcytosin [115].

1.5 Funktion von MAGE I während der Tumorgenese

Während der Kanzerogenese unterliegen einzelne Zellen einer irreversiblen genetischen Veränderung. Entartete Zellen führen durch klonale Proliferation zur Entstehung eines in der Folge heterogenen Tumors [116]. Diese Prozesse können eine Hypermethylierung auslösen und dadurch zu einer Veränderung der Transkription von MAGE-Genen führen [117].

MAGE-A-Proteine beeinflussen den Zellzyklus [104]. MAGE-A1 inhibiert im NOTCH-1-Signalweg die Signaltransduktion. Dieser Signalweg ermöglicht die Zell-Zell-Kommunikation und deren Interaktion via NOTCH-Rezeptor. Im adulten Organismus spielt dieser Signalweg bei der Zelldifferenzierung eine essentielle Rolle [118]. MAGE-A1 bindet an das SKI-interacting-Protein (SKIP), das die Transduktion vermittelt. In der Folge fungiert MAGE-A1 im beschriebenen Signalweg als transkriptioneller Repressor [118]. Genprodukte von MAGE-A2 hemmen das TP53. Die Apoptose wird gehemmt und es kommt zu einem unregulierten Tumorwachstum. MAGE-A3 interagiert mit einem Korepressor von TP53 und unterbindet die Apoptose in Tumorzellen. MAGE-A4 hat vermutlich einen gegenläufigen Effekt, indem es an das Onkoprotein Gankyrin bindet und die TP53-vermittelte Apoptose induziert. Dies erfolgt durch Abspaltung der C-terminalen 107 Aminosäuren des MAGE-A4-Antigens [119].

Einige Studien konnten zeigen, dass die MAGE-A Expression in Tumorzellen mit der Entdifferenzierung des Tumors und dessen Prognose korreliert. Parkauf *et al.* zeigten, dass eine Expression eines Genfamilienvertreter MAGE-A1, -A2 oder -A3 zu einer höheren Resistenz gegenüber dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) führt [120].

1.6 Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1)

Sauerstoff wird im Organismus für essentielle metabolische Vorgänge wie der Energiesynthese benötigt. Der Hypoxie-induzierter-Faktor-1 (HIF-1) aktiviert Signalwege, die zur Anpassung des Organismus an Hypoxie dienen. HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor. Er besteht aus einer sauerstoffabhängigen α -Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit. Die Anpassung wird durch die α -Untereinheit gesteuert [121].

Hypoxie ist ein Charakteristikum im Mikromilieu eines soliden Tumors und beeinflusst die Prognose des Krankheitsverlaufs negativ [122]. Hypoxische Areale entstehen durch rasantes unkontrolliertes Tumorstadium und chronische Entzündungsvorgänge [123, 124]. Dies tritt auf, wenn der Abstand zur Gefäßversorgung zunimmt und die maximale Diffusionsstrecke von Sauerstoff (zirka 150 µm) überschritten wird. Dieser Mechanismus limitiert zunächst das Tumorstadium. In Folge entsteht eine Selektion der Tumorzellen, hin zu Hypoxie-adaptierten Tumorzellen. Diese Zellen können unter relativ-hypoxischen Verhältnissen proliferieren. Vor diesem Hintergrund ist eine Tumorstadiumprogression unter nahezu hypoxischen Bedingungen möglich [125, 126].

Grundlage der Anpassung an die Hypoxie ist die Umstellung der Energiegewinnung auf anaerobe Glykolyse, weshalb Glucosetransporter (z.B. Glut-1) und glykolytische Enzyme (z.B. Phosphoglyceratkinase-1) verstärkt synthetisiert werden [127]. Zeitgleich findet Angiogenese und Inhibition von Apoptose statt. Als Vermittler wurde in diesem Kontext der Hypoxie-induzierte Faktor 1 (HIF-1) identifiziert [128].

1.6.1 Funktion von HIF-1 während der Tumorstadiumgenese

Die Überexpression von HIF-1 α ist ein Merkmal verschiedener Tumorstadiumentitäten [129, 130]. HIF-1 wird in Folge von intratumoraler Hypoxie, der Expression von Onkogenen (Human epidermal growth factor receptor 2 ErbB2/Ras Signalweg), durch Inaktivierung von Tumorstadiumsuppressorgenen (von-Hippel-Lindau, VHLP) oder die Phosphatase und Tensin homolog (PTEN) initiiert [131]. Durch die Stabilisierung des HIF-1 Komplexes unter hypoxischen Bedingungen, nimmt HIF-1 eine Schlüsselposition in der Aktivierung des Hypoxie-induzierten Signalwegs bei der Tumorstadiumgenese ein. Unter normoxyschen Bedingungen weist HIF-1 α eine nur sehr geringe Halbwertszeit auf [132]. HIF-1 α wird an zwei spezifischen Prolinresten innerhalb der Oxygen-Dependent-Degradation-Domäne hydroxiliert [133]. Durch Hydroxylierung wird die Bindung des VHLP ermöglicht. In der Folge kommt es zur Ubiquitin-abhängigen Degradation von HIF-1 α . Verminderter Sauerstoffpartialdruck im Gewebe hemmt die Hippel-Lindau-Ubiquitin vermittelte Degradation. HIF-1 α akkumuliert im Gewebe [134]. Nach Stabilisie-

rung des hypoxischen Stresses wird das HIF-1 α -Protein in den Zellkern transloziert. Hier dimerisiert es mit der β -Untereinheit und bildet den aktiven HIF-Transkriptionskomplex und löst dadurch eine transkriptionelle Antwort aus [130]. Das entstandene HIF-1 bindet an DNA-Sequenzen und stimuliert die Expression von Genen, die Glykolyse und die Sezernierung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [135]. VEGF ist ein Signalmolekül in der Vasculogenese und der Angiogenese. Er stimuliert vaskuläres Endothel und beeinflusst andere Zellen (z. B. Stimulation der Migration von Monozyten und Makrophagen) [136].

Bos *et al.* und Ryan *et al.* zeigten, dass HIF-1 α murine Tumorzellen inhibiert. Es wurde diskutiert, ob dadurch das Tumorwachstum durch eine erhöhte Apoptoserate, verminderte Angiogenese und fehlende metabolische Adaption reduziert werden kann, um letztlich die Progredienz eines Tumors zu vermindern [137, 138].

1.7 Fragestellungen

Die Beurteilung und Überwachung präkanzeröser Veränderungen der Mundschleimhaut stellt für den Behandler eine Herausforderung dar. Eine frühe Diagnostik einer Entartung und zeitnahe Therapie führt zur Verbesserung der Heilungschancen. Eine rein visuelle und palpatorische Untersuchung ist stark beschränkt. Die konventionelle Bürstenbiopsie ist an dieser Stelle in ihrer Aussagekraft limitiert. In dieser Studie sollte der Einsatz geeigneter ergänzender Untersuchungsmethoden in Kombination mit einer Bürstenbiopsie evaluiert werden. Als ergänzende Untersuchungsmethode wird vor diesem Hintergrund die Kombination der Bürstenbiopsie in Verbindung mit einer Biomarkerdiagnostik untersucht.

Das Risiko einer Entartung geht mit zellulärer Transformation einher, so dass der Nachweis von MAGE-A und HIF-1 α die Diagnosefindung mittels Bürstenbiopsie verbessern könnte.

MAGE-A gilt als etablierter Tumormarker, der in dieser Studie durch einen vielversprechenden Marker HIF-1 α ergänzt wird [139, 140].

Dabei soll die Frage geklärt werden, ob anhand von Bürstenbiopsaten in Verbindung mit Proteinnachweis und immunzytochemischen Färbungen von HIF-1 α sowie Antikörpernachweis von MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6 und -A12 eine genauere Diagnosestellung möglich ist

Ferner soll diese Studie zeigen, inwiefern die dargestellte Untersuchungsmethode im Hinblick auf Sensitivität/Spezifität im Vergleich zur konventionellen Bürstenbiopsie ohne Tumormarkernachweis und computer-assistierten Methoden abschneidet.

Um eine Vergleichbarkeit mit Probandengut und Literaturdaten zu schaffen wurden außerdem anamnestische Daten wie das Alter, Geschlecht, Risikofaktoren, wie Nikotin- und Alkoholabusus erhoben.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

2.1.1 Patientenkollektiv

Das Studienkollektiv umfasste 72 Patienten, die im Zeitraum von Dezember 2010 bis März 2014 in der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vorstellig wurden. 48 Patienten wurden im Rahmen einer Mundschleimhaut-Sprechstunde untersucht. Es wurden Patienten mit Lichen planus, Leukoplakie und oralen Plattenepithelkarzinom (PECA) untersucht. 24 Patienten ohne pathologischen Befund dienten als Kontrollgruppe. Das Studienkollektiv wurde in folgende Untersuchungsgruppen eingeteilt (siehe Tabelle 2):

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Studie nach Diagnose, Geschlecht und Alter. Dargestellt sind Anzahl der Probanden nach Geschlecht und Durchschnittsalter in Relation zur Diagnose n=72.

Gruppe	Diagnose	Anzahl männliche Probanden	Anzahl weibliche Probanden	Durchschnittsalter in Jahren
1	gesund	8	16	45
2	Lichen planus	4	11	60
3	Leukoplakie	8	10	63
4	Orales PECA	4	11	65

2.1.2 Datenschutz und Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission

Der Datenschutz wurde durch Zuordnung von Nummern nach Befundung in der Pathologie des Universitätsklinikums Würzburg gewährleistet.

Die Studie wurde der Ethikkommission Würzburg zur Kenntnis gebracht und es bestanden keine Einwände (Nr. 2015021801).

2.1.3 Studienbeschreibung

Mittels standardisierter Fragen wurden das Alter, Tabak- und Alkoholkonsum, sowie vorherige Tumorerkrankungen ermittelt (siehe Anhang).

Es wurde von 72 Probanden Bürstenbiopsien entnommen. Die Anamnese und der klinische Befund bestimmten die orale Entnahmestelle. Es wurden Proben aus dem Planum buccale und der Zunge sowie dem Mundboden entnommen. Zur Entnahme wurde die Bürste unter Druck rotierend über das Untersuchungsareal geführt. Dies geschah bis Blutungspunkte auftraten. Das gewonnene Zellgut wurde auf mit permanentem Haftstoff versehenen Objektträgern ausgestrichen. Durch mehrfache Rotation der Bürste wurden zwei Felder auf dem Objektträger mit Zellen bestückt. Anschließend wurden die Objektträger via ORCA FIXX©-Spray fixiert und für die weitere Untersuchung vorbereitet. Ein Objektträger wurde zur Beurteilung an das Pathologische Institut der Universität Würzburg gesendet. Die übrigen Proben wurden immunhistochemisch gefärbt (siehe Tabelle 3) und anschließend durch den Facharzt für Pathologie (Schwerpunkt Oralpathologie), Herrn Dr. med. Harald Ebhardt aus Potsdam, befundet.

Als Positivkontrollen dienten in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg gehobene Biopsate aus histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Die Biopsate wurden direkt nach Entnahme in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gelagert. Es erfolgte die Herstellung von Kryoschnitten der Tumoren und deren immunhistochemische Färbung.

2.2 Geräte und Chemikalien

2.2.1 Geräte

- Schlittenmikrotom, Fa. SLEE Cryostat mnt, SLEE medical an orgentec company, Mainz, Deutschland
- ORCA-Brush© Bürstenbiopsie-Set Fa. Microdent, Breckerfeld, Deutschland
- Menzel-Gläser Polysine© Slides, Fa. Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Eindeckgläser (0,16-0,19 mm), Fa. Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Elektromikroskop, Fa. Leica Leitz DMRD, Wetzlar, Deutschland

- Kamera, Olympus Camedia C-4040ZOOM, Fa. Olympus, Japan
- PAP PEN©, Fa. Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
- Inkubationskammer, feuchte Kammer für Objektträger, Fa. A. Hartenstein, Würzburg

2.2.2 Chemikalien

- ORCA-Fixx©, zytologisches Fixiermittel, DGOD, Leipzig, Deutschland
- CryoGlue medium, Fa. SLEE medical GmbH , Mainz, Deutschland
- HIF-1 α Rabbit Monoclonal Antibody, Fa. Epitomics an abcam© company, Burlingame, Ca, U.S.A.
- Primärantikörper MAGE-57B bereitgestellt von Herrn Prof. Giulio O. Spagnoli, Onkologische Chirurgie, Institut chirurgische Forschung und Klinikmanagement, Universitätsklinik Basel, Basel, Schweiz
- Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulines/ Biotinylated DakoCytomation, Glostrup, Denmark Polyclonal Goat Anti Rabbit Immunoglobulines/ Biotinylated DakoCytomation, Glostrup, Denmark
- Destilliertes Wasser
- Xylol
- Methanol
- Alkohol verdünnt mit Aqua dest. (100 %, 90 %, 80 %, 70 %)
- 0,5 M Ammoniumchlorid
- Puffer Tris Buffered Saline (TBS) aus:
 - o 6,05 g Tris
 - o 8,76 g NaCl
 - o 800 ml destilliertes Wasser
 - o 1 M HCl zum Einstellen des pH Wertes auf pH 7,6
- Puffer PBS aus:
 - o 72 g NaCl
 - o 14,8 g Na₂HPO₄
 - o 4,3 g KH₂PO₄
- 3 % H₂O₂
- 0,8 % und 5 % BSA (Rinderalbumin)

- Horseradish Peroxidasekomplex (Verdünnung 1: 150 in TBS), DakoCytomation, Glostrup, Denmark
- 0,25 % Triton X-100 ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_x$)
- 3'3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Lösung; DAB- Lösung aus:
 - o 150µl DAB-Dako+Chromosom Mischung (Carl Roth GmbH;Karlsruhe, Deutschland)
 - o 150 µl NH_4Cl 0,5 M
 - o 300 µl $NiSO_4$ 0,1 %
 - o 300 µl Glucose 10 %
 - o 50 µl Glucoseoxidase
 - o 15 ml Phosphatpuffer (10x PBS)
- Hämatoxylin Lösung modifiziert nach Gill III, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Eosin Y-Lösung 0,5 % wässrig, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Entellan® Schnelleindeckmittel, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.3 Methode der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie stellt Zellorganellen, Zellbestandteile oder Zellmarkerproteine dar und beruht auf einer Komplexbildung zwischen nachzuweisenden Antigenen und ihren spezifischen Antikörpern.

Die vorliegende Arbeit verwendete die indirekte 3-Schritt-Methode (Labeled Streptavidin-Biotin, LSAB). Ein mit Biotin markierter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Der Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Enzymkonjugat-Komplex bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers. Zugegebenes Chromogensubstrat Diamino-Benzidin (DAB) färbt das Endprodukt [141]. Es resultiert eine bräunliche Färbung der Probe (siehe Abbildung 4 - 15).

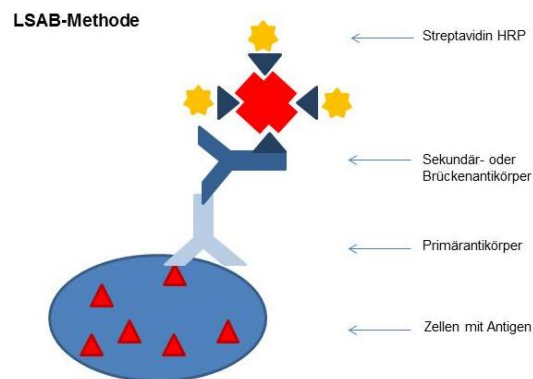


Abbildung 2: Schematische Darstellung der indirekten 3-Schritt-Methode/ Labeled Streptavidin Biotin (LSAB)- Methode, mit Darstellung der Zelle, des Primär- und Sekundärantikörpers, sowie des Streptavidin-Horseradish-Komplex.

Für die MAGE-A-Färbung wurde als Primärantikörper der globale murine monoklonale Antikörper MAGE-A Antikörper 57B verwendet. Landry *et al.* und Rimoldi *et al.* zeigten, dass dieser Antikörper die Antigene des MAGE-Gen-A1, -A2, -A3, -A4, -A6 und -A12 in Zellen, die mit entsprechender cDNA transfiziert wurden, erkennt [142-144]. Er ist nicht gegen MAGE-A8, -A9, -A10 und -A11 wirksam [144]. Das quantitative Expressionsmuster der einzelnen Subgruppen soll hier nicht untersucht werden. Durch den simultanen Nachweis mehrerer Subgruppen wird ein verbessertes Färbeverhalten als bei singulären Antikörpern erreicht [145]. Der Antikörper wurde von Herrn Prof. Giulio C. Spagnoli (Onkologische Chirurgie, Institut für chirurgische Forschung und Klinikmanagement, Universität Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen die Spezies aus welcher der erste Antikörper stammt, für MAGE-57B wurden polyklonale Ziege-gegen-Maus Immunglobuline verwendet.

Für die HIF-1 α Antikörper Färbung wurde als Primärantikörper ein monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Vor Verwendung des Antikörpers wurden an einem Kryoschnitt des Tumors die Konzentration und die Funktion des Antikörpers überprüft. Als Sekundärantikörper wurden für HIF-1 α polyklonale Ziege-gegen-Kaninchen Immunglobulin verwendet (siehe Tabelle 3).

2.3.1 Anfertigung und Färbung von Kryoschnitten

2.3.1.1 Positivkontrolle

Nach der Entnahme wurden die Tumorbiopsate in 0,5 M PBS fixiert und bei -72 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die verwendeten Antikörper zeigten in vorausgegangenen Studien deutliche Reaktionen für MAGE-57B sowie für HIF-1 α [130, 146, 147].

Zur Anfertigung von Kryoschnitten diente ein Schlittenmikrotom. Die Kammer-temperatur betrug -15 °C. Die Gewebeproben wurden mit Gefrierspray auf dem Objektisch fixiert und zum Messer ausgerichtet. Die Dicke der Schnitte betrug 7 μ m. Es wurden pro Objektträger jeweils zwei mal zwei Schnitte aufgetragen. Ein Paar diente als Negativkontrolle, ein Paar wurde eingefärbt (siehe Tabelle 3).

Einbettmittel wurde durch Spülung mit Leitungswasser entfernt. Danach wurden analog des Standardfärbeprotokolls (2.3.2) verschiedene Konzentrationen des ersten Antikörpers aufgetragen. Dies diente der Ermittlung der Antikörperkonzentration. Zusätzlich wurde die optimale DAB-Entwicklungszeit festgestellt und eine methodische Kontrolle durchgeführt. Nach Feststellung der optimalen Konzentration folgten weitere Kontrollfärbungen von Tumorschnitten mit gleicher Konzentration und Entwicklungszeit.

2.3.2 Standardfärbeprotokoll

Zur Analyse der Tumorschnitte und Bürstenbiopsien wurde ein Färbestandardprotokoll der immunhistochemischen Färbung verwendet (DAKO Cytomation Inc, California, USA) (siehe Tabelle 3). Das Protokoll beruht auf der indirekten Drei-Schritt-Methode und kann auch bei geringer Exprimierung des gesuchten Markers ein positives Signal erreichen.

Auf dem Objektträger wurden zwei nebeneinanderliegende Bereiche mit Fettstift markiert. Ein Bereich diente der regulären Färbung. Der zweite Bereich als Negativkontrolle. Es folgten drei Waschungen mit 0,05 M TBS für fünf Minuten. Anschließend führte eine Behandlung mit 3 % H₂O₂ in reinem Methanol zur Blockierung der endogenen Peroxidase. Es folgten zwei fünfminütige Wa-

schungen mit 0,05 M TBS. Zur Permeabilisierung der Zellen und Demaskierung des Gewebes wurden die Zellen zehn Minuten mit 0,5 M Ammoniumchlorid und 0,25 % Triton X-100 in TBS versetzt. Triton X-100 desintegrierte die Zellmembran. Ammoniumchlorid löste Aldehydvernetzungen. Es folgten zwei Waschungen mit TBS für 5 min.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde 5 % Rinderalbumin in TBS für 60 min auf die Objektträger aufgetragen. Es erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Er wurde mit 0,8 % bovinem Serumalbumin (BSA) verdünnt und auf eine Kammer des Objektträgers gebracht. Es wurden für beide Biomarker Konzentrationen von 1:400, 1:250, 1:150 und 1:50 untersucht. Der Primärantikörper wurde jeweils in einem Verhältnis, von 1:50 verwendet, da in dieser Konzentration die besten Ergebnisse erreicht wurden. Die zweite Kammer wurde als Negativkontrolle ohne Antikörper mit 0,8 % BSA versetzt. Die Inkubation erfolgt 24 Stunden bei 4 °C. Nach Inkubation folgten vier fünfminütige Waschungen mit TBS. Anschließend erfolgte die Inkubation beider Kammern mit dem zweiten Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 in TBS. Nach 60 Minuten erfolgten vier fünfminütige Waschungen mit TBS. Anschließend wurden beide Kammern 60 Minuten mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Enzymkonjugat-Komplex (HRP) in einer Verdünnung von 1:150 in TBS inkubiert. Der Nachweis des zweiten Antikörpers wurde mittels DAB Entwicklungsmethode durchgeführt. DAB diente dem Nachweis des Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Enzymkonjugat-Komplex. DAB wurde durch den HRP-Komplex oxidiert und bildete ein in wässrigen und organischen Lösungsmitteln unlösliches Präzipitat, das bei 380 – 780 nm photometrisch detektiert werden konnte. Die DAB Lösung wurde mit 150 µl DAB, 150 µl 0,5 M Ammoniumchlorid, 300 µl 10 % Glucose, 50 µl Glucoseoxidase angesetzt und in 15 ml 1% PBS bei pH 7,4 gelöst. Die Lösung wurde anschließend filtriert und auf die Objektträger aufgetragen. Die Entwicklung der Präzipitate wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Nach Ablauf der Entwicklungszeit wurde die Lösung abgenommen und durch den Auftrag von TBS gestoppt. Die Färbezeit betrug für den MAGE A57B Antikörper 19 Minuten und für den HIF-1 α Antikörper 16 Minuten. Die Färbung der Objektträger erfolgte in feuchten Kammern. Die Proben wurden im An-

schluss an die immunhistochemische Färbung einer HE-Färbung unterzogen. Es folgte ein dreiminütiges Bad in Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill-III [148]. Die Objektträger drei Sekunden in 10 % HCl gespült, gefolgt von drei Minuten unter fließendem Leitungswasser. Es erfolgte ein dreiminütiges Bad in Eosin-Y-Lösung mit anschließender Spülung in Leitungswasser. Die Behandlung mit 100 % Ethanol, 96 % Aceton und 70 % Xylol diente der Entwässerung. Abschließend erfolgte das luftfreie Eindecken mit drei Tropfen Entellan© Schnelleindeckmittel.

Tabelle 3: Tabellarisches Färbeprotokoll; Tabellarisches Färbeprotokoll mit numerischen Ablauf (1-16). Mit Darstellung der Vorgänge, Chemikalien und Dauer der einzelnen Schritte (nach DAKO Cytomation Inc.; California USA).

Schritt	Vorgang	Chemikalie	Dauer
Tag 1			
1	2-fache Markierung mit Fettstift	PAP-PEN©	
2	3 Waschvorgänge	0,05 M TBS	3x5 min
3	Blockierung endogener Peroxidase	3 % H ₂ O ₂ mit Methanol	20 min
4	2 Waschvorgänge	0,05 M TBS	2x5 min
5	Demaskierung des Gewebes	0,5 M Ammoniumchlorid mit 0,25 % Triton X-100	10 min
6	2 Waschvorgänge	0,05 M TBS	2x5 min
7	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen	5 % BSA in 0,05 M TBS	60 min
8	Inkubation erster Antikörper bei 4 °C	Antikörper in 0,8 % BSA	24 h
Tag 2			
9	4 Waschvorgänge	0,05 M TBS	4x5 min
10	Inkubation zweiter Antikörper	1:400 in 0,05 M TBS	60 min
11	4 Waschvorgänge	0,05 M TBS	4x5 min
12	Inkubation mit Horseradish Peroxidasekomplex	1:150 HRP in 0,05 M TBS	60 min
13	4 Waschvorgänge	0,05 M TBS	4x5 min
14	DAB Entwicklung		16-19 min
15	Hämatoxylin-Eosin-Färbung		
15.1	Hämatoxylin-Bad	Hämatoxylin modifiziert nach Gill-III	3 min
15.2	Spülung	10% HCl	3 sek
15.3	Spülung	Leitungswasser	3 min
15.4	Eosin-Bad	Eosin-Y-Lösung	3 min
15.5	Spülung	Leitungswasser	1 min
16	Eindecken der Objektträger		
16.1	Entwässern der Zellen	100 % Alkohol, 96 % Aceton, 70 % Xylol	25 min
16.2	Luftfreies Eindecken	Entellan© Schnelleindeckmittel	-

2.4 Datenakquise und Datenauswertung

Die Datenakquise erfolgte via SAP (SAP Walldorf, Deutschland). Die Auswertung erfolgte mittels Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

Die Bilder wurden mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera hergestellt. Die Datenauswertung der Bilder erfolgte digital mittels der Software Leica LAS EZ, Leica Application Suite, Version 2.0.0. (Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland).

Die Auswertung der Bürstenbiopsien erfolgte zunächst durch das pathologische Institut des Universitätsklinikums Würzburg. Anschließend erfolgte die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate durch Herrn Dr. Harald Ebhardt, Facharzt für Pathologie, Zentrum für Oralpathologie, Potsdam, Deutschland.

Unter Verwendung eines Lichtmikroskops mit integrierter Digitalkamera wurden die Proben in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen und digitalisiert (siehe Abbildung 4 - 15). Die in der Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie der Universitätsklinik intraoperativ entnommenen Tumorbiopsate wurden durch das pathologische Institut der Universität Würzburg befundet.

2.4.1 Angaben zur Statistik

Zur Beschreibung der Ergebnisse dieser prospektiven, deskriptiv projizierten Studie wurden folgende Tests verwendet:

Zur Beschreibung der Abhängigkeit zwischen zwei klassifizierten Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test nach der Maximum-Likelihood-Methode (p_c) berechnet. Bei zu geringer Feldbesetzung (bei zu geringen Erwartungswerten) wurde bei einer 4-Felder-Tafel der exakte Chi-Quadrat-Test nach Fisher und Yates berechnet (p_{fy}). Bei größeren Tafeln wurde der exakte Test nach Mehta und Patel (p_{mp}) angewendet. Für mehr als zwei klassifizierte Variablen wurde die Konfigurationsfrequenzanalyse verwendet.

Wenn im Vergleich zweier Gruppen keine Gaußsche Normalverteilung angenommen werden kann, wird mit dem U-Test nach Mann und Whitney (p_u) ein Messwert zwischen beiden Gruppen verglichen. Die einfaktorielle Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis (p_{kw}) ersetzt den U-Test, wenn drei oder mehr Gruppen zu vergleichen sind.

Eine Korrelation hat als Ergebnis den Korrelationskoeffizienten. Dieser Koeffizient liegt bei -1 und $+1$; $+1$ bedeutet eine ideale Korrelation. Je näher der Korrelationskoeffizient an $+1$ oder -1 ist, desto enger ist die Abhängigkeit der beiden Messungen. 0 besagt, dass keinerlei Abhängigkeit besteht. Ist der Korrelationskoeffizient negativ, so handelt es sich um eine gegensinnige Abhängigkeit. Eine ideale gegenseitige Korrelation ist -1 .

Zu einer Korrelation wird ein p-Wert angegeben, der besagt, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Beziehung vorhanden ist und ob sich der Koeffizient signifikant von Null unterscheidet. Für die Korrelation wird hier immer die Kendallsche Rangkorrelation, mit dem Koeffizienten tau (τ), verwendet. Dieses Verfahren setzt keine Gaußsche Normalverteilung voraus.

Die logistische Regression ist ein multivariates Verfahren zur Vorhersage einer dichotomen Variablen. Sie bildet aus mehreren Risiko- und Einfluss-Variablen, genannt Prädiktoren für jeden Patienten einen Wert, der je nach der dichotomen Zielvariablen (Kriterium) der 1 bzw. der 0 optimal nahe kommt.

Dichotome Variablen sind zulässig, wenn beide Ausprägungen etwa gleich häufig sind. Codierte Variable, wie etwa Diagnose, kann in eine Reihe von 0-1 Variablen umcodieren. In den Tabellen steht zu jedem Kriterium dessen beta-Gewicht und die Odds Ratio (Risikoverhältnis) sowie die Signifikanz des Einflusses.

Ein Konfidenzintervall (KI) wird berechnet, um die Güte eines Schätzwertes zu beurteilen. Der aus der Stichprobe ermittelte Schätzwert repräsentiert vermutlich nicht den tatsächlichen Wert der Grundgesamtheit und es ist kaum zu erwarten, dass er damit exakt übereinstimmt. Durch ein Konfidenzintervall (KI oder Vertrauensbereich) wird dieser unscharfe Ausdruck präzisiert, da er einen

Hinweis auf die Genauigkeit des errechneten Ergebnisses liefert. Ein 95 %-Konfidenzintervall gibt den Bereich an, der mit 95 % Wahrscheinlichkeit den ermittelten Parameter überdeckt.

Zur Überprüfung auf eine Gaußsche Normalverteilung wurde die Probitdarstellung mit den Grenzen nach Lilliefors verwendet.

Die p-Wertberechnung dient dazu, Testergebnisse qualitativ vergleichen zu können. Ein p-Wert unter 0,05 wird als signifikant bezeichnet und das Ergebnis wird als wesentlich interpretiert. Die p-Werte werden mit Stern-Symbolen gekennzeichnet:

$p \leq 0,05$ mit *, $p \leq 0,01$ mit ** und $p \leq 0,001$ mit ***.

Die p-Werte in deskriptiven Arbeiten stellen keine Irrtumswahrscheinlichkeiten dar, da es sich dann nicht um eine geplante prospektive Studie mit einer zu beweisenden Hypothese handelt, sondern sie dienen zur Beurteilung und zum Vergleich der verschiedenen Testergebnisse.

Die Bezeichnung „signifikant“ wird im statistischen Kontext reserviert, um Testergebnisse mit p-Werten unter 0,05 zu beschreiben [149].

3 Ergebnisse

3.1 Auswertbarkeit der Proben und Probandengruppen

Zur Beurteilung ob ein Zusammenhang von präkanzerösen Veränderungen der Mundschleimhaut mit Alter, Geschlecht und Risikofaktoren, wie Tabak- und Alkoholkonsum, besteht, wurden personenbezogene Daten von 72 Probanden ermittelt. Die Kontrollgruppe besteht dabei aus 16 Personen. Für die Ermittlung der Basisdaten wie Alter, Geschlecht, Diagnose und Risikofaktoren wurde das gesamte Probandenkollektiv bewertet (n = 72).

Zur Evaluierung der Diagnosestellung durch eine Kombination einer Bürstenbiopsie mit anschließender Biomarkerdiagnostik wurden von den 72 Patienten jeweils zwei Proben genommen. Insgesamt wurden 144 Proben mittels der LSAB-Methode immunhistochemisch gefärbt. Bei zwölf Proben (8,3 %) gab es nicht genügend auswertbares Zellmaterial auf den Objektträgern und wurden deshalb ausgeschlossen. Ausgeschlossen werden mussten jeweils zwei Proben aus der gesunden Kontrollgruppe und jeweils fünf Proben aus der Probandengruppe der Leukoplakie bzw. Lichen planus Erkrankten. Jeweils sechs der nicht verwertbaren Proben waren den Proben des Nachweises von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α zuzuordnen. Der 95 %-KI dieses Prozentsatzes lag bei 3,12 % bis 17,88 %. Damit konnte sowohl beim Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 sowie HIF-1 α die Daten von 66 Probanden ausgewertet werden (n = 66).

Zum Vergleich beider immunhistochemischer Nachweise wurden nur Proben von Probanden berücksichtigt, bei denen beide Biomarkernachweise bewertbar waren. Bei 60 Probanden konnten beide Biomarker beurteilt und verglichen werden. Somit gilt bei Beurteilung und direktem Vergleich beider Biomarker n = 60.

3.2 Nachweis der Biomarker MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α

Bei der unabhängigen Betrachtung der Biomarker MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α konnten Proben von 66 Probanden jeweils ausgewertet werden (n = 66). Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen positiven und negativem Befund der Färbungen von MAGE A1-4, 6, 12 und HIF-1 α (p_{fy} \leq 0,0005). Bei 16

(24,2 %) der ausgewerteten 66 Proben konnte MAGE-A 1-4, 6, 12 nachgewiesen werden. Das Konfidenzintervall lag bei den positiven Proben zwischen 14,5 % bis 36,6 %.

Für HIF-1 α konnte in 13 (19,7 %) von 66 Proben ein positiver Nachweis erfolgen. Das Konfidenzintervall für den positiven Nachweis für HIF-1 α lag zwischen 10,9 % bis 31,7 % (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Anteil der positiven Nachweise am Gesamtkollektiv der Proben (n = 66) für die untersuchten Biomarker (MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α); n = 66; dargestellt sind die Biomarker in Prozent, sowie das 95 %-Konfidenzintervall (KI).

Antikörper	positiver Befund	gesamt	%	95%-KI	
MAGE-A57B	16	66	24.2 %	14.5 %	36.6 %
HIF-1 α	13	66	19.7 %	10.9 %	31.7 %

3.2.1 Positiver Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 stehen im Zusammenhang mit einem oralen PECA

Zur Ermittlung ob ein positiver MAGE-A 1-4, 6, 12 Nachweis im Zusammenhang mit einer oralen Vorläuferläsion bzw. Plattenepithelkarzinom besteht, wurden die Färbeergebnisse der MAGE-A Subgruppen und Diagnosen der untersuchten Probanden verglichen. Von den insgesamt 72 Probanden wurden insgesamt 6 Proben (je zwei Gesunde, Leukoplakie bzw. Lichen planus Erkrankte) aufgrund zu wenig auswertbaren Zellmaterial reduziert. Damit ergibt sich ein Stichprobenumfang von n = 66.

14 (31,8 %) der positiven 66 MAGE-A Nachweise fielen erkrankten Probanden zu. Eine der positiven Proben war eine Leukoplakie ohne Dysplasie und eine weitere Lichen planus zuzuordnen. Hoch signifikant ($p_c \leq 0,05$) war, dass zwölf (80,0 %) Proben der Probanden mit einem oralen PECA eine Färbung aufwiesen. Somit stehen positive MAGE-A 1-4, 6, 12 Proben in einem Zusammenhang mit einem oralen PECA.

15 (93,75 %) der Leukoplakieproben, sowie 12 (92,31 %) der Lichen planus Proben und drei (20 %) der PECA-Proben wiesen keinen positiven MAGE-A

Nachweis auf. Proben der Leukoplakie mit Dysplasie waren ausschließlich negativ (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Diagnosen in Bezug auf den Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12; Anzahl und Prozentsatz der n = 66 Patienten bzw. der 44 Erkrankten. Die Prozente beziehen sich auf die Zeile, d.h. auf die Diagnose. Die 3 Patienten mit Dysplasie sind in dieser Gruppe enthalten, ausgewertet wurden nur beurteilbare Proben.

Diagnose	MAGE-A 1-4, 6, 12				p _c
	Positiv		Negativ		
	n	%	n	%	
Gesund	2	9.09 %	20	90.91 %	
Erkrankt	14	31.82 %	30	68.18 %	0.03* _c
Lichen planus	1	7.69 %	12	92.31 %	
Leukoplakie *)	1	6.25 %	15	93.75 %	
PECA	12	80.00 %	3	20.00 %	≤0.00*** _c
keine Leukoplakie	15	30.00 %	35	70.00 %	
Leukoplakie ohne Dysplasie	1	7.69 %	12	92.31 %	
Leukoplakie mit Dysplasie	0	0.00 %	3	100.00 %	0.20 _{mp}

3.2.2 Positiver Nachweis von HIF-1α zeigt Zusammenhang mit einem oralen PECA

Zur Analyse eines möglichen Zusammenhangs zwischen einer positiven HIF-1α Befundung mit der Diagnose, wurden die positiven und negativen Proben des HIF-1α Antikörpers in Abhängigkeit zu den Erkrankungen untersucht. Von 66 der insgesamt 72 Probanden konnten verwertbare Proben genommen werden, weshalb der Stichprobenumfang n=66 entspricht. Aufgrund unzureichenden Zellmaterials wurden Proben eines Kontrollprobanden, eines Leukoplakie und oralen PECA Erkrankten sowie drei Lichen planus Erkrankten nicht ausgewertet.

13 (34,3 %) von 66 Proben zeigten einen positiven HIF-1α Nachweis. 11 (25,7 %) der positiven Proben konnten PECA Patienten zugeordnet werden. Zwei der Proben gehörten zu Probanden der Kontrollgruppe. Proben der Gruppen Leukoplakie und Lichen planus waren ausschließlich negativ. Signifikant (p_c ≤ 0,00) war, dass 11 (18,6 %) Proben der Probanden mit einem oralen PECA eine Färbung aufwiesen, 3 (21,4 %) der Proben waren negativ. (siehe Tabelle 6). Damit konnte ein Zusammenhang eines positiven HIF-1α Nachweis mit einem oralen PECA in Verbindung gebracht werden.

Tabelle 6: Diagnosen und HIF-1 α ; Anzahl und Prozentsatz der n = 66 Patienten bzw. der 43 Erkrankten. Die Prozente beziehen sich auf die Zeile, d.h. auf die Diagnose. Die 3 Patienten mit Dysplasie sind in dieser Gruppe enthalten.

Diagnose	HIF-1 α				p _c
	Positiv		negativ		
	n	%	n	%	
Gesund	2	8.7 %	21	91.3 %	0.12 _{fy}
Erkrankt	11	25.6 %	32	74.4 %	
Lichen planus	0	0.0 %	12	100.0 %	≤0.00*** _c
Leukoplakie *)	0	0.0 %	17	100.0 %	
PECA	11	78.6 %	3	21.4 %	
keine Leukoplakie	13	26.5 %	36	73.5 %	0.06 _{mp}
Leukoplakie ohne Dysplasie	0	0.0 %	14	100.0 %	
Leukoplakie mit Dysplasie	0	0.0 %	3	100.0 %	

3.2.3 Der Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α zeigt eine hohe Übereinstimmung

Die Biomarker MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α zeigten beide einen Zusammenhang mit einem oralen PECA. Um beide Biomarker miteinander vergleichen zu können, wurden Proben von Probanden verwendet, bei denen beide Biomarker ein auswertbares Ergebnis zeigten. Somit ergibt sich ein Stichprobenumfang von n = 60. 9 Proben sind für beide Biomarker positiv (69,2 %), 43 Proben für beide negativ (71,7 %). 30,8% der positiven MAGE-A 1-4, 6, 12 Proben sind HIF-1 α negativ. 8,5 % der negativen MAGE A 1-4, 6, 12 Proben sind positiv im Nachweis von HIF-1 α (siehe Tabelle 7). 52 von 60 untersuchten Proben zeigen sowohl für den MAGE-A 1-4, 6, 12 sowie für den HIF-1 α Nachweis dasselbe Ergebnis. Damit zeigen die MAGE-A 1-4, 6, 12- und HIF-1 α Diagnostik eine Übereinstimmung von 86,7 %.

Tabelle 7: Positiver und negativer Nachweis der MAGE Subgruppen A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α im direkten Vergleich; Anzahl und Prozentsatz von n = 60 Patienten. Die Prozente beziehen sich auf das Ergebnis des MAGE-A 1-4, 6, 12-Nachweis.

HIF-1 α	MAGE-A 1-4, 6, 12				p _{fy}
	Positiv		Negativ		
	(n = 13)		(n = 47)		
	n	%	n	%	
Positiv	9	69.2 %	4	8.5 %	≤ 0.00***
Negativ	4	30.8 %	43	71.7 %	

3.2.4 Sensitivität und Spezifität von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der immunhistochemischen Nachweise von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α , wurden die Ergebnisse der gefärbten Bürstenbiopsien mit den histologisch gestellten Diagnosen durch den Pathologen verglichen. Als Referenz wurden Tumorbiopsate, welche mittels Skalpellbiopsie gewonnen wurden, verwendet. Diese Biopsate wurden nach den gleichen Methoden wie die Bürstenbiopsate aufgearbeitet.

Die Sensitivität beschreibt den Prozentsatz der Probanden bei welchen die jeweilige Erkrankung tatsächlich erkannt wird. Sie ermittelt sich aus dem Quotienten aus richtig positiven zu der Summe aus richtig positiv und falsch negativen Ergebnissen. Die Spezifität beschreibt die Wahrscheinlichkeit dass tatsächlich Gesunde auch als diese erkannt werden. Sie ermittelt sich aus dem Quotienten der richtig negativen und der Summe aus falsch positiven und richtig negativen Ergebnissen.

Die Nachweise von MAGE-A 1-4, 6, 12 weisen beim oralen Plattenepithelkarzinom eine Sensitivität von 80,0 % und eine Spezifität von 92,2 % auf. 92,2 % der als nicht maligne eingestuften Läsionen lieferten einen korrekten negativen Befund. Bei drei PECA-Proben konnte kein Nachweis einer Färbung erbracht werden. Bei vier Proben wurde ein falsch positives Ergebnis erreicht. Der Vorhersagewerte liegen bei 75 % bzw. 92 %, d.h. 75 % der Erkrankten und 92 % der Gesunden wurden tatsächlich erkannt (siehe Tabelle 8).

Die Nachweise von HIF-1 α in den Proben weisen eine Sensitivität von 78,6 % und Spezifität von 96,2 % auf. Es wurden 78,6 % der PECA Proben richtig positiv zugeordnet, sowie 96,2 % richtig negativ. Zwei Proben waren falsch positiv, sie wurden vom Pathologen als nicht maligne eingestuft. Die Vorhersagewerte liegen bei 85 % bzw. 94 %, d.h. 85 % der Erkrankten und 94 % der Gesunden wurden tatsächlich erkannt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 8 Sensitivität und Spezifität von MAGE-A 1-4, 6, 12 mit Darstellung der Färberegebnisse und positivem Vorhersagewert (ppW) und negativen Vorhersagewert (npW) in Prozent; n = 66, Goldstandard PECA.

MAGE-A 1-4, 6, 12		PECA	MAGE-A	n	%	ppW %	npW %
Sensitivität	richtig positiv	+	+	12	80.0 %		
	richtig negativ	–	–	47	90.2 %		
	falsch positiv	–	+	4	2.0 %		
	falsch negativ	+	–	4	26.7 %		
Spezifität	richtig positiv	+	+	12	98.1 %		
	richtig negativ	–	–	47	92.2 %		
	falsch positiv	–	+	4	7.8 %		
	falsch negativ	+	–	4	20.0 %		
					75 %	92 %	

Tabelle 9: Sensitivität und Spezifität von HIF-1 α ; mit Darstellung der Färberegebnisse und positiven (ppW) und negativen (npW) Vorhersagewert in Prozent ; n = 66, Goldstandard PECA

HIF-1 α		PECA	HIF-1 α	n	%	ppW %	npW %
Sensitivität	richtig positiv	+	+	11	78.6 %		
	richtig negativ	–	–	51	98.1 %		
	falsch positiv	–	+	2	16.7 %		
	falsch negativ	+	–	3	5.2 %		
Spezifität	richtig positiv	+	+	11	85.7 %		
	richtig negativ	–	–	51	96.2 %		
	falsch positiv	–	+	2	3.9 %		
	falsch negativ	+	–	3	21.4 %		
					85 %	94 %	

3.3 TNM-Klassifikation und UICC-Stadium der an oralen PECA erkrankten Probanden

Die TNM-Klassifikation dient in der Medizin zur Einteilung von malignen Tumoren in Stadien (siehe im Anhang Tabelle 26). Um einen detaillierten Eindruck vom Stadium der Tumorerkrankung der an oralen PECA leiden Studienteilnehmern zu bekommen, wurden die Tumore von den 15 Probanden nach TNM-Klassifikation und UICC-Stadium klassifiziert.

Bei Betrachtung zeigt sich dass 40 % der Probanden einen T2 Tumor aufweisen. T1 Tumoren sind mit einem Anteil von 20 %, T3 Tumore zu 13,33 % und T4 Tumore mit 26,67 % vertreten. Bei 46,67 % können keine regionären

Lymphknotenmetastasen festgestellt werden. Keiner der Patienten weist Fernmetastasen auf. Mäßig differenziertes Gewebe kann in 73,33 % nachgewiesen werden, schlecht differenziertes malignes Gewebe zu 20 % und schlecht differenziertes Gewebe bei 6,67 % der an einem PECA Erkrankten. 93,33 % der Probanden weisen keine Infiltration in Venen auf. Bei 86,67 % der Probanden kann keine Invasion der regionären Lymphbahnen festgestellt werden.

Bei 33,33 % kann eine perineurale Invasion festgestellt werden. Bei 33,33 % der Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom zeigt ein PECA im UICC-Stadium IVa. 26,67 % der Tumore sind Stadium III zuzuordnen, 20 % Stadium II, 13,33 % Stadium I und 6,67 % Stadium IVb (siehe Tabelle 10). Damit sind alle unterschiedlichen Stadien nach TNM-Klassifizierung und UICC Einteilung in der Probandengruppe mit oralen PECA vertreten.

Tabelle 10: TNM-Klassifikation und UICC Einteilung der PECA-Patienten. Anzahl und prozentualer Anteil der Probanden mit einem oralen Plattenepithelkarzinom, unterteilt nach TNM-Klassifikation und UICC-Stadium. n = 15 ; Primärtumor (pT), regionäre Lymphknotenmetastasen (pN; N), Grading (G), Veneninvasion (V), Lymphgefäßinvasion (L))

		Anzahl	%
pT	T0	0	0
	T1	3	20.0
	T2	6	40.0
	T3	2	13.3
	T4	4	26.7
pN	N0	7	46.7
	N1	4	26.7
	N2B	1	6.7
	N2C	2	13.3
	N3	1	6.7
G	G1	0	0
	G2	11	73.3
	G3	3	20.0
	G4	1	6.7
V	0	14	93.3
	1	1	6.7
L	0	13	86.7
	1	2	13.3
N	0	10	66.7
	1	5	33.3
UICC	I	2	13.3
	II	3	20.0
	III	4	26.7
	IVA	5	33.3
	IVB	1	6.7

3.3.1 Ein positiver MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α Nachweis steht in keinem Zusammenhang mit einer bestimmten TNM-Klassifikation

Zur Analyse, ob eine Korrelation eines positiven MAGE-A 1-4, 6, 12 bzw. HIF-1 α Nachweis mit einem bestimmten Stadium eines oralen PECA besteht, wurden die TNM-Klassifikation sowie die UICC-Stadien mit den histochemischen Ergebnissen verglichen. Bei Betrachtung kann keine Abhängigkeit festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Expression von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α steht, in vorliegender Studie, in keinem Zusammenhang mit Größe des Tumors, Lymphknotenstatus oder dem Nachweis von Fernmetastasen.

3.3.2 Keine Korrelation zwischen Risikofaktoren und TNM-Klassifikation

Zur Überprüfung einer Beziehung eines Stadiums eines oralen PECA mit einem Risikofaktor, wurden die unterschiedlichen TNM-Klassifikationen mit den Risikofaktoren ausgewertet. Dabei ergibt sich, dass Patienten mit T1 Tumoren ausschließlich Raucher sind und Probanden mit T3 Tumoren nur Nichtraucher. Es sind 83,33 % der Probanden mit Tumoren der Größe 2-4 cm (T2) und 50 % der Probanden mit in die Nachbarstrukturen infiltrierenden Tumoren (T4) Raucher. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen rauchten signifikant weniger, als Probanden mit Lymphknotenmetastasen (pfy = 0,03). Die Hälfte der Probanden aus der N1- und der N2C- Gruppe sind Nichtraucher. Alle Probanden aus der N2B- und N3-Gruppe sind Nichtraucher (siehe

Tabelle 11). Es besteht kein Zusammenhang zwischen Rauchen und den UICC-Stadien. Eine Signifikanz wird bei Lymphknoten Metastasen bemessen (pfy = 0,03).

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen Rauchern und der Tumorklasse bei an einem oralen PECA Erkrankten. Prozentangaben im Vergleich der Probandenanzahl in der gleichen Tumorklasse. Anzahl und Prozentsatz der Patienten mit einem oralen PECA; p-Wert (P); n = 15

Diagnose	Rauchen				P
	Raucher (n = 10)		Nichtraucher (n = 5)		
	n	%	N	%	p _c
T1	3	100.0 %	0	0.0 %	
T2	5	83.3 %	1	16.7 %	
T3	0	0.0 %	2	100.0 %	
T4	2	50.0 %	2	50.0 %	0.09 *mp
N negativ	7	100.0 %	0	0.0 %	
N positiv	3	37.5 %	5	62.5 %	0.03*fy
N0	7	100.0 %	0	0.0 %	
N1	2	50.0 %	2	50.0 %	
N2b	0	0.0 %	1	100.0 %	
N2c	1	50.0 %	1	50.0 %	
N3	0	0.0 %	1	100.0 %	0.02 *mp

3.4 Alter und Geschlecht in Bezug auf die Diagnose

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen einer oralen Vorläuferläsion und PECA mit Alter und Geschlecht zu ermitteln, wurden die personenbezogenen Daten mit der Diagnose analysiert.

Die vorliegende Studie basiert auf den Daten der 72 Studienteilnehmer. Abhängig der Erkrankung wurden die Probanden in vier Kategorien geteilt. Die gesunde Kontrollgruppe besteht aus 24 Personen. 18 Probanden haben eine Leukoplakie, wobei drei davon eine Dysplasie aufweisen. 15 Teilnehmer haben einen Lichen planus. Die vierte Gruppe mit 15 Probanden sind an einem oralen PECA erkrankt (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Die Diagnosen des Probandenguts. Dargestellt sind Anzahl, prozentualer Anteil Probanden mit entsprechender Diagnose am Gesamtkollektiv. *Die 3 Patienten mit einer Leukoplakie mit Dysplasie sind in der Probandengruppe Leukoplakie enthalten, n = 72.

Diagnose	n	%
Gesund	24	33.3 %
Lichen planus	15	20.8 %
Leukoplakie*	18	25.0 %
Leukoplakie mit Dysplasie (3 aus 18)	3	4.2 %
PECA	15	20.8 %

Um den Einfluss des Alters auf eine Erkrankung zu ermitteln, wurden das Alter und die Probanden betrachtet. Das Alter der Probanden liegt zwischen 23 und 87 Jahren. Das Durchschnittsalter ist 65,7 Jahren, wobei der Altersmedian bei 56,4 Jahren mit einem 68 % Konfidenzintervall (KI) von 39,1 - 69,9 Jahren liegt. Die 80 - 87 Jährigen stellen den kleinsten Teil des Kollektivs, die 50 - 59 Jährigen den größten Teil dar.

Bei Betrachtung des Alters im Zusammenhang mit der Diagnose zeigt sich, dass die gesunde Kontrollgruppe die jüngste Gruppe des Gesamtkollektivs darstellt. Der Mittelwert liegt bei $41,6 \pm 14,3$ Jahren. Der Altersmedian liegt bei 39,3 Jahren. Patienten der anderen Probandengruppen sind im Durchschnitt zirka 20 Jahre älter. Innerhalb der Probandengruppen, welche eine Mundschleimhautveränderung aufweisen, konnte kein Altersunterschied festgestellt werden

(pkw = 0,19). Das Durchschnittsalter für Probanden mit einer Leukoplakie liegt bei 58,4 Jahren, der Altersmedian bei 56,5 Jahren. Patienten mit einem Lichen planus sind im Durchschnitt 60,2 Jahre alt, der Altersmedian liegt bei 61,0 Jahren. Probanden mit einem oralen PECA sind die Ältesten, mit einem durchschnittlichen Alter von $65,7 \pm 11,9$ Jahren und weisen einen Altersmedian von 63,8 Jahren auf (siehe Abbildung 3 und Tabelle 13).

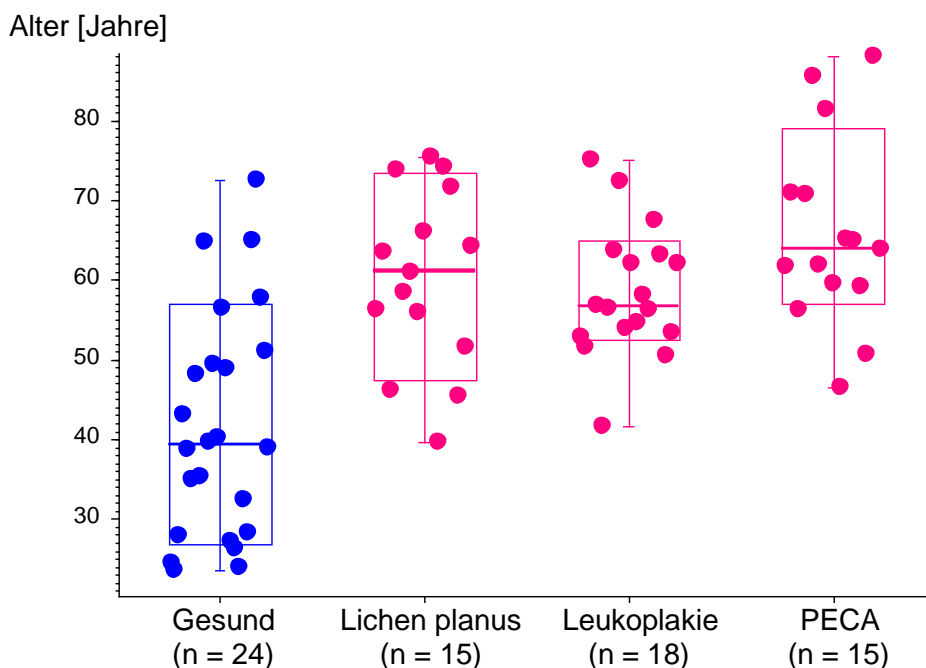


Abbildung 3: Alter nach Diagnosen – graphische Darstellung via Boxplot- Verteilung des Patientenalters innerhalb der einzelnen Probandengruppen. Die Boxen stellen das 68%-KI der Patienten dar. Die Linie in der Box stellt den Median dar und die Whiskers die Spanne. Die Probandengröße der entsprechenden Gruppen ist mit n angegeben; die Gesamtprobandengruppe ist n = 72 Um die Altersunterschiede besser darzustellen werden Mittelwert und Median angeführt.

Tabelle 13: Alter und Diagnosen; n = 72; dargestellt sind Alter in Jahren und Diagnose der Probandengruppen im Vergleich; Mittelwert (MW), Standardabweichung (ST), Konfidenzintervall (CI), p-Wert (P)

Diagnose	n	MW	ST	Median	68 %-CI	P
Gesund	24	41.61	14.28	39.28	26.87 546.92	
Erkrankt	48	61.29	10.64	61.37	51.64 71.97	$\leq 0.00^{***}_U$
Lichen planus	15	60.25	11.18	61.04	47.39 73.37	
Leukoplakie	18	58.44	8.12	56.49	52.49 64.86	
PECA	15	65.74	11.92	63.84	56.91 79.09	0.19 _{kw}

Um einen möglichen geschlechtsspezifischen Zusammenhang zwischen einer oralen Vorläuferläsion und PECA zu ermitteln, wurde das Geschlecht der Probanden mit den Erkrankungen verglichen.

Von den 72 Probanden sind 41 (57 %) männlich und 31 (43 %) weiblich. Die gesunde Kontrollgruppe besteht aus 16 Männern und 8 Frauen. 10 männliche und 8 weibliche Probanden sind an einer Leukoplakie erkrankt. Die Gruppe der an Lichen planus Erkrankten besteht aus 11 Männern und 4 Frauen. 4 männliche und 11 weibliche Probanden sind an einem oralen PECA erkrankt.

Insgesamt weisen 74,19 % der weiblichen und 60,98 % der männlichen Probanden eine Mundschleimhautveränderung auf. Bei den Männern ist mit 44,0 % der Lichen planus die häufigste Erkrankung, bei den Frauen ist mit 47,83 % das orale Plattenepithelkarzinom die häufigste Diagnose. Frauen erkrankten signifikant häufiger an einem oralen PECA ($p = 0,03$) (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Geschlecht und Diagnosen; Dargestellt ist das Geschlecht in Bezug auf die Diagnose der jeweiligen Probandengruppe in Prozent. Anzahl und Prozentsatz der Probanden bzw. Erkrankten, sowie der p-Wert (P). Die Prozente beziehen sich auf das Geschlecht. $n = 72$.

Diagnose	Geschlecht				P
	Männlich (n = 41)		Weiblich (n = 31)		
	N	%	n	%	p_c
Gesund	16	39.0 %	8	25.8 %	0.24
Erkrankt	25	61.0 %	23	74.2 %	
Lichen planus	11	44.0 %	4	17.4 %	0.03*
Leukoplakie	10	40.0 %	8	34.8 %	
PECA	4	16.0 %	11	47.8 %	

Zwischen weiblichen und männlichen Probanden zeigt sich kein signifikanter Altersunterschied ($p_U = 0,57$) (Daten nicht gezeigt).

3.5 Eine Korrelation zwischen Nikotin- und Alkoholkonsum mit einer oralen Vorläuferläsion und PECA ist nicht erkennbar

Zur Ermittlung welchen Einfluss Nikotin- und Alkoholkonsum auf eine orale Vorläuferläsion und PECA haben könnte, wurden von den 72 Probanden das Rauchverhalten sowie der Alkoholkonsum ermittelt. Aus den anamnestischen Erhebungen der Probanden bezüglich des Nikotinkonsums werden Packyears (py) ermittelt. Die py werden durch die Multiplikation der pro Tag gerauchten Zigarettenpackungen und Anzahl der Raucherjahre ermittelt.

Von den 72 Teilnehmern der Studie geben 30 Probanden eine positive Rauchanamnese an. 2 Probanden geben einen Alkoholabusus an, diese gehören zur Gruppe der Nichtraucher (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Risikofaktoren Rauchen und Alkoholabusus. Anzahl der Raucher und Probanden mit regelmäßigem Alkoholkonsum. Prozentualer Anteil und 95%-KI der Probanden mit Risikofaktoren, ausgehend von n = 72. Angegeben sind die Probandenzahl in Prozent, sowie das 95 %-Konfidenzintervall (KI).

Risikofaktoren	n	%	95 %-KI	
Raucher	30	41.7 %	30.4 %	53.9 %
Alkoholabusus	2	2.8 %	0.3 %	9.7 %

Der Teil der Raucher ist innerhalb der gesunden Kontrollgruppe mit 45,83 % größer als in der Gruppe der Erkrankten mit 33,33 %, ein signifikanter Unterschied zeigt sich nicht (pc = 0,31). 26,67 % der Lichen planus Erkrankten sind Raucher, sowie 44,44 % der an einer Leukoplakie leidenden Patienten. Aus der Gruppe der an einem oralen PECA Erkrankten rauchten 66,67 %. Der pc-Wert liegt mit p = 0,08 dezent oberhalb des Signifikanzniveaus (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Risikofaktor Rauchen in Abhängigkeit zur Diagnose; Gezeigt werden die Anzahl und der prozentuale Anteil der Raucher und Nichtraucher in Bezug auf die Diagnose. Die Prozente beziehen sich auf die Diagnose. n = 72

Diagnose	Risikofaktor				pc
	Raucher (n = 30)		Nichtraucher (n = 42)		
	n	%	n	%	
Gesund	22	45.8 %	26	54.2 %	0.31
Erkrankt	8	33.3 %	16	66.7 %	
Lichen planus	4	26.7 %	11	73.3 %	0.08
Leukoplakie	8	44.4 %	10	55.6 %	
PECA	10	66.7 %	5	33.3 %	

Die Anzahl der *py* liegt im Mittel bei 30,1 ± 25,5 *py*. Aufgrund der Abweichung von der Gaußschen Normverteilung wird der Median angegeben. Dieser liegt bei 25 *py* mit einem 68 % -KI von 8 - 48 *py*. Die Raucher der Kontrollgruppe haben durchschnittlich 9,3 *py*. Ein Zusammenhang einer oralen Vorläuferläsion und PECA mit Alkohol- und Tabakkonsum ist nicht erkennbar.

3.5.1 Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α in Bezug auf das Alter und Geschlecht

Eine Korrelation zwischen dem Alter, dem Geschlecht und der Nachweise von MAGE-A 1-4, 6, 12 sowie HIF-1 α soll überprüft werden. MAGE-A 1-4, 6, 12 positive Probanden sind im Durchschnitt $62,2 \pm 12,9$ Jahre alt, MAGE-A 1-4, 6, 12 negative $51,8 \pm 14,9$. HIF-1 α positive Probanden sind durchschnittlich $62,0 \pm 13,0$ Jahre alt, HIF-1 α negative $52,4 \pm 14,8$. Probanden mit negativen MAGE-A 1-4, 6, 12 Nachweis sind signifikant jünger als mit positiven Nachweis ($p_u = 0,020$) (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Biomarker MAGE-A 1-4, 6,12 sowie HIF-1 α in Bezug auf das Alter; dargestellt sind Mittelwert (MW), p-Wert (p_u) und Standardabweichung (ST) der Probanden und dem jeweiligen Antikörpernachweis. jeweils n = 66.

Biomarker		n	MW	ST	p_u
	Alter [Jahre]				
MAGE-A 1-4, 6, 12	Positiv	16	62.2	12.9	0.020*
	Negativ	50	51.8	14.9	
HIF-1 α	Positiv	13	62.0	13.0	0.061
	Negativ	53	52.4	14.8	

Die Analyse des Geschlechts in Bezug auf positive und negative Befunde zeigt, dass 16,2 % der positiven MAGE-A 1-4, 6, 12 Proben männlichen und 34,5 % weiblichen Probanden zuzuordnen sind. Für das männliche Geschlecht können 15,8 %, und für das weibliche Geschlecht 25 % positive immunhistochemische Nachweise erfolgen. Es kann keine Korrelation zwischen dem Geschlecht und positiven oder negativen immunhistochemischen Nachweis festgestellt werden (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Biomarker MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α in Bezug auf das Geschlecht, dargestellt sind Mittelwert (MW), Standardabweichung (ST), p-Wert (P) der Probanden und dem jeweiligen Antikörpernachweis. jeweils n = 66 Proben mit positiver bzw. negativer Antikörperreaktion. Die Prozente beziehen sich auf das Verhältnis von positiv bzw. negativ getesteten Biomarkern abhängig des Geschlechts.

Biomarker		Geschlecht				P
		männlich		weiblich		
		n	%	n	%	
MAGE-A 1-4, 6, 12	Positiv	6	16.2 %	10	34.5 %	0.86 _c
	Negativ	31	83.8 %	19	65.5 %	
HIF-1 α	Positiv	6	15.8 %	7	25.0 %	0.35 _c
	Negativ	32	84.2 %	21	75.0 %	

Damit kann kein Bezug eines positiven HIF-1 α Nachweises mit dem Alter und Geschlecht festgestellt werden. Eine positive MAGE-A 1-4, 6, 12 Diagnose ist ebenfalls unabhängig des Geschlechts. Hingegen scheint eine Korrelation zwischen einem MAGE-A 1-4, 6, 12 Nachweis und dem Alter zu bestehen.

3.5.2 Es besteht keine Korrelation zwischen Tabakkonsum und dem Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α

Um eine Korrelation zwischen Färbeverhalten von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α mit dem Risikofaktor Tabakkonsum beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse der Biomarkernachweise mit dem Rauchverhalten der Probanden verglichen. 37,9 % der MAGE-A 1-4, 6, 12 positiven Probanden sind Raucher und 13,5 % Nichtraucher. 62,1 % der Proben der Raucher und 86,5 % der Nichtraucher MAGE-A 1-4, 6, 12 waren negativ (pc = 0,021). Den HIF-1 α positiven Proben können 25,9 % der Raucher und 15,4 % der Nichtraucher zugeordnet werden. 74,1 % der Raucher und 84,6 % der Nichtraucher zeigen ein HIF-1 α negatives Ergebnis (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Risikofaktor Rauchen in Bezug auf den positiven bzw. negativen Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α ; Anzahl und Prozentsatz von jeweils n = 66. Die Prozente beziehen sich auf die Spalte, d.h. auf die Rauchgewohnheit.

		Rauchen				p _c
		Raucher		Nichtraucher		
		n	%	N	%	
MAGE-A 1-4; 6, 12	Positiv	11	37.9 %	5	13.5 %	0.02*c
	Negativ	18	62.1 %	32	86.5 %	
HIF-1 α	Positiv	7	25.9 %	6	15.4 %	0.29c
	Negativ	20	74.1 %	33	84.6 %	

MAGE-A 1-4, 6, 12 positive Probanden hatten im Durchschnitt zirka 31,6 *py*, dies sind geringfügig mehr als MAGE-A 1-4, 6, 12 negative Patienten mit durchschnittlich 30,3 *py*. Bei HIF-1 α positiven Befunden konnten signifikant mehr *py* errechnet werden (50,6 zu 22,9 *py*), so beträgt hier die Differenz zwischen positiven und negativen *py* 27,7 *py* ($p = 0,02$) (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: *Packyears* in Relation zur positiven bzw. negativen Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α ; dargestellt sind der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (ST), sowie der p-Wert. Die Werte beziehen sich auf die Spalte, d.h. auf die *py*; dargestellt sind nur die rauchenden Probanden aus n = 66.

		Packyears			p
		n	MW	ST	
MAGE-A 1-4; 6, 12	Positiv	11	31.6	29.2	0.93
	Negativ	18	30.3	24.3	
HIF-1 α	Positiv	7	50.6	33.6	0.02*
	Negativ	20	22.9	20.1	

Damit kann gezeigt werden, dass keine Korrelation eines positiven MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α Nachweis mit dem generellen Tabakkonsum besteht. Hin-gegen scheint mit Zunahme der *py* die Wahrscheinlichkeit für einen positiven HIF-1 α Nachweis zu steigen.

3.6 Multivariate Zusammenhänge

Um eine mögliche Korrelation zwischen einer Erkrankung einem oralen PECA mit einem positiven Biomarkernachweis sowie Alter, Geschlecht und Risikofaktoren zu erkennen, wurden multivariate Zusammenhänge analysiert.

Bei multivariaten Untersuchungen werden die verschiedenen statistischen Variablen miteinander verglichen um Abhängigkeitsstrukturen zu erkennen. Die Odds ratio bzw. das Kreuzproduktverhältnis ist eine statistische Maßzahl die etwas über die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen aussagt. Mit der jeweils errechneten Odds ratio wird die Möglichkeit erhalten, Aussagen über die Wahrscheinlichkeit eines positiven Nachweises eines Biomarkers, bei Auftreten eines bestimmten Prädiktors, zu treffen.

3.6.1 Ein positiver MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α Nachweis zeigen einen univariaten Zusammenhang mit einer Erkrankung an einem oralen PECA

Bei Betrachtung der prognostisch relevanten Prädiktoren wie Diagnose, Geschlecht, Alter und Risikofaktor Nikotinkonsum auf positiven Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 bzw. HIF-1 α lassen sich unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten errechnen. Da hier die Biomarkernachweise gesondert auf die Kriterien der begleitenden Daten untersucht werden ergibt sich für beide Biomarker jeweils ein $n = 66$.

Ein positiver MAGE-A 1-4, 6, 12 Nachweis und eine Erkrankung an einem Plattenepithelkarzinom hängen in dieser Studie signifikant zusammen ($p \leq 0,00$). Die weiteren gewählten Prädiktoren weisen keinen signifikanten Zusammenhang auf, somit ist das Ergebnis univariat. Die Ergebnisse der logistischen Regression veranschaulichen, dass bei einem oralen Plattenepithelkarzinom eine um das 47-fache erhöhte Wahrscheinlichkeit eines MAGE-A 1-4, 6, 12 positiven Nachweis besteht (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Koeffizienten der prognostischen Variablen von 4 Prädiktoren (Alter, Geschlecht, Risikofaktor Rauchen) auf positiven MAGE-A 1-4, 6, 12 Nachweis. Logistische Regression auf das Kriterium einer MAGE-A 1-4, 6, 12 positiven Färbung. Das Alter wird in Dezennien berücksichtigt. Dargestellt sind der jeweilig gewählte Prädiktor, die Probandenzahl (n), Regressionskoeffizient β (Str(β)), Odds ratio, das 95 %-ige Konfidenzintervall (95 %- KI), und der p-Wert (p(chi)) .n=66

Prädiktor	n	β	Str(β)	Odds Ratio	95%-KI		p(chi)
Basis	66	-3.23	2.20				
PECA	66	3.65	1.03	38.62	5.14	289.98	$\leq 0.00^{**}$
Alter	66	0.09	0.33	1.10	0.58	2.07	0.78
Geschlecht	66	-0.16	0.91	0.85	0.14	5.07	0.86
Raucher	66	1.07	0.85	2.92	0.56	15.31	0.21
Basis	66	-3.42	1.90				
PECA	66	3.59	0.96	36.39	5.51	240.17	$\leq 0.00^{***}$
Alter	66	0.09	0.33	1.09	0.58	2.07	0.79
Raucher	66	1.07	0.85	2.92	0.56	15.33	0.21
Basis	66	-2.96	0.72				
PECA	66	3.73	0.85	41.52	7.93	217.50	$\leq 0.00^{***}$
Raucher	66	1.03	0.83	2.80	0.55	14.27	0.21
Basis	66	-2.46	0.52				
PECA	66	3.85	0.83	47.00	9.25	238.85	$\leq 0.00^{***}$

Bei der Analyse der Daten in Bezug auf den HIF-1 α Nachweis zeigt die logistische Regression, dass nach Reduktion auf relevante Prädiktoren, das Ergebnis univariat ist. Somit hängt ein positiver HIF-1 α Nachweis und eine Erkrankung an einem Plattenepithelkarzinom signifikant zusammen ($p \leq 0,00$). Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom weisen eine 92-fache höhere Wahrscheinlichkeit eines HIF-1 α positiven Befundes auf. Bei Analyse des Prädiktors Alter zeigt sich eine zirka 3-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit pro Dezennium eines positiven HIF-1 α Nachweis (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Koeffizienten der prognostischen Variablen von 4 Prädiktoren (Alter, Geschlecht und Risikofaktor Rauchen) auf positiven HIF-1 α Nachweis. Logistische Regression auf das Kriterium eines HIF-1 α positiven Nachweis. Das Alter wird in Dezennien berücksichtigt. Dargestellt sind der jeweilig gewählte Prädiktor, die Probandenzahl (n), Regressionskoeffizient β (Str(β)), Odds ratio, das 95 %-ige Konfidenzintervall (95 %- KI) und der p-Wert (p(chi)). n = 66

Prädiktor	N	β	Str(β)	Odds Ratio	95%-KI		p(chi)
Basis	66	17.70	3485.62				
PECA	66	23.19	3485.62				0.99
Alter	66	-0.34	0.38	0.71	0.34	1.48	0.36
Geschlecht	66	-18.40	3485.61				1.00
Raucher	66	-1.28	1.25	0.28	0.02	3.18	0.30
Basis	72	-13.51	4.28				
Alter	72	1.19	0.52	3.30	1.18	9.20	0.02*
Geschlecht	72	1.76	0.99	5.81	0.83	40.71	0.08
Raucher	72	1.25	1.03	3.49	0.46	26.40	0.23
Basis	72	-12.33	3.91				
Alter	72	1.07	0.48	2.90	1.14	7.43	0.03*
Geschlecht	72	1.85	0.98	6.35	0.92	43.68	0.06
Basis	72	-9.14	3.13				
Alter	72	1.01	0.46	2.75	1.12	6.72	0.03*
Basis	66	-3.22	0.72				
PECA	66	4.52	0.97	91.67	13.65	615.68	$\leq 0.00^{***}$

3.6.2 Logistische Regression: MAGE-A 1-4, 6, 12 positive Probanden zeigten eine hohe Wahrscheinlichkeit an einem oralen PECA zu leiden

Um die Bedeutung beider Antikörper für die Diagnose des oralen PECA beurteilen zu können, wurden die Prädiktoren für das PECA gesondert dargestellt. Es wurden die Prädiktoren des positiven Antikörpernachweis, Alter, Geschlecht und Rauchen gewählt. Die Studiendaten aller 72 Probanden wurden hierfür verwendet.

MAGE-A 1-4, 6, 12 positive Probanden zeigten eine 76,5-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Diagnose des oralen PECA. Dies zeigte in dieser Regression einen signifikanten Zusammenhang ($p \leq 0,00$). Das Risiko an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken stieg alle zehn Lebensjahre um das 1,1-fache.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Alter und dem Auftreten eines PECA ($p = 0,027$) ist nachweisbar (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Logistische Regression für die Prädiktoren MAGE-A 1-4, 6, 12 und Alter, Geschlecht für das Kriterium PECA; alle 72 Patienten. Alter wird in Dezennien dargestellt. Dargestellt wird der Zusammenhang zwischen einem positiven Nachweis von MAGE-A 1-4,6, 12 dem Alter und Geschlecht. Regressionsfaktor β (Str(β)), Odds ratio, 95%-ige Konfidenzintervall (95%-KI), p-Wert (P).

Prädiktor	n	β	Str(β)	Odds Ratio	95%-KI		P
Basis	72	-12.33	3.91				
MAGE-A 1-4, 6 12	66	4.38	1.14	76.50	8.17	716.09	$\leq 0.00^{***}$
Alter	72	0.11	0.05	1.11	1.01	1.22	0.03*
Geschlecht	72	1.85	0.98	6.35	0.92	43.67	0.06
Basis	72	-9.14	3.13				
MAGE-A 1-4, 6, 12	66	4.19	1.04	65.97	8.68	501.29	$\leq 0.00^{***}$
Alter	72	0.10	0.05	1.11	1.012	1.21	0.03*

Bei der Analyse der Prädiktoren positiver HIF-1 α Nachweis, Alter, Risikofaktor Rauchen, zeigte die logistische Regression signifikante Ergebnisse. Insbesondere der positive HIF-1 α Nachweis zeigte eine um das 273-fache erhöhte Wahrscheinlichkeit eines oralen PECA ($p \leq 0,00$). Nikotinabusus zeigte unter Einschluss des Prädiktors Alter eine 11,4-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit an einem oralen PECA zu leiden ($p = 0,04$) (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Logistische Regression für die Prädiktoren HIF-1 α und Alter, Rauchen für das Kriterium PECA; alle 72 Patienten. Alter wird in Dezennien dargestellt. Dargestellt wird der Zusammenhang zwischen einem positiven Nachweis von HIF-1 α dem Alter und Risikofaktor Rauchen. Dargestellt sind Regressionsparameter (B), Regressionskoeffizient (Str(β)), Odds ratio, 95%-iges Konfidenzintervall (95 %-KI), p-Wert (p).

Prädiktor	n	B	Str(β)	Odds Ratio	95%-KI		p
Basis	72	-12.17	4.01				
HIF-1 α	66	5.61	1.52	273.60	13.89	5388.47	$\leq 0.00^{***}$
Alter	72	0.13	0.06	1.14	1.02	1.27	0.02*
Rauchen	72	2.43	1.20	11.38	1.09	119.34	0.04*

4 Diskussion

Die Erkrankung an einem oralen Plattenepithelkarzinom (PECA) ist mit einer tumorassoziierten 5-Jahres-Überlebensrate von zirka 53 % vergesellschaftet [10, 150]. Eine frühe Diagnosestellung verbessert die Prognose wesentlich [4, 11, 12]. Loeffelbein *et al.* weisen eine 5-Jahres-Rezidivrate für orale PECA von bis zu 26 % nach [151]. Für Tumoren der Zunge können sogar Werte bis zu 42 % festgestellt werden [152]. Lokale Rezidive und Sekundärtumore sind die häufigste Todesursache der Kopf-Hals-Tumorpatienten [153, 154]. Die Überwachung ausgedehnter Mundschleimhautareale via Skalpellbiopsie stellt sich aufgrund der Feldkanzerisierung schwierig dar [101]. Es ist wünschenswert eine Methode zu etablieren, die ein invasives iatrogenes Eingreifen vermeidet und die Begutachtung großer Mundschleimhautareale ermöglicht. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Studie die orale Bürstenbiopsie in Kombination mit den Biomarkern MAGE-A und HIF-1 α untersucht.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Biomarker, wie MAGE-A Antigene und HIF-1 α , in einer Bürstenbiopsie immunhistochemisch nachgewiesen werden können. Es können maligne entartete Zellen via Biomarker in 92 % der untersuchten Tumorproben detektiert werden (siehe Tabelle 4). Die statistische Analyse der Ergebnisse kann einen Zusammenhang eines Nachweis oraler Plattenepithelkarzinome mit beiden untersuchten Tumormarkern belegen (siehe Tabelle 5; Tabelle 6). Zwei Proben der gesunden Kontrollgruppe weisen einen positiven MAGE-A Nachweis auf. Es kann kein statistischer Zusammenhang gesehen werden (siehe Tabelle 12).

In den Proben der Leukoplakie mit Dysplasie kann keine MAGE-A Expression nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5). Dies steht im Gegensatz zur Studie von Ries *et al.* Diese führten eine klinische Langzeitstudie mit Patienten durch, welche eine Leukoplakie aufwiesen und im weiteren Verlauf ein Plattenepithelkarzinom entwickelten [155]. Eine MAGE-A Expression konnte in hyperplastischen und dysplastischen Leukoplakien und im entstandenen Plattenepithelkarzinom nachgewiesen werden. In 85,4 % der Leukoplakien, die eine maligne Transformation aufwiesen, konnte eine MAGE-A Expression nachgewiesen

werden. Im Gegensatz dazu wurde bei Patienten, welche kein orales PECA entwickelten, keine Expression ermittelt. Ries *et al.* zeigten, dass bereits entartete Zellen in klinisch unauffällig erscheinenden Mundschleimhautläsionen via MAGE-A Antigene nachgewiesen werden können [155]. Krauss *et al.* konnten ebenfalls MAGE-A Expression in Mundschleimhautläsionen nachweisen. Untersucht wurden u.a. Leukoplakien, Lichen planus, Dysplasien und Carcinomata *in situ*. In 33 % der Leukoplakien mit Dysplasie und 61 % der Carcinomata *in situ* konnte eine MAGE-A Expression nachgewiesen werden. In den Proben mit dysplastischen Veränderungen konnte zu zirka 65 % eine MAGE-A Expression nachgewiesen werden. Biopsate mit Lichen planus wiesen keine MAGE-A Expression auf. Ob die MAGE-A Expression in Zusammenhang mit einer erhöhten Entartungswahrscheinlichkeit steht wurde nicht untersucht [156]. Wenn eine MAGE-A Expression nur in bereits entarteten Zellen nachweisbar ist, kann dies als Erklärung dienen, warum in vorliegender Studie keine MAGE-A Expression in einer Leukoplakie nachweisbar ist (siehe Tabelle 5). Ob im weiteren Verlauf eine maligne Transformation stattgefunden hat, war kein Inhalt dieser Studie. Ausgehend von dieser Annahme ist keine bereits entartete Zelle in den Proben vorhanden. Aufgrund der geringen Probenanzahl von drei Proben einer dysplastischen Leukoplakie ist eine klare Aussage kaum möglich. In der Literatur werden verschiedene Methoden verwendet. So zeigten Ries *et al.* eine MAGE-A Expression via RT-PCR in Gewebe aus Skalpelliopsien. Krauss *et al.* verwendeten ebenfalls Gewebeschnitte mit anschließender histochemischer Färbung [156]. Für die PCR wurde über eine höhere Nachweisrate berichtet [157].

Angaben in der Literatur zu einem MAGE-A Nachweis in einem Lichen planus sind rar. Krauss *et al.* konnten in keinem histologischen Schnitt einen Antigen Nachweis erbringen [156]. Eine positive Probe entspricht in vorliegender Studie 7,69 % der gesamten Lichen planus Proben. Ausgehend von den Werten der Spezifität und Sensitivität könnte ein falsch positives Ergebnis vorliegen. Des Weiteren kann keine statistisch relevante Korrelation zwischen dem Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und der Erkrankung an einem OLP gezeigt werden (siehe Tabelle 5 und Tabelle 6)

In 80 % der PECA Proben können MAGE-A-Antigene detektiert werden (siehe Tabelle 5). Dieser Zusammenhang ist statistisch signifikant. Dies steht in Übereinstimmung mit der Literatur. Müller-Richter *et al.* konnten in einer Studie in 91 % der Fälle MAGE-A in einem oralen PECA nachweisen [158]. Krauss *et al.* wiesen 2011 in Skalpelliopsien oraler PECAs MAGE-A Expression nach [156]. Mollaoglu *et al.* konnten via Bürstenbiopsie die Expression von MAGE-A-Antigenen in Proben oraler PECAs nachweisen, Kontrollabstriche bei gesunden Probanden zeigten keine positiven Ergebnisse. Pastorcic-Grgic *et al.* wiesen in 70 % der Fälle von PECAs des Larynx eine MAGE-A Expression nach. In diesen Studien wurde zum Nachweis der MAGE-A Expression die RT-PCR angewendet [140, 159]. In gesunder Mundschleimhaut konnten Subgruppen von MAGE-A nicht nachgewiesen werden [160, 161]. Die Wahrscheinlichkeit an einem oralen Plattenepithelkarzinom im Vergleich zu Gesunden zu erkranken, ist in vorliegender Studie bei positiven MAGE-A Nachweis um das 47-fache erhöht (siehe Tabelle 21). Es konnte ebenfalls eine 3-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit eines HIF-1 α Nachweis festgestellt werden, wenn ein MAGE-A-Antigen Nachweis positiv ist (siehe Tabelle 22).

In dieser Studie kann nur ein Nachweis von HIF-1 α in den Proben der gesunden Kontrollgruppe erbracht werden (siehe Tabelle 6), vermutlich ist hier unter Berücksichtigung der Spezifität von einem falsch positiven Ergebnis auszugehen. Dies steht im Einklang damit, dass HIF-1 α ein wichtiger Faktor der Karzinogenese ist und in gesundem Gewebe i.d.R. nicht vorliegt. Unter normoxischen Sauerstoffbedingungen hat das Protein HIF-1 α nur eine sehr kurze Halbwertszeit, da es kontinuierlich abgebaut wird [132]. HIF-1 α konnte in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose für orale PECAs gebracht werden [162, 163].

In vorliegender Studie kann kein positiver HIF-1 α Nachweis in Proben der Leukoplakien erfolgen (siehe Tabelle 6). Dies ist darauf zurück zu führen, dass in der Regel in einer Leukoplakie keine Hypoxie herrscht, da eine Leukoplakie keine entzündlichen Reaktionen oder aggressives Wachstum aufweist [20].

Vor dem Hintergrund, dass ein oraler Lichen planus als Autoimmunerkrankung mit entzündlichen Geschehen und Chronifizierung einhergeht, sind alle Voraussetzungen für eine Hypoxie gegeben [29]. Die Angiogenese ist ein grundlegender Teil der Pathogenese chronischer entzündlicher Erkrankungen [164]. Durch den Anstieg der lymphozytären Entzündungsmediatoren konnte eine erhöhte Expression von HIF-1 α in einem oralen Lichen planus nachgewiesen werden [164-166]. Dadurch kann vermutet werden das in einem oralen Lichen planus ein positiver HIF-1 α Nachweis via Bürstenbiopsie gelingt. Eine abnorme entzündliche Antwort kann letztlich die Tumorgenese fördern [167]. Ein oraler Lichen planus kennzeichnet sich durch Phasen der Exazerbation und Remission der entzündlichen Reaktionen aus [30].

HIF-1 α kann in vorliegender Arbeit in keiner der Lichen planus Proben nachgewiesen werden (siehe Tabelle 6). Eine mögliche Erklärung könnten Zustände wenig vorhandener oder keiner Entzündungsherde in Ruhephasen sein [30]. Ebenfalls könnte hier ein weiterer Forschungsansatz liegen, die verschiedenen Arten des OLP (siehe Abbildung 1) differenziert auf den Nachweis von HIF-1 α zu untersuchen und in Korrelation zu einer Entartungswahrscheinlichkeit zu setzen. Die höchsten Entartungsrate konnte dem erythematösen und erosiv-ulzerierenden Typ zugeordnet werden [37, 39]. In vorliegender Studie wurde keine Differenzierung zwischen den verschiedenen Formen vorgenommen, um eine möglichst breiten Einblick zu erhalten.

Han *et al.* zeigten, dass inflammatorische Mediatoren (Lipopolysaccharide) unter anderen in oralen PECAs über die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren die Expression von HIF-1 α und VEGF induzieren können. HIF-1 α aktivierte im oralen PECA durch eine transkriptionelle Antwort auf Hypoxie (Aktivierung des HIF-1 α -TLR-/Nuklear Faktor- κ B Signalwegs) eine Rückkopplungsschleife welche durch Initiation weiterer entzündlicher Vorgänge zu einem vermehrten Tumorwachstum beiträgt [123, 124, 168]. Liang *et al.* konnten HIF-1 α zu 66,2 % in oralen PECA via immunhistochemischer Färbung nachweisen und setzen den positiven HIF-1 α Nachweis in Korrelation mit einer erhöhten regionalen Lymphknotenmetastasierung [169]. Liu *et al.* wiesen HIF-1 α zu 69,7 % in Zellen oraler

PECA nach und konnten dies in direkte Verbindung mit einer verringerten Prognose setzen [170]. In vorliegender Studie konnte in 78,6 % der Proben der an einem oralen PECA Erkrankten ein positiver HIF-1 α Nachweis erfolgen. Eine statistische Signifikanz ($p \leq 0,00$) kann bewiesen werden (siehe Tabelle 6). Somit sind die Werte mit der vorhandenen Studienlage vergleichbar und bestätigen HIF-1 α als wertigen Biomarker. Auch über weitere Verfahren, wie die RT-PCR konnten Fillies *et al.* HIF-1 α in oralen Plattenepithelkarzinomen nachweisen. Sie verwendeten für den Nachweis Gewebebiopsien mit anschließender RT-PCR [130, 171].

Aktuelle klinische Studien deuten darauf hin, dass Gingivitiden oder entzündliche Parodontopathien eine verminderte Sauerstoffsättigung aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass Vorgänge im Rahmen einer Gingivitis oder Parodontopathie inflammatorische und hypoxische Mediatoren, wie HIF-1 α , induzieren [172-174]. Ng *et al.* wiesen eine HIF-1 α positive Immunreaktion in parodontal erkrankten Gewebe nach. Der HIF-1 α Spiegel war im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöht [175]. Dies wirft die Frage auf, ob eine Gingivitis oder Parodontitis ein falsch positives Ergebnis auslösen kann. So könnten im Bereich der marginalen Gingiva gelegenen Läsionen ein falsch positives Ergebnis auslösen. Afacan *et al.* wiesen 2018 bei Patienten mit einer manifesten Gingivitis, aggressiver oder chronischer Parodontitis signifikant höhere HIF-1 α Konzentrationen im Speichel als bei gesunden Patienten nach [176]. In vorliegender Studie wurden die Proben aus dem Planum buccale, dem Mundboden und der Zunge entnommen. Eine Läsion im Bereich der marginalen Gingiva war nicht im Probandengut enthalten. Ein Kontakt mit Speichel lässt sich während der oralen Entnahme nicht vermeiden. Eine vorhandene Gingivitis oder Parodontopathie könnte eine mögliche Erklärung für die zwei falsch positiven HIF-1 α -Nachweise unter den gesunden Probanden sein. Weitere Studien wären sinnvoll.

In vorliegender Studie konnten 92 % aller Proben verwendet werden. Nicht verwertbare Proben waren aufgrund unzureichenden Zellmaterials auf dem Objektträger nicht auswertbar. Keine der Proben wurde aufgrund der Biomarker Färbung aus der Studie ausgeschlossen. Dies fokussiert die Limitation auf die

Methode der Probenentnahme. Auffällig ist, dass fünf der zwölf nicht verwendbaren Proben aus der Gruppe der Leukoplakien stammten. Eine Zellentnahme ist durch die verminderte Abschilferung aufgrund der mit einer Leukoplakie einhergehenden Hyperkeratose erschwert [20, 177]. Um eine adäquate Beurteilung durchführen zu können, muss die Zellentnahme bis zur Basalmembran gewährleistet sein. In diesem Kontext wäre die Verwendung von starrerem Borsten bei einer Leukoplakie sinnvoll.

Die Zellentnahme durch eine Bürstenbiopsie aus bereits bestehenden Tumoren oder aus roten Formen des Lichen planus waren erschwert. Häufig entstand eine immediate Blutung bei der Zellentnahme. Durch die erhöhte Anzahl an Erythrozyten auf dem Objektträger musste die Anzahl der Waschschriffe zu Beginn der immunhistochemischen Färbung erhöht werden, was in Folge zu erhöhtem Zellverlust führte. In dieser Studie konnten 92 % der Proben verwendet werden. Mehrotra *et al.* erreichten 2008 eine Rate von 84 % ,sie verwendeten Kinderzahnbürsten zur Zellentnahme [85]. Vorliegende Studie verwendete ein professionelles Bürstenbiopsieset. Alsarraf *et al.* haben verschiedene Studien ausgewertet in Bezug auf verschiedene Entnahmestrategien. Es wurden Kinderzahnbürsten, professionelle Bürstenbiopsiesets und Pinsel verglichen. Die Anwendung einer Bürste, welche speziell für die orale Zellentnahme dient, scheint die Effizienz der Zellentnahme zu erhöhen [178, 179]. Im Vergleich zu Mehrotra *et al.* [85] konnte in dieser Studie durch Verwendung eines professionellen Bürstenbiopsiesets eine Steigerung der Effizienz der Zellentnahme erreicht werden.

Jede Untersuchung von Zellen und Gewebe durch einen Pathologen ist subjektiv und nicht fehlerfrei [180-182]. Die Interobserver-Variabilität ist ein Maß für die Abhängigkeit des Ergebnisses verschiedener Untersucher. Fischer *et al.* untersuchten die Interobserver-Variabilität in Skalpelliopsien oraler Mundschleimhautläsionen. Es wurde eine große Variabilität festgestellt. Die orale Entnahmestelle scheint ein ausschlaggebender Faktor zu sein, so war die Variabilität der Ergebnisse abhängig von der Lokalisation. Für Läsionen im Planum buccale und auf der Zunge konnten die größten Übereinstimmungen bei der

Beurteilung durch die verschiedenen Pathologen festgestellt werden. Die geringsten Übereinstimmungen konnten bei Proben der labialen Mukosa nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen sich vermutlich durch die Gewebebeschaffenheit und die Zugänglichkeit der Entnahmestelle erklären. Läsionen ohne entzündliches Geschehen wurden von Pathologen ähnlich bewertet, im Gegensatz zu Bereichen in denen eine Entzündung vorlag. In einem zylindrischen Biopsat war die Interobserver-Variabilität größer als in einem keilförmigen, in dieser Studie sind die zylindrischen Proben kleiner als die Keilförmigen. So scheint die Entnahmestelle und die Größe des Biopsats ausschlaggebend für die Bewertung durch den Pathologen zu sein [183].

Verschiedene Studien zu diversen Methoden zeigten bei gleicher Entnahmemethode variierende Ergebnisse für Sensitivität und Spezifität. Die in vorliegender Studie ermittelten Werte liegen innerhalb des Spektrums der in der Literatur abgebildeten Werte für die konventionelle Bürstenbiopsie (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9).

Tabelle 25: Publierte Studien zur Wertigkeit von Diagnostikmethoden oraler Präkanzerosen und oralen PECAs im Vergleich zu vorliegender Studie.

Autor	Methode	Probanden	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
Rahman <i>et al.</i> 2012 [77]	Toluidinblau	86	66.7	81.4
Sharwani <i>et al.</i> 2006 [80]	Photodyn. Diagnostik	71	83.0	79.0
Remmerbach <i>et al.</i> 2004 [98]	Konventionell	205	91.3	95.1
Driemel <i>et al.</i> 2008 [184]	Konventionell	169	79.0	100
Trakroo <i>et al.</i> 2015 [87]	Konventionell	50	84.4	88.9
Hohlweg-Majert <i>et al.</i> 2009 [185]	Oral CDx©	75	52.0	29.0
Scheifele <i>et al.</i> 2004 [89]	Oral CDx©	103	92.3	94.3
Kaur <i>et al.</i> 2016 [100]	DNA Bildzytometrie	96	83.3	95.8
Driemel <i>et al.</i> 2007 [90]	Immunhisto. γ -2-Kette Laminin-5	93	79.0	98.0
vorliegende Studie	Immunhisto. MAGE-A	72	80.0	92.2
	HIF-1 α	72	78.6	96.2

Im Vergleich zu einer Studie aus 2015 von Trakroo *et al.* wird in vorliegender Studie eine geringere Sensitivität der Methode nachgewiesen (80 % gegenüber 84,37 %). Die Spezifität und diagnostische Genauigkeit innerhalb unserer Probandengruppe mit einem zusätzlichen histochemischen MAGE-A Nachweis ist im Vergleich höher (92,2 % gegenüber 88,9 %) [87].

Die Sensitivität der Methode mit dem Nachweis von HIF-1 α weist einen geringeren Wert von 78,6 % auf. Die Spezifität weist einen höheren Wert auf (96,2 %).

Im Vergleich zu Remmerbach *et al.* 2004 konnte für den MAGE-A Nachweis ein höherer Wert für die Sensitivität und Spezifität, für den HIF-1 α Nachweis ein höherer Wert für die Spezifität erzielt werden [98]. Driemel *et al.* erzielten 2008 mit konventioneller Bürstenbiopsie und immunhistochemischer Färbung Werte für die Sensitivität von 79 % und Spezifität von 93 % [184].

Hohlweg-Majert *et al.* haben unter Verwendung eines computer-assistierten Nachweis (OralCDx©; Bürstenbiopsie-Set Fa. Microdent, Breckerfeld, Deutschland), Werte für die Sensitivität von 52 % und für die Spezifität von 29 % ermittelt. Eine Erklärung für die niedrigen Werte dieser Studie könnte die fehlende Differenzierung von Proben atypischer Zellen und maligne entarteter Zellen sein [185]. Scheifele *et al.* konnten in einer vorhergehenden Studie höhere Werte für Sensitivität und Spezifität mit dieser Methode erreichen. Die ermittelten Werte überstiegen diese der vorliegenden Studie [89]. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass nicht nur das orale PECA, sondern auch Dysplasien detektiert wurden. In einer zu der vorliegenden Studie vergleichbaren Untersuchung von Scheifele *et al.*, welche sich mit dem computer-assistierten Vergleich von maligne entarteten Zellen beschäftigt, liegt die Sensitivität und Spezifität der Kombination von Bürstenbiopsie mit Biomarkernachweis unterhalb deren ermittelter Werte. Hier wurde eine Sensitivität von bis zu 92,3 % und eine Spezifität bis 94,3 % nachgewiesen [89]. Ein Grund hierfür könnte sein, dass durch die Verwendung eines digitalen Systems die Begutachtung der Proben unter gleichbleibenden standardisierten Bedingungen stattfindet. Die Variabilität der Beurteilung durch verschiedene Pathologen scheint verringert. In einer vergleichbaren Studie die mit immunhistologischen Nachweis von Biomarkern arbeitet, konnte dessen Nutzen nachweisen. Driemel *et al.* untersuchte die Laminin 5-Gamma 2-Kette, so konnten drei der fünf nicht identifizierten Karzinome anhand dieser immunzytochemisch nachgewiesen werden, die Sensitivität dieser Methode betrug 93 % [90].

Auch in vorliegender Studie kann eine überwiegende Steigerung der Sensitivität für die Kombination der Bürstenbiopsie in Kombination mit dem MAGE-A Nachweis erzielt werden (siehe Tabelle 8). Anhand dieser Ergebnisse kann die

Bürstenbiopsie in Kombination mit immunhistochemischen Nachweis hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität als adäquate Untersuchungsmethode eingestuft werden. In vorliegender Studie können die gewählten Biomarker nur in bereits entarteten Zellen nachgewiesen werden. Es kann in Vorläuferläsionen entweder kein oder nur in sehr geringem Prozentsatz ein Nachweis erfolgen (siehe Tabelle 5 und Tabelle 6). Lee *et al.* konnten ebenfalls in ihrer Untersuchung keine MAGE-A-Antigene in nicht entarteten Läsionen nachweisen [186]. Der zusätzliche Nachweis von MAGE-A und HIF-1 α ist eine hilfreiche Ergänzung und kann die Diagnostik verbessern. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse sind MAGE-A und HIF-1 α interessante Marker in der ergänzenden Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms. Es kann als ergänzendes Instrument zur Absicherung bei der primär nicht tumorverdächtigen Mundschleimhautläsion fungieren, da bei diesen Läsionen die Indikation zur Skalpellbiopsie zurückhaltend gestellt werden würde.

Für die Methode der Bürstenbiopsie in Kombination mit Immunhistochemie konnten keine Daten für die Früherkennung von oralen PECAs gewonnen werden. Eine Prognose für eine Entartung anhand der ermittelten Ergebnisse kann nicht gestellt werden. Unabhängig davon werden Nachweise von MAGE-A und auch HIF-1 α in der Literatur in Bezug zur Prognose bewertet. Als prognostische Faktoren für die tumorassoziierte Überlebensrate gelten u.a. die Tumorgroße, die Komorbidität und das Vorhandensein von Metastasen. In Bezug auf die Tumorgroße konnten unterschiedliche 5-Jahres-Überlebensraten festgestellt werden [187]. In vorliegender Studie kann kein Zusammenhang zwischen positiven Nachweis der gewählten Biomarker und Tumorklasse festgestellt werden (siehe Tabelle 10).

Generell korreliert der Nachweis von MAGE-A Antigenen mit einer schlechteren Prognose von Tumorerkrankungen. Pastorcic-Grgic *et al.* führten eine Studie an Patienten mit Pharynxkarzinomen durch. Es konnte eine verkürzte Überlebenszeit in Zusammenhang mit dem Nachweis von Antigenen gegen MAGE-A 1-4, 6, 12 nachgewiesen werden [159]. Ebenfalls konnte bei Patienten mit Prostatakarzinom schlechtere Verläufe in Zusammenhang mit einem Nachweis von

Antigenen gegen MAGE-A festgestellt werden.[188]. Kocher *et al.* wies ebenfalls eine verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit einem Blasenkarzinom mit positivem Nachweis von Antigenen gegen MAGE-A 4 nach [189].

Auch der Nachweis von HIF-1 α konnte in Zusammenhang mit einem negativen Einfluss auf die Überlebensrate gebracht werden. Aebersold *et al.* konnten eine signifikante höhere Überlebensrate für Patienten mit negativem Nachweis für HIF-1 α im Vergleich zu Patienten mit positivem Nachweis feststellen. Es wurden 98 Plattenepithelkarzinome des gesamten Oropharynx untersucht [190]. Den negativen Einfluss auf die Prognose von HIF-1 α lässt sich durch Förderung des Tumorwachstums erklären [138, 191]. Kang *et al.* zeigten ebenfalls, dass Patienten mit keiner oder einer geringen Expression von HIF-1 α in Plattenepithelkarzinomen der Zunge etwa doppelt so hohe Überlebensraten aufwiesen, als Patienten mit hoher Expression [192].

Durch die willkürliche Auswahl der Probanden in vorliegender Studie konnte ein breiter Überblick gewonnen werden. Trotzdem müssen weitere epidemiologische Analysen vorgenommen werden. Eine epidemiologische Datenerhebung war kein Gegenstand dieser Studie. Ausgewählte Aspekte wurden dennoch erfasst und deskriptiv ausgewertet.

Müller-Richter *et al.* konnten in Untersuchungen zur Expression von MAGE-A 1-4, 6, 12 in oralen PECAs keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Geschlechts ermitteln [193]. Montoro *et al.* wiesen bei der Untersuchung oraler PECAs auf MAGE-A4 und MAGE-C1 ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Geschlechterverteilung nach [194]. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie. Der Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α ist in vorliegender Studie unabhängig vom Geschlecht und Alter. Im Literaturvergleich konnten keine Abhängigkeiten zum Geschlecht und Alter der Probanden für HIF-1 α nachgewiesen werden [162, 195].

Da Tabakkonsum als einer der schwerwiegendsten Risikofaktoren gilt, liegt ein Zusammenhang nahe [6]. In vorliegender Studie wurde Tabakkonsum in Zu-

sammenhang mit dem Nachweis der Biomarker untersucht. Positive Biomarkernachweise korrelieren mit hohem Tabakkonsum. Ein Zusammenhang zwischen langjährigem Tabakkonsum und einer malignen Erkrankung im oropharyngealen Bereich gilt als sicher [196-199]. Raucher entwickeln 2-4 mal häufiger einen malignen oralen Tumor als Nichtraucher [197]. Im Vergleich zu Nichtrauchern, welche niemals geraucht haben, ist das Risiko um das 7-bis 10-fache erhöht [196]. Im Tabak sind verschiedene Karzinogene, wie Nitrosamine, polzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Methylchloranten, Benzpyren, Benzantren) enthalten [200]. Bhutani *et al.* wiesen 2011 in nicht entarteten trachealen Bürstenzellen, von Rauchern mit mindestens 20 *py*, MAGE-A1 nach. Vermutlich kann die Expression von MAGE-A Antigenen eine maligne Transformation initiieren [201]. Bezogen auf das gesamte Probandenkollektiv vorliegender Studie ist der Anteil der positiven MAGE-A Nachweise bei Rauchern höher als bei Nichtrauchern. Zwischen der Menge des Nikotinabusus, gerauchter Menge in *Py* und positiven Antikörpernachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 besteht kein Zusammenhang (siehe Tabelle 19 und Tabelle 20). Dunkel *et al.* zeigte, dass keine statistische Abhängigkeit zwischen einer HIF-1 α Expression und Rauchen bestand [202]. Dies steht im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen (siehe Tabelle 19). HIF-1 α positive Probanden wiesen eine höhere *py* Anzahl auf als negative. Es existieren bislang keine Studien, die einen Zusammenhang zwischen Quantität des Tabakkonsums und HIF-1 α Expression untersuchen (siehe Tabelle 20).

In dieser Studie kann kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Erkrankung an einer Leukoplakie und Tabakkonsum festgestellt werden. Es kann ein Anteil von 44,4 % Rauchern innerhalb der Gruppe der Probanden mit Leukoplakie ermittelt werden (im Mittel 35,8 *py*) (siehe Tabelle 16). Baric *et al.* beschrieben, dass eine Leukoplakie bei Rauchern sechs Mal häufiger auftritt, als bei Nichtrauchern. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Eine Erklärung hierfür könnte die Fallzahl der Probanden in dieser Untersuchung sein. Des Weiteren haben Baric *et al.* ebenfalls Pfeifenraucher und Konsumenten weiterer Tabakprodukte in die Studie einbezogen. In vorliegender Studie handelt es sich ausschließlich um Zigarettenkonsum [203].

In dieser Studie kann kein Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und Erkrankung an einem Lichen planus festgestellt werden (siehe Tabelle 16). 26,7 % der Probanden zeigen eine positive Raucheranamnese. Diverse Untersuchungen konnten keine gesicherte Assoziation zwischen einem oralen Lichen planus und Nikotinkonsum bestätigen. Neumann-Jensen *et al.* zeigten, dass ein oraler Lichen bei Rauchern weniger verbreitet ist, als bei Nichtrauchern [204]. Dem gegenüber wiesen Pindborg *et al.* einen oralen Lichen planus häufiger bei Rauchern nach [205]. Die Ätiopathogenese des oralen Lichen planus ist nicht endgültig geklärt [29, 33]. Anhand der dargestellten Ergebnisse kann in diesem Kontext keine gesicherte Aussage getroffen werden. Auffällig ist, dass unter den Probanden mit einem Lichen planus die geringste Anzahl an Rauchern aller Probandengruppen nachweisbar ist. Eine Theorie hierfür stellten Gorsky *et al.* auf. Rauchen könne die Symptome eines Lichen planus durch die Hitze und die Irritation des Tabakrauchs verschlimmern und damit eine Beendigung des Tabakkonsums forcieren [206].

In vorliegender Studie sind 66,7 % der Probanden mit einem oralen PECA Raucher (siehe Tabelle 16). Diese Probanden weisen mit im Mittel 44,4 *py* eine wesentlich höhere *py*-Anzahl als Gesunde oder benigne Erkrankte auf (siehe Tabelle 20). Dies ist unter anderem auf die Altersdiskrepanz der Kontrollgruppe zurückzuführen. Dies bestätigt Nikotinkonsum als manifesten Risikofaktor. Welcher in anderen Studien ebenfalls bestätigt wurde [196, 198, 200, 207].

Die Untersuchungen dieser Studie zeigen, dass die Methode der Probenentnahme durch eine Bürstenbiopsie eine fast schmerzfreie Untersuchungsvariante ist. In Folge dessen, wird dem Patient die Angst vor mehrfachen Eingriffen mit Anästhesie und Skalpell genommen. Eine bessere Mitarbeit ist zu erwarten und damit die Wahrscheinlichkeit erhöht eine neoplastische Veränderung früher zu erkennen.

Da die rein konventionelle Bewertung durch einen Pathologen in der Literatur sehr weit gestreute Ergebnisse zeigt, sollte in vorliegender Studie die Ergänzung der Bürstenbiopsie durch den Nachweis von Biomarkern untersucht werden. In vorliegender Studie können Biomarker eindeutig in Proben von oralen

PECAs nachgewiesen werden. Mit Werten für die Sensitivität für den MAGE-A 1-4, 6, 12 Nachweis von 80 % und Spezifität von 92,2 % und für HIF-1 α für die Sensitivität von 78,6 % und Spezifität von 96,2 %. Der Nachweis von Antigenen gegen MAGE-A 1-4, 6, 12 stellt in vorliegender Arbeit eine vielversprechende Ergänzung der konventionellen Bürstenbiopsie dar.

Aktuell können die Methoden wie die Färbung mit Toluidinblau oder photodynamische Diagnostiken die Existenz eines oralen PECAs nicht mit Sicherheit feststellen [208]. Der positive Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α Antigenen in dieser Studie in oralen PECAs beweist, dass dieser Nachweis als Diagnosefaktor gewählt werden kann. Die Bürstenbiopsie sollte als Beobachtungsinstrument der diagnostischen Absicherung von primär nicht tumorverdächtigen Läsionen verwendet werden. Bei einem positiven Befund der Bürstenbiopsie ist eine Skalpellbiopsie trotz allem zwingend erforderlich.

In der Diagnostik der Mundschleimhaut-Erkrankungen gilt die Skalpellbiopsie laut der S2 k-Leitlinie der DGZMK als Goldstandard (Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde) [27, 69, 101]. Sie ist sensitiver und sicherer als eine rein klinische Begutachtung. Bei dieser Methode ist eine Begutachtung durch einen Pathologen obligat.

Schließlich sind weitere Untersuchungen an einem größeren Probandengut sinnvoll, um einen genaueren Einblick in diese vielversprechende Methode zu geben. Eine Risikobewertung im klinischen Verlauf wäre eine wünschenswerte Entwicklung, um Patienten vor den Konsequenzen einer erstmaligen oder erneuten bösartigen Erkrankung zu bewahren.

5 Zusammenfassung

Pro Jahr erkranken in Deutschland zirka 10.500 und weltweit etwa 400.000 Menschen an einem Plattenepithelkarzinom (PECA) des Mund- und Rachenraums. Präkanzerosen spielen eine zentrale Rolle im Krankheitsverlauf oraler PECAs. Die 5 - Jahres Überlebensrate ist mit zirka 50% gering. Trotz Forschung an Diagnostik und Therapie konnte die Prognose bisher nicht wesentlich gesteigert werden. Eine frühzeitige Diagnosestellung von malignen Veränderungen ist vor diesem Hintergrund bedeutsam. MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α sind etablierte Biomarker im Bereich der Tumorforschung und sind in vielen soliden Tumoren nachweisbar.

In vorliegender Studie wurden Expression von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α in oralen Vorläuferläsionen (Leukoplakie und oralen Lichen planus) und PECA analysiert. Dazu wurde von unterschiedlichen Probandengruppen durch Bürstenbiopsien Zellmaterial gewonnen und anschließend eine immunhistochemische Analyse durchgeführt und von Pathologen bewertet. Des Weiteren wurde die Sensitivität und Spezifität der Methode in Bezug auf den Antigennachweis untersucht. Anamnestische Probandendaten wie Alter, Geschlecht, Diagnose und Risikofaktoren Nikotin- und Alkoholabusus dienten der Ermittlung der Korrelationen zur Expression der Biomarker. Alle Parameter wurden auf Signifikanz und multivariate Zusammenhänge untersucht.

Eine Korrelation zwischen MAGE-A Antigenen und HIF-1 α Antigenen in oralen PECA ist via Bürstenzytologie nachweisbar. Ein Zusammenhang zwischen steigendem Alter und der Diagnose PECA besteht, hingegen kann keine Korrelation zwischen positiven Biomarkernachweis, Größe des Tumors, Lymphknotenstatus oder Nachweis von Metastasen nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte keine Korrelation in Bezug auf das Alter und Geschlecht festgestellt werden.

Durch eine hohe Spezifität und Sensitivität ist die Bürstenbiopsie in Kombination mit einem Biomarkernachweis als Methode geeignet, um alltägliche, harmlos erscheinende Mundschleimhautveränderungen zu untersuchen und auszuschließen, dass sich hinter ihnen eine Präkanzerose oder ein Karzinom im Frühstadium verbergen kann. Der Vorteil der Bürstenbiopsie ist, dass die Ent-

nahmetechnik leicht zu erlernen und wirtschaftlich ist. Die Bürstenbiopsie kann als diagnostisches Hilfsmittel bei der Früherkennung oraler Karzinome fungieren.

6 Literaturverzeichnis

1. de Visscher, J.G., [Treatment and prognosis of oral cancer]. Ned Tijdschr Tandheelkd, 2008. **115**(4): p. 192-8.
2. Kaatsch, D.P., *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 2013.
3. La Vecchia, C., et al., *Epidemiology and prevention of oral cancer*. Oral Oncol, 1997. **33**(5): p. 302-12.
4. Howaldt, H.P.V., H.; Blecher, J.C.; et al., *Ergebnisse aus dem DÖSAK Tumorregister*. Mund Kiefer Gesichtschirurgie, 2000(1): p. 216-225.
5. Parkin, D.M., et al., *Fifty years of cancer incidence: CI5 I-IX*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2918-27.
6. Dal Maso, L., et al., *Combined effect of tobacco smoking and alcohol drinking in the risk of head and neck cancers: a re-analysis of case-control studies using bi-dimensional spline models*. Eur J Epidemiol, 2016. **31**(4): p. 385-93.
7. Warnakulasuriya, S., *Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer*. Oral Oncol, 2009. **45**(4-5): p. 309-16.
8. Bui, T.C., et al., *Examining the association between oral health and oral HPV infection*. Cancer Prev Res (Phila), 2013. **6**(9): p. 917-24.
9. Moergel, M., et al., *Chronic periodontitis and its possible association with oral squamous cell carcinoma - a retrospective case control study*. Head Face Med, 2013. **9**: p. 39.
10. Scully, C. and J.V. Bagan, *Recent advances in oral oncology 2008; squamous cell carcinoma imaging, treatment, prognostication and treatment outcomes*. Oral Oncol, 2009. **45**(6): p. e25-30.
11. McLeod, N.M., N.R. Saeed, and E.A. Ali, *Oral cancer: delays in referral and diagnosis persist*. Br Dent J, 2005. **198**(11): p. 681-4.
12. Onizawa, K., et al., *Factors associated with diagnostic delay of oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2003. **39**(8): p. 781-8.
13. Thompson, L., *World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours*. Ear Nose Throat J, 2006. **85**(2): p. 74.
14. Reibel, J., *Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics*. Crit Rev Oral Biol Med, 2003. **14**(1): p. 47-62.
15. Pindborg, J., Reichart P.A., Smith C.J., Van der Wall, I. et al., *Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa*. . World Health Organization (ed) International classifications of tumours, 1997(2).
16. Barnes, L.E., JW; Reichart, PA; Sidransky D, *Pathology and Genetics: Head and Neck Tumours.*, in World Health Organization (ed) International classifications of tumours. 2005, IARC Press Lyon
17. Reichart, P.A., [Oral precancerous conditions--an overview]. Mund Kiefer Gesichtschir, 2003. **7**(4): p. 201-7.
18. Hornstein, O.P., [Oral leukoplakias. I. Classification, differential diagnosis, etiological conditions for neoplastic transformation, prognosis]. Dtsch Zahnärztl Z, 1977. **32**(7): p. 497-505.
19. WHO, W.H.O., *Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancerous lesions*. Oral Surg (46): p. 518-539.
20. Reichart, P.A., *Orale Leukoplakie/Erythroplakie*. , in Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. 2007.
21. Schwenzer, N.E., M., *Präkanzerosen der Munschleimhaut - Leukoplakie*. Zahnärztliche Chirurgie, 2009.

22. Rodstrom, P.O., et al., *Cancer and oral lichen planus in a Swedish population*. Oral Oncol, 2004. **40**(2): p. 131-8.
23. Schepman, K.P., et al., *Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leukoplakia*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1996. **32B**(6): p. 416-9.
24. Dietrich, T., P.A. Reichart, and C. Scheifele, *Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population*. Oral Oncol, 2004. **40**(2): p. 158-63.
25. Bunnell, A., et al., *Analysis of primary risk factors for oral cancer from select US states with increasing rates*. Tob Induc Dis, 2010. **8**: p. 5.
26. van der Waal, I., K.P. Schepman, and E.H. van der Meij, *A modified classification and staging system for oral leukoplakia*. Oral Oncol, 2000. **36**(3): p. 264-6.
27. Kunkel, M.H., *K. S 2 k-Leitlinie: Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde*. 2010.
28. Lodi, G., et al., *Systematic review of randomized trials for the treatment of oral leukoplakia*. J Dent Educ, 2002. **66**(8): p. 896-902.
29. Sugerman, P.B., et al., *The pathogenesis of oral lichen planus*. Crit Rev Oral Biol Med, 2002. **13**(4): p. 350-65.
30. Krupaa, R.J., et al., *Oral lichen planus: An overview*. J Pharm Bioallied Sci, 2015. **7**(Suppl 1): p. S158-61.
31. Al-Hashimi, I., et al., *Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007. **103** Suppl: p. S25 e1-12.
32. Bricker, S.L., *Oral lichen planus: a review*. Semin Dermatol, 1994. **13**(2): p. 87-90.
33. Sugerman, P.B. and N.W. Savage, *Oral lichen planus: causes, diagnosis and management*. Aust Dent J, 2002. **47**(4): p. 290-7.
34. Chaudhry, S.I., et al., *The use of topical calcineurin inhibitors in the management of oral lichen planus*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2007. **21**(4): p. 554-6.
35. Ali, A.A. and C.S. Suresh, *Oral lichen planus in relation to transaminase levels and hepatitis C virus*. J Oral Pathol Med, 2007. **36**(10): p. 604-8.
36. Hasseus, B., et al., *Langerhans cells from human oral epithelium are more effective at stimulating allogeneic T cells in vitro than Langerhans cells from skin*. Clin Exp Immunol, 2004. **136**(3): p. 483-9.
37. Gandolfo, S., et al., *Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population*. Oral Oncol, 2004. **40**(1): p. 77-83.
38. Mattsson, U., M. Jontell, and P. Holmstrup, *In reply to the short communication "Malignant transformation of oral lichen planus" by A. Larsson and G. Warfvinge in Oral Oncology 39 (2003) 630-1*. Oral Oncol, 2004. **40**(6): p. 649-50.
39. Ismail, S.B., S.K. Kumar, and R.B. Zain, *Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation*. J Oral Sci, 2007. **49**(2): p. 89-106.
40. Scheifele, C. and P.A. Reichart, *[Oral leukoplakia in manifest squamous epithelial carcinoma. A clinical prospective study of 101 patients]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 1998. **2**(6): p. 326-30.
41. Lodi G, S.A., Bez C, Demarosi F, Carrassi A., *Interventions for treating oral leukoplakia*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 1999.
42. Kramer, I.R., J.J. Pindborg, and M. Shear, *The World Health Organization histological typing of odontogenic tumours. Introducing the second edition*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1993. **29B**(3): p. 169-71.
43. Reichart, P.A., *Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures*. Clin Oral Investig, 2001. **5**(4): p. 207-13.

44. Coatesworth, A.P. and K. MacLennan, *Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: the prevalence of microscopic extracapsular spread and soft tissue deposits in the clinically NO neck*. *Head Neck*, 2002. **24**(3): p. 258-61.
45. Sasaki, T., et al., *Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age*. *J Oral Pathol Med*, 2005. **34**(3): p. 129-33.
46. Califano, J., et al., *Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization*. *Cancer Res*, 1996. **56**(11): p. 2488-92.
47. Llewellyn, C.D., et al., *Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997*. *Oral Oncol*, 2003. **39**(2): p. 106-14.
48. Altieri, A., et al., *Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer*. *Br J Cancer*, 2002. **87**(11): p. 1227-9.
49. Levi, F., et al., *Refined and whole grain cereals and the risk of oral, oesophageal and laryngeal cancer*. *Eur J Clin Nutr*, 2000. **54**(6): p. 487-9.
50. Gillison, M.L., et al., *Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(9): p. 709-20.
51. Smith, E.M., et al., *Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(6): p. 449-55.
52. Iyer, S.G., et al., *Surgical treatment outcomes of localized squamous carcinoma of buccal mucosa*. *Head Neck*, 2004. **26**(10): p. 897-902.
53. Sessions, D.G., et al., *Analysis of treatment results for floor-of-mouth cancer*. *Laryngoscope*, 2000. **110**(10 Pt 1): p. 1764-72.
54. Rodgers, L.W., Jr., et al., *Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth*. *Head Neck*, 1993. **15**(1): p. 16-9.
55. Kovacs, A.F., *Relevance of positive margins in case of adjuvant therapy of oral cancer*. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2004. **33**(5): p. 447-53.
56. Liu, X., et al., *Neck observation versus elective neck dissection in management of clinical T1/2N0 oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 232 patients*. *Chin J Cancer Res*, 2017. **29**(3): p. 179-188.
57. McMahan, J., et al., *Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer*. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2003. **41**(4): p. 224-31.
58. Parsons, J.T., et al., *An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1997. **39**(1): p. 137-48.
59. Hicks, W.L., Jr., et al., *Surgery as a single modality therapy for squamous cell carcinoma of the oral tongue*. *Am J Otolaryngol*, 1998. **19**(1): p. 24-8.
60. Bernier, J., et al., *Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(19): p. 1945-52.
61. Cooper, J.S., *Postoperative irradiation in head and neck cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1993. **26**(1): p. 181-2.
62. Schenk, P., *[Melanocytes, Langerhans and Merkel cells in oral epithelium]*. *Acta Otolaryngol*, 1975. **80**(3-4): p. 301-11.
63. Bragulla, H.H. and D.G. Homberger, *Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia*. *J Anat*, 2009. **214**(4): p. 516-59.
64. Walker, D.M., G. Boey, and L.A. McDonald, *The pathology of oral cancer*. *Pathology*, 2003. **35**(5): p. 376-83.
65. Schwenzer, N.E., M., *Zahnärztliche Chirurgie. Präkanzerosen der Mundschleimhaut-Leukoplakie*. 2009.

66. Kleihues, P., C.W.K.E., et al., *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, 2005.
67. Slaughter, D.P., H.W. Southwick, and W. Smejkal, *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin*. *Cancer*, 1953. **6**(5): p. 963-8.
68. Braakhuis, B.J., et al., *A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications*. *Cancer Res*, 2003. **63**(8): p. 1727-30.
69. Hullmann, M., et al., [*Oral cytology: historical development, current status, and perspectives*]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2007. **11**(1): p. 1-9.
70. J, B.A.R.T.B., *Bürstenbiopsie zur Mundkrebsfrüherkennung*. *Zahnärztliche Mitteilungen*, 2004. **9** p. 28-32.
71. Drinnan, A.J., *Screening for oral cancer and precancer--a valuable new technique*. *Gen Dent*, 2000. **48**(6): p. 656-60.
72. Johnson, N.W., *Oral Cancer* FDI World Dental Press London, 1999: p. 1-44.
73. Niebel, H.H. and B. Chomet, *In Vivo Staining Test for Delineation of Oral Intraepithelial Neoplastic Change: Preliminary Report*. *J Am Dent Assoc*, 1964. **68**: p. 801-6.
74. Onofre, M.A., M.R. Sposto, and C.M. Navarro, *Reliability of toluidine blue application in the detection of oral epithelial dysplasia and in situ and invasive squamous cell carcinomas*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2001. **91**(5): p. 535-40.
75. Ram, S. and C.H. Siar, *Chemiluminescence as a diagnostic aid in the detection of oral cancer and potentially malignant epithelial lesions*. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2005. **34**(5): p. 521-7.
76. Gandolfo, S., et al., *Toluidine blue uptake in potentially malignant oral lesions in vivo: clinical and histological assessment*. *Oral Oncol*, 2006. **42**(1): p. 89-95.
77. Rahman, F., et al., *A study to evaluate the efficacy of toluidine blue and cytology in detecting oral cancer and dysplastic lesions*. *Quintessence Int*, 2012. **43**(1): p. 51-9.
78. Leunig, A., et al., *Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence*. *Laryngoscope*, 2000. **110**(1): p. 78-83.
79. Schleier, P., W. Zenk, and W. Dietel, [*Tumors of the mouth cavity. Not all fluorescent tumors are malignant*]. *MMW Fortschr Med*, 2002. **144**(13): p. 26-8.
80. Sharwani, A., et al., *Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy*. *J Photochem Photobiol B*, 2006. **83**(1): p. 27-33.
81. Zenk, W., et al., [*Visualizing carcinomas of the mouth cavity by stimulating synthesis of fluorescent protoporphyrin IX*]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 1999. **3**(4): p. 205-9.
82. Bienengraber, V., M. Stubbe, and I. Steder, [*Value of exfoliative cytology in the diagnosis of malignant and precancerous lesions of oral mucosa*]. *Stomatol DDR*, 1986. **36**(1): p. 12-8.
83. Mehrotra, R., et al., *Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions*. *Mol Cancer*, 2006. **5**: p. 11.
84. Driemel, O., et al., *Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2007. **5**(12): p. 1095-100.
85. Mehrotra, R., et al., *The use of an oral brush biopsy without computer-assisted analysis in the evaluation of oral lesions: a study of 94 patients*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2008. **106**(2): p. 246-53.
86. Remmerbach, T.W., et al., *Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer*. *Anal Cell Pathol*, 2001. **22**(4): p. 211-21.

87. Trakroo, A., et al., *Efficacy of Oral Brush Biopsy without Computer-Assisted Analysis in Oral Premalignant and Malignant Lesions: A Study*. J Int Oral Health, 2015. **7**(3): p. 33-8.
88. S, C., et al., *Transepithelial Brush Biopsy - Oral CDx(R) - A Noninvasive Method for the Early Detection of Precancerous and Cancerous Lesions*. J Clin Diagn Res, 2014. **8**(2): p. 222-6.
89. Scheifele, C., et al., *The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases*. Oral Oncol, 2004. **40**(8): p. 824-8.
90. Driemel, O., et al., *Laminin-5 immunocytochemistry: a new tool for identifying dysplastic cells in oral brush biopsies*. Cytopathology, 2007. **18**(6): p. 348-55.
91. Driemel, O., et al., *Protein profiling of oral brush biopsies: S100A8 and S100A9 can differentiate between normal, premalignant, and tumor cells*. Proteomics Clin Appl, 2007. **1**(5): p. 486-93.
92. Haas, M., et al., *[Laminin-5 in diseases of the oral cavity]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2000. **4**(1): p. 25-9.
93. Haas, M., Berndt, A., Hyckel, P. et al. , Mund Kiefer Gesichtschir 2000.
94. Delamater, E.D., H. Mescon, and J.D. Barger, *The chemistry of the Feulgen reaction and related histo- and cytochemical methods*. J Invest Dermatol, 1950. **14**(2): p. 133-52.
95. Bocking, A., et al., *Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry*. Cancer, 1985. **56**(7): p. 1600-4.
96. Duesberg, P.H., *Are cancers dependent on oncogenes or on aneuploidy?* Cancer Genet Cytogenet, 2003. **143**(1): p. 89-91.
97. Wright, J.M., *Oral precancerous lesions and conditions*. Semin Dermatol, 1994. **13**(2): p. 125-31.
98. Remmerbach, T.W., et al., *[Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2004. **8**(4): p. 229-36.
99. Maraki, D., J. Becker, and A. Boecking, *Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer*. J Oral Pathol Med, 2004. **33**(7): p. 398-404.
100. Kaur, M., et al., *Evaluation of brush cytology and DNA image cytometry for the detection of cancer of the oral cavity*. Diagn Cytopathol, 2016. **44**(3): p. 201-5.
101. Richards, D., *Adjunctive tests cannot replace scalpel biopsy for oral cancer diagnosis*. Evid Based Dent, 2015. **16**(2): p. 46-7.
102. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2617-21.
103. van der Bruggen, P., et al., *A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3*. Eur J Immunol, 1994. **24**(12): p. 3038-43.
104. Barker, P.A. and A. Salehi, *The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease*. J Neurosci Res, 2002. **67**(6): p. 705-12.
105. Ding, M., et al., *Cloning and analysis of MAGE-1-related genes*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **202**(1): p. 549-55.
106. Xiao, J. and H.S. Chen, *Biological functions of melanoma-associated antigens*. World J Gastroenterol, 2004. **10**(13): p. 1849-53.
107. Bolli, M., et al., *Tissue microarray evaluation of Melanoma antigen E (MAGE) tumor-associated antigen expression: potential indications for specific immunotherapy and prognostic relevance in squamous cell lung carcinoma*. Ann Surg, 2002. **236**(6): p. 785-93; discussion 793.
108. Muller-Richter, U.D., et al., *Different expression of MAGE-A-antigens in foetal and adult keratinocyte cell lines*. Oral Oncol, 2008. **44**(7): p. 628-33.

109. Zendman, A.J., D.J. Ruiter, and G.N. Van Muijen, *Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function*. J Cell Physiol, 2003. **194**(3): p. 272-88.
110. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Science, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
111. De Plaen, E., et al., *Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family*. Immunogenetics, 1994. **40**(5): p. 360-9.
112. Feng, Y.G., J., Yang, M, *When MAGE meets RING: insights into biological functions of MAGE proteins*. Protein Cell, 2011(2): p. 7-12.
113. Artamonova, II and M.S. Gelfand, *Evolution of the exon-intron structure and alternative splicing of the MAGE-A family of cancer/testis antigens*. J Mol Evol, 2004. **59**(5): p. 620-31.
114. De Plaen, E., et al., *Alternative promoters of gene MAGE4a*. Genomics, 1997. **40**(2): p. 305-13.
115. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
116. Cohen, S.M. and L.B. Ellwein, *Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis*. Cancer Res, 1991. **51**(24): p. 6493-505.
117. Cannuyer, J., et al., *Epigenetic hierarchy within the MAGEA1 cancer-germline gene: promoter DNA methylation dictates local histone modifications*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58743.
118. Laduron, S., et al., *MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(14): p. 4340-50.
119. Yang, B., et al., *MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9954-62.
120. Park, J.W., et al., *A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers*. J Immunol Methods, 2002. **266**(1-2): p. 79-86.
121. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 1230-7.
122. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 38-47.
123. Han, S., et al., *Crosstalk between the HIF-1 and Toll-like receptor/nuclear factor-kappaB pathways in the oral squamous cell carcinoma microenvironment*. Oncotarget, 2016. **7**(25): p. 37773-37789.
124. Semenza, G.L., *HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics*. Trends Mol Med, 2002. **8**(4 Suppl): p. S62-7.
125. Vaupel, P., A. Mayer, and M. Hockel, *Tumor hypoxia and malignant progression*. Methods Enzymol, 2004. **381**: p. 335-54.
126. Graeber, T.G., et al., *Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours*. Nature, 1996. **379**(6560): p. 88-91.
127. Denko, N.C., *Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(9): p. 705-13.
128. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
129. Ohh, M., et al., *Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(7): p. 423-7.
130. van Diest, P.J., M.M. Vleugel, and E. van der Wall, *Expression of HIF-1alpha in human tumours*. J Clin Pathol, 2005. **58**(3): p. 335-6.

131. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
132. Jewell, U.R., et al., *Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous*. FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1312-4.
133. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
134. Trastour, C., et al., *HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome*. Int J Cancer, 2007. **120**(7): p. 1451-8.
135. Semenza, G.L., *Regulation of mammalian O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 551-78.
136. Brennan, P.A., N. Mackenzie, and M. Quintero, *Hypoxia-inducible factor 1alpha in oral cancer*. J Oral Pathol Med, 2005. **34**(7): p. 385-9.
137. Bos, R., et al., *Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(6): p. 1573-81.
138. Ryan, H.E., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth*. Cancer Res, 2000. **60**(15): p. 4010-5.
139. Metzler, P., et al., *MAGE-A as a novel approach in the diagnostic accuracy of oral squamous cell cancer: a case report*. Head Neck Oncol, 2009. **1**: p. 39.
140. Mollaoglu, N., et al., *Prediction of recurrence using exfoliative cytology and melanoma-associated antigen-A mRNA analysis following wide excision of oral squamous cell carcinoma: short report*. Cytopathology, 2011. **22**(6): p. 387-91.
141. Bourne, A.J., *Handbuch I der Immunhistochemischen Färbemethoden*. DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, 2000. **4**: p. 7-13.
142. Chambost, H., et al., *Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3530-3.
143. Rimoldi, D., et al., *Anti-MAGE-3 antibody 57B and anti-MAGE-1 antibody 6C1 can be used to study different proteins of the MAGE-A family*. Int J Cancer, 2000. **86**(5): p. 749-51.
144. Landry, C., et al., *Monoclonal antibody 57B stains tumor tissues that express gene MAGE-A4*. Int J Cancer, 2000. **86**(6): p. 835-41.
145. Nelson, P.T., et al., *Cancer/testis (CT) antigens are expressed in fetal ovary*. Cancer Immun, 2007. **7**: p. 1.
146. Jungbluth, A.A., et al., *Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer*. Int J Cancer, 2000. **85**(4): p. 460-5.
147. Scanlan, M.J., A.J. Simpson, and L.J. Old, *The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary*. Cancer Immun, 2004. **4**: p. 1.
148. Boon, M.D., J., *Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice*. 1986, Elsevier Science Publishing Company.
149. Haubitz, I., *Beschreibung statistischer Methoden*. 1995.
150. Gupta, S., et al., *Temporal trends in the incidence and survival of cancers of the upper aerodigestive tract in Ontario and the United States*. Int J Cancer, 2009. **125**(9): p. 2159-65.
151. Loeffelbein, D.J., et al., *Loco-regional recurrence after surgical treatment of oral squamous cell carcinoma: Proposals for follow-up imaging based on literature, national guidelines and institutional experience*. J Craniomaxillofac Surg, 2015. **43**(8): p. 1546-52.
152. Bachar, G., et al., *Outcome of oral tongue squamous cell carcinoma in patients with and without known risk factors*. Oral Oncol, 2011. **47**(1): p. 45-50.

153. Vikram, B., et al., *Failure in the neck following multimodality treatment for advanced head and neck cancer*. *Head Neck Surg*, 1984. **6**(3): p. 724-9.
154. Day, G.L. and W.J. Blot, *Second primary tumors in patients with oral cancer*. *Cancer*, 1992. **70**(1): p. 14-9.
155. Ries, J., et al., *Detection of MAGE-A expression predicts malignant transformation of oral leukoplakia*. *Cancer Invest*, 2012. **30**(7): p. 495-502.
156. Krauss, E., et al., *MAGE-A antigens in lesions of the oral mucosa*. *Clin Oral Investig*, 2011. **15**(3): p. 315-20.
157. Khammissa, R.A., et al., *Oral squamous cell carcinoma in a South African sample: Race/ethnicity, age, gender, and degree of histopathological differentiation*. *J Cancer Res Ther*, 2014. **10**(4): p. 908-14.
158. Brisam, M., et al., *Expression of MAGE-A1-A12 subgroups in the invasive tumor front and tumor center in oral squamous cell carcinoma*. *Oncol Rep*, 2016. **35**(4): p. 1979-86.
159. Pastorcic-Grgic, M., et al., *Prognostic value of MAGE-A and NY-ESO-1 expression in pharyngeal cancer*. *Head Neck*, 2010. **32**(9): p. 1178-84.
160. Ries, J., et al., *Expression of melanoma-associated antigens in oral squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2008. **37**(2): p. 88-93.
161. Ries, J., et al., *A novel multiple-marker method for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma*. *Dis Markers*, 2009. **27**(2): p. 75-84.
162. Schrijvers, M.L., et al., *Overexpression of intrinsic hypoxia markers HIF1alpha and CA-IX predict for local recurrence in stage T1-T2 glottic laryngeal carcinoma treated with radiotherapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008. **72**(1): p. 161-9.
163. Moeller, B.J., R.A. Richardson, and M.W. Dewhirst, *Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(2): p. 241-8.
164. Scardina, G.A., et al., *Angiogenesis in oral lichen planus: an in vivo and immunohistological evaluation*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2011. **59**(6): p. 457-62.
165. Ding, M., J.Y. Xu, and Y. Fan, *Altered expression of mRNA for HIF-1alpha and its target genes RTP801 and VEGF in patients with oral lichen planus*. *Oral Dis*, 2010. **16**(3): p. 299-304.
166. de Carvalho Fraga, C.A., et al., *High HIF-1alpha expression genotypes in oral lichen planus*. *Clin Oral Investig*, 2013. **17**(9): p. 2011-5.
167. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 883-99.
168. Sumbayev, V.V., *LPS-induced Toll-like receptor 4 signalling triggers cross-talk of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and HIF-1alpha protein*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(2): p. 319-26.
169. Liang, X., et al., *Hypoxia inducible factor-alpha expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma*. *Anticancer Res*, 2008. **28**(3A): p. 1659-66.
170. Liu, S.Y., et al., *Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma*. *Oral Oncol*, 2008. **44**(3): p. 277-85.
171. Fillies, T., et al., *HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor*. *BMC Cancer*, 2005. **5**: p. 84.
172. Golz, L., et al., *Genome-wide transcriptome induced by Porphyromonas gingivalis LPS supports the notion of host-derived periodontal destruction and its association with systemic diseases*. *Innate Immun*, 2016. **22**(1): p. 72-84.

173. Golz, L., et al., *Hypoxia and P. gingivalis synergistically induce HIF-1 and NF-kappaB activation in PDL cells and periodontal diseases*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 438085.
174. Golz, L., et al., *LPS from P. gingivalis and hypoxia increases oxidative stress in periodontal ligament fibroblasts and contributes to periodontitis*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 986264.
175. Ng, K.T., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human periodontal tissue*. J Periodontol, 2011. **82**(1): p. 136-41.
176. Afacan, B., et al., *Gingival crevicular fluid and salivary HIF-1alpha, VEGF, and TNF-alpha levels in periodontal health and disease*. J Periodontol, 2018.
177. Klanrit, P., et al., *DNA ploidy in proliferative verrucous leukoplakia*. Oral Oncol, 2007. **43**(3): p. 310-6.
178. Remmerbach, T.W., A. Hemprich, and A. Bocking, *[Minimally invasive brush-biopsy: innovative method for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma]*. Schweiz Monatsschr Zahnmed, 2007. **117**(9): p. 926-40.
179. A, H.A., O. Kujan, and C.S. Farah, *The utility of oral brush cytology in the early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: A systematic review*. J Oral Pathol Med, 2018. **47**(2): p. 104-116.
180. Fleskens, S. and P. Slootweg, *Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility*. Head Neck Oncol, 2009. **1**: p. 11.
181. Karabulut, A., et al., *Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions*. J Oral Pathol Med, 1995. **24**(5): p. 198-200.
182. Warnakulasuriya, S., et al., *An appraisal of oral cancer and pre-cancer screening programmes in Europe: a systematic review*. J Oral Pathol Med, 2015. **44**(8): p. 559-70.
183. Fischer, D.J., et al., *Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral pre-malignant and malignant lesions*. J Oral Pathol Med, 2004. **33**(2): p. 65-70.
184. Driemel, O., et al., *[Performance of conventional oral brush biopsies]*. HNO, 2008. **56**(2): p. 205-10.
185. Hohlweg-Majert, B., et al., *Sensitivity and specificity of oral brush biopsy*. Cancer Invest, 2009. **27**(3): p. 293-7.
186. Lee, K.D., et al., *Expression of the MAGE-1, -2, -3, -4, and -6 genes in non-squamous cell carcinoma lesions of the head and neck*. Acta Otolaryngol, 1996. **116**(4): p. 633-9.
187. van den Broek, G.B., et al., *Genetic abnormalities associated with chemoradiation resistance of head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4386-91.
188. Kufer, P., et al., *Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease*. Cancer Res, 2002. **62**(1): p. 251-61.
189. Kocher, T., et al., *Prognostic relevance of MAGE-A4 tumor antigen expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a tissue microarray study*. Int J Cancer, 2002. **100**(6): p. 702-5.
190. Aebbersold, D.M., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(7): p. 2911-6.
191. Ellis, L.M. and I.J. Fidler, *Angiogenesis and metastasis*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(14): p. 2451-60.
192. Kang, F.W., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression indicates poor clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma*. Exp Ther Med, 2013. **5**(1): p. 112-118.

193. Muller-Richter, U.D., et al., *Analysis of expression profiles of MAGE-A antigens in oral squamous cell carcinoma cell lines*. Head Face Med, 2009. **5**: p. 10.
194. Montoro, J.R., et al., *Expression of cancer-testis antigens MAGE-A4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2012. **34**(8): p. 1123-8.
195. Hwa, J.S., et al., *The prognostic value of immunohistochemical markers for oral tongue squamous cell carcinoma*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2015. **272**(10): p. 2953-9.
196. Warnakulasuriya, S., G. Sutherland, and C. Scully, *Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence*. Oral Oncol, 2005. **41**(3): p. 244-60.
197. Johnson, N.W. and C.A. Bain, *Tobacco and oral disease. EU-Working Group on Tobacco and Oral Health*. Br Dent J, 2000. **189**(4): p. 200-6.
198. Gupta, P.C., et al., *Effect of cessation of tobacco use on the incidence of oral mucosal lesions in a 10-yr follow-up study of 12,212 users*. Oral Dis, 1995. **1**(1): p. 54-8.
199. Radoj, L., et al., *Tobacco smoking, alcohol drinking and risk of oral cavity cancer by subsite: results of a French population-based case-control study, the ICARE study*. Eur J Cancer Prev, 2013. **22**(3): p. 268-76.
200. Johnson, N., *Tobacco use and oral cancer: a global perspective*. J Dent Educ, 2001. **65**(4): p. 328-39.
201. Bhutani, M., et al., *Frequent expression of MAGE1 tumor antigens in bronchial epithelium of smokers without lung cancer*. Exp Ther Med, 2011. **2**(1): p. 137-142.
202. Dunkel, J., et al., *Prognostic markers in stage I oral cavity squamous cell carcinoma*. Laryngoscope, 2013. **123**(10): p. 2435-41.
203. Baric, J.M., et al., *Influence of cigarette, pipe, and cigar smoking, removable partial dentures, and age on oral leukoplakia*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1982. **54**(4): p. 424-9.
204. Neumann-Jensen, B., P. Holmstrup, and J.J. Pindborg, *Smoking habits of 611 patients with oral lichen planus*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1977. **43**(3): p. 410-5.
205. Pindborg, J.J., et al., *Prevalence of oral lichen planus among 7639 Indian villagers in Kerala, South India*. Acta Derm Venereol, 1972. **52**(3): p. 216-20.
206. Gorsky, M., et al., *Smoking habits among patients diagnosed with oral lichen planus*. Tob Induc Dis, 2004. **2**(2): p. 103-8.
207. Wang, X., et al., *The role of cigarette smoking and alcohol consumption in the differentiation of oral squamous cell carcinoma for the males in China*. J Cancer Res Ther, 2015. **11**(1): p. 141-5.
208. Macey, R., et al., *Diagnostic tests for oral cancer and potentially malignant disorders in patients presenting with clinically evident lesions*. Cochrane Database Syst Rev, 2015(5): p. CD010276.
209. Hartmann, S., et al., *Oral brush biopsy and melanoma-associated antigens A (MAGE-A) staining in clinically suspicious lesions*. J Craniomaxillofac Surg, 2015. **43**(10): p. 2214-8.

7 Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolavulänsäure
B	Regressionsparameter
BSA	bovines Serumalbumin
CI	Konfidenzintervall
DAB	3,3 Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1	Hypoxia-inducible-Factor-1
HRP	Horseradish Peroxidase
HPV	Humanes Papilloma Virus
ICD	International Classification of Diseases and Related Health Problems
KI	Konfidenzintervall
LSAB	Labeled Streptavidin-Biotin
M	molare Masse, Quotient aus Masse m und der Stoffmenge n
MW	Mittelwert
MAGE-A	Melanomassoziierte Antigene A
MKG	Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
MSH	Mundschleimhaut
MW	Mittelwert
n	Probandenzahl

npw	negativer Vorhersagewert
ppw	positiver Vorhersagewert
ODD-D	oxygen dependent degradation domain
OLP	oralen Lichen ruber
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECA	PlattenepithelkarzinomRKI Robert-Koch-Institut
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SKIP	SKI- interacting Protein
ST	Standardabweichung
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	Tris Buffered Saline
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
pfy	p aus dem exakten Test nach Fisher und Yates
pkw	p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis
pmp	p aus dem exakten Test nach Mehta und Patel
pU	p aus dem U-Test nach Mann und Whitney
py	Packyears
str β	Regressionskoeffizient β

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Übersicht über orale Vorläuferläsionen und Carcinoma in situ, dargestellt sind Präkanzerose Läsionen bzw. Konditionen und deren Untergruppen.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der indirekten 3-Schritt-Methode/ Labeled Streptavidin Biotin (LSAB)- Methode, mit Darstellung der Zelle, des Primär- und Sekundärantikörpers, sowie des Streptavidin- Horseradish-Komplex.....	22
Abbildung 3: Alter nach Diagnosen – graphische Darstellung via Boxplot- Verteilung des Patientenalters innerhalb der einzelnen Probandengruppen. Die Boxen stellen das 68%-KI der Patienten dar. Die Linie in der Box stellt den Median dar und die Whiskers die Spanne-Die Probandengröße der entsprechenden Gruppen ist mit n angegeben; die Gesamtprobandengruppe ist n = 72 Um die Altersunterschiede besser darzustellen werden Mittelwert und Median angeführt.	39
Abbildung 4: Tumorschnitt eines oralen PECA; HE-Färbung mit positivem histochemischen Nachweis von MAGE-A 1-4,6, 12; Vergrößerung 50-fach	87
Abbildung 5: Tumorschnitt eines oralen PECA; HE-Färbung mit positivem histochemischen Nachweis von MAGE-A 1-4,6 und 12; Vergrößerung 50-fach	87
Abbildung 6: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE-Färbung im immunhistochemischen Nachweis von MAGE- A 1-4, 6, 12, Vergrößerung 100fach	87
Abbildung 7: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE-Färbung im immunhistochemischen Nachweis von MAGE- A	87

Abbildung 8: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE-Färbung im immunhistochemischen Nachweis von MAGE- A 1-4, 6, 12, Vergrößerung 400 fach	88
Abbildung 9: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; Negativkontrolle, Vergrößerung 100 fach	88
Abbildung 10: Tumorschnitt eines oralen PECA; HE-Färbung mit positivem histochemischen Nachweis von HIF-1 α ; Vergrößerung 50 fach	88
Abbildung 11: Tumorschnitt eines oralen PECA; HE-Färbung mit positivem histochemischen Nachweis von HIF-1 α ; Vergrößerung 100 fach	88
Abbildung 12: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE-Färbung mit immunhistochemischen Nachweis von HIF-1 α ; Vergrößerung 50 fach.....	88
Abbildung 13: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE-Färbung mit immunhistochemischen Nachweis von HIF-1 α ; Vergrößerung 200 fach.....	88
Abbildung 14: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE Färbung mit immunhistochemischen von HIF-1 α , Vergrößerung 200fach.	89
Abbildung 15: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE Färbung mit immunhistochemischen Nachweis von HIF-1 α , Vergrößerung 400fach.....	89

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kriterien einer Zelldysplasie; Zytologische Veränderungen in der Zellmorphologie und der Architektur des Epithels [66]. Linke Spalte: Veränderungen der Zellmorphologie; rechte Spalte: Veränderungen der Architektur des Epithels.....	8
Tabelle 2:	Gruppeneinteilung der Studie nach Diagnose, Geschlecht und Alter. Dargestellt sind Anzahl der Probanden nach Geschlecht und Durchschnittsalter in Relation zur Diagnose n=72.....	18
Tabelle 3:	Tabellarisches Färbeprotokoll; Tabellarisches Färbeprotokoll mit nummerischen Ablauf (1-16). Mit Darstellung der Vorgänge, Chemikalien und Dauer der einzelnen Schritte (nach DAKO Cytomation Inc.; California USA).....	25
Tabelle 4:	Anteil der positiven Nachweise am Gesamtkollektiv der Proben (n = 66) für die untersuchten Biomarker (MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α); n = 66; dargestellt sind die Biomarker in Prozent, sowie das 95 %-Konfidenzintervall (KI).....	30
Tabelle 5:	Diagnosen in Bezug auf den Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12; Anzahl und Prozentsatz der n = 66 Patienten bzw. der 44 Erkrankten. Die Prozente beziehen sich auf die Zeile, d.h. auf die Diagnose. Die 3 Patienten mit Dysplasie sind in dieser Gruppe enthalten, ausgewertet wurden nur beurteilbare Proben.....	31
Tabelle 6:	Diagnosen und HIF-1 α ; Anzahl und Prozentsatz der n = 66 Patienten bzw. der 43 Erkrankten. Die Prozente beziehen sich auf die Zeile, d.h. auf die Diagnose. Die 3 Patienten mit Dysplasie sind in dieser Gruppe enthalten.....	32
Tabelle 7:	Positiver und negativer Nachweis der MAGE Subgruppen A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α im direkten Vergleich; Anzahl und	

	Prozentsatz von n = 60 Patienten. Die Procente beziehen sich auf das Ergebnis des MAGE-A 1-4, 6 ,12-Nachweis.	32
Tabelle 8	Sensitivität und Spezifität von MAGE-A 1-4, 6, 12 mit Darstellung der Färbeergergebnisse und positivem Vorhersagewert (ppW) und negativen Vorhersagewert (npW) in Prozent; n = 66, Goldstandard PECA.....	34
Tabelle 9:	Sensitivität und Spezifität von HIF-1 α ; mit Darstellung der Färbeergergebnisse und positiven (ppW) und negativen (npW) Vorhersagewert in Prozent ; n = 66, Goldstandard PECA.....	34
Tabelle 10:	TNM-Klassifikation und UICC Einteilung der PECA-Patienten. Anzahl und prozentualer Anteil der Probanden mit einem oralen Plattenepithelkarzinom, unterteilt nach TNM-Klassifikation und UICC-Stadium. n = 15 ; Primärtumor (pT), regionäre Lymphknotenmetastasen (pN; N), Grading (G), Veneninvasion (V), Lymphgefäßinvasion (L))	36
Tabelle 11:	Zusammenhang zwischen Rauchern und der Tumorklasse bei an einem oralen PECA Erkrankten. Prozentangaben im Vergleich der Probandenanzahl in der gleichen Tumorklasse. Anzahl und Prozentsatz der Patienten mit einem oralen PECA; p-Wert (P); n = 15.....	37
Tabelle 12:	Die Diagnosen des Probandenguts. Dargestellt sind Anzahl, prozentualer Anteil Probanden mit entsprechender Diagnose am Gesamtkollektiv. *Die 3 Patienten mit einer Leukoplakie mit Dysplasie sind in der Probandengruppe Leukoplakie enthalten, n = 72.	38
Tabelle 13:	Alter und Diagnosen; n = 72; dargestellt sind Alter in Jahren und Diagnose der Probandengruppen im Vergleich; Mittelwert (MW), Standardabweichung (ST), Konfidenzintervall (CI), p-Wert (P)	39

Tabelle 14:	Geschlecht und Diagnosen; Dargestellt ist das Geschlecht in Bezug auf die Diagnose der jeweiligen Probandengruppe in Prozent. Anzahl und Prozentsatz der Probanden bzw. Erkrankten, sowie der p-Wert (P). Die Prozente beziehen sich auf das Geschlecht. n = 72.	40
Tabelle 15:	Risikofaktoren Rauchen und Alkoholabusus. Anzahl der Raucher und Probanden mit regelmäßigem Alkoholkonsum. Prozentualer Anteil und 95%-KI der Probanden mit Risikofaktoren, ausgehend von n = 72. Angegeben sind die Probandenzahl in Prozent, sowie das 95 %-Konfidenzintervall (KI).	41
Tabelle 16:	Risikofaktor Rauchen in Abhängigkeit zur Diagnose; Gezeigt werden die Anzahl und der prozentuale Anteil der Raucher und Nichtraucher in Bezug auf die Diagnose. Die Prozente beziehen sich auf die Diagnose. n = 72	41
Tabelle 17:	Biomarker MAGE-A 1-4, 6,12 sowie HIF-1 α in Bezug auf das Alter; dargestellt sind Mittelwert (MW), p-Wert (p_u) und Standardabweichung (ST) der Probanden und dem jeweiligen Antikörpernachweis. jeweils n = 66.....	42
Tabelle 18:	Biomarker MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α in Bezug auf das Geschlecht, dargestellt sind Mittelwert (MW), Standardabweichung (ST), p-Wert (P) der Probanden und dem jeweiligen Antikörpernachweis. jeweils n = 66 Proben mit positiver bzw. negativer Antikörperreaktion. Die Prozente beziehen sich auf das Verhältnis von positiv bzw. negativ getesteten Biomarkern abhängig des Geschlechts.	43
Tabelle 19:	Risikofaktor Rauchen in Bezug auf den positiven bzw. negativen ,Nachweis von MAGE-A 1-4, 6 , 12 und HIF-1 α ; Anzahl und Prozentsatz von jeweils n = 66. Die Prozente beziehen sich auf die Spalte, d.h. auf die Rauchgewohnheit.	44

Tabelle 20:	<i>Packyears</i> in Relation zur positiven bzw. negativen Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12 und HIF-1 α ; dargestellt sind der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (ST), sowie der p-Wert. Die Werte beziehen sich auf die Spalte, d.h. auf die <i>py.</i> ; dargestellt sind nur die rauchenden Probanden aus n = 66.	44
Tabelle 21:	Koeffizienten der prognostischen Variablen von 4 Prädiktoren (Alter, Geschlecht, Risikofaktor Rauchen) auf positiven MAGE-A 1-4, 6, 12 Nachweis. Logistische Regression auf das Kriterium einer MAGE-A 1-4, 6, 12 positiven Färbung. Das Alter wird in Dezennien berücksichtigt. Dargestellt sind der jeweilig gewählte Prädiktor, die Probandenzahl (n), Regressionskoeffizient β (Str(β)), Odds ratio, das 95 %-ige Konfidenzintervall (95 %-KI), und der p-Wert (p(chi)) .n=66	46
Tabelle 22:	Koeffizienten der prognostischen Variablen von 4 Prädiktoren (Alter, Geschlecht und Risikofaktor Rauchen) auf positiven HIF-1 α Nachweis. Logistische Regression auf das Kriterium eines HIF-1 α positiven Nachweis. Das Alter wird in Dezennien berücksichtigt. Dargestellt sind der jeweilig gewählte Prädiktor, die Probandenzahl (n), Regressionskoeffizient β (Str(β)), Odds ratio, das 95 %-ige Konfidenzintervall (95 %- KI) und der p-Wert (p(chi)). n = 66.....	47
Tabelle 23:	Logistische Regression für die Prädiktoren MAGE-A 1-4, 6, 12 und Alter, Geschlecht für das Kriterium PECA; alle 72 Patienten. Alter wird in Dezennien dargestellt. Dargestellt wird der Zusammenhang zwischen einem positiven Nachweis von MAGE-A 1-4,6, 12 dem Alter und Geschlecht. Regressionsfaktor β (Str(β)), Odds atio, 95 5-Konfidenzintervall (95%-KI), p-Wert (P).	48

Tabelle 24:	Logistische Regression für die Prädiktoren HIF-1 α und Alter, Rauchen für das Kriterium PECA; alle 72 Patienten. Alter wird in Dezennien dargestellt. Dargestellt wird der Zusammenhang zwischen einem positiven Nachweis von HIF-1 α dem Alter und Risikofaktor Rauchen. Dargestellt sind Regressionsparameter (B), Regressionskoeffizient (Str(β)), Odds ratio, 95-iges Konfidenzintervall (95 %-KI), p-Wert (p).....	48
Tabelle 25:	Publizierte Studien zur Wertigkeit von Diagnostikmethoden oraler Präkanzerosen und oralen PECAs im Vergleich zu vorliegender Studie.	56
Tabelle 26:	TNM: Klinische Klassifikation -Die TNM-Klassifikation dient der Einteilung (Klassifikation) von malignen Tumoren in Stadien. Die Kategorien des TNM-Systems entsprechen den Buchstaben: T=Tumor, Ausdehnung; N= Fehlen oder Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen; M=Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen, G=Grading.....	85

10 Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht [209]:

Hartmann, S; Kipke, R; Rauthe, S; Mutzbauer, G; Brands, R; Ebhardt, H; Kübler, A; Müller-Richter, U, *Oral brush biopsy and melanoma-associated antigens A (MAGE-A) staining in clinically suspicious lesions*. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 2015, Issue 43 (10), p. 2214-8

11 Anhang

11.1 TNM Klassifikation

Tabelle 26: **TNM: Klinische Klassifikation** -Die TNM-Klassifikation dient der Einteilung (Klassifikation) von malignen Tumoren in Stadien. Die Kategorien des TNM-Systems entsprechen den Buchstaben: T=Tumor, Ausdehnung; N= Fehlen oder Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen; M=Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen, G=Grading.

T-Klassifikation	
T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumor kleiner als 2 cm in der größten Ausdehnung
T2	Tumor 2 und 4 cm in der größten Ausdehnung
T3	Tumor über 4 cm in der größten Ausdehnung
T4a	Tumor durchbricht kortikalen Knochen, infiltriert tiefe Zungenmuskulatur, Kieferhöhle und Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert die tiefe Halsmuskulatur, Proc. Pterygoideus oder die Schädelbasis
N-Klassifikation	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Ipsilateraler Lymphknoten kleiner 3 cm
N2	a ipsilateraler Lymphknoten zwischen 3 und 6 cm b ipsilateraler Lymphknoten unter 6 cm c bilateral, kontralateral unter 6 cm
M-Klassifikation	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
G	Histopathologisches Grading
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	gut differenziert
G2	schlecht differenziert
G3	Undifferenziert
G4	undifferenziert bzw. anaplastisches Gewebe

weitere Klassifikationen	
v	V0/1 keine/ eine Invasion in Venen
l	L0/1 keine/ eine Infiltration in Lymphgefäße
Pn	Pn0/1 keine/eine perineurale Infiltration

11.2 Abbildungen Färbeergebnisse

In den Abbildungen 11 bis 22 sind positive Färbebeispiele für den MAGE-A 1-4, 6 und 12 sowie HIF-1 α Nachweis zu sehen. Diese Bilder wurden im Rahmen vorliegender Arbeit angefertigt. Es werden Tumorschnitte, sowie Zellen aus Bürstenbiopsaten gezeigt

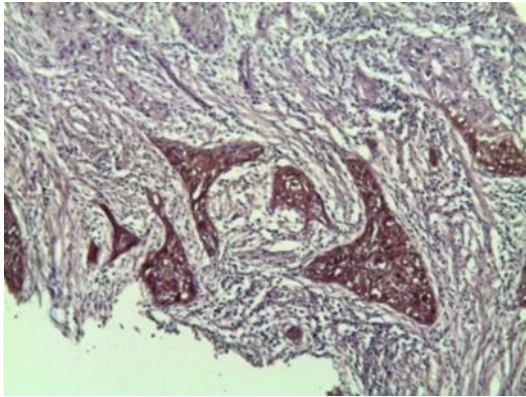


Abbildung 4: Tumorschnitt eines oralen PECA; HE-Färbung mit positivem immunhistochemischen Nachweis von MAGE-A 1-4, 6, 12; Vergrößerung 50-fach

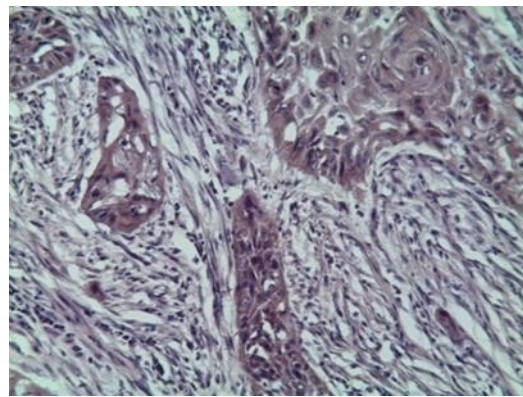


Abbildung 5: Tumorschnitt eines oralen PECA; HE-Färbung mit positivem immunhistochemischen Nachweis von MAGE-A 1-4, 6 und 12; Vergrößerung 50-fach

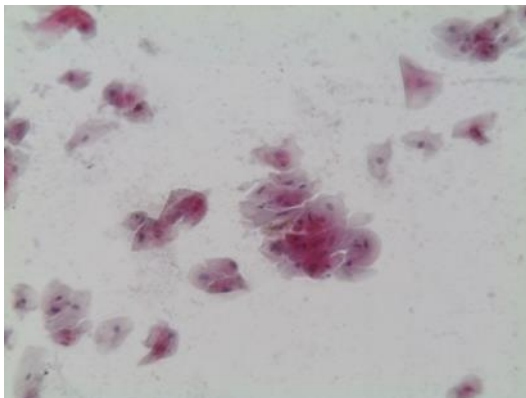


Abbildung 6: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE-Färbung im immunhistochemischen Nachweis von MAGE- A 1-4, 6, 12, Vergrößerung 100-fach

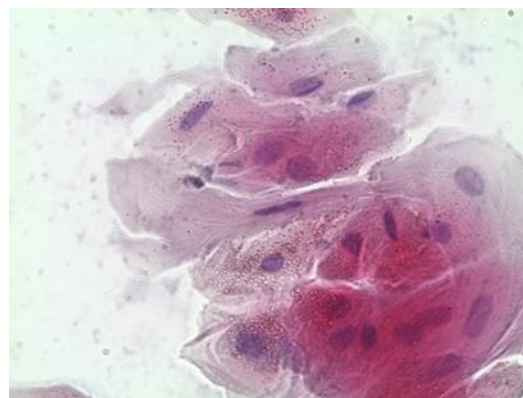


Abbildung 7: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE-Färbung im immunhistochemischen Nachweis von MAGE- A 1-4, 6, 12, Vergrößerung 400-fach

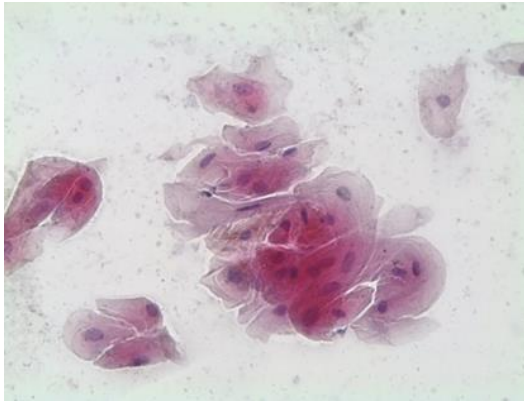


Abbildung 8: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE-Färbung im immunhistochemischen Nachweis von MAGE- A 1-4, 6, 12, Vergrößerung 400- fach

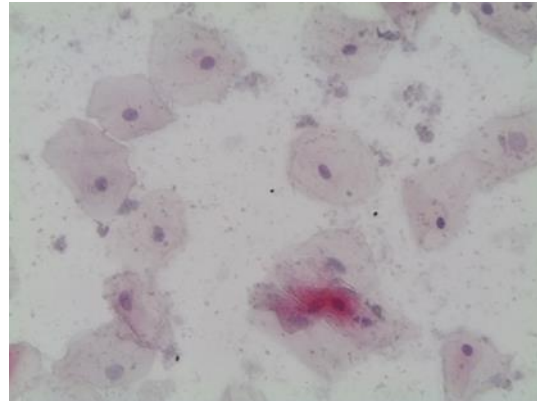


Abbildung 9: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; Negativkontrolle, Vergrößerung 200-fach

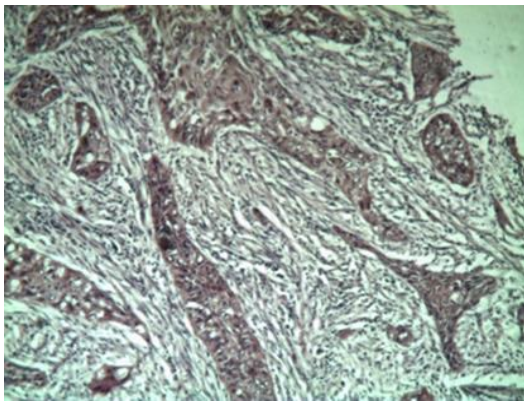


Abbildung 10: Tumorschnitt eines oralen PECA; HE-Färbung mit positivem immunhistochemischen Nachweis von HIF-1α; Vergrößerung 50-fach

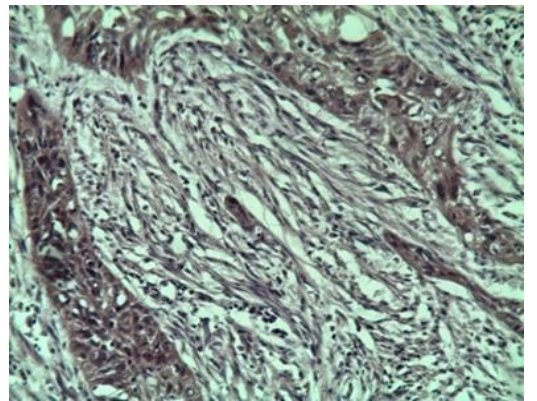


Abbildung 11: Tumorschnitt eines oralen PECA; HE-Färbung mit positivem immunhistochemischen Nachweis von HIF-1α; Vergrößerung 100-fach

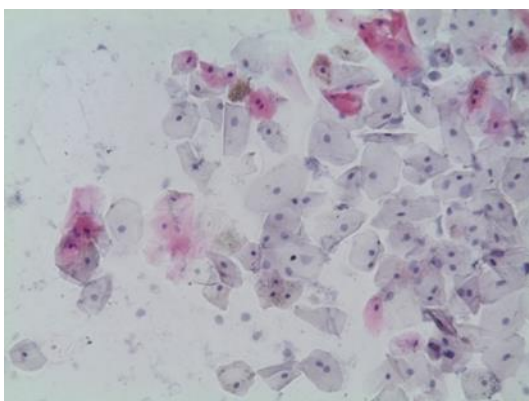


Abbildung 12: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE-Färbung mit immunhistochemischen Nachweis von HIF-1α; Vergrößerung 200-fach

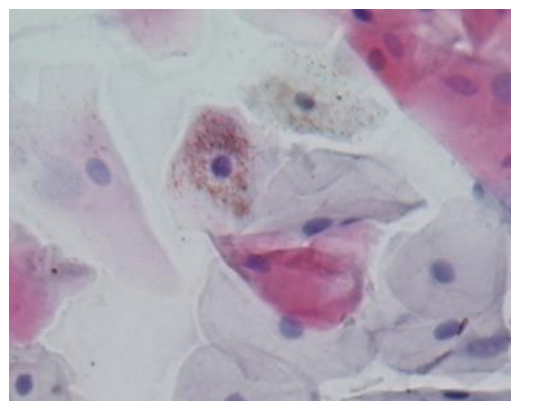


Abbildung 13: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE-Färbung mit immunhistochemischen Nachweis von HIF-1α; Vergrößerung 400-fach

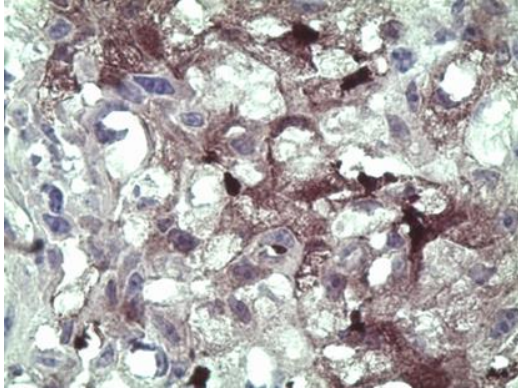


Abbildung 14: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE Färbung mit immunhistochemischen von HIF-1 α , Vergrößerung 200-fach.

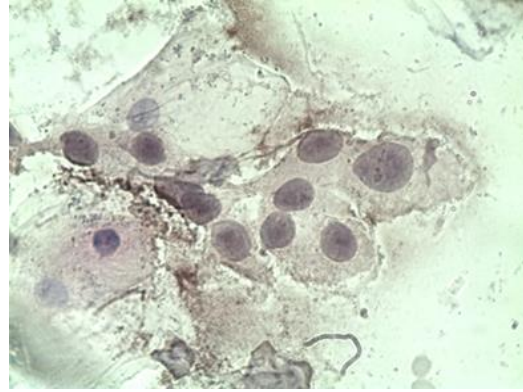


Abbildung 15: Zellen der Mundschleimhaut eines Probanden mit oralen PECA; HE Färbung mit immunhistochemischen Nachweis von HIF-1 α , Vergrößerung 400-fach

11.3 Standardisierter Fragebogen

Standardisierter Fragebogen zur Probenentnahme und Datenevaluation der Probanden:

Klinik und Poliklinik
für Mund-, Kiefer- und
Plastische Gesichtschirurgie



Universitätsklinikum Würzburg



Datum der Probenentnahme _____

Lokalisation der Probenentnahme _____

Art der Probenentnahme/ Probe _____

Probandenkennung _____

Geburtsdatum _____

Anamnese _____

Grunderkrankungen _____

Diagnose Art _____

- Lokalisation _____

Tumorerkrankungen _____

Medikamente _____

Chemotherapie _____

Radiatio - wann? _____
- Lokalisation _____
- Dosis (gy) _____

Alkohol - Art? _____
- Menge pro Tag _____
- Dauer des Konsums _____

Nikotin/ Tabakkonsum (Art?) _____
- Menge pro Tag _____
- Dauer in Jahren _____

Sonstiges _____

Universitätsklinikum Würzburg



12 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler für die Möglichkeit, an seiner Klinik, mein Probandengut zu akquirieren und die vorliegenden Untersuchungen durchzuführen.

Daneben danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Urs Müller-Richter für die Überlassung des Thematik, die Betreuung und Begleitung während der Erstellung dieser Arbeit..

Herr Dr. med. Harald Ebhardt beurteilte die Bürstenbiopsien aus pathologischer Sicht. Frau Dr. Imme Haubitz unterstützte mich im Bereich der statistischen Auswertung. Ihnen beiden gilt mein herzlicher Dank.

Daneben begleitete mich Herr Dr. Axel Seher und Frau Margit Schleyer bei der praktischen Durchführung meiner Experimente. Ihnen vielen Dank.

Mein Dank gilt den Herren Dr. Konstantin Kanofsky und Dr. Peer Kanofsky für die Unterstützung im Bereich des wissenschaftlichen Schreibens, der konstruktiven Kritik und dem Korrekturlesen.

Ein großer Dank an meine Mutter und meine Schwester, welche mich stets bestärkt haben.

In großer Dankbarkeit widme ich diese Arbeit meiner gesamten Familie, welche mich in jeder Hinsicht bedingungslos unterstützt hat. Ohne Ihre Motivation, Zeit, emotionale Stütze, Geduld und Fürsorge wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Abschließend gilt mein besonderer Dank allen Probanden, die an dieser Studie teilgenommen haben.