

**Aus der Klinik und Poliklinik für  
Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. Dr. A. C. Kübler**

**Analysen von Bürstenbiopsien oraler Läsionen  
im Hinblick auf die Expression von GLUT1 und SHH und deren Bedeutung für die Diag-  
nose maligner Transformationen**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Olga Köhler**

**aus Würzburg**

**Würzburg, Dezember 2019**

**Referent:** apl. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Urs Müller-Richter

**Korreferent:** Univ.-Prof. i. R. Dr. med. dent. Ulrich Schlagenhaut

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 22.06.2021

**Die Promovendin ist Zahnärztin**

*Für meine Familie und meine Freunde*

# Inhaltsverzeichnis

## Inhalt

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Hintergründe des oralen Plattenepithelkarzinoms .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie und Bedeutung der Früherkennung des oralen Plattenepithelkarzinoms.....	1
1.1.2 Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms .....	2
1.1.3 Zelluläre Pathogenese .....	4
1.1.4 Ätiologie.....	7
<b>1.2 Orale Präkanzerosen .....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Präkanzeröse Läsionen und präkanzeröse Konditionen .....	9
1.2.2 Leukoplakie .....	10
1.2.3 Orale Lichen planus .....	14
<b>1.3 Diagnostik oraler Läsionen .....</b>	<b>19</b>
1.3.1 Goldstandard .....	19
1.3.2 Transepitheliale Bürstenbiopsie .....	20
<b>1.4 Untersuchte Marker .....</b>	<b>22</b>
1.4.1 GLUT1 .....	22
1.4.2 SHH .....	27
<b>1.5 Fragestellung .....</b>	<b>32</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Studiendesign .....</b>	<b>33</b>
2.1.1 Patientenkollektiv .....	33
2.1.2 Probenentnahme .....	34
2.1.3 Votum der Ethikkommission.....	34
<b>2.2 Geräte und Chemikalien.....</b>	<b>35</b>
2.2.1 Geräte .....	35
2.2.2 Chemikalien .....	35
<b>2.3 Immunzytochemische Analyse .....</b>	<b>37</b>
2.3.1 Methode der Immunzytochemie .....	37
2.3.2 Immunzytochemisches Färbeprotokoll .....	38
2.3.3 Anfertigung und Färbung von Kryoschnitten gesicherter PECA zur Herstellung einer methodischen Positivkontrolle .....	40
2.3.4 Immunhistochemische Färbung der Bürstenbiopsie .....	41
2.3.5 Auswertung.....	42
<b>2.4 Statistische Methoden .....</b>	<b>44</b>
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Patientenkollektiv .....</b>	<b>46</b>
3.1.1 Alter und Geschlecht .....	46
3.1.2 Diagnose .....	47

3.1.3 Risikofaktoren .....	51
3.1.4 Tumorklasse.....	54
<b>3.2 Antikörperfärbung .....</b>	<b>56</b>
3.2.1 Alter, Geschlecht und Antikörper .....	57
3.2.2 Diagnose und Antikörper .....	58
3.2.3 Risikofaktoren und Antikörper .....	60
3.2.4 Tumorklasse und Antikörper .....	61
<b>3.3 Nicht verwertbare Proben.....</b>	<b>62</b>
3.3.1 Alter, Geschlecht und nicht verwertbare Proben .....	62
3.3.2 Diagnose und nicht verwertbare Proben.....	62
3.3.3 Risiken und nicht verwertbare Proben .....	62
3.3.4 Tumorklasse und verwertbare Proben .....	62
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Autoren .....</b>	<b>63</b>
4.1.1 Korrelation des Färbeverhaltens mit der Diagnose .....	63
4.1.2 Korrelation des Färbeverhaltens zum Geschlecht der Patienten .....	72
4.1.3 Korrelation des Färbeverhaltens mit dem Alter der Patienten .....	73
4.1.4 Korrelation des Färbeverhaltens mit den Risikofaktoren des Patienten .....	75
4.1.5 Beurteilung der immunzytochemisch unterstützten Bürstenbiopsie als Früherkennungsmethode .....	76
<b>4.2. Interpretation und Ausblick .....</b>	<b>78</b>
4.2.1 Einsatz der Immunzytochemie mittels GLUT1 und SHH im Sinne einer Früherkennungsmethode .....	78
4.2.2 Therapeutisches Potential von <i>GLUT1</i> und <i>SHH</i> .....	81
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>83</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>85</b>
<b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>95</b>
<b>8. TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>96</b>
<b>9. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</b>	<b>97</b>

CA IX	Carbonic anhydrase 9
CI	Konfidenzintervall
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAB	Diaminobenzidin
DHH	Desert Hedgehog protein
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EPOR	Erythropoietin receptor
GLI	Glioma-associated-oncogene
GLUT1	Glucosetransporter 1
HE	Hämalaun-Eosin
HIF1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter-Faktor-1- $\alpha$
HIP	Hedgehog interacting protein
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IHH	Indian Hedgehog protein
LSAB	Labeled Strep-Avidin-Biotin
MCM	Minichromosome-Maintenance-Proteine
MW	Mittelwert
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer'
NOR	Nucleolus organizer region
PAH	polyzyklische aromatische Wasserstoffe
PBS	Phosphat buffered Saline
$p_c$	p aus dem Chi-Quadrat-Test nach der Maximum-Likelihood-Methode
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death ligand 1
PECA	Plattenepithelkarzinom
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
$p_{fy}$	p aus dem exakten Test nach Fisher und Yates
$p_{kw}$	p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis
$p_{mp}$	p aus dem exakten Test nach Mehta und Patel
PTCHD1	Patched1-receptor
$p_U$	p aus dem U-Test nach Mann und Whitney
Py	PackYears
RKI	Robert-Koch-Institut
SHH	Sonic Hedgehog protein
SMO	Smoothend
ST	Standardabweichung
SUFU	Suppresor of Fused
TBS	Tris buffered Saline
TNF- $\beta$	Tumornekrosefaktor beta
TSNA	tabakspezifische N-Nitrosamine
uPAR	Urokinase-type plasminogen activator receptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

# **1. Einleitung**

## **1.1. Hintergründe des oralen Plattenepithelkarzinoms**

### **1.1.1 Epidemiologie und Bedeutung der Früherkennung des oralen Plattenepithelkarzinoms**

Auf Grundlage von Daten der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland schätzte das Robert-Koch-Institut (RKI), dass im Jahr 2012 deutschlandweit rund 477.950 Menschen neu an Krebs erkrankten. Die Prognose für das Jahr 2016 liegt bei ca. 498.700 Neuerkrankungen [1]. Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens gehören mit 3,7 % bei Männern und 1,6 % bei Frauen zu den häufigsten Malignomen [2]. Unter Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens werden verschiedene Malignome subsumiert, die laut RKI deutschlandweit 2012 etwa 12.940 Neuerkrankungen ausmachten. 90 % hiervon stellen Plattenepithelkarzinome dar [1]. Auch international gehören die Mundhöhlenkarzinome zu den zehn häufigsten bösartigen Neubildungen und werden jährlich für etwa 145.000 Todesfälle verantwortlich gemacht. Die Inzidenz variiert geografisch sehr stark, wobei die höchsten Raten in Frankreich, Pakistan, Indien, Brasilien und Australien zu verzeichnen sind. Gründe für die unterschiedliche geografische Häufigkeit sind in Risikofaktoren wie z.B. Tabak- und Alkoholkonsum, sozioökonomischer Status und Lebensstil zu suchen [3].

Die absolute 5-Jahres Überlebensrate betrug laut RKI in den Jahren 2011-2012 43 % für Männer und 55 % für Frauen [1]. Zu Beginn der 1980er Jahre lagen in Deutschland die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Männer bei 35 % und für Frauen bei 53 % [4]. So stirbt innerhalb dieses Beobachtungszeitraumes immer noch durchschnittlich die Hälfte der erkrankten Patienten. Studien konnten aufzeigen, dass trotz Einführung neuer chirurgischer, strahlen- sowie chemotherapeutischer Therapiemethoden keine deutliche Verbesserung der Überlebensrate zu erkennen ist [5-8]. Es konnte jedoch bewiesen werden, dass der Zeitpunkt der Diagnosestellung, die Prognose beeinflusst und sich wesentlich auf den Erfolg einer möglichen Therapie auswirkt [9-12]. Kleinere Tumore (T1, T2) weisen im Vergleich zu fortgeschrittenen Tumoren (T3, T4) erwartungsgemäß eine günstigere Prognose auf [13]. Frühbefunde (T1, T2) ergeben eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 70 % , während sie für Spätbefunde (T3, T4) auf 43 % absinkt [14]. Früherkennung bleibt also die aussichtsreichste Strategie zur Steigerung der Überlebensrate [15].

### 1.1.2 Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle stellt eine invasive, epitheliale Neoplasie der Mundschleimhaut dar, die sich durch variable Grade an Differenzierung des Plattenepithels und schneller lokoregionäre Lymphknotenmetastasierung auszeichnet. Das Krankheitsbild tritt vorwiegend in der fünften bis sechsten Lebensdekade auf, betrifft häufiger das männliche Geschlecht und ist mit Risikofaktoren wie Tabak und Alkoholkonsum vergesellschaftet [3, 16].

Das klinische Erscheinungsbild variiert zwischen endophytisch ulzerierenden, exophytisch wachsenden und gemischten Formen. Da es oftmals erst in fortgeschrittenen Stadien zu starken Einbußen der Lebensqualität kommt, die den Patienten zum Handeln bewegen, sollte bei der halbjährlichen zahnärztlichen Vorsorgeuntersuchung Mundschleimhautveränderungen besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden, um Plattenepithelkarzinome bereits in frühen Stadien zu diagnostizieren [17].

Das Mundhöhlenkarzinom wird auf Grundlage der TNM-Klassifikation eingeteilt. Neben der Größe (T), dem Lymphknotenstatus (N) und dem Vorliegen von Fernmetastasen (M), wird auch der Differenzierungsgrad (G) berücksichtigt [16, 18].

**Tabelle 1: TNM-System für Mundhöhlen- und Lippenkarzinome [16, 18]**

T	Primärtumor
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumorgröße bis 2 cm Durchmesser
T2	Tumordurchmesser zwischen 2-4cm
T3	Tumor größer als 4 cm in größter Ausdehnung
T4a (Lippe)	Tumor infiltriert die Kortikalis, den N. alveolaris inferior, den Mundboden oder die äußere Haut
T4a (Mundhöhle)	Tumor infiltriert die Kortikalis, tiefer liegende Anteile der Zungenmuskulatur (M. genioglossus, hypoglossus, palatoglossus, styloglossus), die Kieferhöhle und/oder die äußere Haut des Gesichts/Halses
T4b	Tumor infiltriert pterygoide Knochenanteile, Bereiche des M.masseter, die Schädelbasis und/oder umhüllt die A.carotis interna
N	Regionaler Lymphknotenstatus (Cervikale LK) (Lymphknoten der Mittellinie sind als ipsilateral deklariert)
Nx	Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen

N1	Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten, 3cm oder kleiner in größter Ausdehnung
N2a	Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten, 3-max. 6cm in der Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten (nicht größer als 3cm)
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten (nicht größer als 6 cm)
N3	Metastasen in einem Lymphknoten mit Ausdehnung >6cm
M	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Fernmetastasen nachweisbar

**Tabelle 2: Stadieneinteilung von PECAs der Mundhöhle und Lippe laut UICC[16, 18]**

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1,T2 T3	N1 N0,N1	M0
IVa	T1,T2,T3 T4a	N2 N0,N1,N2	M0
IVb	beliebige T T4b	N3 beliebige N	M0
IVc	beliebige T	beliebige N	M1

**Tabelle 3: UICC-Grading-Einteilung der Tumore [18]**

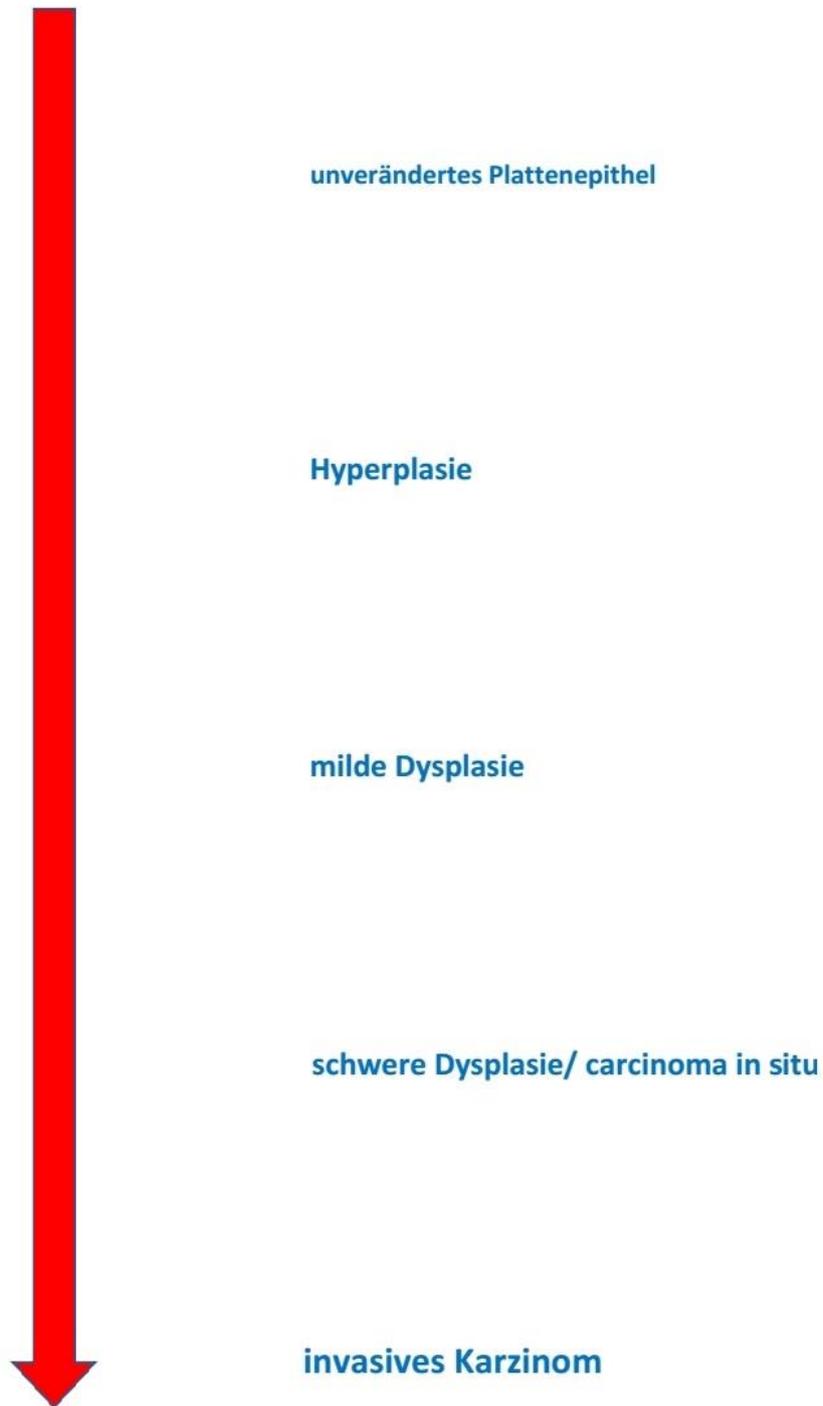
Grad 1 (G1)	Gut differenziertes bösartiges Gewebe (low grade), hohe Übereinstimmung mit Ursprungsgewebe
Grad 2 (G2)	Mäßig differenziertes bösartiges Gewebe
Grad 3 (G3)	Schlecht/niedrig differenziertes bösartiges Gewebe
Grad 4 (G4)	Nicht differenziertes bösartiges Gewebe (undifferenziert, anaplastisch) (high-grade). Der Tumor kann nicht mehr oder nur aufgrund immunhistochemischer Untersuchungen einem bestimmten Ausgangsgewebe zugeordnet werden
Grad X (GX)	Grad der Differenzierung nicht beurteilbar

Der histopathologische Befund spielt bei der Klassifikation eines oralen Plattenepithelkarzinoms eine entscheidende Rolle. Prognose- und therapie relevant ist hier, neben dem TNM-Stadium, auch die Einteilung des Differenzierungsgrades. G1 steht hier für gut, G3 für schlecht differenzierte Tumore. Schlecht differenzierte Tumore befallen häufiger regionale Lymphknoten und führen zu einer reduzierten Überlebensrate. Weitere negative

prognostische Kriterien sind Ausbreitung auf lokoregionäre Lymphbahnen (L), Venen (V) und perineurale Invasion (Pn) [16].

### **1.1.3 Zelluläre Pathogenese**

Bei der Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen [19]. Prinzipiell ist es möglich, dass sich Plattenepithelkarzinome aus klinisch gesund erscheinender Mundschleimhaut bilden. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass ein hoher Anteil aus bereits langfristig bestehenden Vorläuferläsionen hervorgeht [20]. Die Entartungswahrscheinlichkeit wird durch die Histologie und die Dauer des Bestehens der Läsion beeinflusst. Angaben variieren hier deutlich von Studie zu Studie und sind abhängig von der Dauer des Beobachtungszeitraums [21, 22]. Der mehrstufige Prozess der Karzinogenese beinhaltet die Inaktivierung von Tumorsuppressoren und/oder Aktivierung von Proto-Onkogenen [7]. Das zunächst gesund erscheinende Epithel entwickelt sich, über eine histologisch nachweisbare Hyperplasie, zu einer Dysplasie, zu einem *carcinoma in situ* und befällt schließlich benachbartes Gewebe [19]. Gerade in Randbereichen zwischen maligner und benigner Schleimhaut lassen sich diese Epithelveränderungen nachweisen. Rein klinisch beschriebene Läsionen wie z.B. Leukoplakien können also jede der genannten histologischen Zwischenstufe aufweisen [23] und bedürfen einer Abklärung [11].



*Abbildung 1: Histologisch nachweisbare Veränderungen des Plattenepithels während der Karzinogenese*

Die Charakterisierung der Akkumulation molekularer Veränderungen ist Gegenstand aktueller Forschung [24]. Durch experimentelle Studien konnten bereits eine umfangreiche

Menge an Kenntnissen der spezifischen genetischen Alterationen und Mechanismen gesichert werden. Funktionsabweichungen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, sowie eine genetische Disposition stellen eine gemeinsame Komponente der Initiation und Progression oraler Karzinome [25].

Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Telomerase in 90 % der oralen Plattenepithelkarzinome und in prämaligen Läsionen nachweisbar ist [19]. Die Telomerase arbeitet an der Aufrechterhaltung der Telomere und verhindert so den Eintritt in die Ruhephase des Zellzyklus. Bei jeder Zellteilung geht in der Regel ein Stück der Telomere verloren. Wird eine gewisse Telomerlänge erreicht, geht die Zelle in die Ruhephase über und teilt sich nicht mehr. Dies wird durch die Aktivierung der Telomerase verhindert [26].

Nachgewiesen ist weiterhin, dass die Inaktivierung von *p16* (CDK-Inhibitor-2A) ein frühes Ereignis in der Karzinogenese darstellt [7, 19]. Vor allem die daraus resultierende fehlende Hemmung der Proteinkinase CDK4 führt dazu, dass der Übergang G1/S-Phase innerhalb des Zellzyklus behindert wird und die DNA-Synthese ungehindert fortgesetzt werden kann [27].

Weiterhin gilt der Verlust von *9p21*, dem Chromosom, auf dem das *p16*-Tumorsuppressorgen lokalisiert ist, als gemeinsame genetische Aberration [25], die in 70-80 % der oralen Plattenepithelkarzinome zu finden ist und bereits bei 30 % der Hyperplasien nachgewiesen werden kann [7].

Dass weitere Tumorsuppressorgene, wie *FIHT* und *RSSF1A*, durch einen Ausfall des *3p* Chromosoms deaktiviert werden, kann sowohl bei Dysplasien, als auch bei invasiven Karzinomen beobachtet werden [7, 25].

Der Verlust der Heterozygotie von *17p* und *TP53* Punktmutationen sind bei ca. 50 % der Plattenepithelkarzinome zu finden und tauchen erst im späteren Verlauf des Prozesses auf [7]. Das *p53*-Tumorsuppressorgen arretiert bei Mutationen den Zellzyklus und leitet Reparaturversuche ein. Ein Verlust führt zu weiteren Mutationen und genetischer Instabilität [28].

Neben diesen Veränderungen in Tumorsuppressorgenen können auch Proto-Onkogene betroffen sein und zu Onkogenen mutieren. Prominentes Beispiel hierfür ist der epidermal growth factor (EGF) mit dem korrespondierenden Rezeptor EGFR (epidermal growth

factor receptor). Die Bindung des Liganden setzt eine Kaskade in Gang, die Zellproliferation, Apoptose, Metastasierungspotential und Angiogenese reguliert. EGFR-(Über)Expression wurde bei 90 % der Plattenepithelkarzinome nachgewiesen [19].

Des Weiteren spielt die Überexpression von Zellzyklusregulatoren wie *Cyclin D1* eine bedeutende Rolle bei der Progression der Tumorgenese [29]. Diese Amplifikation resultiert in vermehrten Mitoseraten und kann mit erhöhtem Lymphknotenbefall und schlechter Prognose assoziiert werden [7, 29].

Weiterhin sind Karzinomzellen in der Lage die Erkennung durch das Immunsystem zu umgehen und die Anti-Tumor-Immunantwort zu inhibieren. Mechanismen, wie z.B. eine reduzierte T-Lymphozytenaktivität, die Aktivität immunsuppressiver Zellen und zytokinvermittelte Effekt beeinträchtigen die Immunantwort und fördern so den Prozess der Karzinogenese [19]. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass Kontrollpunkte, die eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen einnehmen, als Angriffspunkte genutzt werden können um diesen Prozess zu beeinflussen [30]. So konnte die Blockade der Bindung von PD1 und PD-L1 oder die Blockade von CTLA-4 bereits als vielversprechende Immuntherapien bewertet werden [30-32].

Zahlreiche Arbeitsgruppen erforschen momentan Möglichkeiten, diese und weitere Mechanismen als Angriffspunkt zu nutzen, um diagnostische Möglichkeiten und Therapieoptionen zu verbessern.

#### **1.1.4 Ätiologie**

Die Entdeckung zellulärer Marker soll das Selektieren von Risikopatienten erleichtern und eine bessere prognostische Beurteilung ermöglichen. Aber nicht nur auf molekularer Ebene können Risikopatienten auffindig gemacht werden. Auch traditionelle Risikofaktoren wie z.B. Tabak und Alkoholkonsum sind Indikatoren für mögliche maligne Entartung und ermöglichen Aussagen zur Prognose von Mundschleimhautveränderung.

Der Zusammenhang zwischen chronischem Tabakkonsum und der Entstehung maligner Tumore innerhalb der Mundhöhle konnte bereits in zahlreichen Studien belegt werden [33-36]. Hier konnten für bis zu 90 % der Patienten mit Mundhöhlenkarzinom positive Raucheranamnesen nachgewiesen werden [33]. Zigarren- und Pfeifenrauchen wurden in besonderem Maße mit dem oralen Karzinom in Verbindung gebracht. Auch rauchfreie Formen des Tabakkonsums, stark verbreitet in Asien, Afrika, und Nordamerika, gelten

als karzinogen [3]. Tabakprodukte enthalten 4.800 Inhaltstoffe von denen 66 als Karzinogene ausgewiesen sind [3]. Zu den wichtigsten zählen tabakspezifische N-Nitrosamine (*TSNA*) und polyzyklische aromatische Wasserstoffe (*PAH*) [37, 38].

Auch konnte ein Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und der oralen Karzinogenese aufgezeigt werden. Dieser erklärt sich durch einen genotoxischen Effekt durch die im Alkoholabbau entstehenden Acetaldehyde und einer vermehrten Produktion reaktiver DNA-Produkte [3, 37]. Jedoch scheint dieser Mechanismus noch nicht vollständig geklärt [39]. Entscheidend ist allerdings seine Rolle als Lösungsmittel für andere Kanzerogene und die Permeabilitätssteigerung der oralen Mukosa für *TSNA* und aromatische Kohlenwasserstoffe [33, 40, 41]. Dieser Sachverhalt verdeutlicht den Synergismus zwischen Tabak- und Alkoholkonsum und äußert sich als multiplikativer Effekt [35, 39]. Zudem besteht eine deutliche Dosisabhängigkeit [36]. So erhöht sich das Risiko für die Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms um das 35-fache bei starkem Alkoholkonsum kombiniert mit Tabakkonsum. Im Gegensatz dazu steigt dieses Risiko lediglich um das 4-fache bei alleinigem Tabakgenuss [33].

Mit Alkoholismus einhergehenden Komplikationen wie Maldigestion und Malabsorption können zudem eine Mangelernährung auslösen, welche wiederum den Allgemeinzustand und die Immunabwehr des Betroffenen herabsetzt. Die Bedeutung eines funktionsbereiten Immunsystems liegt in der Beseitigung reaktiver Oxidanzien und freier Radikale, die genetische, epigenetische und metabolische Veränderungen fördern können. Alkohol-, Tabak-, und/oder mangelernährungsbedingte Immunsuppression bewirkt zudem eine verminderte Speichelproduktion und Immunität der oralen Mukosa, eine Reduktion von *CD4*-Helferzellen und eine Abschwächung der *NK*-Zellaktivität [42].

Mangelnde Mundhygiene und Irritationen der Mundschleimhaut, wie z.B. eine chronische Reizung durch scharfkantige Füllungs-, Kronen- oder Prothesenränder, erhöhen ebenfalls das Risiko für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms [43]. Weitere ätiologische Faktoren sind diverse Industriegifte wie z.B. Teerbestandteile und das in asiatischen Ländern beliebte Kauen der Betelnuss [19].

Ebenso können auch chronische Infektionen bei der Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms eine Rolle spielen. Eine Besiedelung mit *Candida albicans* an bereits bestehenden Mundschleimhautveränderungen erhöht das Risiko der malignen Transformation zum oralen Plattenepithelkarzinom [44]. Die Infektion mit dem humanen Papillomavirus

(HPV) zählt ebenfalls zu den bekannten Risikofaktoren. Dieser ist in der Lage, durch den Einbau viraler Proto-Onkogene und Ausschaltung bestimmter Suppressorgene wie z.B. *p53*, einen irreparablen Schaden in der Wirtszelle zu verursachen und so die Karzinogenese zu fördern [45, 46]. Vor allem die HPV-Subtypen *16* und *18* konnten im Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom und in Präkanzerosen nachgewiesen werden, während sie nur selten in gesunder Mundschleimhaut anzutreffen sind [47].

Im Gegensatz dazu belegen zahlreiche Studien, dass eine vermehrte Einnahme von Obst und Gemüse das Krebsrisiko für den oberen digestiven Trakt deutlich reduzieren kann. Orale Antioxidantien und Radikalfänger, wie Vitamin A, E, und C und Carotinoide neutralisieren reaktive Stoffwechselprodukte, greifen in den Entartungsprozess ein und scheinen sogar zu einer Regression von präkanzerösen Läsionen zu führen [19, 37, 41, 48].

## **1.2 Orale Präkanzerosen**

### **1.2.1 Präkanzeröse Läsionen und präkanzeröse Konditionen**

Bei den Mundschleimhautveränderungen, die mit erhöhtem Entartungsrisiko einhergehen, sollten präkanzeröse Läsionen von präkanzerösen Konditionen unterschieden werden [49]. Im Gegensatz zu präkanzerösen Läsionen, die an einer oder mehreren konkreten Stellen der Mundschleimhaut ein erhöhtes Entartungsrisiko zeigen, kann bei der prä-malignen Kondition von einer generellen Entartungsgefahr der Schleimhaut ausgegangen werden [50]. Diese Unterteilung bietet jedoch aktuell Raum für Diskussionen und soll durch den Begriff "*potentially malignant disorders*" ersetzt werden [51-53].

Zu den präkanzerösen Läsionen gehören Leukoplakien, Erythroplakien, Erythroleukoplakien und proliferative verruköse Leukoplakien [51]

Zu den relevanten präkanzerösen Konditionen zählt vor allem der Lichen planus der Mundschleimhaut. Weitere Grunderkrankungen, die mit einem erhöhten Risiko zur Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen in Verbindung gebracht werden, sind der Chronisch-diskoide Lupus erythematoses, das Plummer-Vinson Syndrom bei Eisenmangelanämie, die orale submuköse Fibrose, die Syphilis, die Xeroderma pigmentosum und die Epidermolysis bullosa [51].

Es ist bekannt, dass die Mehrzahl oraler Plattenepithelkarzinome auf dem Boden einer Vorläuferläsion entsteht [54]. Jedoch entwickelt sich auch ein Drittel aller Karzinome aus klinisch gesund erscheinender Schleimhaut [55].

### **1.2.2 Leukoplakie**

Der klinisch geprägte Begriff der Leukoplakie kann laut World Health Organisation (WHO) als weiße, nicht abwischbare Veränderung der Mundschleimhaut definiert werden, die klinisch und pathologisch keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann [56]. Mit regional variierenden Prävalenzen von ca. 0,2-5 % gehört die orale Leukoplakie zu den häufigsten prämaligen Veränderungen der Mundschleimhaut [55, 57]. Männer sind dabei mit 2,3 % häufiger betroffen als Frauen mit 0,9 %. Der Erkrankungsgipfel liegt in der westlichen Welt in der fünften bis sechsten Lebensdekade [55].

Nikotin- und Alkoholkonsum werden auch hier zu den wichtigsten Risikofaktoren gezählt [40].

Mit durchschnittlichen Transformationsraten von 1-2 % für alle Formen der Leukoplakie [53] und malignen Transformationsraten von bis zu 36 % [58] bedarf eine klinisch auftretende Leukoplakie stets einer strengen Beurteilung.

#### **Klinisches Erscheinungsbild**

Generell in allen Mundschleimhautarealen möglich, entstehen orale Leukoplakien vermehrt im Bereich der bukkalen Mundschleimhaut, im Bereich des Mundbodens, an der Mukosa der Alveolarfortsätze, im Zungenrandbereich, am Gaumen und den Lippen [55, 59]. Ihrem klinischen Erscheinungsbild entsprechend, wurden Leukoplakien subgruppiert, um Rückschlüsse auf ihr potentiellies Entartungsrisiko zu ermöglichen [49, 58].

- homogene Leukoplakie (plan, gleichmäßig flach, auch faltig bis wellig, weißlich)
- inhomogene Leukoplakien (unregelmäßig flach, nodulär, exophytisch, weiß, rötlich)
- proliferative verruköse Leukoplakien (ausgedehnt, zunächst homogen dann verrukös)
- idiopathische Leukoplakien (keine ätiologischen Faktoren)



Abbildung 2: Klinisches Erscheinungsbild der Leukoplakie [60] a) homogene Leukoplakie am rechten Zungenrand b) inhomogenen Leukoplakie am planum buccale c) proliferative verruköse Leukoplakie Regio 41-45

Inhomogene und verruköse Formen zeigen im Allgemeinen ein deutlich höheres Entartungsrisiko als homogene [51]. Die meisten oralen Leukoplakien unterliegen keiner Transformation und können sich sogar nach Ausschalten der ätiologischen Faktoren zurückbilden [49]. Je unruhiger das Bild der Schleimhautveränderung, desto höher das Potential zur malignen Entartung. Mischformen und Sonderformen sind möglich und zeigen entsprechend hohes malignes Potential.

#### Erythroplakie

Die Erythroplakie ist eine rötliche Mundschleimhautveränderung, die klinisch und pathologisch keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann. Die Erythroplakie hat im Vergleich zur Leukoplakie ein deutlich erhöhtes Entartungsrisiko [53].

#### Erythroleukoplakie

Die Erythroleukoplakie ist den inhomogenen Leukoplakien zuzuordnen und zeigt ein Nebeneinander von weißlich veränderten Arealen und roten Schleimhautbezirken. Diese kann, wie die Erythroplakie, durch leichte Beschwerden und Brennen der Mundschleimhaut klinisch symptomatisch werden [49].

#### Proliferative verruköse Leukoplakie

Eine weitere Sonderform ist die proliferative verruköse Leukoplakie. Sie gilt als besonders aggressiv und als direkter Vorläufer des verrukösen Karzinoms [50]. Frühen Stadien fehlen Anzeichen und typische Kriterien der Dysplasie sowie Veränderungen der Zellarchitektur und -morphologie [11]. Die Gefahr der Unterschätzung durch fehlende histopa-

thologische Kriterien, die Tendenz zur multifokalen Ausbreitung und die hohe Wahrscheinlichkeit der Transformation von bis zu 74 % [61] bedingen die Empfehlung zu einer chirurgischen Exzision unter histologischer Randkontrolle.

Die vorläufige Diagnose einer oralen Leukoplakie stützt sich also auf den klinischen Befund. Eine Persistenz der Veränderung nach Ausschaltung der bestehenden ätiologischen Risikofaktoren und einem Beobachtungszeitraum von zwei Wochen festigen die Diagnose und machen eine histopathologische Untersuchung unumgänglich [53, 62]. Patienten mit ausgedehnten, suspekten Läsionen sollten im Sinne eines "field mapping" mehrere Proben entnommen werden [53]. So können Differenzialdiagnosen wie z.B. der orale Lichen planus, das Leuködem, die orale Candidiasis, Morsicatio buccarum, lichenoiden Reaktionen, Lupus erythematodes, der weiße Schwammnävus oder die orale Haarleukoplakie ausgeschlossen und ein diagnostisch-therapeutisches Konzept erstellt werden [49].

### **Histologie**

Zur Klassifizierung präkanzeröser Läsionen bedient man sich der Zuordnung innerhalb des Konzepts der intraepithelialen Plattenepithelneoplasien ("squamous intraepithelial neoplasia"/*SIN*) [62]. Diese wird neben der Bezeichnung der Epitheldysplasie nach Kleinsasser und der Ljubljana-Klassifikation verwendet und meist bevorzugt. Die histologische Begutachtung stützt sich hierbei vor allem auf den Grad der Architekturstörung bei erhaltener Basalmembran. Differenziert werden hier unterschiedliche Schweregrade (gering-, mäßig-, hochgradige *SIN*). Weiterhin spielen Plattenepithelarchitektur und zytologische Atypien bei der Beurteilung eine entscheidende Rolle (s. Tabelle 4) [11].

**Tabelle 4: Histologische Kriterien zur Diagnose der Dysplasie [50]**

Merkmale gestörter Plattenepithelarchitektur	Merkmale der zytologischen Atypie
Irreguläre Epithelschichtung	Abnorme Variation der Kerngröße
Verlust der Basalzellpolarität	Abnorme Variation der Kernform
Tropfenförmige Reteleisten	Abnorme Variation der Zellgröße
Steigerung der Mitosezahl	Abnorme Zellform
Vorzeitige Keratinisierung in Einzelzellen (Dyskeratose)	Erhöhte Kern-Plasma-Relation, Hyperchromasie der Kerne
Keratinperlen in den Reteleisten	Atypische Mitosefiguren

Bei der Gegenüberstellung der aktuellen Klassifikationen wird deutlich, dass das Konzept der *SIN* keine Unterscheidung zwischen hochgradiger *SIN* und *Carcinoma in situ* vornimmt (s. Tabelle 5). Diese Nomenklatur erleichtert aufgrund ihrer Reproduzierbarkeit den klinischen Alltag. Die Zusammenfassung von *SIN III* und *Carcinoma in situ* hat den Vorteil, dass Läsionen mit hoher Karzinomwahrscheinlichkeit eine entsprechende Therapieplanung erfahren [11]. Die Verwendung derartiger Graduierungssysteme erlaubt also die Erstellung einer Prognose und eines diagnostisch-therapeutischen Konzepts.

**Tabelle 5: Nomenklatur der präkanzerösen Läsionen [11, 50, 53]**

Epitheldysplasie	Ljubljana-Klassifikation (SIL)	Intraepitheliale Neoplasie (SIN)	Karzinomrisiko der SIN
Epithelhyperplasie	Einfache Hyperplasie		0,9 %
Geringe Epitheldysplasie	Basale/parabasale Hyperplasie	Niedriggradige intraepitheliale Neoplasie SIN I	11 %
Mäßige Epitheldysplasie	Atypische Hyperplasie	Mäßiggradige intraepitheliale Neoplasie SIN II	11 %
Schwere Epitheldysplasie	Atypische Hyperplasie	Hochgradige intraepitheliale Neoplasie SIN III	90 %
Carcinoma in situ	Carcinoma in situ	Hochgradige intraepitheliale Neoplasie SIN III	90 %
Plattenepithelkarzinom	Plattenepithelkarzinom	Plattenepithelkarzinom	

Epitheldysplasie, langes Bestehen der Läsion, Lokalisationen am Zungenrand und am Mundboden, Größe (> 200 mm<sup>2</sup>), weibliches Geschlecht, Läsionen bei Nichtrauchern, Candida-infizierte Läsionen, nachweisbare DNA-Aneuploidie und Läsionen bei Risikopatienten mit bereits aufgetretenen Plattenepithelkarzinomen sind Risikofaktoren, die die Wahrscheinlichkeit der Transformation bestehender Läsionen weiter erhöhen [53, 62].

Da ätiologische Risikofaktoren wie z.B. Alkohol und Nikotinkonsum auf die gesamte Schleimhaut einwirken, sind im Sinne der Feldkanzerisierung mehrere synchrone oder metachrone Veränderungen möglich. So kann eine tumoröse Veränderung inmitten eines Bereichs genetisch veränderten Epithels liegen, welches jedoch morphologisch unauffällig erscheint. Des Weiteren können mehrere derartige Felder im oberen Aerodigestivtrakt des Kopf-Hals-Bereichs vorliegen und einen Zweitumor provozieren [11].

Aufgrund hoher Transformationsraten bestehender Läsionen und dem Auftreten genetisch veränderter Felder ist die Suche nach prädiktiven Markern für die maligne Transformation weit gestreut und Gegenstand aktueller Forschung [58].

### **Therapie**

Die Therapie der Leukoplakie ist abhängig von ihrem vermuteten Entartungspotential und ihrer Form. Initial sollte der Einfluss bestehender Risikofaktoren minimiert werden [49]. Bei inhomogenen Formen und persistierenden homogenen Läsionen ist eine Biopsie unverzichtbar. Fehlen Anzeichen einer Dysplasie, entscheidet die Lokalisation, das Ausmaß und der Allgemeinzustand des Patienten über eine chirurgische Weiterbehandlung [49]. Zeigt die histopathologische Untersuchung Anzeichen einer Dysplasie, muss eine chirurgische Weiterbehandlung in Betracht gezogen werden. Läsionen mit mittelgradiger bis schwerer Dysplasie erlauben dabei keinerlei Beobachtungsstrategien [62].

Alternativen zur konventionellen chirurgischen Entfernung bieten hier der Einsatz von Lasern und die Kryochirurgie [58]. Die fehlende histopathologische Kontrolle ist hierbei als Nachteil zu werten. Eine photodynamische Therapie wie auch eine systemische Gabe von Retinoiden und Betakarotin, Bleomycin, Calcipotriol sind denkbar, jedoch aufgrund der Nebenwirkungen und der hohen Rezidivrate als problematisch zu bewerten [49].

Unverzichtbar bleibt ein lebenslanges *Follow-up*, das bei nicht-dysplastischen Läsionen alle sechs bis zwölf Monate, bei dysplastischen alle drei bis sechs Monate durchgeführt werden sollte [62].

### **1.2.3 Oraler Lichen planus**

Die orale Form des Lichen ruber, definiert als nicht kontagiöse, entzündlich papulöse Dermatose mit einem chronischen oder subakuten Verlauf, gehört mit einer Prävalenz von 0,1-4 % zu einer der häufigsten Mundschleimhauterkrankungen [53]. Er manifestiert sich häufig in der fünften und sechsten Lebensdekade und betrifft weibliche Patienten doppelt so häufig wie männliche [58, 63]. Neben dem Befall der Schleimhäute findet sich in ca. 15 % der Fälle eine kutane Manifestation wie z.B. an Beugeseiten der Unterarme und Unterschenkel. Hautanhangsgebilde können ebenfalls betroffen sein. Häufigste extraorale Manifestation ist die genitale Mukosa, aber auch ösophageale, laryngeale, nasale, konjunktivale und perianale Manifestationen können auftreten [53, 63, 64].

## Ätiologie und Pathogenese

Ätiologie und Pathogenese des oralen Lichen planus sind bislang nicht vollständig aufgeklärt, scheinen aber auf einer T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktion zu beruhen, bei der eine lokal begrenzte Antigenexpression auf den Basalzellen eine T-Lymphozyten-vermittelte Apoptose dieser Keratinozyten einleitet [58]. Ein eindeutiger Auslöser konnte hierbei bislang nicht definiert werden, wird aber in einer genetischen Komponente vermutet [53]. Die zunächst *CD4+*-T-Helferzell-vermittelte Immunantwort resultiert durch Ausschüttung von Zytokinen wie z.B. *IFN- $\gamma$*  in einer Aktivierung von Makrophagen und *CD8+*-T-Zellen. Zwei kürzlich beschriebene Subpopulationen von T-Helfer-Zellen regulieren dabei das Gleichgewicht der Immunantwort. Die gestörte Balance zwischen diesen Subtypen scheint bei der Pathogenese des oralen Lichen planus eine Rolle zu spielen [65]. Der chronische Verlauf wird mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors *NF- $\kappa$ B* in Zusammenhang gebracht und die Inhibition des *TGF- $\beta$* -Signalwegs resultiert in einer Hyperproliferation der Keratinozyten, was wiederum klinisch als weiße Läsion auffällig wird [63].

Man nimmt an, dass die Antigenexpression der basalen Keratinozyten durch verschiedene Faktoren moduliert werden kann. Zu den wichtigsten Faktoren gehören [53, 63, 66]:

- Medikamente wie nicht-steroidale Antiphlogistika, ACE-Hemmer, Beta-Blocker, Diuretika, Anti-Malaria-Medikamente, orale Hypoglykämika, Penicillamine, Goldsalze, antiretrovirale Medikamente
- Infektionen mit z.B. Hepatitisviren, Herpes simplex Virus, Epstein-Barr-Virus, Humanem Papillomavirus, *Helicobacter pylori*
- mechanische Traumata (*Köbner-Phänomen*)
- genetische Prädisposition
- psychischer Stress
- Graft-versus-Host-Reaktionen
- Überempfindlichkeitsreaktion auf dentale Werkstoffe wie Amalgam, verschiedene Metalle und Komposite

Die hier genannten Faktoren gelten ebenso als Auslöser einer lichenoiden Reaktion, die als Variante des oralen Lichen planus verstanden werden kann. Klinisch und histopathologisch nicht vom Lichen planus unterscheidbar, kann der lichenoiden Reaktion ein ätiologischer Faktor z.B. Amalgam zugeordnet werden. Der Nachweis einer Überempfindlichkeitsreaktion mittels Patch-Test oder eine Remission nach Entfernung des Auslösers kann zur Differenzierung beitragen [63].

### **Klinisches Erscheinungsbild**

Der klinische Verlauf ist phasenhaft und unterschiedlich ausgeprägt und befällt meist die bukkale Mukosa, die Zunge, die Gingiva, seltener Lippen oder Gaumen [58, 63]. Bei symptomatischen Verläufen können raue Missempfindungen, Sensibilität gegenüber scharfen Speisen, Mundschleimhautbrennen und starke Schmerzen auftreten. Asymptomatische Veränderungen sind häufiger [53] und werden meist erst als Zufallsbefund während einer zahnärztlichen Routineuntersuchung entdeckt. Mukosale Läsionen treten oft bilateral oder symmetrisch auf [67]. Das klinische Erscheinungsbild kann unterschiedlichen Formen zugeordnet werden [53, 64].

- retikulär
- papulär
- plaqueartig
- erythematös
- ulzerierend
- atrophisch
- bullös

Mischformen sind möglich [67]. Am häufigsten ist der retikuläre Typ, der vor allem an der bukkalen Mukosa und im Vestibulum auftritt und durch eine netzartige weiße Streifung (*Wickham'sche Streifung*) imponiert [63]. Dieser bleibt häufig asymptomatisch [58]. Auch die plaqueartige Form des oralen Lichen planus bleibt häufig symptomarm. Sie ähnelt klinisch dem Bild der Leukoplakie, zeigt aber in der Peripherie flächenhafte Plaques mit Wickhamscher Streifung [67]. Seltener und meist akut verlaufend zeigt sich das papuläre Erscheinungsbild. Gekennzeichnet durch das Auftreten von kleinen weißen Papeln und der Wickhamschen Streifung in den Randbereichen geht die papuläre Form

häufig in andere Formen des oralen Lichen planus über [58]. Bei einem erosiven Lichen planus finden sich fibrinös belegte Ulzera auf einer erythematös infiltrierten Schleimhaut [67]. Diese, oft mit Brennen und Schmerzen einhergehende Veränderung ist an der Gingiva propria, als leicht blutendes rötliches Gewebe, nur schwer von einer Gingivitis abgrenzbar [63]. Seltener ist der bullöse Typ, der durch Ödementstehung in der Basalzellschicht verschieden große Blase aufweisen kann. Diese bestehen nicht lange und hinterlassen ulzerativ veränderte Schleimhaut [53]. Eine lang bestehende, entzündliche Veränderung kann in einen atrophischen Lichen planus resultieren und taucht oft kombiniert neben erythematösen und ulzerierenden Arealen auf [65].

Klinische Differentialdiagnosen wie das orale Plattenepithelkarzinom, die chronische Candidiasis, das vernarbende Pemphigoid, der Pemphigus vulgaris, der lupus erythematoses, die Leukoplakie, das erythema multiforme, die hypersensitive Mukositis, die Graft-versus-Host-Reaktionen und natürlich die lichenoiden Reaktionen sind möglich und erschweren eine präzise Diagnose [64].

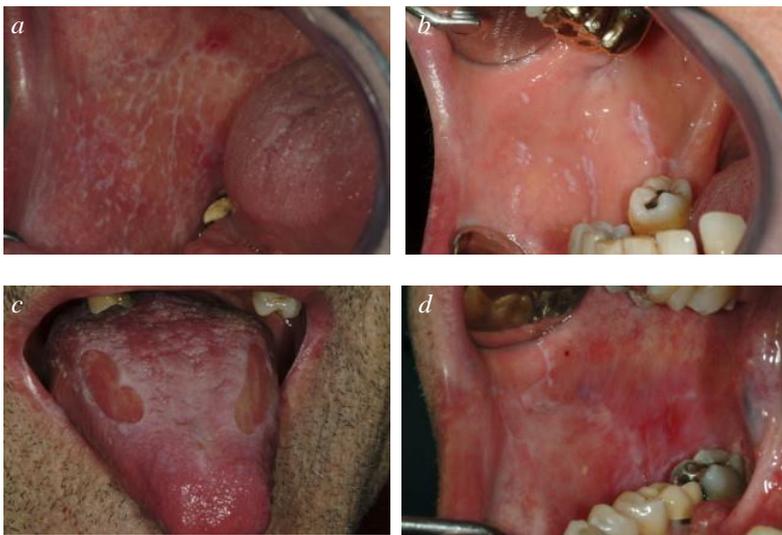


Abbildung 3: Variationen des klinischen Erscheinungsbildes des oralen Lichen planus [63] a) retikulärer Lichen planus, planum buccale b) papulärer Lichen planus, planum buccale c) erosiver Lichen planus, Zungensrand d) atrophischer Lichen planus, planum buccale

### **Histologie**

Trotz der klinischen Morphologie und der häufig charakteristischen Verteilung kann die Diagnose durch das Auftreten von untypischen Manifestationen oder lichenoiden Reaktionen erschwert werden [53]. Auch histologisch fällt eine eindeutige Zuordnung schwer. Eine Hyperkeratose mit verbreitertem stratum spinosum, eine Verflüssigung der Basalzellschicht, eosinophiles subepitheliales Infiltrat aus Lymphozyten, ein Fehlen oder

sägezahnförmiges Aussehen der epithelialen Reteleisten und das Auftreten von Civatte-Körperchen kennzeichnen das Bild des Lichen planus [15, 64, 67]. Diese sind allerdings nicht spezifisch und können auch bei lichenoiden Reaktionen, lupus erythematoses, Graft-versus-Host-Reaktionen und chronischer ulzerativer Stomatitis auftreten [58].

Dieser Sachverhalt macht klar, dass das beschriebene Entartungspotenzial des oralen Lichen planus kontrovers diskutiert werden muss [68]. Nicht nur die Abhängigkeit von der korrekten Diagnosestellung mit ausschlaggebenden Kriterien ist hierbei von Bedeutung. Auch der klinische Typ des Lichen planus scheint ausschlaggebend zu sein [58]. Da der orale Lichen planus trotz Allem, mit angegebenen Transformationsraten von 0,4-5 %, zu den Grunderkrankungen gezählt wird, die mit einem erhöhten Risiko zur Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen in Verbindung gebracht werden [63], ist die Suche nach geeigneten Markern, mit deren Hilfe das Risiko der malignen Transformation abgeschätzt werden kann, Gegenstand aktueller Forschung.

### **Therapie**

Die Elimination mechanischer Irritation, das Beseitigen der Auslöser einer Überempfindlichkeit (Amalgamsanierung, Medikamentenaustausch) sowie Mundhygiene-Instruktionen sollten zu Beginn der Therapie stehen und die Symptomatik lindern [63, 66].

Nicht erosive und asymptomatische Formen des Lichen planus können beobachtet werden und bedürfen keiner Behandlung. Bei symptomatischen und erosiven Formen haben sich topisch anzuwendende Kortikosteroide als effektiv erwiesen. Sie wirken antiinflammatorisch und immunsuppressiv, können aber mit Nebenwirkungen wie z.B. atrophen Schleimhautveränderungen und Candidainfektionen einhergehen, die gegebenenfalls eine zusätzliche Behandlung notwendig machen [69]. In einigen Fällen können systemische Kortikosteroide und andere systemisch wirksame immunsuppressive Medikamente indiziert sein. Diese sollten aber auf Grund der Nebenwirkungen und Risiken nur auf therapierefraktäre und ausgedehnten erosive Formen beschränkt bleiben [66].

Weitere topisch wirksame Substanzen (Cyclosporin, Tacrolimus, Pimecrolimus) oder Retinoide werden ebenfalls eingesetzt, sind aber aufgrund ihrer weniger potenten Wirksamkeit und ihrer enormen Nebenwirkungen nur in sehr seltenen Fällen indiziert oder gar gänzlich obsolet [58, 63].

Alternative Therapiemöglichkeiten bieten Behandlungen mit Psoralen und UV-A-Licht (PUVA), photodynamische Therapie, chirurgische Exzision, Kryochirurgie und CO<sub>2</sub>-Laserchirurgie [66]. Chirurgische Verfahren können zwar in seltenen Fällen indiziert sein, ändern aber nichts an der Grunderkrankung. Gerade atrophische und erosive Formen bedürfen engmaschiger Kontrollen und gegebenenfalls einer Exzision [63].

## **1.3 Diagnostik oraler Läsionen**

### **1.3.1 Goldstandard**

Karzinome der Mundhöhle werden trotz ihrer Zugänglichkeit häufig erst in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien diagnostiziert. Dies liegt zum einen daran, dass Patienten mit entsprechender Symptomatik häufig erst spät vorstellig werden und zum anderen daran, dass Untersucher pathologische Veränderungen fehlinterpretieren [9, 62, 70]. Die Beurteilung oraler Läsionen erfolgt zunächst klinisch durch visuelle und taktile Befundsicherung. Klinische Warnsignale wie Verlust des Oberflächenglanzes und der Oberflächenintegrität, Verhornungstendenz, Erosion und Ulzeration, Inhomogenität, Blasenbildung/Desquamation, Induration, Atrophie, Pigmentierung und Brennen der Mundschleimhaut bedürfen weiterer Abklärung. Zusatzuntersuchungen wie Vitalitätsprobe benachbarter Zähne, Parodontalbefund, Röntgenuntersuchung, Lymphknotenstatus und Sensibilitätsprüfung nervaler Strukturen liefern weitere Hinweise zur Abklärung der Entität. Nach Ausschluss inflammatorischer Ursachen, mechanischer Irritationen und Noxen sollte bei Vorläuferläsionen, die nach zwei Wochen keine Rückbildungstendenz zeigen und sich nicht eindeutig einer definierten Grunderkrankung zuordnen lassen, eine histologische Klärung erfolgen. Goldstandard ist hier eine repräsentative Skalpellbiopsie. Eine vollständige Exzision sollte der Inzisionsbiopsie vorgezogen werden, falls diese nicht ausreichend repräsentativ für die gesamte Läsion ausfallen kann. Komplikationen wie Infektionen, Nachblutung, Schädigung von Nachbarstrukturen und Narbenbildung begründen die geringe Akzeptanz dieser diagnostischen Methode beim Patienten [62, 71, 72]. In ca. 23,9 % der Skalpellbiopsien erhält man hierbei eine negative Diagnose [73]. Dieser Sachverhalt mindert das Vertrauen des Patienten und kann eine Ablehnung der Untersuchungsmethode bei erneutem Verdacht begründen. Des Weiteren zeigen Studien, dass Inzisionsbiopsien zu einer Progression des Tumors führen können [74], was die Forderung nach alternativen non-invasiven Methoden verstärkt.

### **1.3.2 Transepitheliale Bürstenbiopsie**

Eine alternative non-invasive Screeningmethode stellt die transepitheliale Bürstenbiopsie dar [75, 76]. Speziell hierfür entwickelte Bürsten ermöglichen das Ernten von relevanten Zelllagen, in denen die squamöse intraepitheliale Neoplasie ihren Ursprung hat [56]. Hierbei wird die Gefahr der Tumorzellverschleppung [77] durch den Erhalt der Basalmembran minimiert [78]. Weitere Vorteile dieser Methode liegen in der besseren Akzeptanz aufgrund der weniger invasiven Methode und der geringeren Kosten [79]. Dies macht sie vor allem für großflächige Areale und für den Einsatz im *Follow-up* attraktiv [56]. Bedingt durch die Größe der gesamten Mundhöhle, kann die Bürstenbiopsie lediglich für bereits sichtbare Läsionen eingesetzt werden [10]. Die Anwendung der Technik ist zudem vom Untersucher abhängig, weshalb für die Durchführung eine Schulung für die Probenentnahme und ein erfahrener Pathologe empfehlenswert sind [15]. Die Wertigkeit dieser Methode variiert studienabhängig. Verschiedene Autoren beschreiben eine Spezifität von 95,1-99,5 % und eine Sensitivität von 79-97 % und zeigen auf, dass gerade maligne Läsionen nicht immer eindeutig erkannt werden [56]. Die herkömmliche morphologische Beurteilung durch einen Pathologen scheint als Methode unzureichend [73]. Daher sind weitere unterstützende Verfahren, z.B. immunhistochemische Färbungen, zur Steigerung der Wertigkeit notwendig.

### **Computerunterstützten Methoden der Bildanalyse (OralCDx®)**

Bei der automatischen computerunterstützten Bildanalyse werden nach morphologisch-zytologischen Kriterien Zellen selektiert und anschließend dem Pathologen zur Kontrolle angeboten [80]. Der behandelnde Arzt erhält den Befund und eine Empfehlung für das weitere Vorgehen. Unzureichendes Zellmaterial oder das Fehlen von epithelialen Atypien erfordern eine erneute Bürstenbiopsie bzw. eine weitere klinische Kontrolle. Bei atypischen Zellen, einem Dysplasie- oder einem Karzinomverdacht wird eine Skalpellbiopsie angeraten. Die Anzahl unzureichenden Materials liegt bei 2-7 % [80]. Die in Studien beschriebene Sensitivität ist meist hoch und erreicht oft nahezu 100 % [74, 75, 79, 81]. Die Werte für Spezifität werden unterschiedlich hoch, unter anderem aber auch mit kritischen 32 % angegeben [79, 82].

### **DNA Zytometrie**

Dieses etablierte Verfahren zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Vorläuferläsionen bedient sich der DNA-Ploidie, um maligne transformierte Zellen zu

erkennen. Diese zeigen im Gegensatz zu gesunden Zellen einen abweichenden Chromosomensatz (Aneuploidie), welcher durch die Anfärbung der Kern-DNA sichtbar gemacht werden kann [83]. Zellen, die mittels Bürstenbiopsie entnommen wurden, werden mit Feulgenfarbstoff markiert und entsprechend ihrer Lichtabsorption beurteilt. Die Messung der optischen Dichte erfolgt computergestützt am Mikroskop, das mit einer Digitalkamera versehen ist [10]. Unzureichendes Material auf dem Objektträger und die Tatsache, dass nicht alle Tumore aneuploide Chromosomensätze besitzen erschweren die Auswertung und benötigen einen erfahrenen Untersucher [15, 50]. Studien beschreiben eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 100 %, bei nur 0,5 % unzureichendem Probenmaterial auf dem Objektträger [80]. Kritisch beurteilt existieren aber noch sehr wenige Daten für intraepitheliale Neoplasien mit hohem Risiko und andere potentiell maligne Veränderungen, die eine Früherkennung des oralen Plattenepithelkarzinoms beschreiben [80, 83-85].

### **Immunzytochemisch erweiterte Bürstenbiopsie**

Dieses Verfahren stützt sich auf tumortypische Expressionsmuster ausgewählter Proteine, die durch immunzytochemische Anfärbung atypische Zellen detektierbar machen. *Driemel et al.* beschreiben eine Sensitivität von 93-95 % und eine Spezifität von 100 % für dieses Verfahren mit Hilfe des Nachweises von Lamin-5 und hochmolekularem Tenascin-C [10]. Beide Marker werden in malignem Gewebe verstärkt exprimiert und können mittels geeigneter Antikörper auf Bürstenbiopsaten nachgewiesen werden. Weitere bereits untersuchte Marker wie Zytokeratin AE1 und AE3, p53, Minichromosome-Maintenance-Proteine (*MCM*), Nukleolus-Organisator-Regionen (*NOR*), *S100A8*, *S100A9* scheinen vielversprechend, benötigen aber noch weitere klinische Studien um ihre Aussagekraft zu verifizieren [80]. Die Identifikation und Suche nach derartigen Markern kann nicht nur eine gezieltere Prognose ermöglichen, sondern auch zum besseren Verständnis der Karzinogenese beitragen [72].

### **Dünnschichtzytologie**

Diese Methode schafft durch Vereinzelung der geernteten Zellen bessere Beurteilungsmöglichkeiten der Morphologie [86, 87]. Erste Anwendungen zeigen eine Sensitivität von 95,1 % und eine Spezifität von 99,0 %. Nicht beurteilbare Proben lagen aufgrund geringer Zellanzahl bei 8,8 % [60].

## 1.4 Untersuchte Marker

### 1.4.1 GLUT1

Malignes Gewebe zeichnet sich durch eine erhöhte Metabolisierung, einen hohen Bedarf und eine gesteigerte Aufnahme von Glukose aus. Der Transport von Glukose erfolgt über membranständige Transporterproteine (*GLUTs*) und gilt als limitierender Faktor für eine erhöhte Metabolisierungsrate [88].

#### Funktion und Aufbau

*GLUT1* gehört zu einer Familie löslicher Carrierproteine und sichert die energieunabhängige Aufnahme von Glukose entlang eines Konzentrationsgradienten. Codiert von den *SLC2A*-Genen, umfasst die *SLC2A*-Superfamilie 14 verschiedene Proteine [89, 90]. Jedes zeichnet sich durch gewebsspezifische Expression und unterschiedliche Affinität zu Glukose und anderen Hexosen aus [91]. Hinsichtlich ihrer Sequenz und ihrer Substratspezifität lassen sich drei Subfamilien untergliedern. Gruppe I setzt sich zusammen aus *GLUT1-4* und *GLUT 14*. Gruppe II vereint *GLUT5*, *GLUT7*, *GLUT9* und *GLUT11* und Gruppe III fasst *GLUT6*, *GLUT8*, *GLUT10*, *GLUT12* und *HMIT (SLC2A13)* zusammen [88, 89, 91].

**Tabelle 6: SLC2A-Superfamilie (modifiziert nach Mueckler und Thorens) [91]**

Name/ Gen	Hauptsubstrat	Transport *	Gewebsspezifische Expression	In Verbindung stehende Erkrankungen
GLUT1/ SLC2A1	Glukose, Galaktose, Mannose, Glukosamine	F	Erythrozyten, Gehirn, Blut-Hirn-Schranke, Blut-Gewebe-Schranke, Embryonalentwicklung	Paroxysmale belastungsinduzierte Dystonie, GLUT1-Mangelsyndrom
GLUT2/ SLC2A2	Glukose, Galaktose, Fruktose, Mannose, Glukosamine	F	Leber, Langerhans-Inseln, Darm, Niere, Gehirn	Fanconi-Bickel-Syndrom, (Typ 2 Diabetes)
GLUT 3/ SLC2A3	Glukose, Galaktose, Mannose, Xylose	F-	Gehirn, Hoden	
GLUT4/ SLC2A4	Glukose, Glukosamine	F	Muskel, Herz, Fettgewebe	(Typ 2 Diabetes)
GLUT5/ SLC2A5	Fruktose	F	Darm, Niere	

GLUT6/ SLC2A6	Glukose	F	Gehirn, Leukozyten, Milz	
GLUT7/ SLC2A7	Glukose, Fruktose	F	Darm, Hoden Prostata	
GLUT8/ SLC2A8	Glukose, Fruktose, Galaktose	F	Hoden, Gehirn, Nebenniere, Leber, Milz, braunes Fettgewebe, Lunge	
GLUT9/ SLC2A9	Urate, (Glukose, Fruktose)		Niere, Leber, Darm, Plazenta, Lunge, Leukozyten	Hypourikämie
GLUT10/ SLC2A10	Glukose, Galaktose	F	Herz, Lunge, Gehirn, Leber Muskel, Pankreas, Plazenta, Niere	Arterial-Tortuosity-Syndrom
GLUT11/ SLC2A11	Glukose, Fruktose	F	Herz, Muskel	
GLUT12/ SLC2A12	Glukose	F	Herz, Prostata, Muskel, Plazenta	
HMIT/ SLC2A13	Myo-Inositol	C/H+	Gehirn, Fettgewebe	
GLUT14/ SLC2A14		O	Hoden	

C: Cotransporter, F: Erleichterte Diffusion, O: "Orphan Transporter" (Substrate unbekannt)

Vergleichbar ist die Grundstruktur aus zwölf amphiphilen transmembranären Helices, die Lokalisation des Carboxyl- und Amino-Terminus im Zytosol sowie einem intrazellulären Loop zwischen der sechsten und siebten transmembranösen Domäne [88]. Gruppe I und II besitzen zwischen der ersten und zweiten Helix einen extrazellulären Loop, der eine N-glykosidische Bindung ermöglicht. Mitglieder der Gruppe III vereint das Auftreten eines derartigen Loops zwischen der neunten und zehnten Domäne [88]. Trotz zahlreicher Studien ist über den genauen Mechanismus des Transportvorgangs und die dreidimensionale Struktur nur wenig bekannt [92]. Die Anordnung innerhalb der Plasmamembran erlaubt die Bildung einer hydrophilen Pore, die den Transport ermöglicht. Die Bindung von Substraten verursacht Konformationsänderungen, die die Transportaktivität regulieren [93].

Klasse I und Klasse II

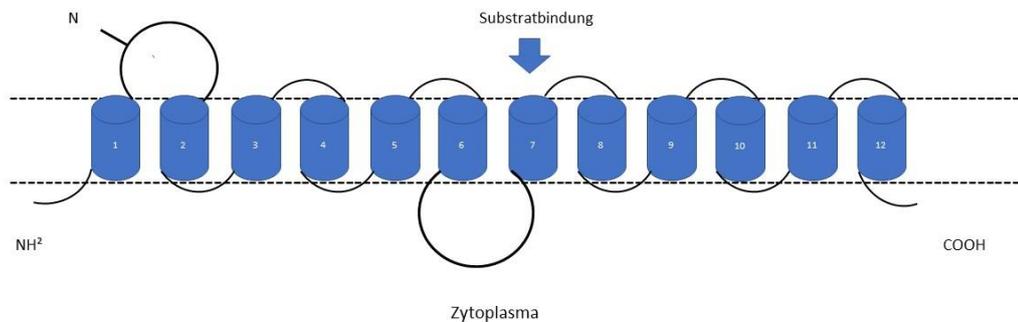


Abbildung 4: Modell der Anordnung von GLUT-1 innerhalb der Zellmembran

Die Tatsache, dass die Affinität für das Substrat außerhalb der Zelle höher zu sein scheint als innerhalb und die experimentelle Beobachtung, dass eine Beschleunigung der Konformationsänderung eintritt, wenn das Substrat auf der zytoplasmatischen Seite präsent ist, geben Anlass, das simple Modell eines asymmetrischen Transports zu diskutieren und lassen die Komplexität des Glukosetransports unter physiologischen Bedingungen vermuten [91, 93].

### **Rolle als Tumorhypoxiemarker und Prognosefaktor**

Um die diagnostischen Möglichkeiten im Bereich der Früherkennung und Therapieoptionen weiter verbessern zu können, haben sich in den vergangenen Jahren zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Analyse der Expression verschiedener Tumormarker beschäftigt. Es fanden sich zahlreiche Marker, deren Expression bezüglich ihrer prognostischen Aussagekraft analysiert wurde. In einer umfassenden Studie teilten *Schliephake et al.* diese Tumormarker in vier Hauptgruppengruppen ein [94]. Um eine Einteilung nach der biologischen Funktion der Tumormarker vornehmen zu können, scheint die Erweiterung um die Gruppe der Hypoxiemarker empfehlenswert. Vertreter wie z.B. der Hypoxie-induzierte Faktor 1 $\alpha$  (*HIF1 $\alpha$* ), die Carboanhydrase IX (*CA IX*), *GLUT1* und der Erythropoetin-Rezeptor (*EPOR*) werden durch hypoxische Bedingungen reguliert und gelten zudem als prognostische Faktoren [95-98]. Gerade die Expression und Coexpression von *HIF1 $\alpha$*  und *GLUT1* wurde häufig mit einer schlechten Prognose des oralen Plattenepithelkarzinoms

in Verbindung gebracht [99, 100]. Hierbei dient das stabilisierte *HIF1 $\alpha$*  als Bote, der die Hypoxieinformation in den Zellkern transportiert und dort die eine Aktivierung von mehr als 100 Genen, darunter auch *GLUT1*, reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass *HIF1 $\alpha$*  einen Komplex bildet, der den *GLUT1*-Promotor bindet [88].

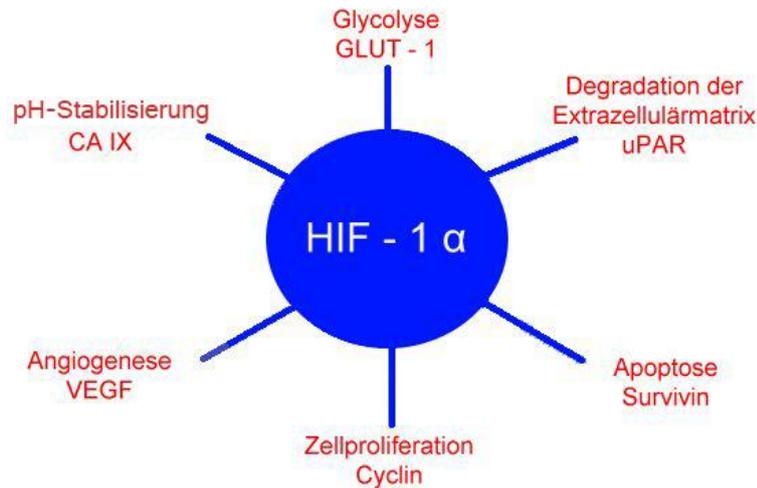


Abbildung 5: *HIF-1-alpha-abhängige Adaption von Tumorzellen an hypoxische Bedingungen*

Neben der Ausbildung eines tumoreigenen Gefäßsystems sichert das Tumorgewebe seine Nutrition also durch gesteigerte Aufnahme von Glukose [101]. Klinisch kann dieser Sachverhalt in vielen Fällen durch Visualisierung der Glukoseaufnahme eines Tumors mittels Injektion von *F-labeled-2fluoro-2-deoxy-D-Glukose* und darauffolgender Positronen-Emissions-Tomographie (*PET*) bestätigt werden [88]. Bereits Warburg stellte fest, dass Tumorzellen sich bezüglich des Glukosestoffwechsels von gesundem Gewebe unterscheiden und schrieb dem gesteigerten Glukosestoffwechsel maligner Zellen eine entscheidende Rolle bei der Nutrition und Progression maligner Erkrankungen zu [102]. Nicht proliferatives Gewebe verwertet die aufgenommene Glukose in einer kompletten Oxidation (38 ATPs) und bedient sich nur bei Hypoxie der vergleichsweise wenig effizienten anaeroben Glykolyse (2 ATPs). Proliferierende Gewebe wie z.B. Tumorgewebe haben andere Bedürfnisse und scheinen sich sowohl bei Hypoxie als auch bei ausreichender Sauerstoffzufuhr auf die anaerobe bzw. aerobe Glykolyse mit einer geringeren Energieausbeute zu konzentrieren (*Warburg Effekt*) [101, 103]. Um den Glukosebedarf der proliferierenden Zellen zu decken, wird dementsprechend eine 20-30mal höhere Aufnahme benötigt [101], die mittels geeigneter Transporter wie *GLUT1* realisiert wird.

## Expression von GLUT1

Unter physiologischen Bedingungen zeigt sich die *GLUT1*-Expression in vielen Zelltypen, oft kombiniert mit anderen *GLUT*-Isoformen. Hierbei scheinen unterschiedliche Expressionslevels für die basale Glukoseaufnahme von Bedeutung zu sein [90, 91]. Ein auffällig hoher Level wurde vor allem bei Erythrozyten und bei Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke gemessen. *GLUT1* spielt weiterhin eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Implantation und Entwicklung. Die hohe Expressionsrate zeigt hierbei vor allem eine Abhängigkeit von hormoneller Steuerung durch Progesteron und ferner auch durch Östrogen. Auch Insulin und Glukokortikoide scheinen während der Entwicklung Einfluss auf die *GLUT1*-Expression zu haben und regulieren diese in Skelettmuskelzellen. Hierbei wird der physiologische Expressionsrückgang im Adulten durch gewebsspezifische Isoformen wie z.B. *GLUT4* in Skelettmuskelzellen kompensiert [93]. Neben der hormonellen Regulation wird die *GLUT1*-Expression, wie bereits beschrieben, auch direkt über die zirkulierende Sauerstoff- und Glukosekonzentration moduliert. Hypoxische Bedingungen führen auf Transkriptionsebene und über Stabilisierung der *mRNA* zu einer gesteigerten Expression und sichern so die Glukoseaufnahme [93]. Weiterhin können Transformationen, die durch Onkogene wie z.B. *ras* und *src* moduliert werden, zum Expressionanstieg beitragen [88]. Zahlreiche Studien belegen ein Auftreten von hypoxischen Bedingungen und Überexpression von *GLUT1* bei malignen Tumoren des Colons, der Lunge, der Schilddrüse, der Brust, des Ösophagus, des Magens, des Pankreas, der Ovarien, der Galle, der Prostata und beim malignen Mesotheliom [88-90, 92]. Auch das orale Plattenepithelkarzinom zeigt eine signifikant erhöhte Expression [104-107]. Diese wird häufig mit der Aggressivität des Tumors, einem verminderten Therapieerfolg und einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht [88, 97, 105, 106]. Bereits bei dysplastischen Mundschleimhautveränderungen kann ein erhöhtes *GLUT1*-Expressionslevel beobachtet werden [108]. Dieser Sachverhalt lässt vermuten, dass diese Überexpression einen fundamentalen und frühen Zeitpunkt innerhalb der Karzinogenese spiegelt. Ebenso zeigen Studien an *HPV* induzierten Transformationen des Cervixepithles, dass eine *GLUT1*-Überexpression ein frühes Event in der Entstehung dort angesiedelter Neoplasien darstellt. Unklar bleibt, ob die, durch Hypoxie hervorgerufenen, metabolischen Veränderungen eine Ursache oder lediglich einen Effekt der malignen Transformation repräsentieren [88].

### 1.4.2 SHH

Der *Hedgehog*-Signalweg gehört zu den essenziellen Elementen der Embryogenese und spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung in der embryonalen Entwicklung. Im adulten Gewebe physiologischerweise inaktiv, wird seine Dysregulation heute mit dem Auftreten unterschiedlicher Malignome in Verbindung gebracht [109].

#### **Aufbau und Funktion**

Erstmals beschrieben und untersucht bei der Fruchtfliege *Drosophila*, nimmt der *Sonic-Hedgehog*-Signalweg entwicklungsgeschichtlich eine sehr frühe Position ein und wurde seitdem konserviert [110]. Das Hedgehog-Signal wird über seinen Rezeptor *Patched1* und die Aktivierung einer Signalkaskade weitergeleitet und gelangt so an Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Unterschiede zu der Regulation bei *Drosophila* finden sich in zusätzlichen Komponenten bei der Signalübertragung aber auch in Komponenten, die entwicklungsgeschichtlich nicht konserviert wurden [111, 112]. Bei Säugetieren wurden bislang drei unterschiedliche Formen des *Hedgehog*-Proteins identifiziert: Sonic- (*SHH*), Indian- (*IHH*) und Desert Hedgehog (*DHH*) [113]. Die Funktion während der Entwicklung scheint sich im Falle von *DHH* auf die Gonaden zu beschränken. *IHH* wird mit der Entwicklung des primitiven Entoderms in Verbindung gebracht und hat Einfluss auf Chondrozyten der Wachstumsfuge. *SHH*, das meist exprimierte Hedgehog-Protein während der Embryogenese, reguliert grundlegende Muster wie die Ausbildung der Rechts-Links-Symmetrie und die dorso-ventrale Achse des Embryos sowie die Entwicklung der Gliedmaßen. Während der Organogenese spielt seine Expression vor allem eine Rolle für die Entwicklung epithelialer Gewebe [111]. Mutationen resultieren in variablen klinischen Erscheinungsformen und Erkrankungen wie z.B. der Holoprosencephalie und Defekte der Gliedmaßen [114]. *SHH* wirkt als Morphogen, das sowohl die Proliferation als auch das Differenzierungsschicksal der Zellen reguliert. Dieser Prozess ist sowohl zeit- als auch positionsabhängig und wird über unterschiedliche Konzentrationen von *SHH* entlang eines Gradienten autokrin und parakrin gesteuert [110]. Die Ausbildung eines solchen Gradienten basiert auf der Modifikation des synthetisierten Proteins und der Möglichkeit zur Bewegung innerhalb eines morphogenetischen Feldes. Der 45 kDa Vorläufer wird autoproteolytisch in *SHH-N* (Aminoterminus) und *SHH-C* (Carboxylterminus) geteilt, wo-

bei *SHH-N* die Signalfunktion übernimmt, während *SHH-C* zur Vermittlung der Autoproteolyse notwendig scheint. *SHH-N* erfährt durch weitere Addition einer Cholesterol- und einer Palmitoyl-Gruppe eine Lipid-Modifikation, die die Sekretion des Proteins und eine Verteilung des Signals über weite Bereiche ermöglicht. Unterstützt wird dieser Vorgang durch *Dispatched*, einem transmembranären Transporter, und durch Heparansulfat-Proteoglykane, die den extrazellulären Transport bewerkstelligen [115].

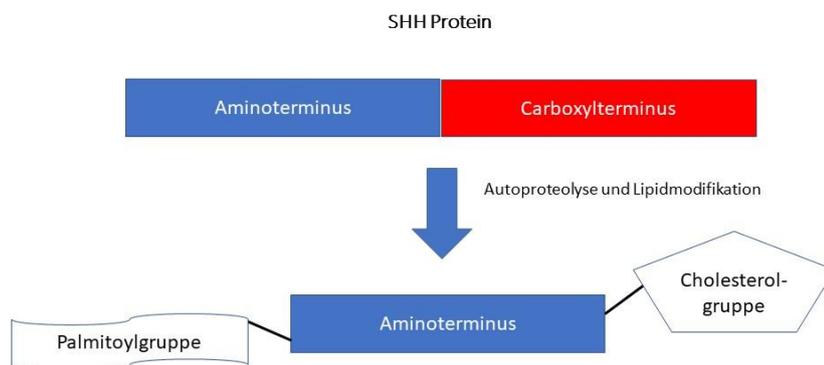


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Lipidmodifikation des SHH-Proteins

Weiterhin existieren Mechanismen, die den Gradienten zusätzlich in Form und Größe regulieren. Die Tatsache, dass eine hohe *SHH*-Konzentration in der Umgebung auch in der Zielzelle eine hohe *SHH*-Expression induziert, erhöht weiterhin die Konzentration nahe der ursprünglichen Quelle. Gedrosselt wird das Signal durch die vermehrte Expression von *Patched1*, die ebenfalls über die *SHH*-Konzentration moduliert wird, und durch das Hedgehog-interacting-Protein (*HIP*), einem transmembranären Protein, welches *SHH* bindet und so die Reichweite des Signals verringert [110, 111].

### Signaltransduktion

An der Zielzelle selbst wird die Bindung von *SHH* mittels transmembranöser Proteine (*Cdo* und *Boc*) erleichtert, deren Expression ebenfalls im Sinne eines negativen Feedbacks reguliert wird [110]. Dies ermöglicht eine Interaktion zwischen *SHH* mit der styrolbindenden Domäne seines Rezeptor *Patched1*, der dieses Signal an die Zelle weiter-

leiten kann. Die Hemmung des Signalwegs beschreibt den Normzustand. Fehlt der Ligand, dann blockiert der Rezeptor Patched1 (*PTCHD1*) den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Smoothed (*SMO*) [116]. Es wird diskutiert, dass Patched1 hierbei indirekt über die Konzentration und Verteilung eines kleinen inhibierenden Moleküls wirkt [115] und dass Vitamin D3 eine mögliche Rolle als *Patched1*-abhängiger Inhibitor spielt [117]. Die unterdrückte Aktivität von *SMO* führt dazu, dass die Signalkaskade nicht aktiviert wird und alle weiteren beteiligten Proteine ebenfalls in ihrer inaktiven Form verbleiben oder endosomal abgebaut werden. Die Anordnung dieser Proteine an primären Zilien erleichtert die Interaktion der Zelle mit der Umgebung und dient als wichtige Empfängerstruktur und Regulator dieses Signalwegs in Vertebraten [118]. Bindet der *Hedgehog*-Ligand den Rezeptor *Patched1*, so wird der nachgeschaltete Rezeptor *SMO* am primären Zilium eingebaut und aktiviert [117]. *SMO* sendet das Signal an die *Hedgehog*-Effektoren, einem zytosolischen Komplex von Proteinen und Proteinkinasen, die schließlich das Signal an Transkriptionsfaktoren weiterleiten. Dieser Proteinkomplex besteht bei *Drosophila* aus verschiedenen Komponenten wie *Costal2* (*Cos2*), der Serin-Threonin-Kinase *Fused*, dem *Suppressor of Fused* und dem Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *cubitus interruptus*. Die Aktivität von *Ci*, einem Mitglied der *GLI*-Familie, ist abhängig von der Phosphorylierung durch Proteinkinase A, Glykogensynthase-Kinase  $3\beta$  und Caseinkinase  $1\alpha$  (*CK1 $\alpha$* ) [113]. Bei Abwesenheit von *SHH* verhindert *Cos2* die Translokation von *Ci* in den Zellkern und *Ci* bildet aufgrund der Hyperphosphorylierung durch diese drei Kinasen und der daraus resultierenden Modifikation die repressive Form des Transkriptionsfaktors aus [111]. Obwohl dieser Signaltransduktionsweg entwicklungsgeschichtlich konserviert wurde, vermutet man bei Säugetieren eine andere Gewichtung der Funktion einzelner Komponenten und andere Mechanismen der Signalverarbeitung. Im Gegensatz zu *Drosophila* besitzen Säuger drei verschiedene *GLI*-Familienmitglieder, die als Transkriptionsfaktor wirken. Diese modulieren die Expression bestimmter Zielgene, die den Zellzyklus, die Zellmigration, die Apoptose und Angiogenese regulieren [119]. *GLI2* und *GLI3* können dabei je nach Anwesenheit von *SHH* eine aktivierende aber auch eine repressive Wirkung entfalten. *GLI1* dient ausschließlich als Aktivator und wird bei Anwesenheit von *SHH* vermehrt transkribiert, wodurch das Signal im Sinne einer positiven Rückkopplung verstärkt wird [110]. Weiterhin nehmen der *SMO*-regulierte Proteinkomplex und die Lokalisation am primären Zilium, eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion der Vertebraten

ein. Nach der Phosphorylierung durch die *CK1α* und die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-kinase 2 (*GRK2*) wird die Translokation von *SMO* am Zilium eingeleitet und mit Hilfe von  $\beta$ -*Arrestin* und *Kif3a* bewerkstelligt. Das aktivierte *SMO* begünstigt danach mit Hilfe von *Kif7* die Translokation und Dissoziation eines *SUFU-GLI*-Protein-Komplexes und ermöglicht *GLI* so den Weg in den Zellkern [119].

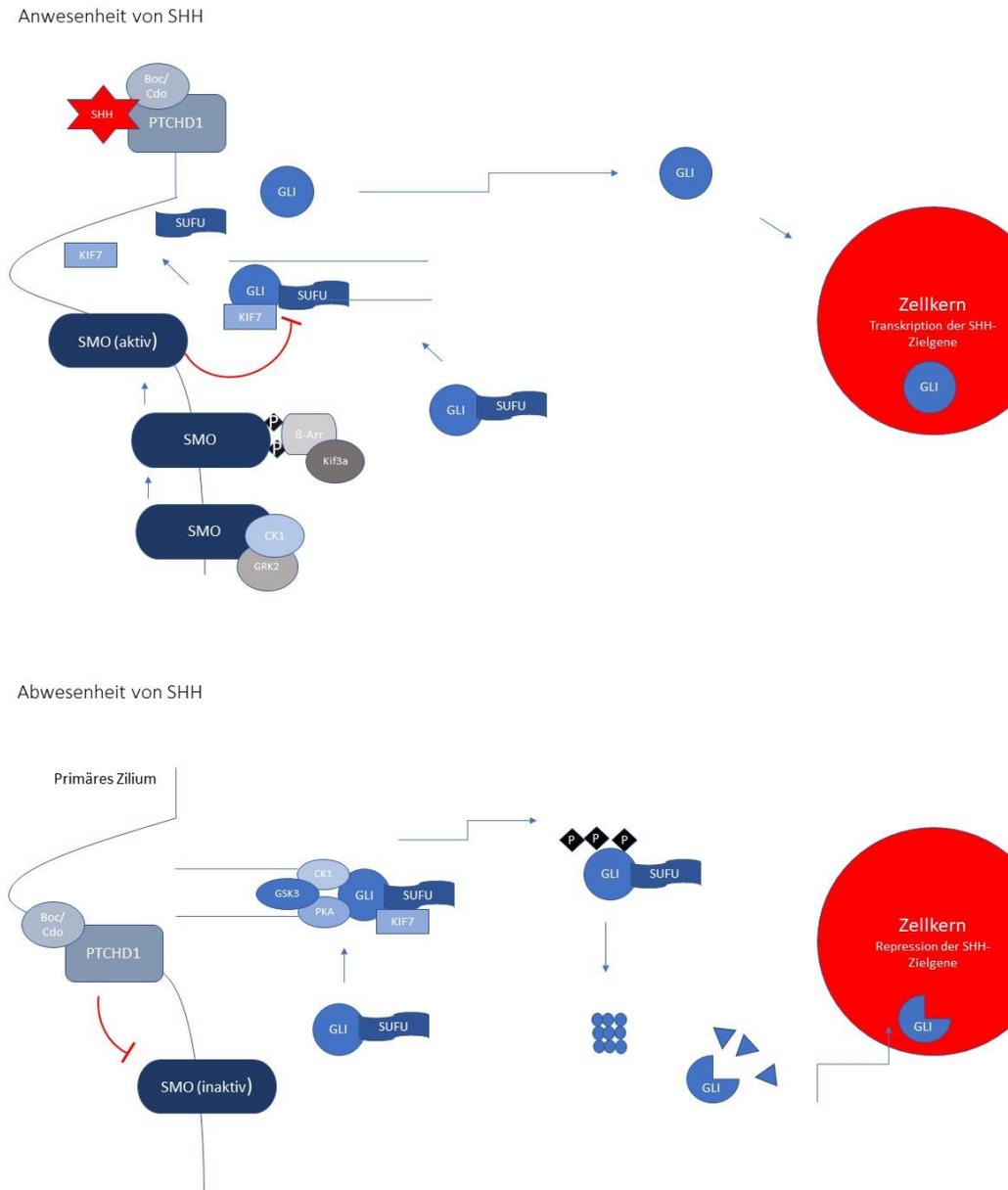


Abbildung 7: SHH-Signaltransduktion in Vertebraten

In den vergangenen Jahren beschäftigten sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Bedeutung des primären Ziliums und der komplexen Signaltransduktion innerhalb des Ziliums. Ungeklärt bleibt bislang der genaue Mechanismus der Inhibierung von *SMO* durch *Patched1* [115]. Auch ein detaillierteres Verständnis für den Vorgang, wie *SMO* eine Aktivierung von *GLI* herbeiführt, bleibt Gegenstand aktueller Forschung [119].

### **Bedeutung innerhalb der Tumorgenese und therapeutische Einsatzmöglichkeiten**

Erste Hinweise auf eine abnorme Aktivierung des *Hedgehog*-Signalwegs im Zuge der Tumorgenese fanden sich bei Patienten mit Gorlin-Goltz-Syndrom. Diese Patienten leiden unter einer *Loss-of-Function*-Mutation des *Patched1*-Gens und neigen zur Ausbildung multipler Basalzellkarzinome und anderer Tumore wie z.B. dem Medulloblastom oder Rhabdomyosarkom [116]. Auch sporadisch auftretende Basalzellkarzinome zeigen häufig eine Fehlregulation des Signalwegs und defekte Komponenten wie z.B. *Patched1*, *SMO*, *SUFU* oder in seltenen Fällen auch *GLII* [111]. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg bei zahlreichen Tumorentitäten eine entscheidende Rolle spielt. Hierunter fallen das kleinzellige Bronchialkarzinom, das Adenokarzinom des Pankreas, Tumore des Gastrointestinaltrakts, der Leber, der Brust, der Prostata [113], der Blase und das Gliom [111]. Auch beim oralen Plattenepithelkarzinom scheint eine Aktivierung des Signalwegs nachweisbar [120].

Zudem wurde gezeigt, dass Tumorrepopulationen nach Radiochemotherapie und therapeutische Resistenz in vielen Fällen mit der Fehlregulation dieser Kaskade in Verbindung gebracht werden können [120]. Dieser Umstand und die Tatsache, dass im Adulten die Hemmung des Signalwegs den Normzustand beschreibt, geben Anlass dazu, die Blockade dieses Signalwegs als Ziel therapeutischer Intervention in Betracht zu ziehen. Zahlreiche Therapeutika wie z.B. der pflanzliche *SMO*-Antagonisten *Cyclopamin*, synthetischen Antagonisten wie *SANT 1-4*, *KAAD-Cyclopamine*, *CUR-61414* [111] und das bereits weitentwickelte *Vismodegib* [121] zeigen vielversprechende Ergebnisse und hemmen die Kaskade an Stellen, die defekte Komponenten wie *Patched1* oder fehlaktiviertes *SMO* kompensieren können. Erste klinische Untersuchungen zeigen jedoch auch, dass manche Tumorentitäten Resistenzen gegen eine *SMO*-Blockade ausbilden können [118]. *SHH*-spezifische monoklonale Antikörper wie *5E1* konnten ebenfalls therapeutische Erfolge erzielen. Dabei spielt nicht nur die Blockade der proliferierenden Tumorzellen selbst eine entscheidende Rolle, sondern auch die Hemmung benachbarter Stromazellen,

die durch juxta- und parakrine *SHH*-Signalübertragung Angiogenese, Wachstum, Zellmotilität und Metastasierungspotential des Tumors beeinflussen [113]. Um weitere effektive Therapieoptionen zu entwickeln, zielt die nächste Generation therapeutischer Mittel direkt auf die *GLI*-Transkriptionsfaktoren und hemmt so die Expression der ihrer Zielgene. Gegenstand aktueller Forschung bleibt ein besseres Verständnis des Signalkaskade und möglicher kompensatorischer Mechanismen, welche die Resistenzen verursachen. Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft die Grundlage für den Einsatz kombinierbarer Therapeutika bilden, die eine effektivere Therapie ermöglichen [118].

### **1.5 Fragestellung**

Diese Studie befasst sich mit der Analyse von Bürstenbiopsien im Hinblick auf die Expression von GLUT1 und SHH und deren Bedeutung für die Diagnose maligner Transformation. Mit Hilfe der Untersuchung unterschiedlicher Probandengruppen soll die immunzytochemisch erweiterte Bürstenbiopsie als mögliches klinisches Screeningverfahren für maligne Transformation von Schleimhautläsionen bewertet werden.

## 2. Material und Methode

### 2.1 Studiendesign

#### 2.1.1 Patientenkollektiv

Das Kollektiv dieser Studie umfasst 75 Patienten, die im Zeitraum vom 13.12.2010 bis 01.04.2014 in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- Gesichtschirurgie der Julius Maximilians Universität Würzburg vorstellig wurden. Die entnommenen Proben setzen sich zusammen aus Bürstenbiopsien von 24 gesunden Probanden, 18 Probanden mit einer vorhandenen Leukoplakie, 15 Patienten mit einem oralen Lichen planus und 15 Patienten mit einem histologisch gesicherten oralen Plattenepithelkarzinom. Die Proben der gesunden Patienten stammen aus verschiedenen Lokalisationen der Mundhöhle. Diese umfassen Alveolarkamm, Zunge, Planum buccale und Mundboden. Die gesunde Kontrollgruppe wurde durch das Fehlen klinisch sichtbarer Schleimhautläsionen definiert und vom Pathologen als unauffällig eingestuft. Es wurden überwiegend jüngere Probanden ausgewählt, um die Akkumulation endogener und exogener Noxen innerhalb der Kontrollgruppe möglichst gering zu halten. Eine erhöhte Exposition gegenüber Noxen, erschwerte Hygienebedingungen durch Zahnersatz, reduzierte Mundhygienefähigkeit, Multimorbidität und reduzierte Abwehrkräfte stellen besondere Anforderungen an das orale Plattenepithel älterer Patienten, die trotz klinisch läsionsfreier Schleimhaut zelluläre Veränderungen akkumulieren könnten und sich daher als Kontrollgruppe weniger eignen als jüngere Probanden. Das Kollektiv der Leukoplakie- und Lichen-Patienten setzte sich aus Probanden zusammen, die nach einer Biopsie und der Diagnose durch den Pathologen zu einem *Follow-up* regelmäßig im Rahmen einer Mundschleimhautsprechstunde einbestellt wurden. Die Probenentnahme der Plattenepithelkarzinom-Patienten erfolgt nach histologischer Sicherung bei stationärer Aufnahme oder ebenfalls im Rahmen der Mundschleimhautsprechstunde. Anamnesedaten wie Alkohol-, Nikotinkonsum, Grunderkrankungen, weitere Tumorerkrankungen, bereits erfolgte Chemotherapien, Radiatio und familiäre Prädisposition wurden detailliert anhand eines standardisierten Fragebogens erfasst. Zudem wurden zwölf weiteren Plattenepithelkarzinom-Patienten intraoperativ Tumorbiosate entnommen und für eine Kryosektion vorbereitet.

### **2.1.2 Probenentnahme**

Die Probenentnahme fand in der Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg statt und wurde nach intensiver Schulung und unter Aufsicht eines erfahrenen Chirurgen durchgeführt. Das Zellmaterial der gesunden Probanden stammte aus verschiedenen Regionen der Mundhöhle: Wangenschleimhaut, Zungenrand und Mundboden. Bei den Patienten mit Mundschleimhautveränderungen wurden die Proben vom Areal der Gewebeveränderung entnommen. Zur Entnahme des Materials wurden Bürsten des Bürstenbiopsiesets ORCA-BRUSH® der Firma ZL MICRODENT Attachment GmbH & Co. KG, Breckerfeld verwendet. Die Bürste wurde unter leichtem Druck rotierend über das gewählte Areal geführt, bis das Auftreten kleiner Blutungspunkte eine ausreichende Eindringtiefe signalisierte. Zur Übertragung des Zellmaterials auf einen Objektträger wurde die Bürste um 360 Grad rotiert und an zwei gleichgroßen Arealen des Objektträgers mehrfach ausgestrichen. Um eine ausreichende Adhäsion des gewonnenen Zellmaterials zu gewährleisten, wurden, anstelle der im Set enthaltenen Träger, Adhäsionsobjektträger des Typs Polysine® Slides (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Die gewonnenen Proben wurden anschließend mittels des im Set enthaltenen zytologischen Sprayfixativs behandelt und so für die zytopathologische Untersuchung vorbereitet. Den gewählten Arealen wurde ausreichend Zellmaterial für fünf Objektträger entnommen. Ein Objektträger wurde direkt an das Pathologische Institut der Universitätsklinik Würzburg gesandt und dort mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung beurteilt. Die übrigen Proben wurden im Rahmen dieser Studie von Doktoranden im wissenschaftlichen Labor der Poliklinik für Mund-, Kiefer- Gesichtschirurgie immunhistochemisch gefärbt und abschließend nochmals von einem erfahrenen Pathologen des Zentrums für Oralpathologie in Potsdam (Dr.med. Harald Ebhardt) bewertet.

Zur Etablierung einer methodischen Positivkontrolle, wurden intraoperativ entnommene Tumorbiopsate immunhistochemisch gefärbt. Die Proben der histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinome wurden intraoperativ entnommen und für die Herstellung von Kryoschnitten vorbereitet.

### **2.1.3 Votum der Ethikkommission**

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

## **2.2 Geräte und Chemikalien**

### **2.2.1 Geräte**

- Kryostat MNT von SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
- ORCA-Brush® Bürstenbiopsie-Set von Microdent, Breckerfeld, Deutschland
- Inkubationskammer für Objektträger, GT Labortechnik, Arnstein, Deutschland
- Menzel- Gläser Polysine® Slides der Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Eindeckgläser, Standardstärke 0,16-0,19 mm, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Elektromikroskop, Leica Leitz DMRD, Wetzlar, Deutschland
- Kamera, EC 3, Leica Mikrosystems, Heerbrugg, Schweiz
- PAP PEN® Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland

### **2.2.2 Chemikalien**

- Orca- Fixx, zytologisches Fixiermittel, DGOD, Leipzig, Deutschland
- CryoGlue medium, SLEE medical an orgentec company, Mainz, Deutschland
- Anti-Glucose Transporter GLUT1 antibody, Rabbit Monoclonal Antibody Epitomics-an abcam® company, Burlingame, California, U.S.A.
- SHH polyclonal antibody, Rabbit Polyclonal Antibody, Abnova, Heidelberg, Deutschland
- Destilliertes Wasser
- Xylol
- Methanol
- Alkohol verdünnt mit Aqua dest. (100 %, 90 %, 80 %, 70 %)
- 0,5 M Ammoniumchlorid
- Puffer: Tris-buffered saline (TBS) (0,05 M) aus:

- 6,05 g Tris
- 8,76 g NaCl
- 800 ml destilliertes Wasser
- 1 M HCl zum Einstellen des pH Wertes auf pH 7,6
- Puffer: Phosphate buffered saline (*PBS*) aus:
  - 72 g NaCl
  - 14,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 4,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 0,8 % und 5 % BSA (Rinderalbumin)
- Horseradish Peroxidasekomplex , DakoCytomation, Glostrup, Denmark
- 0,25 % Triton X-100 (C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>x</sub>)
- Polyclonal Goat Anti Rabbit Immunoglobulines/ Biotinylated
- DAB- Lösung aus:
  - 150 µl DAB-Dako+Chromosom Mischung
  - 150 µl NH<sub>4</sub>Cl
  - 300 µl NiSO<sub>4</sub>
  - 300 µl Glucose 10%
  - 50 µl Glucoseoxidase
  - 15 ml Phosphatpuffer (PBS)
- Hämatoxylin Lösung modifiziert nach Gill III, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- HCL
- Eosin Y-Lösung 0,5 % wässrig, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Entellan® Schnelleindeckmittel, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## 2.3 Immunzytochemische Analyse

### 2.3.1 Methode der Immunzytochemie

Zur Färbung der vorliegenden Bürstenbiopsate wurde ein immunhistochemisches Standardprotokoll für Paraffin/Kryoschnitte verwendet. Dieses erlaubte, dank der indirekten Methode der Immunhistochemie, auch bei geringen Mengen des exprimierten Markers ein positives Signal. Dieses Signal identifiziert mittels Antigen-Antikörperreaktion den gesuchten Marker und wird mit Hilfe der hier verwendeten indirekten Drei-Schritt Methode verstärkt. Zur Analyse der vorliegenden Proben wurde die sogenannte Labeled Streptavidin-Biotin (LSAB) Methode gewählt. Hierbei nutzt man die Affinität des Vitamins Biotin zu dem Glykoprotein Streptavidin, welches vier Bindungsstellen für Biotin besitzt und so eine zusätzliche Signalverstärkung ermöglicht. Zunächst bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Danach folgt die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der mit Biotin konjugiert wurde. Im letzten Schritt erfolgt die Bildung der Streptavidin-Biotin-Horseradish-Peroxidase-Komplexe. Das Enzym Horseradish-Peroxidase (*HRP*) bewirkt die Oxidation eines zugesetzten Chromogens. Das hier verwendete Diaminobenzidin (*DAB*) wird durch diese Chromogenreaktion braun und macht schließlich auf diesem Weg das vorhandene Antigen sichtbar. Die Streptavidin-Biotin-Methode zeichnet sich im Gegensatz zur Avidin-Biotin-Methode durch weniger unspezifische Bindungen und eine gute Sensitivität aus.

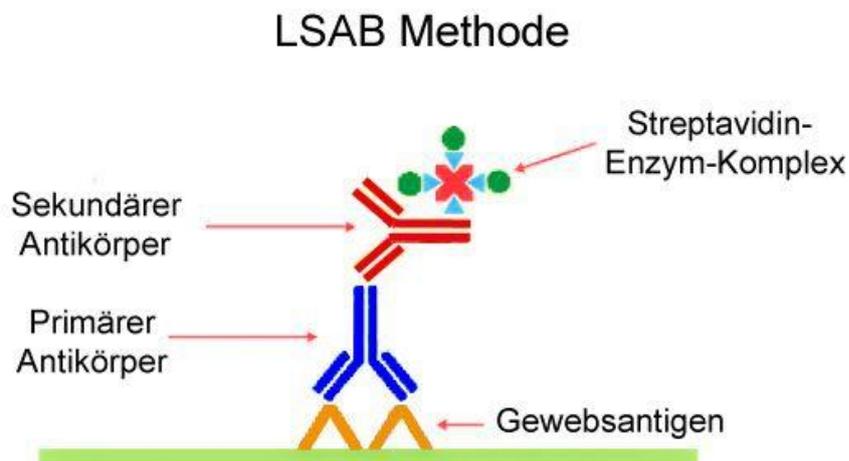


Abbildung 8: Labeled Streptavidin-Biotin-Methode

### 2.3.2 Immunzytochemisches Färbeprotokoll

Alle Färbungen wurden manuell durchgeführt und erfolgten bei Raumtemperatur. Als Puffer diente 0,05 M TBS.

Zunächst wurden auf den vorher fixierten Proben mittels Fettstift zwei Kammern eingeteilt, die später eine direkte Gegenüberstellung von gefärbter Probe und methodischer Negativkontrolle erlaubten.

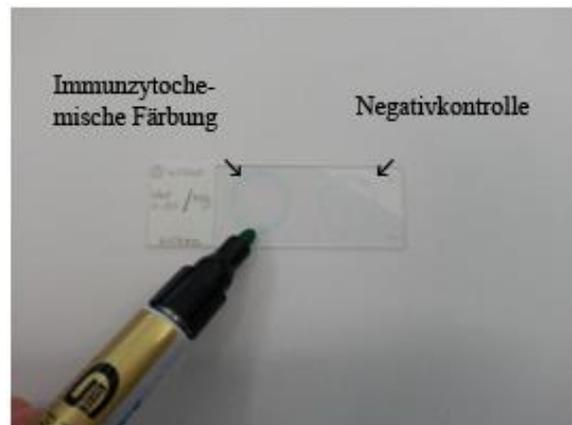


Abbildung 9: Einteilung der Objektträger



Abbildung 10: Platzieren der Objektträger in der Inkubationskammer

Anschließend folgten drei Waschgänge mit TBS, die jeweils fünf Minuten andauerten, und eine zwanzigminütige Behandlung mit 3 %  $H_2O_2$  in Methanol. Dieser Schritt blockiert die Aktivität einer eventuell vorhandenen endogenen Peroxidase, welche zu einem

falsch positiven Ergebnis führt. Im Anschluss daran wurden zwei weitere Waschgänge mit TBS à fünf Minuten und eine zehn-minütige Behandlung mit 0,5 M Ammoniumchlorid und 0,25 % Triton X-100 in TBS durchgeführt. In diesem Schritt wurden die Zellen durch das Triton X-100 permeabilisiert. Das Ammoniumchlorid löst Aldehydvernetzungen auf und demaskiert somit das Gewebe. Nach zwei Waschgängen mit TBS wurde die Blockade der unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % BSA (Rinderalbumin) in TBS ausgeführt. Die sechzig-minütige Einwirkzeit ermöglicht dem Protein die unspezifischen Bindungsstellen zu besetzen, sodass diese nicht mehr vom primären Antikörper gebunden werden können.

Nun erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper bei 4 °C, über Nacht. Der Antikörper wurde verdünnt mit 0,8 % BSA auf eine Kammer des Objektträgers gegeben. Die zweite Kammer wurde lediglich mit 0,8 % BSA (kein primärer Antikörper) versetzt und dient im Folgenden als methodische Negativkontrolle. Am 2. Tag der Färbung wurden zunächst vier Waschgänge mit TBS vorgenommen, bevor die Inkubation mit dem 2. Antikörper folgte. Dieser wurde 1:400 in TBS verdünnt, richtet sich gegen die Spezies (*Rabbit*), aus der der primäre Antikörper stammt und wurde auf beide Kammern des Objektträgers gegeben. Nach sechzig Minuten wurden vier Waschgänge à fünf Minuten mit TBS und die Inkubation mit dem *Horseradish Peroxidasekomplex* vorgenommen. Dieser wurde zuvor 1:150 in TBS verdünnt, für 60 Minuten auf beide Kammern des Objektträgers gegeben und anschließend in vier Waschgängen à fünf Minuten mit TBS entfernt. Dieser Schritt markiert den sekundären Antikörper und macht ihn so mit einer Entwicklungsmethode z.B. mittels *DAB* nachweisbar. Um die *DAB*-Lösung anzusetzen, wurden 150 µl *DAB*, 150 µl Ammoniumchlorid, 300 µl Nickelsulfat, 300 µl 10% Glucose und 50 µl Glucoseoxidase in 15 ml Phosphatpuffer gelöst. Die einzelnen Lösungen wurden bereits vorher in den richtigen Mengen aliquotiert, kurz vor ihrem Gebrauch aufgetaut und sofort angesetzt. Die entstandene Lösung wurde filtriert und auf die Objektträger aufgetragen. Die ablaufende *DAB*-Entwicklung wurde unter einem Mikroskop beobachtet und mit der Negativkontrolle verglichen. Nach Ablauf der Entwicklungszeit wurde der Vorgang mit dem Auftragen von TBS gestoppt. Die Lösung wurde vom Objektträger entfernt und sachgerecht entsorgt.

Im Anschluss an die immunhistochemische Färbung wurden die Proben zusätzlich einer Hämalaun-Eosin-Färbung (*HE*)-Färbung unterzogen, um die spätere Beurteilung zu erleichtern. Abschließend wurden die Präparate mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Entellan® eingedeckt (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

### **2.3.3 Anfertigung und Färbung von Kryoschnitten gesicherter PECA zur Herstellung einer methodischen Positivkontrolle**

#### **Schneiden und Vorbereiten:**

Um die spätere Beurteilung zu erleichtern, wurden zunächst Färbungen von Kryoschnitten gesicherter Plattenepithelkarzinome durchgeführt. Dieses Prozedere unterstützte die Suche nach der optimalen Verdünnung der primären Antikörper und die Suche nach der optimalen DAB-Entwicklungszeit zur Erzielung eines zufriedenstellenden Färbeergebnisses. Die Probenentnahme fand im OP der Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der Universität Würzburg statt. Die Tumorproben wurden unmittelbar nach der Entnahme in 0,5 M PBS fixiert und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Kryoschnitte der Proben wurden mit Hilfe des Kryostats MNT (SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland) bei einer Kammertemperatur von -15 °C hergestellt. Dazu wurden die Proben zunächst auf dem Objektischchen mit Gefrierspray fixiert, anschließend eingespannt und im richtigen Winkel zum Messer ausgerichtet. Die Schichtstärke wurde mit 7 µm möglichst dünn eingestellt. Aufgetragen auf beschichtete Objektträger (Polysine® Slides der Firma Thermo Scientific) wurden jeweils vier Schnitte, in Paaren angeordnet, auf einen Objektträger aufgenommen: ein Paar zur Färbung, eines für die Negativkontrolle.

#### **Färben:**

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Kryoschnitte kurz in Leitungswasser gespült, um das restliche Einbettmittel zu entfernen. Nach Ausführung des Standardprotokolls für immunhistochemische Färbung mit unterschiedlichen Konzentrationen des primären Antikörpers und genauer Dokumentation der DAB Entwicklungszeit, erfolgte eine zusätzliche Hämalaun-Eosin-Färbung. Diese diente als Übersichtsfärbung, um die Morphologie der Proben besser beurteilen zu können. Hierbei wurden die Schnitte fünf Minuten in Hämalaunlösung nach Mayer gefärbt, einige Sekunden mit HCL und drei Minuten mit Leitungswasser gespült. Danach folgte die Gegenfärbung mit Eosinlösung für

weitere fünf Minuten. Nach der Färbung werden basophile Verbindungen wie z.B. Nukleinsäuren im Zellkern blau, die übrigen Strukturen wie Zytoplasma oder Interzellularsubstanzen rot dargestellt. Abschließend wurde eine Entwässerung mittels ansteigender Alkoholreihe und das Eindecken mit Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Beurteilung der Färbung erfolgte durch Dr.med. Harald Ebhardt des Zentrums für Oralpathologie in Potsdam.

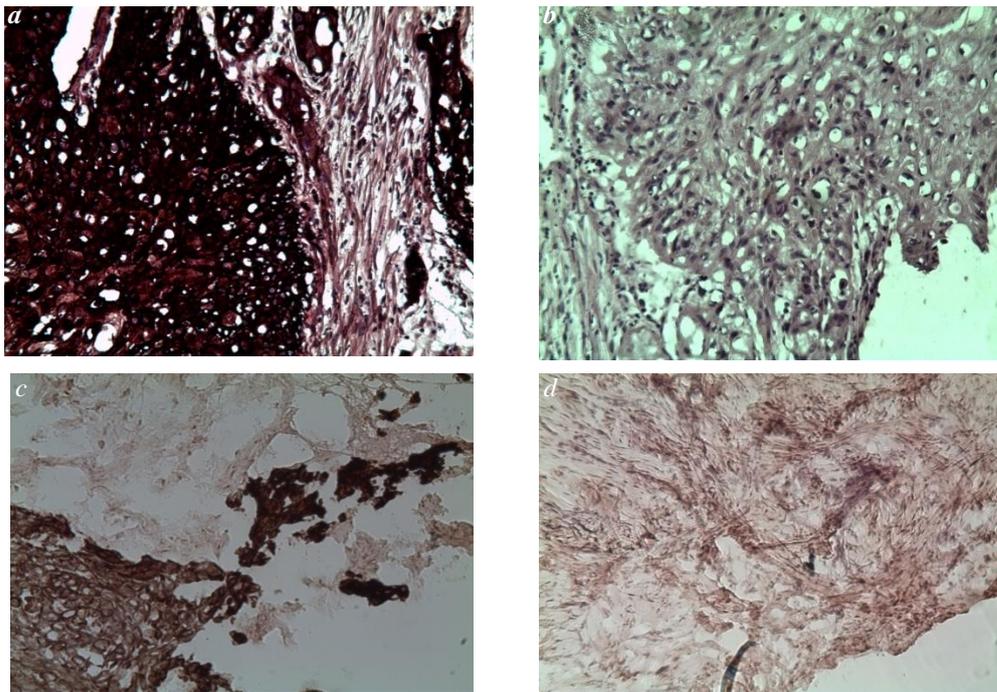


Abbildung 11: Nachweis der Expression der untersuchten Antikörper in einem oralen Plattenepithelkarzinom (Kryoschnitte) a) GLUT-1 positive Färbung, Vergrößerung 1:100, Verdünnung 1:150, DAB Entwicklungszeit 12 min b) GLUT-1-Negativkontrolle, Vergrößerung 1:100, Verzicht auf den primären Antikörper, DAB-Entwicklungszeit 12 min c) SHH-positive Färbung, Vergrößerung 1:100, Verdünnung 1:200, DAB-Entwicklungszeit 16 min d) SHH-Negativkontrolle, Vergrößerung 1:100, Verzicht auf den primären Antikörper, DAB-Entwicklungszeit 16 min

### 2.3.4 Immunhistochemische Färbung der Bürstenbiopsie

Nachdem die optimale Antikörperkonzentration und die optimale DAB-Entwicklungszeit ermittelt waren, wurde das modifizierte immunhistochemische Standardprotokoll zur Färbung der Bürstenbiopsate herangezogen. Die Färbung wurde vom Doktoranden ebenfalls manuell durchgeführt. Verwendete primäre Antikörper waren:

- GLUT-1 (anti-Glut 1 RAB monoklonal, Epitomics Inc, Burlingame CA, USA)

- *SHH* (anti-SHH RAB polyklonal, Abnova GmbH, Heidelberg)

**Tabelle 7: Modifizierung des Standardprotokolls für immunhistochemische Färbungen**

Antikörper	Konzentration	DAB Entwicklungszeit
GLUT-1	1:150	12 min
SHH	1:200	16 min

### 2.3.5 Auswertung

Zunächst erfolgte die Einteilung in zwei zytologische Befundgruppen. Die Zuordnung, die sich über den Nachweis oder das Fehlen gefärbter Zellen definierte, erlaubte Rückschlüsse auf die Expression des untersuchten Markers. Die Auswertung erfolgte dabei durch den Doktoranden und wurde durch die Auswertung von Dr. med. Harald Ebhardt, Facharzt für Pathologie am Zentrum für Oralpathologie in Potsdam, bestätigt.

Die immunzytochemisch gefärbten Bürstenbiopsate wurden weiterhin mit der Diagnosestellung des pathologischen Instituts des Universitätsklinikum Würzburg verglichen. Hierbei wurden nicht nur die Bürstenbiopsate mit der konventionellen HE-Färbung des Pathologischen Instituts berücksichtigt, sondern auch die histologischen Ergebnisse aus Probeexzision oder Tumorentfernung der betroffenen Patienten.

Anhand dieser gesicherten Zuordnung zu einer der vier Probandengruppen wurde die Bedeutung des Markers im Hinblick auf die maligne Transformation untersucht.

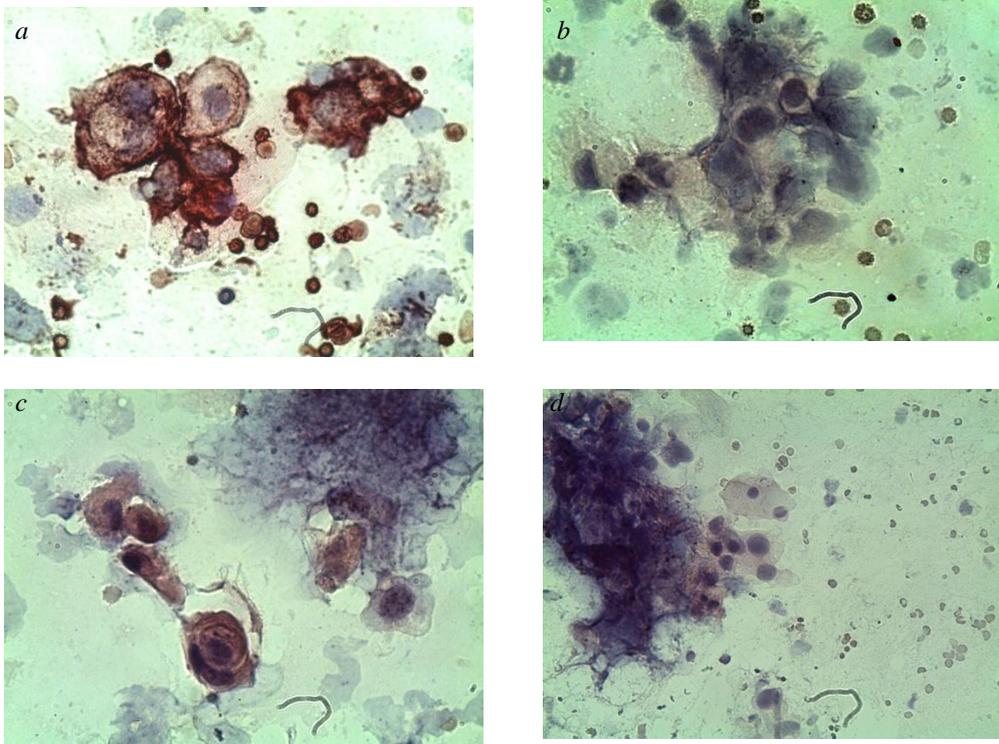


Abbildung 12: Auswertungsbeispiele der immunzytochemisch gefärbten Bürstenbiopsate a) Auswertungsbeispiele für die GLUT-1- positive Färbung der Bürstenbiopsate , Vergrößerung 1:200, Verdünnung 1:150, DAB Entwicklungszeit 12 min b) Negativkontrolle der GLUT-1-Färbung, Vergrößerung 1:200, Verzicht auf den primären Antikörper, DAB Entwicklungszeit 12 min c) Auswertungsbeispiele für die SHH-Färbung der Bürstenbiopsate, Vergrößerung 1:200, Verdünnung 1:200, DAB-Entwicklungszeit 16 min d) Negativkontrolle der SHH-Färbung, Vergrößerung 1:200, Verzicht auf den primären Antikörper, DAB-Entwicklungszeit 16 min

Untersucht wurden in der Auswertung folgende Aspekte:

- Expression der Marker in den Unterschiedlichen Probandengruppen
- Alter in Korrelation zum Färbungsverhalten
- Geschlecht in Korrelation zum Färbungsverhalten
- Alkohol und Nikotinabusus in Korrelation zum Färbeverhalten
- Tumorgröße in Korrelation zum Färbeverhalten
- Lymphknotenstatus in Korrelation zum Färbeverhalten
- Invasion der Lymphgefäße in Korrelation zum Färbeverhalten

- Tumorinvasion von Venen in Korrelation zum Färbeverhalten
- Perineurale Invasion in Korrelation zum Färbeverhalten
- Entdifferenzierungsgrad des Tumors in Korrelation zum Färbeverhalten
- UICC-Stadien in Korrelation zum Färbeverhalten
- Sensitivität und Spezifität der Untersuchungsmethode
- Praktikabilität der immunzytochemisch unterstützten Bürstenbiopsie

## 2.4 Statistische Methoden

Die Statistische Analyse stützt sich auf die Daten einer prospektiven Studie mit deskriptiver Zielsetzung.

Die Abhängigkeit zweier Variablen wurde mittels Chi-Quadrat-Test nach der Maximum-Likelihood-Methode ( $p_c$ ) ermittelt. Bei zu geringen Erwartungswerten wurde bei einer Vier-Felder-Tafel der exakte Chi-Quadrat-Test nach Fisher und Yates ( $p_{fy}$ ) und bei größeren Tafeln der exakte Test nach Mehta und Patel ( $p_{mp}$ ) herangezogen.

Für Gruppen mit zwei verschiedenen Variablen wurde der U-Test nach Mann und Whitney ( $p_U$ ) angewandt und so ein Messwert zwischen zwei Gruppen verglichen. Für den Vergleich von Gruppen mit mehr als zwei Variablen diente die Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis ( $p_{KW}$ ).

Um die Abhängigkeit zweier Messungen zu beschreiben wurde die Kendallsche Rangkorrelation, mit dem Koeffizienten tau ( $\tau$ ) verwendet. Der Korrelationskoeffizient ist eine Zahl zwischen -1 und +1. -1 ist dabei eine ideale gegensinnige, +1 eine ideale Korrelation. Der Wert 0 umschreibt, dass keinerlei Abhängigkeit besteht. Als weitere Information dient hierbei der p-Wert. Er gibt an ob sich der Koeffizient signifikant von Null unterscheidet, d.h. ob eine Beziehung gefunden werden kann.

Zudem wurden Konfidenzintervalle berechnet, um die Güte eines Schätzwertes beurteilen zu können. Die Vermutung, dass der wahre Wert in der näheren Umgebung des Schätzwertes liegt, kann durch den Konfidenzintervall (CI oder Vertrauensbereich) umschrieben werden. Ein 95% -CI gibt den Bereich an, der mit 95%iger Wahrscheinlichkeit den ermittelten Parameter überdeckt.

Die errechneten p-Werte ermöglichen einen quantitativen Vergleich der Testergebnisse. p-Werte unter 0,05 werden als signifikant bezeichnet und wurden mit Symbolen gekennzeichnet ( $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ ). Die p-Werte in deskriptiven Arbeiten stellen keine Irrtumswahrscheinlichkeiten dar, sondern dienen zur Beurteilung und zum Vergleich der verschiedenen Testergebnisse [122].

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Patientenkollektiv

Um die wesentlichen Ergebnisse und originären Daten dieser Dissertation beurteilen zu können wurde zunächst eine detaillierte Analyse des Patientenkollektivs durchgeführt.

#### 3.1.1 Alter und Geschlecht

Um eine detaillierte Analyse der Patientendaten zu ermöglichen, wurde das Kollektiv zunächst nach Alter und Geschlecht unterteilt. Diese Studie basiert auf Daten von 72 Patienten im Alter von 23 bis 87 Jahren. Das mittlere Alter betrug  $54,7 \pm 15,1$  Jahre, der Altersmedian lag bei 56,4 Jahre mit einem 68 %-Konfidenzintervall (CI) von 39,1- 69,9 Jahren. 41 Patienten (57 %) waren männlich und 31 (43 %) weiblich (s. Abbildung 13).

#### Geschlechtsverteilung

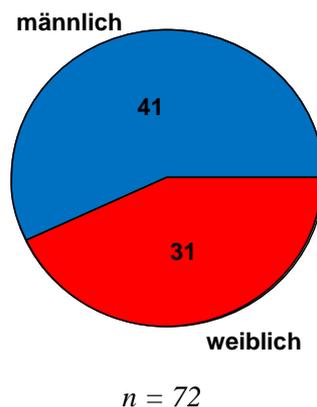


Abbildung 13: Geschlechtsverteilung innerhalb des Patientenkollektivs

Zwischen männlichen und weiblichen Probanden fand sich kein signifikanter Altersunterschied ( $p_U = 0,57$ ). Die 50-59 Jährigen stellten den größten, Patienten zwischen 80-87 Jahren den kleinsten Anteil des Patientenkollektivs (s. Abbildung 14). Die Gruppe der 80-87 Jährigen bestand zum größten Teil aus weiblichen Probanden. 60-69 jährige Patienten waren überwiegend männlich.

## Alter und Geschlecht

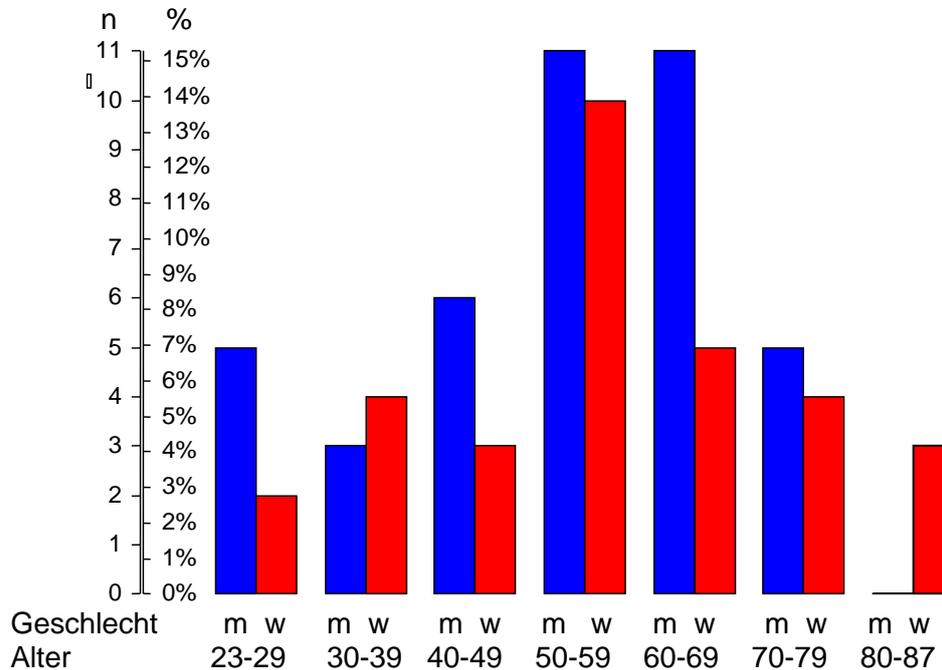


Abbildung 14: Alter und Geschlecht innerhalb des Patientenkollektivs

Jede Säule stellt Anzahl und Prozentsatz der Patienten in der genannten Altersgruppe (vollendete Lebensjahre) dar und ist nach Geschlecht unterteilt, ■ = männlich, ■ = weiblich. n = 72.

### 3.1.2 Diagnose

24 der 72 Probanden wiesen keine Schleimhautveränderungen auf und dienten als gesunde Kontrollgruppe. Bei 15 Probanden des Patientenkollektivs konnte ein histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom nachgewiesen werden. Bei 15 Patienten wurde ein oraler Lichen planus und bei 18 Patienten eine Leukoplakie diagnostiziert. Drei der 18 Leukoplakie-Patienten wiesen histologisch eine Dysplasie auf. Abbildung 15 zeigt Anzahl und prozentualen Anteil der unterschiedlichen Diagnosen.

## Diagnosen

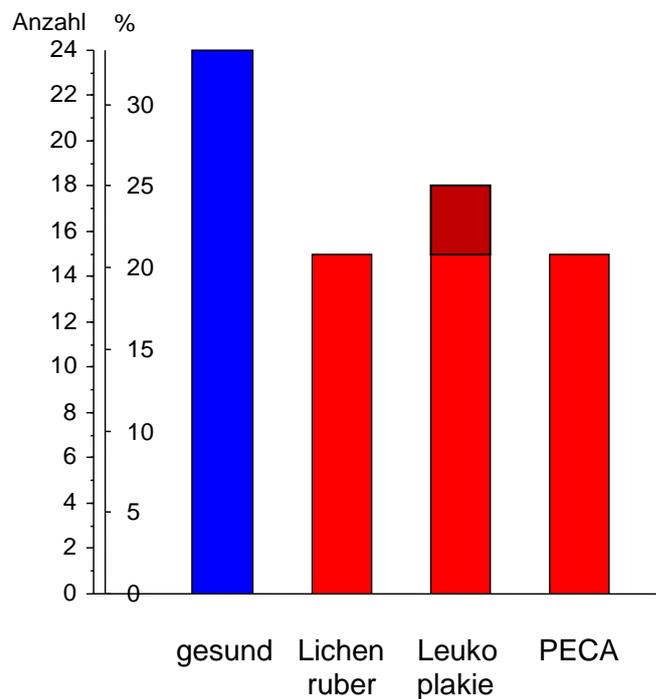


Abbildung 15: Diagnosen: Die Säulen stellen die Anzahl und den prozentualen Anteil der unterschiedlichen Diagnosen dar. Die Säule für Leukoplakie ist in Diagnosen ohne (unten) und mit Dysplasie (oben) unterteilt.  $n = 72$

Betrachtet man die Anzahl der Patienten in den unterschiedlichen Diagnosegruppen sowie den prozentualen Anteil am Gesamtkollektiv, wird ersichtlich, dass Patienten ohne Mundschleimhautveränderung den größten Anteil des Kollektivs stellten. Die gesunde Kontrollgruppe umfasste 33,33 %. Probanden mit einem oralen Plattenepithelkarzinom machten 20,83 % der Probanden aus. Probanden mit einer Leukoplakie stellten einen Anteil von 25 %, Patienten mit oralem Lichen ruber planus einen Anteil von 20,83 % (s. Tabelle 8).

**Tabelle 8. Diagnosen**

<b>Diagnose</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
gesund	24	33.33%
Lichen ruber	15	20.83%
Leukoplakie	18	25.00%
PECA	15	20.83%
Leukoplakie mit Dysplasie	3	4.17%

Anzahl, prozentualer Anteil innerhalb des Kollektivs.  $n = 72$ .

### 3.1.2.1 Alter und Diagnose

Betrachtet man die Zusammenstellung des Patientenkollektivs im Bezug auf das Alter und die Diagnose, so zeigt sich, dass die gesunde Kontrollgruppe deutlich jünger gewählt wurde. Der Mittelwert dieser Probanden lag bei  $41,6 \pm 14,3$  Jahren. Patienten mit den bereits beschriebenen Mundschleimhautveränderungen waren durchschnittlich 20 Jahre älter. Innerhalb der Gruppe der erkrankten Probanden mit Mundschleimhautveränderungen konnte kein signifikanter Altersunterschied errechnet werden ( $p_{\text{KW}} = 0,19$ ). Plattenepithelkarzinom-Patienten waren mit einem durchschnittlichen Alter von  $65,7 \pm 11,9$  Jahren die ältesten und Leukoplakie-Patienten mit durchschnittlich  $58,4 \pm 8,1$  Jahren die jüngsten Erkrankten (s. Tabelle 9).

**Tabelle 9. Alter und Diagnosen**

<b>Diagnose</b>	<b>n</b>	<b>MW</b>	<b>ST</b>	<b>Median</b>	<b>68%-CI</b>		<b>p</b>
gesund	24	41.609	14.276	39.3	26.9	56.9	
erkrankt	48	61.286	10.636	61.4	51.6	72.0	$<0.000005^{***}_{\text{U}}$
Lichen ruber	15	60.246	11.176	61.0	47.4	73.4	
Leukoplakie	18	58.438	8.118	56.5	52.5	64.9	
PECA	15	65.743	11.916	63.8	56.9	79.1	$0.19_{\text{KW}}$

$n = 72$ ,

Der Median lag bei den gesunden Probanden bei 39,3 Jahren, bei Patienten mit Lichen planus bei 61,0 Jahren, bei Leukoplakiepatienten bei 56,5 Jahren und bei Plattenepithelkarzinompatienten bei 63,8 Jahren (s. Abbildung 16).

## Alter nach Diagnosen

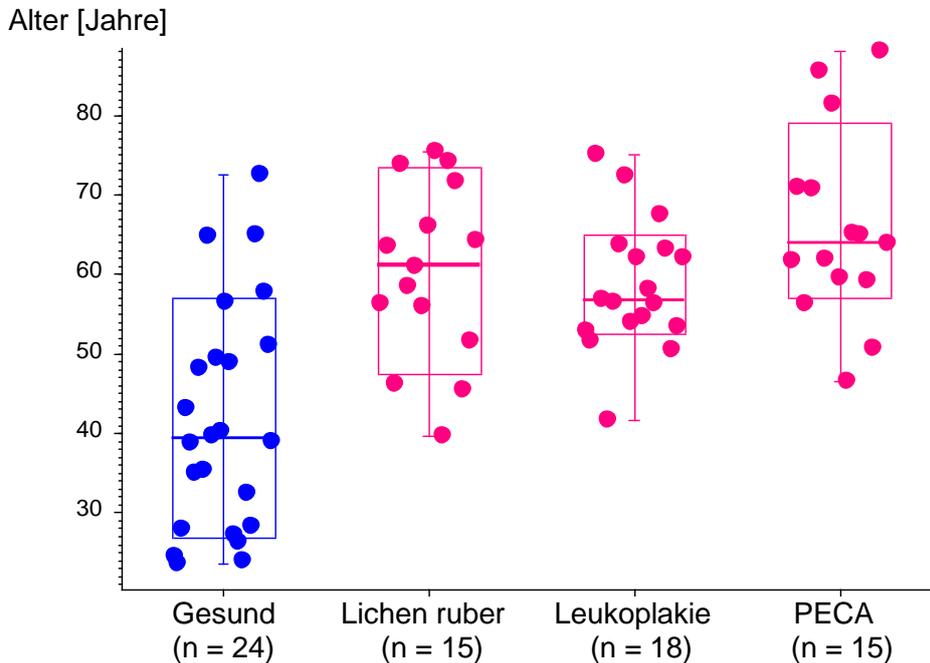


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Verteilung des Patientenalters in den einzelnen Diagnosegruppen mittels Boxplot : Die Boxen stellen den 68%-CI der Patienten dar, die Linie in der Box den Median und die Whiskers die Spanne.  $n = 72$ .

### 3.1.2.2 Geschlecht und Diagnose

Lichen-Patienten waren überwiegend männlich, PECA-Patienten überwiegend weiblich. Die Anzahl weiblicher Probanden in der gesunden Kontrollgruppe und bei den Probanden mit einer Leukoplakie war gleich hoch (s. Abbildung 17).

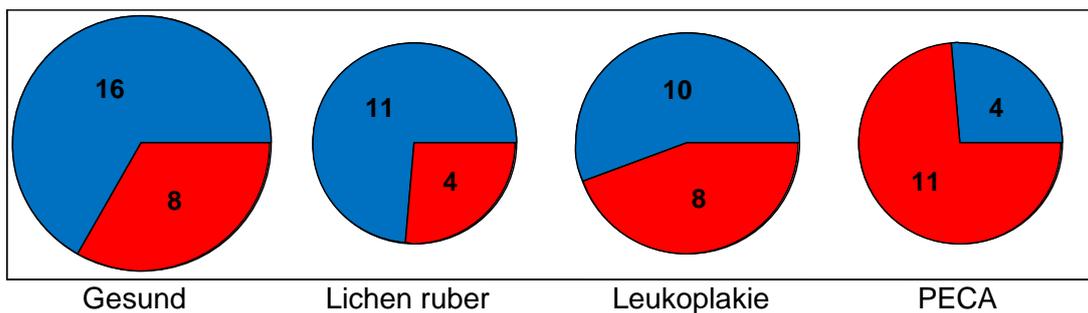


Abbildung 17: Geschlechtsverteilung in den Diagnosegruppen :Die Größe der Kreise stellt die Zahl der Patienten mit der jeweiligen Diagnose dar, die Kreise sind nach Geschlecht unterteilt, ■ = männlich, ■ = weiblich.

60,98 % der Männer und 74,19 % der Frauen wiesen eine Mundschleimhautveränderung auf. Unter den Erkrankten war der orale Lichen ruber planus mit 44 % die häufigste Diagnose der männlichen Probanden. Bei den erkrankten Frauen war diese Diagnose mit 17,39 % deutlich seltener. Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom waren signifikant häufiger weiblich ( $p_c = 0,031$ ) (s. Tabelle 10).

**Tabelle 10. Geschlecht und Diagnosen**

Diagnose	Geschlecht				$p_c$
	männlich		weiblich		
	(n = 41)		(n = 31)		
	n	%	n	%	
gesund	16	39.02%	8	25.81%	
erkrankt	25	60.98%	23	74.19%	0.24
Lichen ruber	11	44.00%	4	17.39%	
Leukoplakie	10	40.00%	8	34.78%	
PECA	4	16.00%	11	47.83%	0.031*

*Anzahl und Prozentsatz der n = 72 Patienten bzw. der 48 Erkrankten. Die Prozente beziehen sich auf die Spalte, d.h. auf das Geschlecht.*

### 3.1.3 Risikofaktoren

Analysiert man die gesammelten Patientendaten in Bezug auf Risikofaktoren einer möglichen malignen Entartung, zeigt sich, dass 30 der 72 Befragten eine positive Raucheranamnese angaben. Der prozentuale Anteil gemessen am Kollektiv lag bei 41,67 %. Lediglich 2,8 % der Befragten gaben täglichen Alkoholkonsum an, diese gehörten zu der Gruppe der Nichtraucher. Die erhobenen Daten stützen sich auf die Auswertung des Anamnesebogens, der während der Untersuchung gemeinsam mit dem Patienten erarbeitet wurde. Die Abweichungen zu üblichen statistischen Erhebungen, in Bezug auf regelmäßigen Alkoholkonsum an vergleichbaren Patientenkollektiven ist auffällig. Diese Diskrepanz deutet darauf hin, dass aufgrund der gezielten Fragestellung nach täglichem Alkoholkonsum, fehlender Anonymität während der Befragung und mangelndem Vertrauensverhältnis zur Doktorandin Falschaussagen getätigt wurden.

**Tabelle 11. Rauchen und Alkoholkonsum**

Diagnose	n	%	95%-CI	
Raucher	30	41.67%	30.35%	53.88%
Alkohol	2	2.78%	0.34%	9.68%

Anzahl und prozentualer Anteil und 95%-CI der Probanden mit Risikofaktoren in der Anamnese. n = 72.

Aus den Angaben der Probanden bezüglich ihres Nikotinkonsums wurden *packyears* (Py) errechnet. Die Anzahl der *packyears* lag im Mittel bei  $30,1 \pm 25,5$  *packyears*. Aufgrund der starken Abweichung von der Gaußschen Normverteilung sei hier noch der Median angegeben. Dieser lag bei 25 *packyears* mit einem 68 %-CI von 8-48 *packyears*. Abbildung 18 zeigt die Anzahl und den prozentualen Anteil der Probanden in Korrelation mit den errechneten *Packyears*.

### Nikotin- und Alkoholkonsum

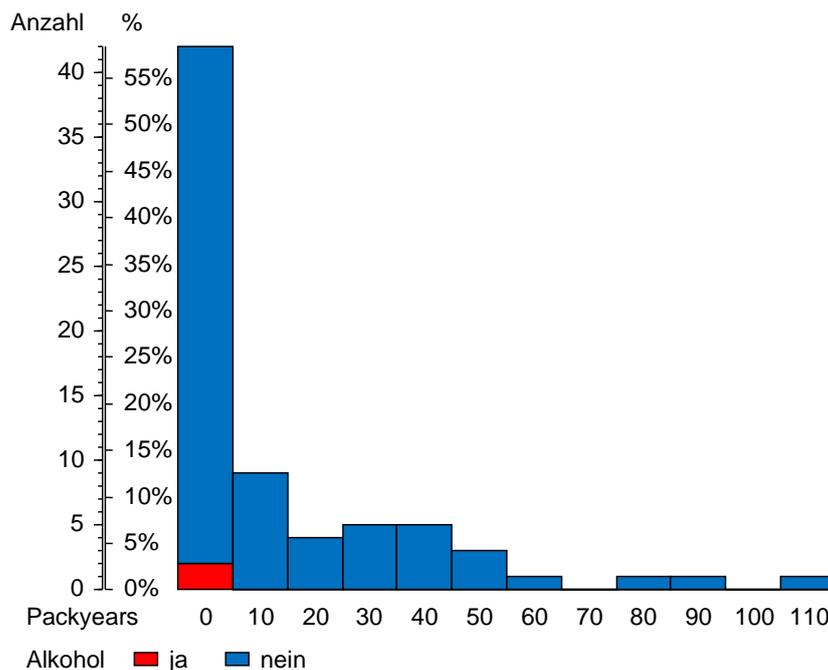


Abbildung 18: Nikotin- und Alkoholkonsum: Die Säulen beschreiben die Anzahl und den prozentualen Anteil der Patienten entsprechend ihrer Risikofaktorexposition. Die Säulen stehen für die individuell errechneten *packyears* und sind zudem nach Alkoholkonsum unterteilt.

### 3.1.3.1 Alter, Geschlecht und Risikofaktoren

Innerhalb der Gruppe der Raucher stieg die Anzahl der *packyears* mit dem Alter signifikant ( $\tau = 0,37$ ,  $p = 0,0039$ ) an. Die Raucher waren jünger als die Nichtraucher, dies jedoch nicht signifikant. Die 2 Patienten, die täglichen Alkoholkonsum angaben, waren beide Nichtraucher, mit 70 und 85 Jahren deutlich älter und weiblich. Beide gehörten in die Probandengruppe mit einem PECA. Unter den 41 männlichen Probanden befanden sich 16 Raucher mit einem prozentualen Anteil von 39 %. 14 der 31 weiblichen Patienten rauchten und erzielten einen Anteil 45 % der gesamten weiblichen Probanden.

Ein Zusammenhang mit dem Geschlecht in Bezug auf den Nikotinkonsum war innerhalb dieses Kollektivs nicht signifikant ( $p_c = 0,60$ ).

### 3.1.3.2 Diagnose und Risikofaktoren

Weiterhin soll nach einem Zusammenhang zwischen der Diagnose und den beschriebenen Risikofaktoren für eine maligne Transformation gesucht werden. Mit 45,83 % war der Anteil der rauchenden Probanden in der Gruppe der Gesunden deutlich größer als der mit 33,33 % in der Gruppe der erkrankten Probanden. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p_c = 0,31$ ). 26,67 % der Lichen-Patienten und 44,44 % der Leukoplakie-Patienten rauchten. 66,67 % der Plattenepithelkarzinom-Patienten waren Raucher und 33,33 % Nichtraucher. Der  $p_c$ -Wert lag hier bei 0,083 und somit geringfügig oberhalb des Signifikanzniveaus. Der prozentuale Anteil der Raucher unter den Lichen-Patienten war geringer als der entsprechende Anteil unter den Leukoplakie-Patienten und den Plattenepithelkarzinom-Patienten (s. Tabelle 12).

**Tabelle 12. Rauchen und Diagnosen**

Diagnose	Rauchen				$p_c$
	Raucher (n = 30)		Nichtraucher (n = 42)		
	n	%	n	%	
gesund	22	45.83%	26	54.17%	0.31
erkrankt	8	33.33%	16	66.67%	
Lichen ruber	4	26.67%	11	73.33%	0.083
Leukoplakie	8	44.44%	10	55.56%	
PECA	10	66.67%	5	33.33%	

Anzahl und Prozentsatz der  $n = 72$  Patienten bzw. der 48 Erkrankten. Die Prozente beziehen sich auf die Zeile, d.h. auf die Diagnose.

Tabelle 13 veranschaulicht das Verhältnis von Diagnose zur gerauchten Menge. Die gesunden Raucher hatten mit durchschnittlich 9,25 deutlich weniger *packyears* als die erkrankten Raucher mit 37,69 ( $p_u = 0,00037$ ). Innerhalb der erkrankten Gruppen mit Mundschleimhautveränderungen konnte bei Lichen-Patienten eine geringere *packyears*-Anzahl festgestellt werden als bei Leukoplakie- und Plattenepithelkarzinom-Patienten. Probanden mit einem *PECA* zeigten mit durchschnittlichen Werten von 44,4 *packyears* den höchsten Nikotinkonsum auf.

**Tabelle 13. Diagnose und gerauchte Menge**

Diagnose	n	PackYears		p
		MW	ST	
gesund	8	9.250	2.121	
erkrankt	22	37.682	25.988	0.00037*** <sub>U</sub>
Lichen ruber	4	24.7500	7.4106	
Leukoplakie	8	35.7500	25.0528	
PECA	10	44.4000	30.6855	0.45 <sub>KW</sub>

*Mittelwert der errechneten packyears in den unterschiedlichen Diagnosegruppen.*

### 3.1.4 Tumorklasse

Um eine detaillierte Analyse der 15 *PECA*-Probanden dieses Kollektivs vornehmen zu können, soll weiterhin das UICC-Stadium der Tumore und ihre TNM-Klassifikation berücksichtigt werden. Betrachtet man die Anzahl und prozentuale Verteilung der *PECA*-Probanden in Bezug auf ihre TNM-Klassifikation und ihr UICC-Stadium, so wird ersichtlich, dass Plattenepithelkarzinom-Patienten dieses Kollektivs zu 40 % einen Tumor der Klasse T2 aufwiesen. Mit prozentualen Anteilen von 20 %, 13,33 % und 26,67 % verteilen sich T1, T3 und T4 fast gleichermaßen auf die nächsten Ränge. In 46,67 % konnten keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. Keiner der Probanden hatte Fernmetastasen. Mäßig differenziertes malignes Gewebe fand sich in 73,33 % der Fälle, schlecht differenziertes malignes Gewebe bei 20 % und undifferenzierte Gewebe bei 6,67 % der *PECA*-Patienten. Ein großer Anteil zeigte keine nachweisbare Infiltration in Venen (93,33 %) oder regionale Lymphbahnen (86,67 %). Eine perineurale Invasion lag bei 33,33 % der *PECAs* vor.

Bei fünf der 15 Probanden zeigte sich nach Einteilung in UICC-Stadien am häufigsten ein *PECA* im Stadium IVa (33,33 %). Stadium III (26,67 %), Stadium II (20 %) und

Stadium I (13,33 %) waren geringfügig seltener vertreten. Nur 6,67 % der PECAs konnten dem Stadium IVb zugeordnet werden (s. Tabelle 14)

**Tabelle 14. Tumorklassen der PECA-Patienten**

		Anzahl	%
pT	T1	3	20.00
	T2	6	40.00
	T3	2	13.33
	T4	4	26.67
pN	N0	7	46.67
	N1	4	26.67
	N2B	1	6.67
	N2C	2	13.33
	N3	1	6.67
G	G2	11	73.33
	G3	3	20.00
	G4	1	6.67
v	0	14	93.33
	1	1	6.67
l	0	13	86.67
	1	2	13.33
n	0	10	66.67
	1	5	33.33
UICC	I	2	13.33
	II	3	20.00
	III	4	26.67
	IVA	5	33.33
	IVB	1	6.67

*Anzahl und prozentualer Anteil der PECA-Patienten unterteilt nach TNM-Klassifikation und UICC-Stadium. n = 15 Patienten*

Eine positive Korrelation zwischen der Höhe des diagnostizierten Stadiums und dem Patientenalter konnte nicht bestätigt werden. Es konnte kein Zusammenhang der Tumorklasse mit dem Alter oder dem Geschlecht festgestellt werden.

### 3.2 Antikörperfärbung

Die Antikörperfärbung wurde unterschiedlichen Parametern gegenübergestellt und im Hinblick auf Bedeutung für die Diagnose maligner Transformation analysiert. Bei 30 (41,67 %) der ausgewerteten 72 Proben konnte ein positiver *GLUT-1* Nachweis erfolgen, wohingegen nur 11 (18,03 %) von 61 auswertbaren Proben positiv auf *SHH* getestet werden konnten (s. Abbildung 19).

#### Nachweis der Antikörper

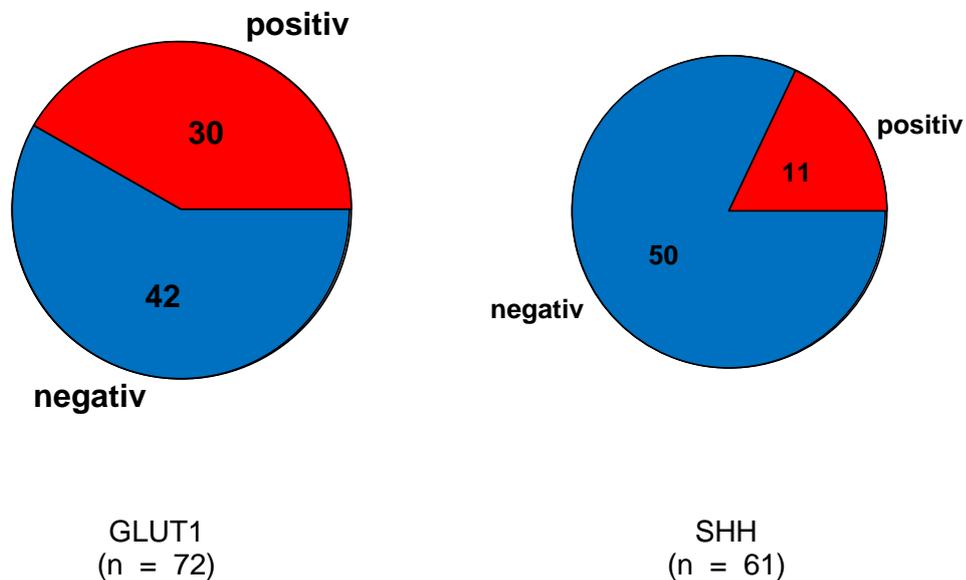


Abbildung 19: Nachweis der Antikörper

Tabelle 15. Anteil der positiven Antikörper

Antikörper	n	gesamt	%	95%-CI	
GLUT1	30	72	41.6667%	30.3521%	53.8756%
SHH	11	61	18.0328%	9.3610%	30.3951%

Anzahl und prozentualer Anteil der positiven Antikörperreaktionen. n = 72. 11 der 72 SHH-Färbungen konnten nicht beurteilt werden.

Bei 61 der 72 Probanden konnten beide Antikörperfärbungen beurteilt und verglichen werden. Zwischen positivem und negativem Befund von *GLUT1* und *SHH* war kein Zusammenhang zu erkennen ( $p = 0,18$ ). Tabelle 16 zeigt, dass unter den *GLUT1*-positiven Befunden sieben Probanden ebenfalls eine positive *SHH*-Färbung aufwiesen. 73,08 % dieser positiven *GLUT1*-Proben waren *SHH*-negativ. 11,43 % der 61 *GLUT1*-negativen

Probanden zeigten einen positiven *SHH*-Befund. Bei 88,57 % der negativen *GLUT1*-Proben konnte auch keine *SHH*-Färbung nachgewiesen werden.

**Tabelle 16. *GLUT1* und *SHH***

<b>SHH</b>	<b>GLUT 1</b>				<b>p<sub>fy</sub></b>
	positiv (n = 26)		negativ (n = 35)		
	n	%	n	%	
positiv	7	26.92%	4	11.43%	0.18
negativ	19	73.08%	31	88.57%	

Anzahl und Prozentsatz von n = 61 Patienten. Die Prozente beziehen sich auf die Spalte, d.h. auf *GLUT1*.

### 3.2.1 Alter, Geschlecht und Antikörper

Um eine Aussage bezüglich des Färbeverhaltens der Proben vornehmen zu können, sollte zunächst ein Zusammenhang zwischen dem Alter, dem Geschlecht und dem Ergebnis der Färbung hergestellt werden. *SHH*-positive Probanden waren durchschnittlich 60,7±18,6 Jahre alt, *SHH*-negative 53,1±14,6 Jahre. Unter den *GLUT1*-positiven Probanden lag das Durchschnittsalter bei 62,7±10,2 Jahren. *GLUT1*-negative Probanden waren signifikant jünger (p<sub>u</sub> = 0.00026) (s. Tabelle 17).

**Tabelle 17. Alter und Antikörper**

<b>Antikörper</b>		<b>n</b>	<b>MW</b>	<b>ST</b>	<b>p<sub>u</sub></b>
<b>Alter [Jahre]</b>					
<b>GLUT1</b>	positiv	30	62.720	10.193	0.00026***
	negativ	42	49.018	15.540	
<b>SHH</b>	positiv	11	60.695	18.557	0.14
	negativ	50	53.099	14.600	

Mittelwert und ST der Probanden mit positiver bzw negativer Antikörperreaktion, n = 72, bzw. n = 61 Proben

Bei der Betrachtung des Zusammenhanges zwischen dem Geschlecht und den Resultaten der Antikörperfärbung fällt auf, dass unter den männlichen Probanden 36,59 % *GLUT1*-positiv und 5,71 % *SHH*-positiv waren. Weibliche Probanden zeigten zu 48,39 % einen positiven *GLUT1*- und zu 34,62 % einen positiven *SHH*-Befund. Negative *SHH*-Proben fanden sich signifikant häufiger bei männlichen Probanden (p<sub>fy</sub> = 0,0059) (s. Tabelle 18).

**Tabelle 18. Geschlecht und Antikörper**

Antikörper		Geschlecht				p
		männlich		weiblich		
		n	%	n	%	
GLUT1	positiv	15	36.59%	15	48.39%	0.31 <sub>c</sub>
	negativ	26	63.41%	16	51.61%	
SHH	positiv	2	5.71%	9	34.62%	0.0059** <sub>fy</sub>
	negativ	33	94.29%	17	65.38%	

Anzahl und Prozentsatz der n = 72 bzw. der 61 Proben mit positiver bzw. negativer Antikörperreaktion. Die Prozente beziehen sich auf die Spalte, d.h. auf das Geschlecht.

### 3.2.2 Diagnose und Antikörper

Die histologisch gesicherte Diagnose durch den Pathologen und die hierbei erfolgte Beurteilung der Malignität des Gewebes wurde nun auf Zusammenhänge mit den Resultaten der Antikörperfärbung geprüft. Alle gesunden Probanden waren *GLUT1*-negativ. Patienten mit Mundschleimhautläsionen waren signifikant häufiger *GLUT1*-positiv ( $p_c = 0,00000005$ ). 30 der 48 erkrankten Probanden hatten einen *GLUT1*-positiven Befund. Unter diesen Probanden konnte bei 80 % der *PECA*-, bei 60 % der Lichen- und bei 50 % der Leukoplakie- Patienten eine positive Färbung nachgewiesen werden. Leukoplakie-Patienten mit Dysplasie waren nicht signifikant häufiger *GLUT1*-positiv als Leukoplakie-Patienten mit Dysplasie (s. Tabelle 19).

**Tabelle 19. Diagnosen und *GLUT1***

Diagnose	GLUT1				p <sub>c</sub>
	positiv		negativ		
	n	%	n	%	
gesund	0	0.00%	24	100.00%	<0.00000005*** <sub>c</sub>
erkrankt	30	62.50%	18	37.50%	
Lichen ruber	9	60.00%	6	40.00%	0.19 <sub>c</sub>
Leukoplakie <sup>*)</sup>	9	50.00%	9	50.00%	
PECA	12	80.00%	3	20.00%	
keine Leukoplakie	21	38.89%	33	61.11%	0.58 <sub>c</sub>
Leukoplakie ohne Dysplasie	7	46.67%	8	53.33%	
Leukoplakie mit Dysplasie	2	66.67%	1	33.33%	

Anzahl und Prozentsatz der n = 72 Patienten bzw. der 48 Erkrankten. Die Prozente beziehen sich auf die Zeile, d.h. auf die Diagnose. \*) Die 3 Patienten mit Dysplasie sind in dieser Gruppe enthalten.

Die Analyse der *SHH*-Färbung zeigt hingegen, dass bei 9,09 % der gesunden Probanden eine *SHH*-Expression festgestellt werden konnte. Unter den erkrankten Probanden konnten ausschließlich und somit signifikant häufiger *PECA*-Patienten mit einem *SHH*-positiven Befund beobachtet werden ( $p_c = 0,000018$ ). Bei 60 % der *PECA*-Probanden konnte ein positiver *SHH*-Nachweis erbracht werden. 40 % der 15 *PECA*-Probanden lieferten allerdings *SHH*-negative Ergebnisse (s. Tabelle 20).

**Tabelle 20. Diagnosen und *SHH***

Diagnose	SHH				p
	positiv		negativ		
	n	%	n	%	
gesund	2	9.09%	20	90.91%	
erkrankt	9	23.08%	30	76.92%	0.30 <sub>fy</sub>
Lichen ruber	0	0.00%	13	100.00%	
Leukoplakie	0	0.00%	11	100.00%	
PECA	9	60.00%	6	40.00%	0.000018 *** <sub>c</sub>
keine Leukoplakie	11	22.00%	39	78.00%	
Leukoplakie ohne Dysplasie	0	0.00%	8	100.00%	
Leukoplakie mit Dysplasie	0	0.00%	3	100.00%	0.38 <sub>mp</sub>

Anzahl und Prozentsatz der  $n = 61$  Patienten bzw. der 39 Erkrankten. Die Prozente beziehen sich auf die Zeile, d.h. auf die Diagnose.

Die Ergebnisse dieser immunzytochemisch gefärbten Bürstenbiopsien können weiterhin mit der histopathologisch gestellten Diagnose verglichen und auf die erreichte Sensitivität und Spezifität dieser non-invasiven Früherkennungsmethode geprüft werden.

Gemessen am Goldstandard Skalpellbiopsie konnten durch die *GLUT1*-Färbung 80 % der untersuchten *PECA*s als malignes Gewebe richtig zugeordnet werden. 68,42 % der als nicht maligne eingestuften Läsionen lieferten einen korrekten negativen Befund. Bei drei gesicherten *PECA*-Patienten konnte mittels *GLUT1*-Färbung kein Nachweis maligner Transformation erbracht werden. Falsch positive Ergebnisse wurden bei 18 Patienten ohne *PECA* nachgewiesen, diese lieferten bei der Beurteilung der Skalpellbiopsie keinen Anhalt für Malignität und wurden als Lichen und Leukoplakie diagnostiziert.

**Tabelle 21. Sensitivität und Spezifität von GLUT1**

			GLUT1	PECA	n	%
<b>GLUT1</b>	Sensitivität	richtig positiv	+	+	12	80.00%
	Spezifität	richtig negativ	–	–	39	68.42%
		falsch negativ	–	+	3	20.00%
		falsch positiv	+	–	18	31.58%

$n = 72$ , Goldstandard PECA, PECA positiv = 15, PECA negativ = 57,  $p_c = 0.00063^{***}$

Mit Hilfe der SHH-Färbung wurden 60 % der PECA-Probanden richtig erkannt. 95,65 % des Kollektivs der benignen Läsionen und gesunder Mundschleimhaut konnten ebenfalls richtig eingestuft werden. Sechs der 15 PECA-Probanden lieferten falsch negative Ergebnisse. Zwei gesunde Probanden lieferten falsch positive Resultate.

**Tabelle 22. Sensitivität und Spezifität von SHH**

			SHH	PECA	n	%
<b>SHH</b>	Sensitivität	richtig positiv	+	+	9	60.00%
	Spezifität	richtig negativ	–	–	44	95.65%
		falsch positiv	–	+	2	4.35%
		falsch negativ	+	–	6	40.00%

$n = 61$ , Goldstandard PECA, PECA positiv = 15, PECA negativ = 46  $p_{fy} = 0.000013^{***}$

### 3.2.3 Risikofaktoren und Antikörper

Um den Einfluss der Risikofaktoren auf das Färbeverhalten mit dem Einfluss der Diagnose vergleichen zu können, wurde zunächst das Kollektiv der Raucher und das der Nichtraucher auf den prozentualen Anteil Antikörper-positiver Proben analysiert. Der Vergleich der Raucheranamnese ergab, dass 53 % der Raucher GLUT1-positiv waren. Unter den Nichtrauchern betrug der prozentuale Anteil der GLUT1-positiven Befunde 33.33 %. Die Auswertung der SHH-Färbung ergab für 28 % der Raucher positive Ergebnisse. SHH-positive Nichtraucher stellten 11,11 % des Kollektivs. Beide Antikörper lieferten hier insignifikante Resultate (s. Tabelle 23).

**Tabelle 23. Rauchen und Antikörper**

		Rauchen				p
		Raucher		Nichtraucher		
		n	%	n	%	
GLUT1	positiv	16	53.33%	14	33.33%	0.090 <sub>c</sub>
	negativ	14	46.67%	28	66.67%	
SHH	positiv	7	28.00%	4	11.11%	0.17 <sub>fy</sub>
	negativ	18	72.00%	32	88.89%	

Anzahl und Prozentsatz der n = 72 bzw. 61 Patienten. Die Prozente beziehen sich auf die Spalte, d.h. auf die Rauchgewohnheit.

GLUT1-positve Probanden kamen durchschnittlich auf 40,13 *packyears* und hatten ca. 20 *packyears* mehr als GLUT1-negative Patienten (p = 0,012). SHH-positve Patienten kamen auf einen Mittelwert von 37,42 *packyears*. Bei SHH-negativen Befunden konnten insignifikant weniger *packyears* errechnet werden als bei SHH-Positiven (s. Tabelle 24).

**Tabelle 24. Gerauchte Menge und Antikörper**

		n	packyears		p
			MW	ST	
GLUT1	positiv	16	40.125	28.740	0.012*
	negativ	14	18.643	15.495	
SHH	positiv	7	37.429	34.607	0.57
	negativ	18	28.500	23.710	

### 3.2.4 Tumorklasse und Antikörper

Die Untersuchung des Färbeverhaltens in Bezug auf die Einteilung der PECA nach TNM-Klassifikation und UICC-Stadium brachte keinerlei Abhängigkeiten. Die Vermutung, dass die Expression von GLUT1 und SHH mit der Größe des Tumors, dem Lymphknotenstatus oder dem Auftreten von Fernmetastasen zusammenhängt, ließ sich in dieser Studie nicht bestätigen.

### **3.3 Nicht verwertbare Proben**

Bei der detaillierten Analyse dieser non-invasiven Früherkennungsmethode wurde zudem die Anzahl nicht verwertbarer Proben berücksichtigt. Alle *GLUT1*-Färbungen lieferten ausreichend Material für eine Beurteilung. Bei 11 *SHH*-Färbungen (15,3 %) konnte nicht ausreichend Zellmaterial auf den Objektträgern gesichert werden. Der 95 %-CI dieses Prozentsatzes lag bei 7,88 % bis 26.12 %.

#### **3.3.1 Alter, Geschlecht und nicht verwertbare Proben**

Es konnte kein Zusammenhang zwischen unzureichendem Material, dem Alter und dem Geschlecht der Probanden festgestellt werden.

#### **3.3.2 Diagnose und nicht verwertbare Proben**

Nicht verwertbare Proben fanden sich nur im Zusammenhang mit der *SHH*-Färbung. 7 (38,89 %) Leukoplakie-Patienten konnten nicht in die Studie eingeschlossen werden und stellten den größten Anteil der nicht verwertbaren Proben. 2 (13,89 %) der Lichen-Patienten und 2 (8,33 %) der gesunden Probanden konnten ebenfalls nicht in die Studie eingeschlossen werden. Patienten mit *PECA*-Diagnose konnten in 100% der Fälle ausgewertet werden. Alle nicht auswertbaren Leukoplakie-Proben stammten von Patienten ohne Dysplasie.

#### **3.3.3 Risiken und nicht verwertbare Proben**

Die Annahme, dass eine hohe Risikofaktorexposition die Verwertbarkeit der Proben beeinflusst, ließ sich nicht bestätigen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen nicht verwertbaren Proben und den Risikofaktoren der Probanden nachgewiesen werden.

#### **3.3.4 Tumorklasse und verwertbare Proben**

Alle *PECA*-Proben lieferten ausreichend Zellmaterial. Es bestand somit kein Zusammenhang zwischen nicht auswertbarem Probenmaterial und der Einteilung der *PECAs* nach TNM und UICC.

## 4. Diskussion

### 4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Autoren

#### 4.1.1 Korrelation des Färbeverhaltens mit der Diagnose

##### ***GLUT1*- Expression innerhalb der diagnostisch erstellten Probandengruppen und Korrelation mit der TNM-Klassifikation und dem UICC-Stadium**

Der Schwerpunkt dieser experimentellen, prospektiven Studie befasst sich mit der Expression der untersuchten Tumormarker in gesunder Mundschleimhaut, prämaligen und malignen Veränderungen. Die Unterscheidung, die klinisch häufig Probleme bereiten kann, soll durch eine geeignete Methode der Früherkennung maligner Veränderung erleichtert werden. In der durchgeführten Analyse lieferten alle 24 Probanden mit klinisch gesund erscheinender Mundschleimhaut keinen Anhalt für eine *GLUT1*-Überexpression. Vergleichbare Studien anderer Autoren, die eine immunhistochemische Analyse an Kryoschnitten gesunder Mundschleimhaut durchführten, zeigen ähnliche Ergebnisse.

*Reisser et al.* konnten an einem Patientenkollektiv mit 34 Probanden feststellen, dass sich die Expression von *GLUT1* im gesunden epithelialen Gewebe auf die basale Zellschicht begrenzt. Die Färbung wurde hier als schwach und unregelmäßig beurteilt und konnte einer deutlichen Expression im endothelialen Gewebsanteil gegenübergestellt werden. Des Weiteren konnte eine Zunahme der Expression ausgehend von gesunder Mundschleimhaut, über frühe dysplastische Läsionen bis hin zum gesicherten Plattenepithelkarzinom beobachtet werden [108].

Da diese Studie glatte Schnitte zur Beurteilung heranzog, stellt sich die Frage ob es zwischen den Methoden starke Unterschiede in der Genauigkeit gibt. Die Entnahme mittels rigiden Borsten kann, im Gegensatz zur Skalpellbiopsie, nur Epithelfragmente liefern [56]. Die Sicherung und Beurteilung der kompletten basalen Zellschicht am Entnahmeort ist mittels Bürstenbiopsie nicht durchführbar. Relevante Zellschichten der untersuchten gesunden Kontrollgruppe, die eine mögliche intraepitheliale Neoplasie beinhalten können, wurden in der vorliegenden Studie als *GLUT1*- negativ beurteilt.

Arbeitsgruppen, die sich mit der Expression von *GLUT1* in gesund imponierender Mundschleimhaut beschäftigten, bestätigten bereits vor Jahren, dass *GLUT1* in basalen und parabasalen Zelllagen nachweisbar ist [123, 124]. Darüber hinaus können Zusammenhänge der Expression mit der Keratinisierung der Zellen vermutet werden [125].

Gesunde Mundschleimhaut kann in zwei Kompartimente unterteilt werden: Während oberflächliche Zellschichten gut differenziert sind, beinhalten basale Zelllagen gesunder Mundschleimhaut undifferenzierte, proliferierende Zellen [126]. Im Verlauf des Prozesses der Karzinogenese verschiebt sich dieses Gleichgewicht zu Gunsten des undifferenzierten, proliferierenden Kompartiments, was in einer vermehrten *GLUT1*-Expression resultiert.

*Rudlowski et al.* konnten vergleichbare Ergebnisse bei der Untersuchung der malignen Transformation am Gebärmutterhals vorweisen. Hier konnte mittels Immunhistochemie und *In-situ*-Hybridisierung gezeigt werden, dass mit zunehmendem Dysplasiegrad auch eine Zunahme der *GLUT1*-Expression einhergeht. Des Weiteren konnte mit steigender Expression ein reduzierter Glykogengehalt beobachtet werden [127]. Dieser Sachverhalt verdeutlicht, dass eine Korrelation zwischen der gesteigerten *GLUT1*-Expression und Veränderungen im Glukosemetabolismus zugunsten der aeroben Glykolyse zu bestehen scheinen (*Warburg Effekt*) [101].

Betrachtet man die vorliegende Arbeit und die Ergebnisse der Probanden mit prämaligen Veränderungen, wird ersichtlich, dass 60 % der Lichen-Patienten und 50 % der Leukoplakie-Patienten, die histopathologisch keinen Anhalt für Malignität lieferten, *GLUT1*-positiv waren. Hierunter befanden sich lediglich drei Patienten mit einer histologisch gesicherten Dysplasie, bei denen entsprechend der Ergebnisse von *Reisser et al.* eine gesteigerte *GLUT1*-Expression vermutet werden konnte.

15 Probanden mit einer klinisch imponierenden Leukoplakie lieferten histologisch nicht ausreichend Kriterien für eine Dysplasie, zeigten jedoch *GLUT1*-positive Ergebnisse. Dieser Sachverhalt lässt vermuten, dass die vermehrte Expression von *GLUT1* ein frühes Ereignis der Karzinogenese darstellt [126, 128] und morphologischen Veränderungen voranzugehen scheint. Bei drei der 18 untersuchten Probanden mit einer Leukoplakie konnte histopathologisch eine geringgradige Dysplasie (*SINI*) nachgewiesen werden. Hiervon reagierten zwei dysplastische Läsionen *GLUT1*-positiv (66,67 %). Ein atypische Keratinisierung und eine Zunahme der Mitosezahl gehören zu den morphologischen Kriterien

einer frühen dysplastischen Veränderung [50]. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass Leukoplakien, die histopathologisch als dysplasiefrei beurteilt wurden, eine erhöhte *GLUT1*-Expression aufweisen können und somit künftige morphologische Veränderungen in Betracht gezogen werden sollten.

Weiterhin konnten bei neun Lichen-Patienten, die im Rahmen dieser Studie histopathologisch als dysplasiefrei beurteilt wurden, *GLUT1*-positive Ergebnisse festgehalten werden. Kritisch beurteilt, konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass sowohl der prämaligne Charakter dieser Grunderkrankung als auch Kriterien zur klinischen und histologischen Sicherung der Diagnose des oralen Lichen planus Raum für Diskussionen bieten [68]. Von zahlreichen Autoren wird der prämaligne Charakter dem Auftreten einer möglichen dysplastischen Läsion, und weniger der Grunderkrankung selbst, zugeschrieben [66]. Studien haben zudem gezeigt, dass die Diagnosestellung des oralen Lichen planus und die Beurteilung einer Dysplasie Untersucherabhängig zu sein scheint [129].

*Burstein et al.* zeigten durch die Analyse von gesunder, hyperplastischer und neoplastischer Mundschleimhaut, dass eine Zunahme der *GLUT1*-Expression entsprechend der histologischen Einstufung beobachtet werden kann. Die Färbung der gesunden Mundschleimhaut wurde hier als negativ oder sehr schwach beurteilt, während im Falle einer Hyperplasie basale Zellen, vor allem im Bereich der Reteleisten, verstärkt anfärbbar waren. *SINI*-Läsionen konnten mittels zunehmender *GLUT1*-Färbung bereits gut von gesunden Proben unterschieden werden. Läsionen, die als *SIN3* eingestuft wurden zeigten eine deutliche Überexpression [126]. Diese Studie bestätigt somit die Korrelation der *GLUT1*-Expression mit der Zunahme des Risikos maligner Transformation.

Ein weiterer Aspekt, der den hohen Anteil an gefärbten, dysplasiefreien Läsionen erklärt, ist der, dass Läsionen, die einer Leukoplakie oder dem oralen Lichen planus zugeschrieben werden, häufig proliferative Prozesse aufweisen. Eine Überlagerung durch sekundäre Entzündungsprozesse und die entzündliche Komponente der Grunderkrankung beeinflussen das Proliferationsverhalten an derartigen Läsionen. *Woo et al.* konnten zeigen, dass die Diagnosestellung einer Leukoplakie kritisch beurteilt werden muss und, dass Läsionen ohne Anzeichen einer Dysplasie proliferative und entzündliche Bereiche aufweisen können [130]. Des Weiteren können durch den chronischen Verlauf des Lichen planus Entzündungszellen und Zytokine auf Mundschleimhautzellen einwirken und dort entscheidende, den Zellzyklus und die Proliferation betreffende, Mechanismen beeinflussen

[131]. *Mochizuki et al.* demonstrierten anhand von Tiermodellen, dass sowohl malignes als auch entzündlich verändertes Gewebe eine erhöhte *GLUT1*-Expression aufweist. Die Expressionsrate in malignem Gewebe war hierbei signifikant höher [132]. Dies untermauert die in dieser Studie aufgestellten Hypothesen möglicher Ursachen für die höhere *GLUT1*-Expressionsrate der potentiell prämaligen Läsionen.

Weiterhin zeigten auch zwölf der 15 der Plattenepithelkarzinome (80 %) in dieser Studie eine *GLUT1*-positive Färbung und bestätigen die bereits beschriebene Studie von *Reisser et al.* entsprechend einer Zunahme der Expression in malignem Gewebe [108]. Drei der 15 *PECA*-Probanden zeigten keinerlei Hinweis auf eine *GLUT1* Expression und wurden als negativ beurteilt. Bei der Analyse *GLUT1*-positiver und -negativer *PECA*-Proben konnte keinerlei Abhängigkeit mit der TNM-Klassifikation oder dem UICC Stadium der Tumore festgestellt werden.

Eine vergleichbare Expressionsrate konnte von *Oliver et al.* in einer retrospektiven immunhistochemischen Analyse an 54 *PECAs* festgehalten werden. Hier wurden bei 49 Probanden positive Färbungen nachgewiesen (90,7 %) und 20 Probanden wurden als schwach gefärbt beurteilt [96].

Einen höheren Anteil *GLUT1*-positiver *PECAs* wies *Ayala et al.* bei der immunhistochemischen Analyse von 142 oralen Plattenepithelkarzinomen nach. Hier wurden bei 135 Probanden (95 %) *GLUT1*-positive Befunde gesichert. 50,3 % dieser Probanden zeigten eine membranöse Färbung, 49,7 % eine nukleäre Expression. Kontrollen an gesunder Mundschleimhaut zeigten eine nicht detektierbare oder sehr schwache Expression von *GLUT1* [105].

*Ohba et al.* kamen zu einem vergleichbaren Ergebnis: Alle immunhistochemisch untersuchten *PECAs* (n = 24) exprimierten *GLUT1*. 45,8 % zeigten eine intensive, 54,2 % eine schwache Färbung [128].

Untersuchungen an Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms von *Fukuzumi et al.* zeigten mittels *RT-PCR*, dass alle analysierten Zelllinien eine gesteigerte *GLUT1*-Expression aufweisen, die ebenfalls in unterschiedlichen Ausprägungen detektiert werden konnte [104].

Im Vergleich dazu zeigte die Arbeit von *Eckert et al.* eine immunhistochemisch nachweisbare Expression in weitaus weniger Fällen auf. Lediglich 59 % (n = 79) konnten als

deutlich *GLUT1*-positiv bewertet werden. Darunter befanden sich schwache, moderate und starke Färbeergebnisse. Eine Korrelation mit der Tumorgröße (T), dem Lymphknotenstatus (N) oder dem Differenzierungsgrad (G) konnte nicht festgestellt werden [99].

Zu vergleichbaren Ergebnissen bezüglich der Korrelation der Färbung mit der TNM-Klassifikation kamen auch *Tian et al.* bei der Untersuchung von 19 *PECAs*: Präoperative Untersuchungen in Bezug auf die *FDG*-Akkumulation mittels *PET* und postoperative immunhistochemische Analysen der *GLUT1*-Expression zeigten keine signifikanten Zusammenhänge. *GLUT1*-positive *PECAs* erzielten einen Anteil von 94,7 % und zeigten keine Korrelation mit dem Differenzierungsgrad des Tumors oder der Tumorgröße [133].

Eine entsprechende Studie bezüglich der Zusammenhänge der *FDG*-Akkumulation und der *GLUT1*-Expression an immunhistochemisch gefärbten Inzisionsbiopsien lieferten *Yamada et al.* für 36 Probanden. Hier konnten ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang der *GLUT1*-Expression mit T oder N gefunden werden [134].

Untersuchungen von *Zhou et al.* an Kopf-Hals-Tumoren konnten zeigen, dass eine *GLUT1*-Expression zu 78,9 % immunhistochemisch nachweisbar war und bestätigen somit die Ergebnisse dieser Arbeit. Eine dabei durchgeführte vergleichende Untersuchung mittels *RT-PCR* bestätigte die hohe *GLUT1*-Expression auf genetischer Ebene. Die Arbeitsgruppe konnte jedoch signifikante Zusammenhänge mit dem Lymphknotenstatus und dem klinischen Tumorstadium festhalten. Eine Korrelation mit dem Differenzierungsgrad wurde nicht nachgewiesen [135].

Der Vergleich dieser Ergebnisse mit der Analyse von *Mellanen et al.* an 20 Kopf-Hals-Tumoren zeigt, dass diese Arbeitsgruppe ebenfalls eine erhöhte *GLUT1*-Expression mit deutlich erhöhtem Level an *mRNA* nachweisen konnte. Zusammenhänge mit dem Differenzierungsgrad des Tumors konnten nicht nachgewiesen werden [107] und bestätigen somit das Ergebnis der vorliegenden Studie.

Zusammenfassend lässt sich -analog der Ergebnisse anderer Autoren- eine deutlich erhöhte *GLUT1*-Expressionsrate für *PECAs* feststellen. Vergleichbar ist ebenso der Anteil an *GLUT1*-negativen Testergebnissen *PECA*-Probanden.

*Zhou et al.* zeigten auf, dass bei *PECA*-Probanden eine deutliche *GLUT1*-Überexpression auf genetischer Ebene detektierbar ist. In der gleichen Studie konnten jedoch nur bei

78,9% *GLUT1* auf Proteinebene nachgewiesen werden. Als Ursache vermutet die Arbeitsgruppe unter anderem insuffiziente Expression auf Translationsebene oder Dehydratation und daraus resultierenden Verlust der Immunogenität[135].

Da sich die meisten der erwähnten Studien der Immunhistochemie als Nachweismethode bedienen, sind sie ebenso nur eingeschränkt mit der zytologischen Untersuchungsmethode dieser Arbeit vergleichbar. Es kann vermutet werden, dass sich die geringfügig höheren Expressionsraten anderer Autoren durch übersichtlichere Beurteilungsmöglichkeiten glatter Schnitte erklären lassen.

So konnte *Ayala et al.* aufzeigen, dass eine erhöhte *GLUT1*- Expression bei schlecht differenzierten *PECAs* vor allem in zentralen und perinekrotischen Zonen beobachtet werden konnte. Wohingegen gut differenzierte *PECAs* eine Färbung in peripheren Bereichen aufwiesen [105]. Dieser Sachverhalt könnte das Auftreten falsch negativer Testergebnisse innerhalb dieser Studie begreiflich machen. Die Probenentnahme erfolgte überwiegend im Zentrum der Läsion und konnte unter Umständen nicht ausreichend Zellmaterial aus peripheren Bereichen sichern.

Des Weiteren konnten *Oliver et al.* in ihrer Studie aufzeigen, dass bei einem Anteil der *GLUT1*-positiven Probanden überwiegend basale Epithelschichten eine positive Färbung zeigten, während oberflächlichere Schichten eine schwache oder gar keine Färbung aufwiesen [96]. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass falsch negative Ergebnisse auf unzureichend Zellmaterial aus basalen Zellschichten zurückgeführt werden könnten.

Die Bürstenbiopsie liefert lediglich zytologisches Material zur Beurteilung und erlaubt daher keine Gegenüberstellung des Färbeverhaltens unterschiedlicher Epithelschichten. Jedoch veranschaulichen die vorliegenden Ergebnisse die Komplexität und Bedeutung der *GLUT1*-Expression zum einen als frühes Ereignis der Karzinogenese aber auch als Antwort auf hypoxische Bedingungen im Verlauf maligner Transformation [126].

### ***SHH* Expression innerhalb der diagnostisch erstellten Probandengruppen und Korrelation mit der TNM-Klassifikation und dem UICC-Stadium**

In den vergangenen Jahren konnte eine Aktivierung des *SHH*-Signalwegs mit dem Prozess der Karzinogenese in Verbindung gebracht werden. Mechanismen, die diese Aktivierung in Gang setzen, werden in sporadischen Mutationen der Komponenten dieser

Signalkaskade vermutet, aber auch durch eine erhöhte *SHH*-Ligand-Expression unterhalten [113]. Obwohl in den vergangenen Jahren gezeigt werden konnte, dass der *SHH*-Signalweg bei zahlreichen Tumorentitäten eine entscheidende Rolle spielt [113], existieren nur wenige Studien, die sich mit der Expression von *SHH* im oralen Plattenepithelkarzinom auseinandersetzen.

In der vorliegenden Studie konnten 61 *SHH*-Färbungen beurteilt werden. Bei 90,01 % der gesunden Probanden konnte keine *SHH*-Expression nachgewiesen werden. Zwei Proben zeigten eine positive Reaktion.

Die Analyse der Probanden mit Mundschleimhautläsionen brachte signifikante Ergebnisse und zeigte lediglich für *PECA*-Patienten *SHH*-positive Ergebnisse ( $p = 0,000018$ ). 100 % der 13 untersuchten Lichen-Patienten und 100 % der elf ausgewerteten Leukoplakie-Patienten wiesen keine erhöhte *SHH*-Expression auf. Unter diesen Leukoplakien befanden sich drei Patienten mit einer histologisch gesicherten Dysplasie (*SINI*). Neun der 15 untersuchten Plattenepithelkarzinome (60 %) lieferten *SHH*-positive Ergebnisse, Zusammenhänge mit der TNM-Klassifikation und dem UICC-Stadium konnten nicht festgestellt werden.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis gelangten auch *Schneider et al.* im Rahmen ihrer Studie an Plattenepithelkarzinomen der Haut und Mundschleimhaut im Jahre 2011. Hier konnte bei der Untersuchung von gesunder Mundschleimhaut und bei 43 % der oralen *PECA*s immunhistochemisch keine *SHH*-Expression nachgewiesen werden. 43 % der *PECA*s zeigten eine schwache, 11 % eine moderate und 2 % eine intensive Färbung [136].

Immunhistochemische Analysen von *Wang et al.* zeigen eine höhere Expressionsrate. 72,5 % der untersuchten oralen Plattenepithelkarzinome wiesen hier eine hohe *SHH*-Expression auf. Es bestand kein Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad, der Tumorgröße, dem Lymphknotenstatus und dem Auftreten von Fernmetastasen. Tumorfrees Kontrollgewebe stammte aus benachbarten Mundschleimhautregionen des gleichen Probanden und konnte als negativ oder schwach gefärbt beurteilt werden [120].

Durch die Verwendung glatter Schnitte als Probenmaterial konnte hier eine Beurteilung des gesamten Epithels und des angrenzenden Stromas erfolgen, wohingegen die Bürstenbiopsie lediglich Epithelfragmente liefert [50]. *Yauch et al.* demonstrierten, dass der *SHH*-Ligand weniger eine Aktivierung des Signals im Tumorepithel bewirkt als vielmehr

eine Aktivierung der Signalkaskade innerhalb des Stroma auslöst [137]. Die bessere Beurteilungsmöglichkeit des malignen Gewebes innerhalb seiner benachbarten Strukturen könnte also die geringfügig höhere Expressionsrate der Immunhistochemie gegenüber den zytologischen Untersuchungsverfahren erklären und das Auftreten falsch negativer Ergebnisse innerhalb dieser Studie begreiflich machen.

Eine Aktivierung dieses Signalwegs konnten auch *Nishimaki et al.* bestätigen. Diese Arbeitsgruppe analysierte die *SHH*-Expression an Zelllinien des oralen *PECA*s. Mittels *RT-PCR* konnten hier erhöhte Expressionsraten bei fünf der 14 Zelllinien nachgewiesen werden. Alle fünf zeigten auch erhöhte Expressionsraten für *PTCHD1*, *SMO* und *GLI1* [138]. Auch *Fan et al.* zeigten in einer Studie an 74 *PECA* signifikante Unterschiede der Expressionsrate beim Vergleich mit gesundem Kontrollgewebe [139].

Zu einem alternativen Ergebnis gelangten *Leovic et al.* mittels qRT-PCR für 64 Patienten mit oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen. Sowohl die gesunde Kontrollgruppe (n = 6) als auch die *PECA*-Probanden zeigten eine *SHH*-Expression, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. Eine erhöhte *SHH*-Expression konnte häufig im umliegenden Stroma detektiert werden. Die Aktivierung des Signalwegs im Zuge der Karzinogenese wurde auch hier bestätigt [140].

*Cavicchioli Buim et al.* hingegen konnten beim Vergleich der *SHH*-Expressionsrate bei gesunden Probanden und *PECA*-Patienten keine Unterschiede nachweisen. Immunhistochemische Analysen und quantitative *Real-time PCR* brachten innerhalb der gesunden Kontrollgruppe (n = 3) keine Hinweise auf eine *SHH*-Expression. Nichtneoplastische Gewebeproben der Tumorpatienten konnten ebenfalls negativ bewertet werden, zeigten jedoch geringe *GLI-1* Expressionsraten. Alle 30 untersuchten *PECA*s zeigten keinen Hinweis auf eine *SHH*-Expression aber deutliche Überexpressionen für *PTCHD1*, *SMO* und *GLI-1* [141].

Diese zum Teil differenten Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeitsgruppen demonstrieren, dass trotz nicht nachweisbarer *SHH*-Expression eine Aktivierung dieser Signalkaskade detektiert werden kann. Zahlreiche Autoren beschreiben, dass sowohl Mutationen der einzelnen *SHH*-Signalwegkomponenten [113], als auch zusätzliche kompensatorische Mechanismen und alternative Signaltransduktionswege zu einer Expression der Zielgene führen können [118]. Dieser Sachverhalt liefert eine mögliche Erklärung für das

Auftreten falsch negativer Ergebnisse innerhalb der *PECA*-Probandengruppe dieser Studie.

In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich *PECA*-Proben (60 %) und gesunde Probanden (9,09 %) als *SHH*-positiv bewertet. Prämaligne Schleimhautläsionen, mit und ohne Dysplasie, zeigten keine nachweisbare *SHH*-Expression. Falsch positive Ergebnisse traten lediglich in der gesunden Kontrollgruppe auf. Dieser Umstand lässt vermuten, dass weitere Auslöser der Aktivierung des *SHH*-Signalwegs nicht auszuschließen sind [140, 142].

*Xuan et al.* lieferten geringfügig abweichende Ergebnisse bei einer immunhistochemischen Analyse des Gebärmutterhalskarzinoms und seiner Vorläuferläsionen. Normales Epithel lieferte hier eine Expressionsrate von 9 % und wurde als schwach gefärbt beurteilt. *SIN1* Läsionen wurden zu 50 %, *SIN2* zu 60 % und *SIN3* zu 68 % als *SHH*-positiv bewertet und zeigten in dieser Studie signifikante Ergebnisse. 95 % der Cervixkarzinome zeigten ebenfalls eine signifikante *SHH*-Überexpression und somit eine deutlich höhere Rate als in der vorliegenden Arbeit am oralen *PECA* [143].

Eine zunehmende Expression in dysplastischem Gewebe wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen. Das könnte an der Vergleichsweise geringen Fallzahl nachgewiesener Dysplasien (n = 3) innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs liegen.

Betrachtet man die Ergebnisse von Arbeitsgruppen, die sich mit vergleichbaren Tumorentitäten anderer Lokalisation beschäftigten, zeigt sich, dass in den meisten Fällen eine erhöhte *SHH*-Expression in malignem Gewebe nachgewiesen werden kann.

Studien von *Mori et al.* am ösophagealen Plattenepithelkarzinom konnten bei allen 34 untersuchten Zelllinien eine erhöhte Expression von *SHH*, *PTCHD1* und *SMO* bei dieser Tumorentität bestätigen. *GLI-1* konnte bei 91 % der Zelllinien nachgewiesen werden [144].

*Zhao et al.* lieferten entsprechende Studien am Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und konnten im Vergleich mit benachbartem tumorfreiem Gewebe immunhistochemisch bei 75 % der Proben signifikant höhere *SHH*-Expressionsraten nachweisen. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit konnten signifikante Zusammenhänge mit steigendem UICC-Stadium gefunden werden ( $p = 0.001$ ) [145].

Auch *Ma et al.* konnten mittels Immunhistochemie, *In-situ*-Hybridisierung und *Real-time PCR* keine *SHH*-Expression in normalem Epithel des Ösophagus detektieren. Bei zehn der 22 Plattenepithelkarzinome dieser Studie konnte eine erhöhte *SHH*-Expression nachgewiesen werden [146]. Weiterhin detektierten sie ebenfalls eine signifikant höhere Expressionsrate (100 %) beim gastrischen Plattenepithelkarzinom im Vergleich mit entsprechendem gesundem Gewebe [147].

Arbeitsgruppen, die sich mit dem Plattenepithelkarzinom der Lunge beschäftigten, bestätigten die erhöhten *SHH*-Expressionsraten malignen Gewebe. *Yue et al.* ermittelten immunhistochemisch eine Expressionsrate von 90 % [148].

Kritisch beurteilt scheint sich der *SHH*-Ligand nur eingeschränkt für die Diagnose maligner Transformation des oralen Plattenepithelkarzinoms zu eignen. Analysen zur Expression weiterer *SHH*-Signalwegkomponenten scheinen die Aktivierung des Signalwegs gezielter nachweisen zu können.

#### **4.1.2 Korrelation des Färbeverhaltens zum Geschlecht der Patienten**

##### ***GLUT1***

Für die immunzytochemische Färbung mit dem *GLUT1*-Antikörper ergab sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem Geschlecht. 36,6 % der männlichen und 48,4 % der weiblichen Probanden waren *GLUT1*-positiv ( $p = 0.31$ ). Der Vergleich mit anderen Autoren bestätigt die geringe Relevanz des Geschlechts auf das Färbeergebnis [99, 128].

Beim Vergleich der allgemeinen Patientendaten wird ersichtlich, dass die vorliegende Studie die in den letzten Jahren vermehrt beschriebene Tendenz der steigenden Anzahl weiblicher Raucher und weiblicher *PECA*-Patienten bestätigt [3, 4, 37]. So konnte Nikotinkonsum bei 45 % des weiblichen Kollektivs nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil unter den männlichen Probanden ergab 39 %. Der Geschlechtseinfluss in Bezug auf den Nikotinkonsum konnte innerhalb dieses Kollektivs als nicht signifikant beurteilt werden, zeigt aber eine tendenzielle Zunahme weiblicher Raucher.

##### ***SHH***

Hierbei ergab sich für *SHH* ein signifikantes Ergebnis mit einer stärkeren Färbung beim weiblichen Geschlecht ( $p = 0.0059$ ). Zwischen den männlichen und weiblichen Probanden dieser Studie fand sich kein Altersunterschied ( $p = 0.57$ ). Kritisch beurteilt ergibt sich

dieser Sachverhalt aus der Geschlechterverteilung innerhalb der einzelnen Diagnosegruppen. *PECA*-Probanden waren signifikant häufiger weiblich ( $p = 0.031$ ). Elf der 15 Probanden gehörten hier zum weiblichen Geschlecht. In den übrigen Probandengruppen war der Anteil der männlichen Probanden höher. Aus Regressionsanalysen der Arbeitsgruppe auf das Kriterium einer *SHH*-positiven Färbung, wird ersichtlich, dass die Diagnose *PECA* mit einer stark erhöhten Färbewahrscheinlichkeit den größten Einfluss auf das Färbeverhalten zu haben scheint und der Geschlechtseinfluss eine deutlich geringere Rolle spielt.

Vergleiche mit anderen Autoren bestätigen die irrelevante Bedeutung des Geschlechts in Bezug auf die Expression von *SHH* und anderer Komponenten dieses Signaltransduktionsweges [141, 145, 148].

#### **4.1.3 Korrelation des Färbeverhaltens mit dem Alter der Patienten**

##### ***GLUT1***

Die statistische Auswertung zur Ermittlung der Expression von *GLUT1* ergab signifikante Ergebnisse. Betrachtet man das komplette Patientenkollektiv, so zeigt sich, dass *GLUT1*-positive Probanden mit einem Durchschnittsalter von 62,7 deutlich älter waren als *GLUT1*-negative Probanden dieses Kollektivs ( $p = 0.00026$ ) mit einem Durchschnittsalter von 49 Jahren. Da die gesunde Kontrollgruppe dieser Studie signifikant jünger war als die Patienten mit Mundschleimhautläsionen, lässt sich auch hier der Einfluss der Diagnose auf das Färbeverhalten nicht ausschließen.

*Ohba et al.* fanden in der bereits beschriebenen Studie keine signifikanten Zusammenhänge mit dem Patientenalter seiner *PECA*-Patienten. Das mittlere Durchschnittsalter der Patienten mit schwacher Expression lag bei 58 Jahren und das der Patienten mit starker Expression bei 62 Jahren, was eine tendenzielle Zunahme der Expression älterer Patienten erkennen lässt.

Auch *Eckert et al.* konnten keine signifikanten Zusammenhänge mit dem Patientenalter feststellen. Zudem lieferte diese Studie andere Tendenzen bezüglich der Korrelation von Färbeintensität und Patientenalter: Schwache *GLUT1*-Expressionen zeigten vor allem Patienten mit einem Durchschnittsalter von 62,5. Für eine starke Expression konnte ein mittleres Durchschnittsalter von 56,4 Jahren angegeben werden.

In der vorliegenden Arbeit deutet die signifikante Korrelation des Färbeverhaltens mit dem Patientenalter darauf hin, dass es altersbezogene Faktoren zu geben scheint, die eine *GLUT1*-Expression modulieren können. Aus diesem Zusammenhang heraus lässt sich vermuten, dass die Akkumulation reaktiver Noxen und die Zunahme entzündlicher Prozesse bei älteren Probanden als mögliche Auslöser einer erhöhten *GLUT1*-Expression darstellen [132, 149]. Eine erhöhte Exposition gegenüber Tabak und/oder Alkohol, erschwerte Hygienebedingungen durch Zahnersatz, reduzierte Mundhygienefähigkeit, Multimorbidität und reduzierte Abwehrkräfte stellen besondere Anforderungen an das orale Plattenepithel älterer Patienten [150] und können ebenfalls als Ursache dieser erhöhten Expressionsrate in Betracht gezogen werden.

Bei kritischer Betrachtung des Durchschnittsalters der untersuchten Probandengruppen zeigt sich jedoch, dass die gesunde Kontrollgruppe mit einem mittleren Alter von 41,6 Jahren signifikant jünger war als das Kollektiv der Probanden mit Mundschleimhautläsionen, die durchschnittlich 61,3 Jahre alt waren ( $p < 0,000005$ ). Dieser Sachverhalt macht deutlich, dass der relevantere Einfluss der Diagnose auf das Färbeverhalten bei dieser Schlussfolgerung berücksichtigt werden muss.

### **SHH**

Für *SHH* ergab die statistische Auswertung keine signifikanten Zusammenhänge. Allerdings zeigt das höhere Durchschnittsalter *SHH*-positiver Probanden (62,7 Jahre) einen tendenziellen Unterschied zum Durchschnittsalter *SHH*-negativer Probanden (53,1 Jahre). Studien anderer Autoren bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und zeigen ebenfalls keine signifikante Korrelation der *SHH*-Expression mit dem Patientenalter [145, 148, 151].

Regressionsanalysen der Arbeitsgruppe ermitteln für das *PECA* eine 33fach erhöhte Wahrscheinlichkeit einer *SHH*-positiven Färbung. Betrachtet man den Prädiktor Alter innerhalb dieser Regression, zeigt sich, dass sich alle 10 Jahre das Risiko, *SHH*-positiv zu sein, verdoppelt. Dieser Sachverhalt zeigt den deutlich stärkeren Einfluss der Diagnose auf das Färbeverhalten. Jedoch sollten auch im Falle von *SHH* weitere Faktoren berücksichtigt werden, die diese tendenzielle Zunahme der *SHH*-Expression im Alter beeinflussen könnten wie z.B. Wundheilungsprozesse chronischer Reizung und vermehrte Risikofaktorexposition [140, 142]

#### 4.1.4 Korrelation des Färbeverhaltens mit den Risikofaktoren des Patienten

##### **GLUT1**

Unterschiede der *GLUT1*-Expression bei Rauchern und Nichtrauchern waren in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant ( $p = 0,090$ ). Unter Beachtung der gerauchten Menge zeigte sich jedoch eine deutliche Korrelation ( $p = 0,012$ ). *GLUT1*-positive Raucher kamen durchschnittlich auf 40,125 *Py*, *GLUT1*-negative Raucher auf 18,643 *Py*. Vergleiche mit anderen Autoren zeigen, dass nur selten Studien durchgeführt wurden, die den Zusammenhang zwischen der *GLUT1*-Expression und dem Nikotinkonsum ihrer Probanden analysierten. Das Patientenkollektiv der Studie von *Ayala et al.* beinhaltete Nichtraucher (19 %), leichte (62,7 %) und moderate/starke Raucher (10,6 %). Signifikante Ergebnisse konnten allerdings nicht dokumentiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können hinsichtlich ihrer Aussagekraft weiterhin mit den Untersuchungen von *Mochizuki et al.* untermauert werden. Hier wurde nachgewiesen, dass *GLUT1* in malignem und in entzündetem Gewebe verstärkt exprimiert wird und, dass seine Expression signifikant häufiger in malignem Gewebe nachgewiesen wurde [132]. Effekte starken Nikotinkonsums auf die Mundschleimhautzellen zeigen sich in einer Vielzahl von unterschiedlichen DNA-Schäden, bakterieller Adhärenz, genetischen Mutationen, DNA-Polymorphismen und DNA-Addukten [149]. Zudem kann die Immunantwort durch häufigen Nikotinkonsum moduliert werden und stark beeinträchtigt sein [152]. Diese entzündliche Komponente und die genetischen Veränderungen festigen die signifikanten Ergebnisse der vorliegenden Studie bezüglich der erhöhten *GLUT1*-Expression bei starken Rauchern.

Auch die Analyse des Alkoholkonsums lässt, lässt trotz geringer Fallzahl, eine Tendenz erkennen: Beide Probanden, die einen Alkoholabusus angaben, reagierten *GLUT1*-positiv und gehörten zu den Nichtrauchern.

Zu den multiplen Effekten des Alkohols auf die orale Mukosa gehören nicht nur gesteigerte Permeabilität und direkte Zellschäden, sondern auch generelle Entzündungsbereitschaft und Atrophie. Dies resultiert in einer Verbreiterung der basalen Zellschichten und ständiger Regenerationsnotwendigkeit der angegriffenen Mukosa [153]. Dies spiegelt sich wiederum entsprechend dem Bedarf proliferativer Gewebe in einer erhöhten *GLUT1*-Expression wider.

Diesen Zusammenhang bestätigten auch *Ayala et al.* in der bereits erwähnten Studie. Hier konnte eine signifikante Korrelation der *GLUT1*-Expression zum Alkoholkonsum der Patienten ermittelt werden ( $p = 0,030$ ).

### ***SHH***

Die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung zeigten keine signifikanten Zusammenhänge mit dem Nikotinkonsum ( $p = 0,17$ ), der als weiterer Auslöser einer möglichen Aktivierung des *SHH*-Signalwegs gehandelt wird [140]. Es konnte aber demonstriert werden, dass *SHH*-positive Raucher durchschnittlich ca. 10 *Py* mehr aufwiesen als *SHH*-negative Raucher. Diese Tatsache lässt zwar eine Tendenz zur Färbung bei langjährigem oder starkem Nikotinkonsum erkennen, stellt jedoch keinen signifikanten Zusammenhang dar ( $p = 0,57$ ).

Lediglich zwei Probanden dieser Studie, von denen nur einer *SHH*-positiv war, gaben anamnestisch einen langjährigen Alkoholabusus an. Signifikante Zusammenhänge mit der immunzytochemischen Färbung konnten hier nicht gefunden werden.

Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den Ergebnissen anderer Autoren [120, 140, 148].

## **4.1.5 Beurteilung der immunzytochemisch unterstützten Bürstenbiopsie als Früherkennungsmethode**

### **Sensitivität und Spezifität**

Die Einführung der Bürste als Entnahmeträger wird von zahlreichen Autoren sowohl hoffnungsvoll als auch kritisch beurteilt. Die Wertigkeit dieser Früherkennungsmethode variiert studienabhängig. Die Sensitivität der nicht methodisch unterstützten Bürstenbiopsie schwankt zwischen 79 und 97 % und die Spezifität zwischen 95,1 und 99,5 % [56].

Ergebnisse dieser Studie erreichten durch eine immunzytochemische *GLUT1*-Färbung der Bürstenbiopsate eine Sensitivität von 80 % und eine Spezifität von 68,42 %. Diese vergleichsweise geringe Wertigkeit kann auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden. Zum einen wurden 60 % der 18 falsch-positiven Diagnosen bei Patienten mit einem oralen Lichen planus festgehalten. Da die histopathologische Diagnose des Lichen planus problematisch sein kann und die Abgrenzung zur epithelialen Dysplasie kritisch beurteilt werden sollte, ist anzunehmen, dass dieser Umstand Einfluss auf die hohe Rate der falsch-positiven Diagnosen hat [154]. Weiterhin können Komorbiditäten vorhanden sein, die

den Metabolismus des Patienten beeinträchtigen und so zu einem falsch-positiven Ergebnis führen. *Lundström et al.* demonstrierten in einer Studie an 40 Patienten mit einem histologisch gesicherten Lichen planus, dass bei elf Patienten zudem ein Diabetes mellitus diagnostiziert werden konnte [155]. Auch *Seyhan et al.* stellten bei fast der Hälfte der untersuchten Lichenpatienten einen gestörten Glukosemetabolismus fest [156]. Dieser Sachverhalt verdeutlicht die möglichen Auswirkungen auf die Rate falsch-positiver Diagnosen [99].

Immunzytochemische Untersuchungen an exfoliativzytologischen Präparaten wurden bereits Mitte der neunziger Jahre durchgeführt und erreichten in einer Studie von *Ogden et al.* eine eingeschränkte Sensitivität von 62 % und eine Spezifität von 100 % für die Verwendung von *Keratin 8* als Tumormarker, der von Autor als brauchbarster Marker seiner Studie beurteilt wurde [157].

Aktuellere Studien lieferten *Driemel et al.* mittels Bürstenbiopsien und der Verwendung von extrazellulären Matrixproteinen zur Detektion atypischer Zellen. Für die  $\gamma$ -Kette von *Laminin 5* erzielte diese Arbeitsgruppe eine Sensitivität von 93 % und eine Spezifität von 98 % [158]. Hochmolekulares *Tenascin C* brachte eine Sensitivität von 83 % und eine Spezifität von 93 % [159].

Weitere vielversprechende Ergebnisse lieferten *Driemel et al.* im Jahr 2007 mittels Bürstenbiopsie und ProteinChip Massenspektrometrie (*SELDI*). Drei Proteine konnten hier mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 91 % normale Mundschleimhaut von Tumorzellen unterscheiden. Entzündungsbedingte und hyperproliferative Läsionen konnten mit einer Sensitivität von 91 % und einer Spezifität von 90 % kenntlich gemacht werden. Zwei dieser Marker wurden im Verlauf der Untersuchung als *S100A8* und *S100A9* identifiziert und deren Expression durch immunzytochemische Analysen verifiziert [160].

### **Nicht auswertbares Probenmaterial und Praktikabilität der Untersuchungsmethode**

Alle *GLUT1*-gefärbten Präparate lieferten ausreichend Zellmaterial für eine Beurteilung. 15,3 % der *SHH*-gefärbten Objektträger konnten aufgrund unzureichenden Materials nicht beurteilt werden. Der 95 %-CI dieses Prozentsatzes lag bei 7,88 bis 26,12 %. Man kann also davon ausgehen, dass bei einem derartigen Verfahren bis zu einem Viertel der Proben nicht auswertbar sind.

*Babshet et al.* beschrieben in ihrer Analyse von Bürstenbiopsien prämaligener und maligner Läsionen, dass sieben der 67 Proben insuffizient waren, was in etwa einem Anteil von 10,45 % entspricht [161]. Mit 8,3 % machten *Poate et al* vergleichbare Angaben bezüglich des Auftretens von insuffizientem Probenmaterial [82]. *Scheifele et al.* gaben in ihrer Studie zur Früherkennung mittels OralCDx 6,8 % und lagen somit unterhalb des ermittelten 95 %-CI dieser Studie [81].

Verglichen mit den anderen Diagnosen, konnten Leukoplakie-Proben in dieser Studie schlechter beurteilt werden. Sie konnten nur zu 61,11 % ausgewertet werden. Proben von Lichen-Patienten hingegen zeigten zu 86,67 %, Proben gesunder Mundschleimhaut zu 91,67 % und Proben von *PECAs* zu 100 % ausreichend Zellmaterial.

Zusammenfassend muss die Materialentnahme mittels Bürste kritisch beurteilt werden. Die vorliegende Arbeit konnte demonstrieren, dass gerade für die potenziell prämaligen Läsionen wie Leukoplakie und Lichen planus, Probleme bei der Sicherung des Zellmaterials entstehen können. Gerade die Beurteilung dieser Läsionen ist allerdings entscheidend für die Früherkennung einer malignen Transformation. Es sollte berücksichtigt werden, dass unzureichendes Zellmaterial und häufige Wiederholungen der Probenentnahme die Motivation des Patienten während des *Follow-up* minimieren können. Auch die damit verbundenen zusätzliche Wartezeiten bei der Diagnosesicherung sollten durch sorgfältige Probenentnahme vermieden werden [49].

## **4.2. Interpretation und Ausblick**

### **4.2.1 Einsatz der Immunzytochemie mittels GLUT1 und SHH im Sinne einer Früherkennungsmethode**

*GLUT1*-positive Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit signifikant häufiger bei Probanden mit sichtbaren Schleimhautläsionen erhoben. Die unterschiedlichen Expressionsraten bei den untersuchten Probandengruppen deuteten darauf hin, dass durch diese immunzytochemische Methode zusätzliche Informationen gesammelt werden können. Betrachtet man die nachgewiesene prognostische Aussagekraft beim *PECA*, die sowohl Einschätzungen zur Aggressivität des Tumors, zur Therapieresistenz und zur Überlebenszeit erlaubt [100, 105, 128, 135], stellt sich zugleich die Frage der Bedeutung der *GLUT1*-Expression bei verschiedenen prämaligen Läsionen.

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren sowohl bei *PECA*-Patienten, als auch bei Lichen- und Leukoplakie-Patienten eine erhöhte Expressionsrate, die sich jedoch anteilig unterschiedlich verhält. Bezieht man gängige Theorien der Karzinogenese in die Schlussfolgerungen mit ein, könnten entzündliche Prozesse und proliferative Vorgänge in der vorliegenden prämaligen Läsion sowie hohe Risikofaktorexpositionen mit der erhöhten *GLUT1*-Expression zusammenhängen und somit detektierbar sein. *Reisser et al.* konnten weiterhin zeigen, dass die *GLUT1*-Expression mit zunehmendem Grad an Dysplasie ansteigt [108]. Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass die Zunahme der *GLUT1*-Expression ein frühes Ereignis der Karzinogenese darstellt. Zur Verifizierung dieser Hypothese empfehlen sich Studien an *GLUT1*-positiven, dysplasiefreien Läsionen mit einem längeren Beobachtungszeitraum. Die Ergebnisse der *GLUT1*-Färbung könnten dementsprechend richtungsweisend für die Erstellung der Prognose einer Läsion sein, Risikopatienten herausfiltern und eine adäquate Anpassung des klinischen Kontrollintervalls dieser Läsion ermöglichen.

Weiterhin kann vermutet werden, dass der Prozess der Karzinogenese einem Zwei-Phasen-Modell unterliegt: In der ersten Phase proliferieren maligne Zelle bis sie durch eine eingeschränkte Sauerstoffversorgung gebremst werden. In der zweiten Phase wird die Genexpression an hypoxische Bedingungen angepasst und zu Gunsten einer stark gesteigerten *GLUT1*-Expression moduliert [162]. Der Nachweis von *GLUT1* mittels immunzytochemisch erweiterter Bürstenbiopsie bietet somit ein einfaches Verfahren, um die Prognose des *PECA*s sowie den Erfolg einer geplanten Therapie besser vorhersagen zu können.

Für die Färbung mittels *SHH* konnten in der vorliegenden Arbeit signifikante Ergebnisse erzielt werden. Da nur bei 60 % der Probanden eine *SHH*-Expression nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Ligand nicht bei allen oralen *PECA* zu finden ist. Betrachtet man die Ergebnisse anderer Autoren, so zeigen sich häufig Aktivierungen des *SHH*-Signalwegs mit und ohne erhöhte Expressionsraten von *SHH* [120, 141]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von *SHH* und der Komponenten seines Signalwegs mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden kann [120, 136]. Eine kombinierte immunzytochemische Analyse der Expression von *SHH* und weiterer Komponenten seines Signalwegs, wie z.B. *PTCHD1*,

*SMO* und *GLII*, scheint daher vielversprechend und könnte somit ein geeignetes Instrument für Diagnose, Prognose und Therapieplanung darstellen.

Die Detektion maligner Transformation innerhalb der Mundhöhle wird durch das Problem der sogenannten Feldkanzerisierung erschwert. Molekulare Studien konnten zeigen, dass in der unmittelbaren Umgebung von Karzinomen der Mundhöhle, aber auch an anderen, weiter entfernten Stellen des Aero-Digestiv-Traktes, Felder gefunden werden können, die prämaligene, genetisch veränderte Zellen beinhalten [163]. Diese Tatsache erklärt das Auftreten von Rezidiven oder Zweittumoren nach erfolgreicher Entfernung des Primärtumors [164]. Um das Vorhandensein von simultanen Zweittumoren zu diagnostizieren, wird routinemäßig eine Endoskopie des Aero-Digestiv-Traktes durchgeführt [19]. Diese könnte durch die Kombination mit immunzytochemischen Verfahren die Beurteilung weiterer Läsionen erleichtern. Dennoch können solche Felder unentdeckt bleiben, da ihre genetische Alternation nicht zwingend klinisch sichtbar ist. Auch die Methode der Bürstenbiopsie ermöglicht bislang nur die Beurteilung klinisch sichtbarer Läsionen. Eine flächendeckende Probenentnahme ist aufgrund der Größe der Mundhöhle nicht praktikabel.

Eine hoffnungsvolle Methode, diese genetische Instabilität zu detektieren und somit nicht sichtbare, maligne Transformationsprozesse zu diagnostizieren, bietet die Analyse von Körperflüssigkeiten. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass Speichelkomponenten untersucht werden können, um Marker verschiedener Erkrankungen zu detektieren [165]. Es gilt nun insbesondere zu evaluieren, ob mittels Speichelproben die Früherkennung des oralen Plattenepithelkarzinoms oder eines Rezidivs durchführbar ist. Hierbei konnten bereits erste Erfolge auf genetischer Ebene, auf transkriptionaler Ebene und auf Proteinebene erzielt werden [166-168]. *Shpitzer et al.* analysierten Speichelproben und die Expression von acht Biomarkern bei 19 Patienten mit Tumoren an der Zunge. Sie identifizierten in ihrer Studie fünf Marker, die eine signifikant erhöhte Expressionsrate bei den untersuchten Tumorpatienten aufweisen. Zu Diesen gehörten *Carbonyle*, *Laktatdehydrogenase*, *Metalloproteinase-9*, *Ki67* und *Cyclin D1*. Zudem stellten sie an drei Markern, darunter auch *Maspin*, eine signifikant geringere Expression fest [169].

Auch *Rhodus et al.* konnten beim Nachweis von NF- $\kappa$ B abhängigen Zytokinen signifikante Unterschiede zwischen Plattenepithelkarzinom-Patienten, Patienten mit prämaligen Läsionen und gesunden Probanden festhalten [170].

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch *GLUT1* und *SHH* im Speichel detektierbar sind und so künftig sowohl einen diagnostischen und prognostischen Nutzen bringen als auch zur Überwachung des Therapieerfolges eingesetzt werden könnten.

#### **4.2.2 Therapeutisches Potential von *GLUT1* und *SHH***

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie und Analysen anderer Autoren konnten zeigen, dass das orale Plattenepithelkarzinom mit einer hohen *GLUT1*-Expressionrate in Verbindung gebracht werden kann.

*Zhou et al.* beschrieben, dass mit dem Einsatz von *Antisense*-RNA die Expression von *GLUT1* in Larynxkarzinomzelllinien reduziert und sowohl ein Wachstumsrückgang als auch eine Reduktion der Glukoseaufnahme beobachtet werden konnte [171].

Studien von *Amann et al.* untersuchten das therapeutische Potential durch die Inhibierung der *GLUT1*-Expression am Leberzellkarzinom. Die Arbeitsgruppe konnte mittels *small interfering RNA (siRNA)* und *Antisense*-Oligodesoxynukleotiden eine Reduktion der Expressionsrate erzielen [172, 173].

Eine andere therapeutische Strategie verfolgt die Inhibierung von *GLUT1* auf Proteinebene. *Rastogi et al.* beobachteten, dass *GLUT1*-Antikörper einen Wachstumsarrest und eine Apoptose in humanen Krebszelllinien bewirken können. Zudem wurde eine Steigerung der antiproliferativen Effekte von *Cisplatin*, *Paclitaxel* und *Gefitinib* beobachtet [174].

Die Ergebnisse zahlreicher Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten deuten darauf hin [171], dass das therapeutische Potential von *GLUT1* genutzt werden kann, um die Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms zu inhibieren.

Auch der *SHH*-Signalwegs kann als wichtiger pharmakologischer Angriffspunkt gesehen werden. Untersuchungen an teratogenen Effekten bei Schafen führten zu der Erkenntnis, dass diese durch den Verzehr des pflanzlichen Alkaloids *Cyclopamin* und eine Hemmung des *SHH*-Signalwegs auf der Ebene des *SMO*-Proteins hervorgerufen wurden. Da sich dieser Wirkstoff als zu toxisch für den therapeutischen Einsatz erwiesen hat, wurden weitere *SMO*-Antagonisten gesucht und in klinischen Studien getestet [175]. Zwanzig Jahren intensiver Forschung zur Identifizierung der Komponenten des *SHH*-Signalwegs und ihrer Rolle innerhalb dieses Signalwegs konnten letztendlich genutzt werden, um Signalweg-Antagonisten wie z.B. *Vismodegib* für den klinischen Einsatz zu entwickeln [118].

Zugelassen für die Behandlung des lokal fortgeschrittenen oder metastasierenden Basalzellkarzinoms konnte in der Zulassungsstudie ein erfolgreicher Tumorrückgang oder eine konstante Tumorgroße in einem Beobachtungszeitraum von neun Monaten nachgewiesen werden [175].

Obwohl *Vismodegib* und andere *SMO*-Antagonisten effektiv zu sein scheinen, zeigen neuere Studien, dass sich unter Medikation mit solchen Substanzgruppen, Resistenzen einstellen können [118, 121]. Um eine kompensatorische Aktivierung der Transkriptionsfaktoren zu verhindern, bietet es sich an, eine Blockade von *GLI* zu erreichen, oder die Komponenten, die *GLI* direkt aktivieren, als therapeutischen Zielpunkt zu wählen [118]. Studien zeigten Erfolge mit *GANT58* und *GANT59* durch die Blockade der transkriptionalen Aktivität von *GLI* beim Prostata-Ca [176]. Arsenisches Trioxid (*ATO*) konnte in Fällen der promyelocytischen Leukämie eingesetzt werden und zeigt ebenfalls gute Ergebnisse für das Medulloblastom [177]. Weiterhin zeigten sich Kombinationen verschiedener Präparate und somit mehrfache simultane Blockaden des Signalwegs als vielversprechend [178].

Dieser Sachverhalt verdeutlicht wie entscheidend eine gründliche und regelmäßige Kontrolle des Therapieerfolgs, d.h. der Expression der *SHH*-Signalwegkomponenten, ist. Non-invasive immunzytochemische Verfahren könnten auch hier von Nutzen sein und bei Verlaufskontrollen eingesetzt werden.

## 5. Zusammenfassung

Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens gehören mit 3,7 % bei Männern und 1,5 % bei Frauen zu den häufigsten Malignomen des Menschen. Unter Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens werden verschiedene Malignome subsumiert, die deutschlandweit 2010 etwa 13.000 Neuerkrankungen ausmachten. 90 % hiervon stellen Plattenepithelkarzinome dar. Statistiken zeigen, dass die Überlebensraten bei oralen Karzinomen, trotz Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten in den vergangenen Jahren, nur wenig Zugewinn verbuchen konnten. Im Gegensatz dazu konnte bewiesen werden, dass der Zeitpunkt der Diagnosestellung, die Prognose beeinflusst und sich wesentlich auf den Erfolg einer Therapie auswirkt. Prinzipiell ist es möglich, dass sich Plattenepithelkarzinome aus klinisch gesund erscheinender Mundschleimhaut bilden. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass ein hoher Anteil aus bereits langfristig bestehenden Vorläuferläsionen, wie z.B. Leukoplakien und Läsionen, die dem Lichen planus zugeschrieben werden, hervorgeht. Gegenwärtigen Forschungsergebnissen zufolge handelt es sich bei der Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms um ein multifaktorielles Geschehen. Der Expressionsnachweis verschiedener Tumormarker konnte bereits genutzt werden, um den Prozess der Karzinogenese besser zu verstehen und vielversprechende Methoden der Früherkennung zu entwickeln. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse von immunzytochemisch gefärbten Bürstenbiopsien im Hinblick auf die Expression von *GLUT1* und *SHH* und deren Bedeutung für den Prozess der malignen Transformation. Malignes Gewebe zeichnet sich durch eine erhöhte Metabolisierung, einen hohen Bedarf und eine gesteigerte Aufnahme von Glukose aus. Daher kann der Prozess maligner Transformation mit der erhöhten Expression von *GLUT1* in Zusammenhang gebracht werden. Auch der *Hedgehog*-Signalweg, der zu den essenziellen Elementen der Embryogenese gehört und im Adulten physiologischerweise inaktiv ist, wird mit dem Auftreten unterschiedlicher Malignome assoziiert. Die untersuchte diagnostische Methode erreichte in der vorliegenden Arbeit eine Sensitivität von 80 % und eine Spezifität von 68 % für die Verwendung eines *GLUT1*-Antikörpers. Die geringe Wertigkeit beruht darauf, dass nicht alle *PECA* erkannt wurden und darauf, dass unter den Vorläuferläsionen ein hoher Anteil *GLUT1*-positiv war. Da eine erhöhte *GLUT1*-Expression generell mit proliferativen Prozessen in Verbindung gebracht werden kann, empfiehlt es

sich *GLUT1*-positive, dysplasiefreie Läsionen regelmäßig und engmaschig, zu beobachten. Die endgültige Beurteilung der Bedeutung einer erhöhten *GLUT1*-Expression in dysplasiefreien, benignen Läsionen, bedarf weiterer Abklärung. Für *SHH* konnte eine Sensitivität von 60 % und eine Spezifität von 96 % ermittelt werden. Die geringe Sensitivität schränkt die Verwendung des *SHH*-Liganden als Instrument zur Früherkennung ein. Vergleiche mit anderen Autoren lassen vermuten, dass eine kombinierte Untersuchung mehrerer Komponenten des *SHH*-Signalwegs die Sensitivität steigern könnte. Die Information, die mittels *SHH*-gefärbten Bürstenbiopsaten gesammelt werden kann, könnte in Zukunft ein wirkungsvolles Instrument der Therapieplanung, Prognosestellung und Therapiekontrolle in der Onkologie darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Dr. Peter Kaatsch, D.C.S., *Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2015. 2015: p. 20-30.*
2. Dr. Peter Kaatsch, D.C.S., *Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2015. 2015: p. p. 18.*
3. Peter Boyle , B.l., *world cancer report 2008*. 2008(International agency for research on cancer).
4. Dr. Joachim Bertz, D.S.D., Dr. Jörg Haberland, Dr. Klaus Kraywinkel, Dr. Bärbel-Maria Kurth, Dr. Ute WolfUnter Mitarbeit von Dr. Sabine Maria List, Enno Nowossadeck und Dr. Thomas Ziese, *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. . 2010(Robert Koch-Institut): p. 13.*
5. Reuther, T., et al., [*Oral squamous cell carcinoma Retrospective analysis of therapy results and prognosis by neoadjuvant, preoperative radio-chemotherapy*]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2006. **10**(1): p. 18-29.
6. Kessler, P., et al., *Neoadjuvant and adjuvant therapy in patients with oral squamous cell carcinoma Long-term survival in a prospective, non-randomized study*. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2008. **46**(1): p. 1-5.
7. Perez-Ordóñez, B., M. Beauchemin, and R.C. Jordan, *Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck*. *J Clin Pathol*, 2006. **59**(5): p. 445-53.
8. Bagan, J.V. and C. Scully, *Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication*. *Oral Oncol*, 2008. **44**(2): p. 103-8.
9. Kowalski, L.P. and A.L. Carvalho, *Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer*. *Oral Oncol*, 2001. **37**(1): p. 94-8.
10. Driemel, O., et al., *Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2007. **5**(12): p. 1095-100.
11. Neid, M. and A. Tannapfel, [*Squamous intraepithelial neoplasia (WHO 2005). Precancerous lesions of the head and neck region*]. *HNO*, 2009. **57**(2): p. 181-7; quiz 188.
12. McGurk, M., et al., *Delay in diagnosis and its effect on outcome in head and neck cancer*. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2005. **43**(4): p. 281-4.
13. Noguchi, M., et al., *Invasive front in oral squamous cell carcinoma: image and flow cytometric analysis with clinicopathologic correlation*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2002. **93**(6): p. 682-7.
14. Klaus-Dietrich Wolff, P.D.m.D.m.d., Markus Follmann, Dr. med. MPH, MSc,2 and Alexander Nast, Dr. med, *The Diagnosis and Treatment of Oral Cavity Cancer*. 2012(Dtsch Arztebl Int. 2012 November; 109(48): 829–835).
15. 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.
16. Barnes L., R.P., Sidransky D., *Pathology and Genetics: Head and Neck Tumours. World Health Organisation Classification of Tumours*. IARC Press Lyon, 2005.

17. Schwenzer, N.E., M., *Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie* Georg Thieme Verlag, 2010(4.Auflage): p. 82-91.
18. Sobin LH, G.M., Wittekind,, *TNM. Classification of Malignant Tumours.7th ed. New York: Wiley. UICC, 2009. .*
19. Argiris, A., et al., *Head and neck cancer*. Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1695-709.
20. Scheifele, C. and P.A. Reichart, *Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia?* Oral Oncol, 2003. **39**(5): p. 470-5.
21. Lee, J.J., et al., *Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1702-10.
22. 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.
23. Brennan, M., et al., *Management of oral epithelial dysplasia: a review*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007. **103 Suppl**: p. S19 e1-12.
24. Shillitoe, E.J., et al., *Genome-wide analysis of oral cancer--early results from the Cancer Genome Anatomy Project*. Oral Oncol, 2000. **36**(1): p. 8-16.
25. Ram, H., et al., *Oral cancer: risk factors and molecular pathogenesis*. J Maxillofac Oral Surg, 2011. **10**(2): p. 132-7.
26. McCaul, J.A., et al., *Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer*. Lancet Oncol, 2002. **3**(5): p. 280-8.
27. Sridhar, J., N. Akula, and N. Pattabiraman, *Selectivity and potency of cyclin-dependent kinase inhibitors*. AAPS J, 2006. **8**(1): p. E204-21.
28. Williams, H.K., *Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma*. Mol Pathol, 2000. **53**(4): p. 165-72.
29. Lippman, S.M., J. Sudbo, and W.K. Hong, *Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development*. J Clin Oncol, 2005. **23**(2): p. 346-56.
30. Ni, L. and C. Dong, *New checkpoints in cancer immunotherapy*. Immunol Rev, 2017. **276**(1): p. 52-65.
31. Li, Y., et al., *A Mini-Review for Cancer Immunotherapy: Molecular Understanding of PD-1/PD-L1 Pathway & Translational Blockade of Immune Checkpoints*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(7).
32. Deng, L., et al., *Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice*. J Clin Invest, 2014. **124**(2): p. 687-95.
33. Blot, W.J., et al., *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. Cancer Res, 1988. **48**(11): p. 3282-7.
34. Jaber, M.A., et al., *Risk factors for oral epithelial dysplasia--the role of smoking and alcohol*. Oral Oncol, 1999. **35**(2): p. 151-6.
35. Jayant, K., et al., *Quantification of the role of smoking and chewing tobacco in oral, pharyngeal, and oesophageal cancers*. Br J Cancer, 1977. **35**(2): p. 232-5.
36. Johnson, N.W., *[Aetiology and risk factors for oral cancer, with special reference to tobacco and alcohol use]*. Magy Onkol, 2001. **45**(2): p. 115-122.
37. Petti, S., *Lifestyle risk factors for oral cancer*. Oral Oncol, 2009. **45**(4-5): p. 340-50.
38. Brunnemann, K.D., et al., *Formation and analysis of tobacco-specific N-nitrosamines*. Crit Rev Toxicol, 1996. **26**(2): p. 121-37.
39. Maserejian, N.N., et al., *Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(4): p. 774-81.

40. Reichart, P.A., [*Primary prevention of mouth carcinoma and oral precancerous conditions*]. Mund Kiefer Gesichtschir, 2000. **4**(6): p. 357-64.
41. Thomas, G., et al., *Risk factors for multiple oral premalignant lesions*. Int J Cancer, 2003. **107**(2): p. 285-91.
42. Enwonwu, C.O. and V.I. Meeks, *Bionutrition and oral cancer in humans*. Crit Rev Oral Biol Med, 1995. **6**(1): p. 5-17.
43. Howaldt, H.P., Schmelzeisen, R., *Einführung in die Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie*. Urban & Fischer, 2002: p. 97-112.
44. Cao, J., H.W. Liu, and J.Q. Jin, [*The effect of oral candida to development of oral leukoplakia into cancer*]. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2007. **41 Suppl**: p. 90-3.
45. Benson, E., et al., *The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas*. Oral Oncol, 2014. **50**(6): p. 565-74.
46. Rampias, T., C. Sasaki, and A. Psyrris, *Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck*. Oral Oncol, 2014. **50**(5): p. 356-63.
47. Anaya-Saavedra, G., et al., *High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study*. Arch Med Res, 2008. **39**(2): p. 189-97.
48. Maserejian, N.N., et al., *Prospective study of fruits and vegetables and risk of oral premalignant lesions in men*. Am J Epidemiol, 2006. **164**(6): p. 556-66.
49. PA, R., *Orale Leukoplakie/ Erythroplakie*. Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund und Kieferheilkunde, 2007. **Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 62(1) 2007**.
50. Driemel, O., *Erkennung oraler Risikoläsionen in der zahnärztlichen Praxis*. 2008(Deutsche Krebshilfe e.V).
51. Hullmann, M.M. and T.E. Reichert, [*Current concepts in diagnosis and treatment of oral malignant tumors*]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2011. **54**(9): p. 1083-8.
52. Warnakulasuriya, S., N.W. Johnson, and I. van der Waal, *Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa*. J Oral Pathol Med, 2007. **36**(10): p. 575-80.
53. Remmerbach, T., *Potenziell maligne Veränderungen der Mundschleimhaut*. Deutscher Ärzte-Verlag; Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift, 2012.
54. Forastiere, A., et al., *Head and neck cancer*. N Engl J Med, 2001. **345**(26): p. 1890-900.
55. Reichart, P.A., *Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans*. Community Dent Oral Epidemiol, 2000. **28**(5): p. 390-8.
56. Hullmann, M., et al., [*Oral cytology: historical development, current status, and perspectives*]. Mund Kiefer Gesichtschir, 2007. **11**(1): p. 1-9.
57. Gupta, P.C., et al., *Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers*. Community Dent Oral Epidemiol, 1980. **8**(6): p. 283-333.
58. Huber, M.A., *White oral lesions, actinic cheilitis, and leukoplakia: confusions in terminology and definition: facts and controversies*. Clin Dermatol, 2010. **28**(3): p. 262-8.
59. Mehta, F.S., et al., *Epidemiologic and histologic study of oral cancer and leukoplakia among 50,915 villagers in India*. Cancer, 1969. **24**(4): p. 832-49.
60. Hullmann M., K.M., Reichert T.E., *diagnostics and therapy of oral precancerous lesions*. Der MKG-Chirurg, 2010(Springer Medizin Verlag).

61. Akrish, S., et al., *Oral squamous cell carcinoma associated with proliferative verrucous leukoplakia compared with conventional squamous cell carcinoma-a clinical, histologic and immunohistochemical study*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2014.
62. Kunkel M. Hertrampf K., K.I.e.a., *Diagnostik und Managment von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde*. Leitlinie der DGZMK/ BZÄK/DGMKG AWMF-Leitlinien-Register Nr 007/092, 2010.
63. Scully, C. and M. Carrozzo, *Oral mucosal disease: Lichen planus*. Br J Oral Maxillofac Surg, 2008. **46**(1): p. 15-21.
64. Rad, M., et al., *Correlation between clinical and histopathologic diagnoses of oral lichen planus based on modified WHO diagnostic criteria*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2009. **107**(6): p. 796-800.
65. Firth, F.A., et al., *Regulation of immune cells in oral lichen planus*. Arch Dermatol Res, 2015.
66. 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.
67. 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.
68. van der Meij, E.H., H. Mast, and I. van der Waal, *The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients*. Oral Oncol, 2007. **43**(8): p. 742-8.
69. Lodi, G., et al., *Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005. **100**(2): p. 164-78.
70. Allison, P., et al., *The role of professional diagnostic delays in the prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma*. Oral Oncol, 1998. **34**(2): p. 147-53.
71. Pentenero, M., et al., *Oral mucosal dysplastic lesions and early squamous cell carcinomas: underdiagnosis from incisional biopsy*. Oral Dis, 2003. **9**(2): p. 68-72.
72. Kujan, O., et al., *Evaluation of screening strategies for improving oral cancer mortality: a Cochrane systematic review*. J Dent Educ, 2005. **69**(2): p. 255-65.
73. Remmerbach, T.W., et al., *Toward a multimodal cell analysis of brush biopsies for the early detection of oral cancer*. Cancer, 2009. **117**(3): p. 228-35.
74. Reddy, S.G., et al., *The sensitivity and specificity of computerized brush biopsy and scalpel biopsy in diagnosing oral premalignant lesions: A comparative study*. J Oral Maxillofac Pathol, 2012. **16**(3): p. 349-53.
75. Sciubba, J.J., *Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group*. J Am Dent Assoc, 1999. **130**(10): p. 1445-57.
76. Mehrotra, R. and S. Yadav, *Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations*. Indian J Cancer, 2006. **43**(2): p. 60-6.
77. Kusakawa, J., et al., *Dissemination of cancer cells into circulation occurs by incisional biopsy of oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2000. **29**(7): p. 303-7.

78. Burkhardt, A., *Die Bürstenbiopsie Theorie und Praxis einer neuen Methode zur Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms- Teil 3*. Oralchirurgie Journal 2006. **4**: p. 26-32.
79. 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.
80. Mehrotra, R., et al., *Oral cytology revisited*. J Oral Pathol Med, 2009. **38**(2): p. 161-6.
81. Scheifele, C., et al., *The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases*. Oral Oncol, 2004. **40**(8): p. 824-8.
82. Poate, T.W., et al., *An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in a specialist Oral Medicine unit*. Oral Oncol, 2004. **40**(8): p. 829-34.
83. Xiao, X., et al., *DNA content status using brush biopsy with image cytometry correlated with staging of oral leukoplakia: a preliminary study*. Oral Oncol, 2015. **51**(1): p. 59-63.
84. Chitturi, R.T., et al., *Evaluation of ploidy status using DNA-image cytometry of exfoliated mucosal cells in oral lichen planus*. J Cytol, 2014. **31**(3): p. 131-5.
85. 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.
86. Kujan, O., et al., *Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: results from a cohort of normal oral mucosa*. Oral Oncol, 2006. **42**(8): p. 810-8.
87. Hayama, F.H., et al., *Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2005. **10**(2): p. 115-22.
88. Macheda, M.L., S. Rogers, and J.D. Best, *Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer*. J Cell Physiol, 2005. **202**(3): p. 654-62.
89. Szablewski, L., *Expression of glucose transporters in cancers*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1835**(2): p. 164-9.
90. Pereira, K.M., et al., *Oxygen metabolism in oral cancer: HIF and GLUTs (Review)*. Oncol Lett, 2013. **6**(2): p. 311-316.
91. Mueckler, M. and B. Thorens, *The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 121-38.
92. Thorens, B. and M. Mueckler, *Glucose transporters in the 21st Century*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(2): p. E141-5.
93. Carruthers, A., et al., *Will the original glucose transporter isoform please stand up!* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(4): p. E836-48.
94. Schliephake, H., *Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2003. **32**(3): p. 233-45.
95. Oliveira, L.R. and A. Ribeiro-Silva, *Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2011. **40**(3): p. 298-307.
96. Oliver, R.J., et al., *Prognostic value of facilitative glucose transporter Glut-1 in oral squamous cell carcinomas treated by surgical resection; results of EORTC Translational Research Fund studies*. Eur J Cancer, 2004. **40**(4): p. 503-7.
97. Kunkel, M., et al., *Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(4): p. 1015-24.

98. Kunkel, M., et al., *Overexpression of GLUT-1 is associated with resistance to radiotherapy and adverse prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity*. Oral Oncol, 2007. **43**(8): p. 796-803.
99. Eckert, A.W., et al., *Coexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients*. Histopathology, 2011. **58**(7): p. 1136-47.
100. Eckert, A.W., et al., *Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients*. Oral Maxillofac Surg, 2012. **16**(2): p. 189-96.
101. Ganapathy, V., M. Thangaraju, and P.D. Prasad, *Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond*. Pharmacol Ther, 2009. **121**(1): p. 29-40.
102. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
103. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
104. Fukuzumi, M., et al., *Gene expression of GLUT isoforms and VHL in oral squamous cell carcinoma*. Cancer Lett, 2000. **161**(2): p. 133-40.
105. Ayala, F.R., et al., *GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma*. Molecules, 2010. **15**(4): p. 2374-87.
106. Li, S., et al., *The effects of GLUT1 on the survival of head and neck squamous cell carcinoma*. Cell Physiol Biochem, 2013. **32**(3): p. 624-34.
107. Mellanen, P., et al., *Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors*. Int J Cancer, 1994. **56**(5): p. 622-9.
108. Reisser, C., et al., *Expression of facilitative glucose transport proteins during development of squamous cell carcinomas of the head and neck*. Int J Cancer, 1999. **80**(2): p. 194-8.
109. Gomez-Ospina, N., et al., *Translocation affecting sonic hedgehog genes in basal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2012. **366**(23): p. 2233-4.
110. Ingham, P.W. and M. Placzek, *Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(11): p. 841-50.
111. Varjosalo, M. and J. Taipale, *Hedgehog: functions and mechanisms*. Genes Dev, 2008. **22**(18): p. 2454-72.
112. Varjosalo, M., et al., *Application of active and kinase-deficient kinome collection for identification of kinases regulating hedgehog signaling*. Cell, 2008. **133**(3): p. 537-48.
113. Rubin, L.L. and F.J. de Sauvage, *Targeting the Hedgehog pathway in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(12): p. 1026-33.
114. Anderson, E. and R.E. Hill, *Long range regulation of the sonic hedgehog gene*. Curr Opin Genet Dev, 2014. **27**: p. 54-9.
115. Choudhry, Z., et al., *Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network*. Ann Neurosci, 2014. **21**(1): p. 28-31.
116. Athar, M., et al., *Sonic hedgehog signaling in Basal cell nevus syndrome*. Cancer Res, 2014. **74**(18): p. 4967-75.
117. McCabe, J.M. and D.J. Leahy, *Smoothed goes molecular: new pieces in the hedgehog signaling puzzle*. J Biol Chem, 2015. **290**(6): p. 3500-7.
118. Atwood, S.X., A.L. Chang, and A.E. Oro, *Hedgehog pathway inhibition and the race against tumor evolution*. J Cell Biol, 2012. **199**(2): p. 193-7.

119. Ryan, K.E. and C. Chiang, *Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates*. J Biol Chem, 2012. **287**(22): p. 17905-13.
120. Wang, Y.F., et al., *Expression of hedgehog signaling molecules as a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2012. **34**(11): p. 1556-61.
121. Tang, J.Y., et al., *Inhibiting the hedgehog pathway in patients with the basal-cell nevus syndrome*. N Engl J Med, 2012. **366**(23): p. 2180-8.
122. Haubitz, I., *Beschreibung statistischer Methoden*. 1995.
123. Gherzi, R., et al., *High expression levels of the "erythroid/brain" type glucose transporter (GLUT1) in the basal cells of human eye conjunctiva and oral mucosa reconstituted in culture*. Exp Cell Res, 1991. **195**(1): p. 230-6.
124. Oyama, Y., et al., *Carrier-mediated transport systems for glucose in mucosal cells of the human oral cavity*. J Pharm Sci, 1999. **88**(8): p. 830-4.
125. Voldstedlund, M. and E. Dabelsteen, *Expression of GLUT1 in stratified squamous epithelia and oral carcinoma from humans and rats*. APMIS, 1997. **105**(7): p. 537-45.
126. Burstein, D.E., et al., *Immunohistochemical detection of GLUT1, p63 and phosphorylated histone H1 in head and neck squamous intraepithelial neoplasia: evidence for aberrations in hypoxia-related, cell cycle- and stem-cell-regulatory pathways*. Histopathology, 2006. **48**(6): p. 708-16.
127. Rudlowski, C., et al., *GLUT1 messenger RNA and protein induction relates to the malignant transformation of cervical cancer*. Am J Clin Pathol, 2003. **120**(5): p. 691-8.
128. Ohba, S., et al., *Overexpression of GLUT-1 in the invasion front is associated with depth of oral squamous cell carcinoma and prognosis*. J Oral Pathol Med, 2010. **39**(1): p. 74-8.
129. Eisenberg, E., *Oral lichen planus: a benign lesion*. J Oral Maxillofac Surg, 2000. **58**(11): p. 1278-85.
130. Woo, S.B., R.L. Grammer, and M.A. Lerman, *Keratosis of unknown significance and leukoplakia: a preliminary study*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2014. **118**(6): p. 713-24.
131. Zargaran, M., et al., *Suitability/unsuitability of cell proliferation as an indicator of malignant potential in oral lichen planus: an immunohistochemical study*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(11): p. 6979-83.
132. Mochizuki, T., et al., *FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models*. J Nucl Med, 2001. **42**(10): p. 1551-5.
133. Tian, M., et al., *Expression of Glut-1 and Glut-3 in untreated oral squamous cell carcinoma compared with FDG accumulation in a PET study*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004. **31**(1): p. 5-12.
134. Yamada, T., et al., *Correlation of metabolism/hypoxia markers and fluorodeoxyglucose uptake in oral squamous cell carcinomas*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2012. **113**(4): p. 464-71.
135. Zhou, S., et al., *Expression of glucose transporter-1 and -3 in the head and neck carcinoma--the correlation of the expression with the biological behaviors*. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2008. **70**(3): p. 189-94.
136. Schneider, S., et al., *Expression of the Sonic hedgehog pathway in squamous cell carcinoma of the skin and the mucosa of the head and neck*. Head Neck, 2011. **33**(2): p. 244-50.

137. Yauch, R.L., et al., *A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer*. Nature, 2008. **455**(7211): p. 406-10.
138. Nishimaki, H., et al., *A role of activated Sonic hedgehog signaling for the cellular proliferation of oral squamous cell carcinoma cell line*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(2): p. 313-20.
139. Fan, H.X., et al., *Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by activating MMP-9 and E-cadherin expression*. Med Oncol, 2014. **31**(7): p. 41.
140. Leovic, D., et al., *Hh-Gli signaling pathway activity in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2012. **34**(1): p. 104-12.
141. Cavicchioli Buim, M.E., et al., *Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study*. Hum Pathol, 2011. **42**(10): p. 1484-90.
142. Le, H., et al., *Hedgehog signaling is essential for normal wound healing*. Wound Repair Regen, 2008. **16**(6): p. 768-73.
143. Xuan, Y.H., et al., *Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions*. Mod Pathol, 2006. **19**(8): p. 1139-47.
144. Mori, Y., et al., *Gli-1 expression is associated with lymph node metastasis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma*. Oncology, 2006. **70**(5): p. 378-89.
145. Zhao, Z., et al., *[Expressions of Sonic hedgehog and matrix metalloproteinase 2 in human esophageal squamous cell carcinoma and the clinicopathological implications]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2013. **33**(7): p. 1008-11.
146. Ma, X., et al., *Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers*. Int J Cancer, 2006. **118**(1): p. 139-48.
147. Ma, X.L., et al., *Study of Sonic hedgehog signaling pathway related molecules in gastric carcinoma*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(25): p. 3965-9.
148. Yue, D., et al., *Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas*. J Exp Clin Cancer Res, 2014. **33**: p. 34.
149. Proia, N.K., et al., *Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(6): p. 1061-77.
150. Gil-Montoya, J.A., et al., *Oral health in the elderly patient and its impact on general well-being: a nonsystematic review*. Clin Interv Aging, 2015. **10**: p. 461-7.
151. Yan, M., et al., *HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2011. **47**(6): p. 504-9.
152. Schierl, M., et al., *Tobacco smoke-induced immunologic changes may contribute to oral carcinogenesis*. J Investig Med, 2014. **62**(2): p. 316-23.
153. Riedel, F., U. Goessler, and K. Hormann, *Alcohol-related diseases of the mouth and throat*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(4): p. 543-55.
154. Sousa, F.A., et al., *Oral lichen planus versus epithelial dysplasia: difficulties in diagnosis*. Braz J Otorhinolaryngol, 2009. **75**(5): p. 716-20.
155. Lundstrom, I.M., *Incidence of diabetes mellitus in patients with oral lichen planus*. Int J Oral Surg, 1983. **12**(3): p. 147-52.
156. Seyhan, M., et al., *High prevalence of glucose metabolism disturbance in patients with lichen planus*. Diabetes Res Clin Pract, 2007. **77**(2): p. 198-202.

157. Ogden, G.R., et al., *DNA and keratin analysis of oral exfoliative cytology in the detection of oral cancer*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1994. **30B**(6): p. 405-8.
158. 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.
159. Driemel, O., et al., *High-molecular tenascin-C as an indicator of atypical cells in oral brush biopsies*. Clin Oral Investig, 2007. **11**(1): p. 93-9.
160. 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.
161. Babshet, M., et al., *Efficacy of oral brush cytology in the evaluation of the oral premalignant and malignant lesions*. J Cytol, 2011. **28**(4): p. 165-72.
162. Ivanov, S., et al., *Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer*. Am J Pathol, 2001. **158**(3): p. 905-19.
163. Braakhuis, B.J., et al., *Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions*. Head Neck, 2002. **24**(2): p. 198-206.
164. 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.
165. Mandel, I.D., *The diagnostic uses of saliva*. J Oral Pathol Med, 1990. **19**(3): p. 119-25.
166. Omar, E., *Current concepts and future of noninvasive procedures for diagnosing oral squamous cell carcinoma - a systematic review*. Head Face Med, 2015. **11**(1): p. 6.
167. Wong, D.T., *Salivary diagnostics*. J Calif Dent Assoc, 2006. **34**(4): p. 283-5.
168. Wong, D.T., *Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics*. J Am Dent Assoc, 2006. **137**(3): p. 313-21.
169. Shpitzer, T., et al., *Salivary analysis of oral cancer biomarkers*. Br J Cancer, 2009. **101**(7): p. 1194-8.
170. Rhodus, N.L., et al., *NF-kappaB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma*. Cancer Detect Prev, 2005. **29**(1): p. 42-5.
171. Zhou, S.H., et al., *Inhibition of cell proliferation and glucose uptake in human laryngeal carcinoma cells by antisense oligonucleotides against glucose transporter-1*. Head Neck, 2009. **31**(12): p. 1624-33.
172. Amann, T., et al., *GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1544-52.
173. Amann, T. and C. Hellerbrand, *GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma*. Expert Opin Ther Targets, 2009. **13**(12): p. 1411-27.
174. Rastogi, S., et al., *Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines*. Cancer Lett, 2007. **257**(2): p. 244-51.
175. Grabbe Stephan, K.R.W.S., Müller-Brenne Tina, Loquai Carmen, *Neue Entwicklungen in der Therapie von Basalzellkarzinomen*. Arzneimitteltherapie; 31, 2013: p. 261-6.
176. Lauth, M., et al., *Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(20): p. 8455-60.

177. Kim, J., et al., *Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(30): p. 13432-7.
178. Wang, Y., et al., *The crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 374-87.

## 7. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: HISTOLOGISCH NACHWEISBARE VERÄNDERUNGEN DES PLATTENEPITHELS WÄHREND DER KARZINOGENESE.....	5
ABBILDUNG 2: KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD DER LEUKOPLAKIE [60] A) HOMOGENE LEUKOPLAKIE AM RECHTEN ZUNGENRAND B) INHOMOGENEN LEUKOPLAKIE AM PLANUM BUCCALE C) PROLIFERATIVE VERRUKÖSE LEUKOPLAKIE REGIO 41-45 .....	11
ABBILDUNG 3: VARIATIONEN DES KLINISCHEN ERSCHEINUNGSBILDES DES ORALEN LICHEN PLANUS [63] A) RETIKULÄRER LICHEN PLANUS, PLANUM BUCCALE B) PAPULÄRER LICHEN PLANUS, PLANUM BUCCALE C) EROSIVER LICHEN PLANUS, ZUNGENRAND D) ATROPHISCHER LICHEN PLANUS, PLANUM BUCCALE .....	17
ABBILDUNG 4: MODELL DER ANORDNUNG VON GLUT-1 INNERHALB DER ZELLMEMBRAN .....	24
ABBILDUNG 5: HIF-1-ALPHA-ABHÄNGIGE ADAPTION VON TUMORZELLEN AN HYPOXISCHE BEDINGUNGEN.....	25
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LIPIDMODIFIKATION DES SHH-PROTEIN .....	28
ABBILDUNG 7: SHH-SIGNALTRANSDUKTION IN VERTEBRATEN .....	30
ABBILDUNG 8: LABELED STREPTAVIDIN-BIOTIN-METHODE.....	37
ABBILDUNG 9: EINTEILUNG DER OBJEKTTRÄGER.....	38
ABBILDUNG 10: PLATZIEREN DER OBJEKTTRÄGER IN DER INKUBATIONSKAMMER .....	38
ABBILDUNG 11: NACHWEIS DER EXPRESSION DER UNTERSUCHTEN ANTIKÖRPER IN EINEM ORALEN PLATTENEPIHELKARZINOM (KRYOSCHNITTE) A) GLUT-1 POSITIVE FÄRBUNG, VERGRÖßERUNG 1:100, VERDÜNNUNG 1:150, DAB ENTWICKLUNGSZEIT 12 MIN B) GLUT-1-NEGATIVKONTROLLE, VERGRÖßERUNG 1:100, VERZICHT AUF DEN PRIMÄREN ANTIKÖRPER, DAB-ENTWICKLUNGSZEIT 12 MIN C) SHH-POSITIVE FÄRBUNG, VERGRÖßERUNG 1:100, VERDÜNNUNG 1:200, DAB-ENTWICKLUNGSZEIT 16 MIN D) SHH-NEGATIVKONTROLLE, VERGRÖßERUNG 1:100, VERZICHT AUF DEN PRIMÄREN ANTIKÖRPER, DAB-ENTWICKLUNGSZEIT 16 MIN .....	41
ABBILDUNG 12: AUSWERTUNGSBEISPIELE DER IMMUNZYTOCHEMISCH GEFÄRBTEN BÜRSTENBIOPSATE A) AUSWERTUNGSBEISPIELE FÜR DIE GLUT-1- POSITIVE FÄRBUNG DER BÜRSTENBIOPSATE , VERGRÖßERUNG 1:200, VERDÜNNUNG 1:150, DAB ENTWICKLUNGSZEIT 12 MIN B) NEGATIVKONTROLLE DER GLUT-1-FÄRBUNG, VERGRÖßERUNG 1:200, VERZICHT AUF DEN PRIMÄREN ANTIKÖRPER, DAB ENTWICKLUNGSZEIT 12 MIN C) AUSWERTUNGSBEISPIELE FÜR DIE SHH-FÄRBUNG DER BÜRSTENBIOPSATE, VERGRÖßERUNG 1:200, VERDÜNNUNG 1:200, DAB-ENTWICKLUNGSZEIT 16 MIN D) NEGATIVKONTROLLE DER SHH-FÄRBUNG, VERGRÖßERUNG 1:200, VERZICHT AUF DEN PRIMÄREN ANTIKÖRPER, DAB-ENTWICKLUNGSZEIT 16 MIN .....	43
ABBILDUNG 13: GESCHLECHTSVERTEILUNG INNERHALB DES PATIENTENKOLLEKTIVS .....	46
ABBILDUNG 14: ALTER UND GESCHLECHT INNERHALB DES PATIENTENKOLLEKTIVS .....	47
ABBILDUNG 15: DIAGNOSEN: DIE SÄULEN STELLEN DIE ANZAHL UND DEN PROZENTUALEN ANTEIL DER UNTERSCHIEDLICHEN DIAGNOSEN DAR. DIE SÄULE FÜR LEUKOPLAKIE IST IN DIAGNOSEN OHNE (UNTEN) UND MIT DYSPLASIE (OBEN) UNTERTEILT. N = 72 .....	48
ABBILDUNG 16: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER VERTEILUNG DES PATIENTENALTERS IN DEN EINZELNEN DIAGNOSEGRUPPEN MITTELS BOXPLOT : DIE BOXEN STELLEN DEN 68%-CI DER PATIENTEN DAR, DIE LINIE IN DER BOX DEN MEDIAN UND DIE WHISKERS DIE SPANNE. N = 72. ....	50
ABBILDUNG 17: GESCHLECHTSVERTEILUNG IN DEN DIAGNOSEGRUPPEN :DIE GRÖßE DER KREISE STELLT DIE ZAHL DER PATIENTEN MIT DER JEWEILIGEN DIAGNOSE DAR, DIE KREISE SIND NACH GESCHLECHT UNTERTEILT, ■ = MÄNNLICH, ■ = WEIBLICH.....	50
ABBILDUNG 18: NIKOTIN- UND ALKOHOLKONSUM: DIE SÄULEN BESCHREIBEN DIE ANZAHL UND DEN PROZENTUALEN ANTEIL DER PATIENTEN ENTSPRECHEND IHRER RISIKOFAKTOREXPOSITION. DIE SÄULEN STEHEN FÜR DIE INDIVIDUELL ERRECHNETEN PACKYEARS UND SIND ZUDEM NACH ALKOHOLKONSUM UNTERTEILT. ....	52
ABBILDUNG 19: NACHWEIS DER ANTIKÖRPER.....	56

Verwendung Bildmaterial Abbildung 2: genehmigt durch Springer Nature

Verwendung Bildmaterial Abbildung 3: genehmigt durch Elsevier

Abbildung 1,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19: eigenständig erstellt

## 8. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: TNM-SYSTEM FÜR MUNDHÖHLEN- UND LIPPENKARZINOME [16, 18] .....	2
TABELLE 2: STADIENEINTEILUNG VON PECCAS DER MUNDHÖHLE UND LIPPE LAUT UICC[16, 18] .....	3
TABELLE 3: UICC-GRADING-EINTEILUNG DER TUMORE [18].....	3
TABELLE 4:HISTOLOGISCHE KRITERIEN ZUR DIAGNOSE DER DYSPLASIE [50] .....	12
TABELLE 5: NOMENKLATUR DER PRÄKANZERÖSEN LÄSIONEN [11, 50, 53] .....	13
TABELLE 6: SLC2A-SUPERFAMILIE (MODIFIZIERT NACH MUECKLER UND THORENS) [91].....	22
TABELLE 7: MODIFIZIERUNG DES STANDARTPROTOKOLLS FÜR IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN ..	42
TABELLE 8. DIAGNOSEN.....	49
TABELLE 9. ALTER UND DIAGNOSEN .....	49
TABELLE 10. GESCHLECHT UND DIAGNOSEN .....	51
TABELLE 11. RAUCHEN UND ALKOHOLKONSUM .....	52
TABELLE 12. RAUCHEN UND DIAGNOSEN .....	53
TABELLE 13. DIAGNOSE UND GERAUCHTE MENGE.....	54
TABELLE 14. TUMORKLASSEN DER PECCA-PATIENTEN .....	55
TABELLE 15. ANTEIL DER POSITIVEN ANTIKÖRPER.....	56
TABELLE 16. GLUT1 UND SHH.....	57
TABELLE 17. ALTER UND ANTIKÖRPER .....	57
TABELLE 18. GESCHLECHT UND ANTIKÖRPER .....	58
TABELLE 19. DIAGNOSEN UND GLUT1.....	58
TABELLE 20. DIAGNOSEN UND SHH.....	59
TABELLE 21. SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT VON GLUT1 .....	60
TABELLE 22. SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT VON SHH .....	60
TABELLE 23. RAUCHEN UND ANTIKÖRPER .....	61
TABELLE 24. GERAUCHTE MENGE UND ANTIKÖRPER .....	61

## 9. Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Brands, R. C., Kohler, O., Rauthe, S., Hartmann, S., Ebhardt, H., Seher, A., Linz, C., Kubler, A. C., Muller-Richter, U. D., *The prognostic value of GLUT-1 staining in the detection of malignant transformation in oral mucosa.* Clin Oral Investig, 2016.

## **Danksagung**

Diese wissenschaftliche Arbeit zu schreiben war für mich nicht nur eine Herausforderung, sondern viel mehr eine wertvolle und lehrreiche Erfahrung, die ich nicht missen möchte. Daher möchte ich mich bei einigen mir nahestehenden Menschen für diese Möglichkeit und ihren moralischen Beistand bedanken.

An erster Stelle, und mögen mir andere verzeihen, muss mein Doktorvater Professor Dr. Dr. Urs Müller-Richter genannt werden. Er war stets er für mich da, hat mich aufgebaut und mir in schweren Phasen mit konstruktiven Gesprächen den Rücken gestärkt. Das habe ich nie als selbstverständlich angesehen. Herzlichen Dank.

Diesen Dank schulde ich auch Herrn Dr. Roman C. Brands, Herrn Dr. Axel Seher, Frau Dr. Imme Haubitz und dem gesamten Team der Forschungsstelle der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Würzburg. Unser reger Austausch war stets eine wertvolle Motivations- und Inspirationsquelle für mich. Für die Ehrlichkeit, die Kritik und die Kollegialität bin ich sehr dankbar.

Darüber hinaus gilt mein Dank meinem Vater, meiner Mutter, meiner Schwester und ihrer Familie und meinem Freund Lukas. Euer Rückhalt spendet mir Kraft und motiviert mich jeden Tag aufs Neue. Diese Unterstützung bedeutet mir mehr, als sich irgendjemand vorstellen kann. Eure Geduld und Anteilnahme kennt keine Grenzen. Dafür bin ich euch auf ewig dankbar.

Dies gilt natürlich auch für meine Freunde, die mich in dieser langen Zeit ertragen und mich immer wieder aufgerichtet haben. Ihr könnt nicht erahnen, wie wichtig das für mich war.

## **Lebenslauf**

**Name:** Olga Köhler

**Geburtsdatum:**

**Geburtsort:**

**Staatsangehörigkeit:**

**Eltern:**

**Familienstand:**

**Schulbildung:**

**Studium:**

**Berufserfahrung:**