

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

**Analyse der Expression von MAGE-A-Antigenen in Präkursorläsionen und
manifesten Tumoren des oralen Plattenepithelkarzinoms**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Eva Krauss
aus Aalen**

Würzburg, Mai 2011

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. Urs Müller-Richter

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2011

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für meine Eltern und meine Schwester

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	
1	EINLEITUNG - 1 -
1.1	Hintergrund der oralen Präkanzerosen und des Plattenepithelkarzinoms - 1 -
1.1.1	Epidemiologie der oralen Präkanzerosen und des Platten- epithelkarzinoms - 1 -
1.1.2	Die Kanzerogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms - 3 -
1.1.3	Feldkanzerisierung..... - 4 -
1.1.4	Definitionen der Vorläuferläsionen der Mundschleimhaut..... - 6 -
1.1.4.1	Leukoplakie..... - 7 -
1.1.4.2	Lichen planus..... - 10 -
1.1.4.3	Epulis..... - 11 -
1.1.4.4	Follikuläre Zysten..... - 14 -
1.1.4.5	Ulzera - 16 -
1.1.4.6	Dysplasie und Carcinom in situ - 17 -
1.1.5	Diagnostik..... - 20 -
1.2	Antigene - 21 -
1.2.1	Allgemeines - 21 -
1.2.2	Funktion der MAGE-Antigene - 23 -
1.2.3	Funktionen der MAGE-A-Antigene während der Tumorgenese - 24 -
1.3	Fragestellungen - 25 -
1.3.1	Erstes Ziel..... - 25 -
1.3.2	Zweites Ziel..... - 26 -
2	MATERIAL UND METHODEN - 27 -
2.1	Patienten - 27 -

2.2	Datenschutz.....	- 29 -
2.3	Geräte und Chemikalien	- 30 -
2.3.1	Geräte.....	- 30 -
2.3.2	Chemikalien und Instrumente.....	- 30 -
2.4	Studienbeschreibung	- 31 -
2.4.1	Färbeprotokoll.....	- 31 -
2.5	Auswertung.....	- 33 -
2.5.1	Hard und Software	- 33 -
2.5.2	HE-Färbungen	- 33 -
2.5.3	Die MAGE-A-Antikörper Färbung.....	- 33 -
2.5.3.1	Methoden der Immunhistochemie	- 34 -
2.5.4	Auszählung der gefärbten Zellen mittels Score-Beurteilung	- 35 -
2.6	Angaben zur Statistik	- 36 -
3	ERGEBNISSE	- 38 -
3.1	Positivkontrolle.....	- 38 -
3.2	MAGE-A in oralen Schleimhautläsionen	- 39 -
3.2.1	Zahnsäckchen/ Zysten.....	- 39 -
3.2.2	Ulzera	- 39 -
3.2.3	Epulis.....	- 40 -
3.2.4	Lichen planus.....	- 41 -
3.2.5	Leukoplakie ohne Dysplasie	- 41 -
3.2.6	Leukoplakie mit Dysplasie.....	- 42 -
3.2.7	Dysplasie	- 43 -
3.2.8	Carcinomata in situ	- 43 -
3.2.9	Grading im Vergleich	- 44 -
3.2.9.1	Grading im Verhältnis zu Anfärbequote.....	- 44 -
3.2.9.2	Grading im Verhältnis zum Score.....	- 45 -

3.3	Beurteilung der Resektionsränder	- 46 -
3.3.1	Ergebnisse der Inter observer Untersuchung	- 48 -
3.3.2	Ergebnisse der Untersuchung mit den Präparaten	- 48 -
3.4	Ergebnisse der statistischen Analyse	- 49 -
3.4.1	Ergebnisse des Wilcoxon Test für die Untersuchung der Fotos	- 49 -
3.4.2	Ergebnisse des Wilcoxon Test für die Fotos aller drei Dysplasiegrade zusammen	- 50 -
3.4.3	Ergebnisse des Kruskal Wallis bei den Fotos.....	- 51 -
3.4.4	Ergebnisse des Wilcoxon Test für die Präparate der drei verschiedenen Gradings getrennt	- 51 -
3.4.5	Ergebnisse des Wilcoxon Test für die Präparate aller drei Grading zusammen	- 53 -
3.4.6	Ergebnisse des Kruskal Wallis Test für die Präparate.....	- 53 -
4	DISKUSSION	- 54 -
4.1	MAGE-A-Antigene in oralen Schleimhautläsionen im Vergleich mit anderen Autoren	- 54 -
4.1.1	Korrelation der MAGE-A-Antigene mit dem Grading	- 56 -
4.1.2	Sensitivität im Vergleich mit anderen Autoren	- 57 -
4.1.3	Expression der Antigene	- 57 -
4.1.4	Perspektiven des MAGE-A-Antigennachweises.....	- 59 -
4.2	Zweite Fragestellung.....	- 63 -
4.2.1	Beurteilung der Resektionsränder.....	- 63 -
4.2.2	Vergleich mit anderen Autoren und anderen Markern	- 64 -
4.2.3	Diskussion der Statistischen Ergebnisse.....	- 65 -
4.2.4	Perspektiven der Randuntersuchung	- 66 -
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	- 68 -
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	- 70 -

7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 83 -
8	TABELLENVERZEICHNIS	- 84 -
9	ANHANG	- 86 -

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5-ALA	5- Aminolävulinsäure
Ab.	Abbildung
Bzw.	beziehungsweise
Cis	Carcinom in situ
CpG	Cytosin–phosphatidyl-Guanin
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
DAC	5-aza-2-deoxycytidine
Dys	Dysplasie
E	Epulis
EGFR	epidermal growth factor receptor
GRP	gankyrin repeat protein
HE	Hämatoxylin-Eisen Färbung
HPV	humanes Papillomavirus
Leu	Leukoplakie
Li	Lichen ruber planus
LOH	loss of heterozygoty
mAb - 57B	monoclonal antibody 57B
MAGE	melanoma-associated antigen
min	Minute
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	plated derived growth factor
PEC	Plattenepithelkarzinom
PP	prozentual positiv gefärbte Zellen
Rb	Retinoblastoma tumor suppressor organ
RKI	Robert Koch-Institut
SI	Intensität
SKIP	ski interacting protein
Tab	Tabelle
Ulz	Ulzera

WHO World Health Organization
z.B. zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Hintergrund der oralen Präkanzerosen und des Plattenepithelkarzinoms

1.1.1 Epidemiologie der oralen Präkanzerosen und des Plattenepithelkarzinoms

Im Jahr 2008 erkrankten laut des World Cancer Reports rund 12,4 Millionen Menschen an einem Karzinom, an dessen Folgen rund 7,6 Millionen verstarben. 0,7 Millionen der Neuerkrankungen betreffen Afrika, 3,4 Millionen Europa und 1,6 Millionen Asien [1]. Das Robert Koch-Institut weist für das Jahr 2006 insgesamt 426.800 Tumorneuerkrankungen in Deutschland aus. Davon sind 53,7% (229.200) männlich und 46,3% (197.600) weiblich. Für das Jahr 2010 wird eine Progression der Tumorerkrankungen von über 246.200 Männern und 197.600 Frauen vermutet [2].

Laut des RKI lagen die Erkrankungsfälle der Mundhöhle und des Rachenraums im Jahr 2006 für Männer bei 7.930, bei Frauen hingegen bei 2.930. Die Prognose des Mundhöhlenkarzinoms für das Jahr 2010 liegt bei 8.360 Tumorerkrankungen für Männer und 3.040 für Frauen [3]. Das orale Plattenepithelkarzinom ist bei Männern der sechst häufigste Tumor [1]. Die 5-Jahres Überlebensraten lag in einem Untersuchungszeitraum von 4 Jahren (1995-1999) bei 44,8% und verbesserte sich-trotz fortschrittlicher Behandlungsmethoden [4] nur gering [5]. Orale Plattenepithelkarzinome können grundsätzlich in der klinisch gesund erscheinenden Mundschleimhaut entstehen, jedoch verhält es sich in der Regel so, dass die Mehrzahl dieser Karzinome aus langfristig bestehenden Vorläuferläsionen hervorgeht [6, 7]. Studien haben gezeigt, dass sich 1-18% der prä-malignen Erkrankungen in ein Plattenepithelkarzinom verwandeln können [8]. Die Gründe dafür sind das hohe Alter der Gesellschaft und der zunehmende Tabakkonsum, der besonders in Entwicklungsländern wie China und Indien anzutreffen ist [9]. Auch in den Industrieländern wird der Übergang in ein Plattenepithelkarzinom hauptsächlich durch die Lebensumstände der Patienten mitbes-

timmt. Alkohol und Nikotinmissbrauch stellen heute die größten Risikofaktoren für die Entstehung von malignen Prozessen dar [7, 10]. Den Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und dem Kopf-Hals-Tumor beschrieben Wynder et al. schon 1956 [11]. Insgesamt betrachtet erhöhen Nikotingenuss und Alkoholkonsum die Tumorentstehung [12-14]. So sterben jährlich laut WHO 5,4 Millionen Menschen an Lungenkrebs und Herzkrankheiten, die in ihrer Hauptursache auf Tabakkonsum zurückgeführt werden können. Auch andere Faktoren fördern die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. So sollen schlechte Ernährung und schlechte Mundhygiene [15], sowie das HPV-Virus [16] einen zusätzlichen Effekt auf die Entstehung haben.

Viele der Präkanzerosen in der Mundschleimhaut werden auch heute noch zu spät erkannt. Dies gilt es zu verhindern. Da sich die meisten Plattenepithelkarzinome aus benignen Vorläuferläsionen wie z.B. der Leukoplakie und des Lichen planus [6] entwickeln hat die Frühdiagnose dieser Erkrankungen ein besonders hohen Stellenwert. Hierbei kommt insbesondere dem Zahnarzt eine entscheidende Rolle zu, da Patienten diesen meist zuerst bei verdächtigen Veränderungen in der Mundhöhle aufsuchen. Ulzerationen und Mukosaveränderungen, die länger als 2 Wochen andauern und aus nicht bekannter Ursache entstehen, müssen gründlich untersucht werden. Mit Hilfe einer Biopsie und einer histopathologischen Untersuchung ist eine weitere Diagnose der Erkrankung möglich [17, 18]. Insgesamt wäre zur schnelleren Erkennung von Präkanzerosen ähnlich dem Melanomscreening beim Allgemeinarzt/Dermatologen und der gynäkologischen Vorsorge beim Frauenarzt mit den Krankenkassen ein bezahltes jährliches Vorsorgekonzept der Schleimhautverhältnisse durch den Zahnarzt/Kieferchirurgen dringend zu vereinbaren.

Bei den Präkanzerosen werden obligate und fakultative Präkanzerosen unterschieden. Obligate Präkanzerosen haben grundsätzlich die Fähigkeit, sich nach entsprechend langer Potenzzeit zum invasiven Karzinom zu entwickeln. Fakultative Präkanzerosen hingegen sind nicht neoplastische Prozesse, die ein ge-

ringeres Risiko zur Mutation und somit zur Ausbildung eines Karzinoms vorweisen (siehe Kapitel 1.1.4).

1.1.2 Die Kanzerogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms

Unter der Kanzerogenese wird der mehrstufige Prozess der Tumorentstehung verstanden [19]. Es finden genetische, epigenetische und metabolische Veränderungen statt. Das orale Plattenepithelkarzinom entsteht meist aus klinisch gesunder Schleimhaut. Zuerst entwickelt sich aus dieser eine Präkanzerose, z.B. eine Leukoplakie und daraus kann ein Karzinom entstehen (siehe Abbildung 1) [20]. Die genetischen Veränderungen finden in Schlüsselgenen, den Protoonkogenen und den Antionkogenen statt. Diese sind für die Wachstumsregulation der Zellen verantwortlich. Veränderungen in den Tumorsuppressorgenen (Antionkogenen) finden in p16 (Promotor Hypermethylierung), p53 (Inaktivierung/Verlust oder Mutation an 17p), Cyclin D1 Überexpression, durch Verlust der Heterozygotie (LOH) und durch Telomerase Aktivierung statt [21]. Protoonkogene sind unter anderem die Wachstumsfaktoren PDGF, EGF und der Rezeptor EGFR, die Veränderungen erfahren und so zu Onkogenen mutieren.

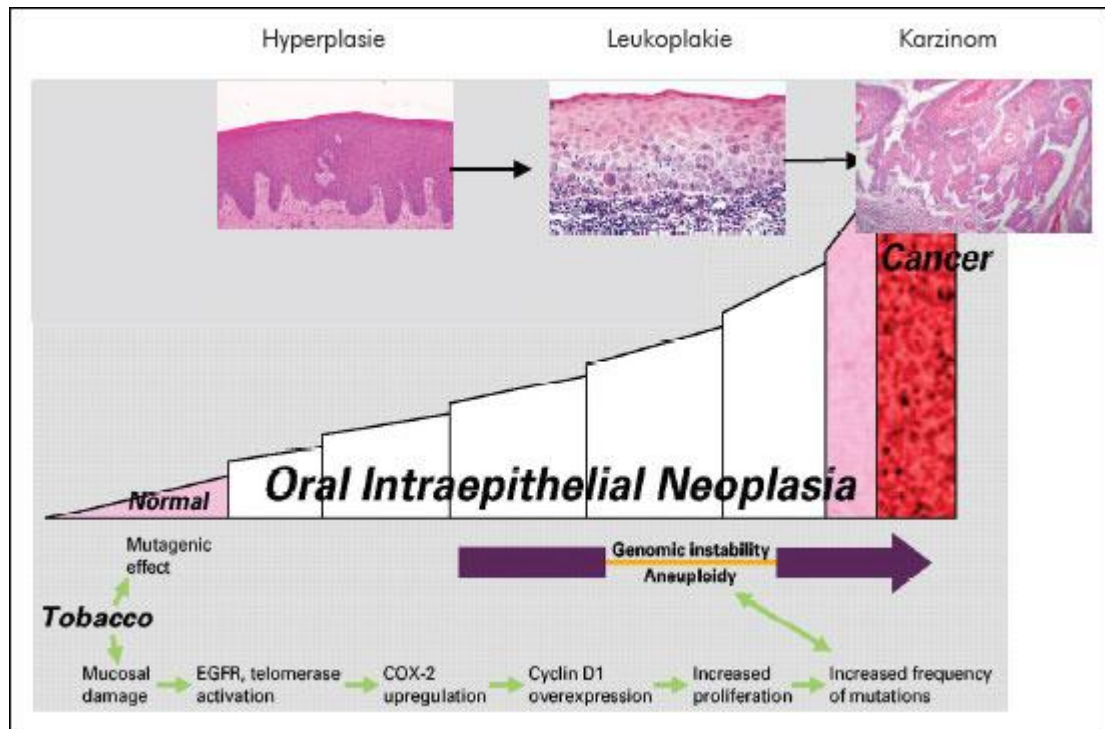


Abbildung 1: nach Lippman [20]: Molekulares (genetische und epigenetische) Progressionsmodell der mehrstufigen Karzinogenese. Der weiße Teil der Grafik steht für die Präkanzerosen wie z.B. die Leukoplakie oder die Erythroplakie. Das Modell beinhaltet die Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktors, die Aktivierung des Enzyms Telomerase, Hochregulierung des COX-2, Überexpression des Cyclin D1. Diese Vorgänge führen zur Proliferation, Weitergabe von Mutationen und letztendlich zur Genominstabilität.

Für die Klassifizierung des oralen Plattenepithelkarzinoms gilt das TNM Stadium. Dabei beschreibt T die Größe des Primärtumors, N das Auftreten von Lymphknotenmetastasen und M das Vorkommen von Fernmetastasen. Wichtig ist zudem die Einteilung in den Differenzierungsgrad des Tumors in gut (G1), mittel (G2) und schlecht (G3) differenziert.

1.1.3 Feldkanzerisierung

Dieser Begriff der Feldkanzerisierung wurde von Slaughter et al. 1953 für Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen geprägt [22]. Slaughter fand bei einer Untersuchung der oralen Plattenepithelkarzinome in der Mundhöhle heraus, dass in ihrer Umgebung Epithelveränderungen in Form einer Präkanzero-

se vorkommen. Diese veränderten Bereiche wurden von ihm als „abnorme Zellen“ bezeichnet. Erklärungen hierfür fand Slaughter nicht. Heute vermutet man, dass gerade im Randbereich zwischen benigner und maligner Schleimhaut diese „abnormen Zellen“ unter toxischen Bedingungen (Alkohol und Tabak) entstehen.

Die Feldkanzerisierung wurde in vielen Organsystemen beschrieben, unter anderem im Mundhöhlenbereich, im Oropharynx, im Larynx [23], in der Lunge [24], dem Ösophagus [25], dem Colon, der Brust, der Blase und der Haut. Boudewijn J.M. Braakhuis et al. haben 2003 versucht den Begriff der Feldkanzerisierung, basierend auf den bisherigen Erkenntnissen der molekularen Grundlagen, gezielter zu definieren: „Es ist die Anwesenheit von einem oder mehreren Bereichen epithelialer Zellen, die genetische Veränderungen haben. Eine Feldläsion hat einen monoklonalen Ursprung und zeigt nicht die üblichen Markenzeichen eines Karzinoms, wie invasives Wachstum, oder metastasisches Verhalten“. Nach dieser Definition ähnelt eine Feldläsion einer Dysplasie [26]. In der Abbildung 2 ist dargestellt, welche Faktoren zur Feldkanzerisierung beitragen, bzw. diese hervorrufen und somit den Grundstein für die spätere Entwicklung eines invasiven Karzinoms legen. Durch Rauchen werden Feldveränderungen in der tumorangrenzenden Schleimhaut bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen induziert. Dabei handelt es sich um die p53-Mutation, den Verlust des Chromosom Y, die Zellproliferation, die Expression der Cytokeratine 7/8 und die morphologischen Veränderungen, die zur Entstehung einer Präkanzerose beitragen [27]. Wichtig ist zudem, dass durch die sogenannte Feldkanzerisierung synchrone oder metachrone Zweit-Karzinome in der Mundhöhle auftreten [7].

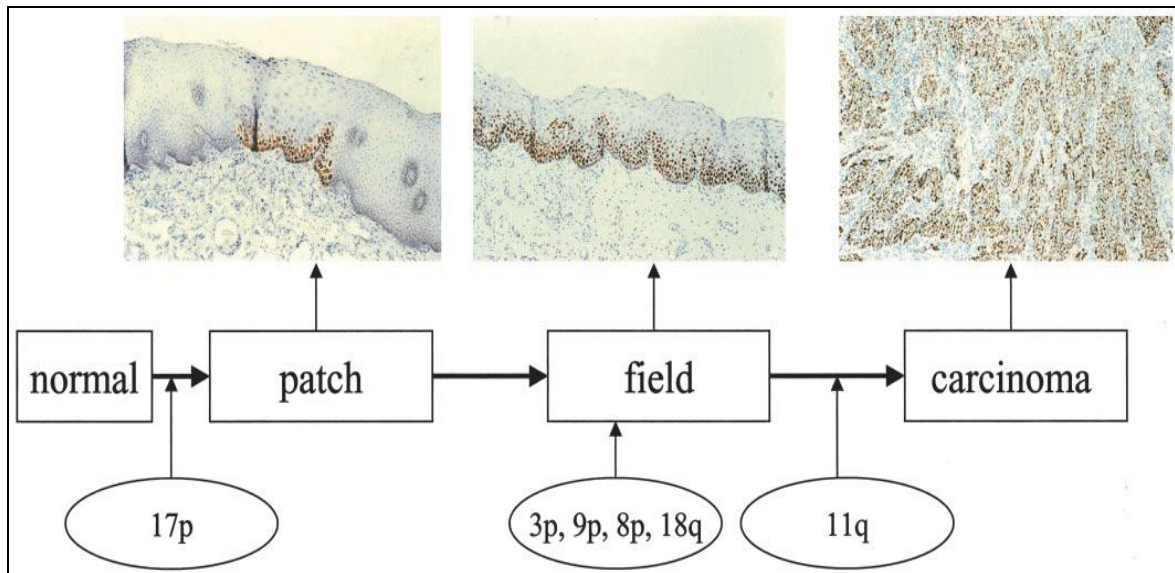


Abbildung 2 : Model für die Karzinogenese von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen.

Zuerst entwickelt sich aus der normalen Schleimhaut ein kleiner Bereich aus klonierten Anteilen von TP 53 mutierten Zellen. So wurde es auch schon für Tumoren der Brust, Lunge und Haut, sowie für Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome beschrieben. Es folgt die Umformung dieses kleinen Bereiches in ein Feld, das aus epithelialen Läsionen von genetisch verwandten Krebszellen besteht und sich auf normale Zellen ausdehnt. Es wird deutlich, welche genetische Veränderungen von der Umformung betroffen sind. Darunter fällt der Verlust des Chromosom 3p, 9p, 8p, 18q, 11q.

1.1.4 Definitionen der Vorläuferläsionen der Mundschleimhaut

Bei Männern ist die häufigste Tumorerkrankung Prostatakrebs, an sechster Stelle kommen die Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches. Die Kopf-Hals-Tumoren beinhalten die Mundhöhle, den Pharynx und den Larynx. Jedes Jahr gibt es ca. 400.000 Neuerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich, die in 300.000 Fällen tödlich enden. Der Großteil davon sind Plattenepithelkarzinome. Die meisten Fälle betreffen Südasien, sowie Süd- und Zentralamerika [1]. Die Langzeitüberlebensrate ist eine der niedrigsten [28]. In Deutschland liegt die relative 5-Jahres Überlebensrate bei Tumoren von Mundhöhle und Rachen für Männer bei 36 % bis 45 % und für Frauen bei 50 % bis 63 % [3].

Eine Präkanzerose ist eine histologische Gewebsschädigung, die mit einem erhöhten Entartungsrisiko verbunden ist. Nach der aktuellen WHO-

Klassifikation werden alle präkanzerösen Läsionen des Plattenepithels (Synonyme: Präkanzerose, prämaligne Läsionen) unter dem Begriff Vorläuferläsionen zusammengefasst. Die histopathologischen Kriterien betreffen gestörte Plattenepithelarchitektur und Zelltypen, wie z.B. die Kern-Plasma-Relation.

Bei den Erkrankungsbildern, die mit einem erhöhten Entartungsrisiko einhergehen, werden prämaligne Läsionen und prämaligne Konditionen unterschieden [8]. Als prämaligne Läsion wird dabei die konkrete Manifestation an umschriebener Stelle oder an mehreren Stellen der Mundschleimhaut verstanden. Im Gegensatz dazu bezeichnet der Begriff der prämaligen Kondition eine Grunderkrankung, die durch eine generell erhöhte Entartungstendenz der Mundschleimhaut charakterisiert ist. Als Beispiel für „prämaligne Kondition“ gilt der Lichen ruber und für die prämaligne Läsion die Leukoplakie/Erythroplakie [29].

Es wird zusätzlich die obligate und fakultative Präkanzerose unterschieden.

Obligate Präkanzerosen entarten mit einer Wahrscheinlichkeit von über 30%, darunter fallen Erythroplakien und Carcinomata in situ. Fakultative Präkanzerosen haben eine Möglichkeit von unter 30% zu entarten, darunter fällt eine einfache Leukoplakie und der Lichen planus.

1.1.4.1 Leukoplakie

Der Begriff Leukoplakie wurde bereits 1877 durch Schwimmer geprägt [30]. Die orale Leukoplakie ist die häufigste benigne vorkommende Mundschleimhautveränderung. Sie gehört zu den prämaligen Läsionen [8]. Sie wird folgendermaßen definiert: „Die orale Leukoplakie ist eine vorwiegend weiße Veränderung der Mundschleimhaut, die weder klinisch noch histopathologisch als eine andere definierbare Schleimhautveränderung charakterisiert werden kann“ [31].

Zur Epidemiologie lässt sich sagen, dass die Inzidenz und Prävalenz je nach Geschlecht, Alter und Lebensart stark variieren. Die Prävalenz liegt zwischen 0,5 und 4% [6]. Dabei gibt es deutlich regionale Unterschiede. Der Altersgipfel liegt im sechsten Lebensjahrzehnt und das männliche Geschlecht ist bevorzugt

betroffen. Beeinflusst wird die maligne Entartung hauptsächlich durch die üblichen Noxen (Alkohol, Tabak) und schlechte Mundhygiene. Klinisch ist die orale Leukoplakie in allen Bereichen der Mundschleimhaut zu beobachten [8]. Sie kann multipel oder isoliert auftreten. Das Erscheinungsbild reicht laut WHO von einem homogenen Bild bis zur inhomogenen Struktur, dabei kann die Oberfläche glatt, rau oder gekörnt sein. Die homogene Form wurde früher auch als Leukoplakie simplex bezeichnet und hat eine relativ geringe Transformationsrate. Die inhomogene Leukoplakie war als exophytische Form (verruköse Leukoplakie) oder erosive Leukoplakie bekannt, mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Entartung. Mischformen zwischen homogener und inhomogener Leukoplakie sind möglich. Eine klinische Sonderform stellt die Erythroleukoplakie dar. Hierbei enthält das weiße Areal rötliche Anteile. Ebenso eine Sonderform ist der rote nicht abwischbare Fleck namens Erythroplakie. Diese geht mit einem erhöhtem Entartungsrisiko einher [32].

Histologisch ist die Leukoplakie gekennzeichnet durch

- Akanthose
- Hyperorthokeratose
- Hyperparakeratose
- Hyperplasie
- lymphozytäre Infiltration des Stromas

zusätzlich oft mit folgenden Epitheldysplasien

- Dyskeratose
- Basalzellhyperplasie
- Zellpolymorphie
- Vermehrung der Mitosen
- Störung der Epithelschichtung

Die Therapie der Leukoplakie richtet sich nach ihrer Form. Erstes Ziel stellt die Erkennung und Beseitigung möglicher Noxen dar. Homogene Formen können hierbei konservativ durch steroidhaltige Salben ergänzend behandelt werden.

Bei der inhomogenen Form und bei länger andauernder fehlender Rückbildungstendenz einer homogenen Leukoplakie ist eine Biopsie und anschließend histopathologische Untersuchung angezeigt. Das Untersuchungsergebnis ist hierbei ausschlaggebend für das weitere Vorgehen.

Die Prognose ist ebenso von der Form der Leukoplakie abhängig. Die Transformation liegt zwischen 3-6 % über einen Zeitraum von 5 Jahren [33].

Die Leukoplakie ist eine der häufigsten Präkanzerosen der Mundschleimhaut und hat daher einen hohen Stellenwert für diese Untersuchung. Je nach Form der Leukoplakie neigt sie zur häufigen Entartung. Deshalb ist es notwendig diese rechtzeitig zu erkennen und zu behandeln, um die Entwicklung eines oralen PEC zu verhindern.

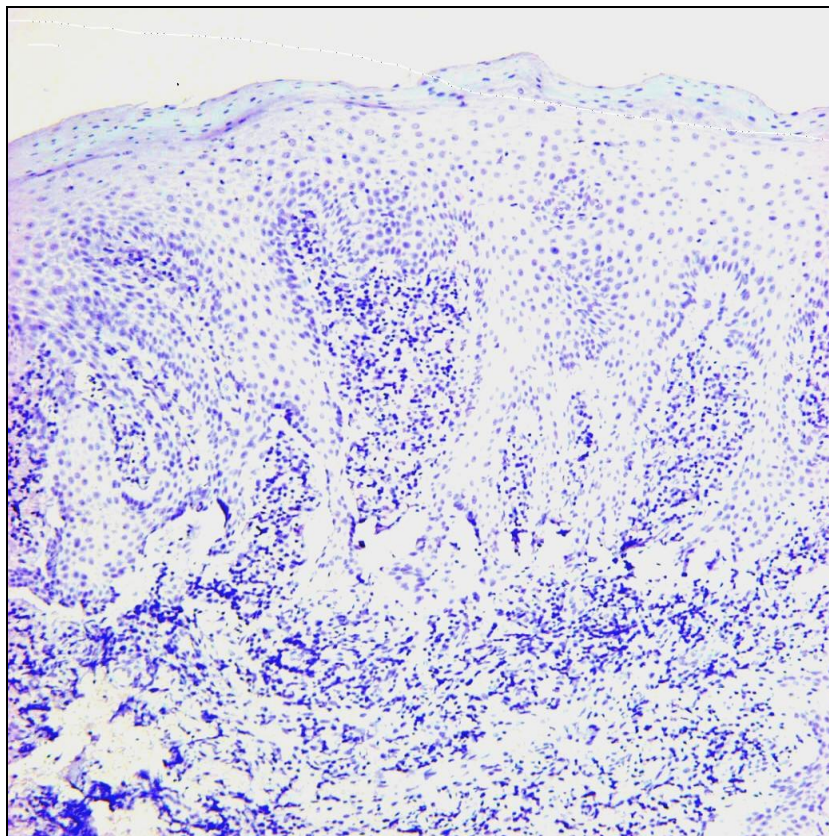


Abbildung 3: Leukoplakie ohne Dysplasie (Nr.06 16978), 100x Vergrößerung HE-Färbung

1.1.4.2 Lichen planus

Der Lichen planus ist eine der wichtigsten Dermatosen und gehört zu den sogenannten präkanzerösen Konditionen [8]. Es handelt sich hierbei um eine Autoimmunerkrankung, bei der vermutlich gegen die basalen Keratinozyten aktivierte T-Zellen auftreten. Bei etwa 30% der Fälle treten, zusätzlich zum Befall von den Extremitätsbeugen, Veränderungen in der Mundschleimhaut auf.

Klinisch ist der Lichen planus am häufigsten an der Wange und den Umschlagfalten zu finden und wird in zwei Formen unterschieden. Die retikuläre Form ist durch die charakteristischen weißen Wickham-Streifen gekennzeichnet, die sich netzförmig an der Wangenschleimhaut befinden. Die erosive Form ist durch gelbliche graue Erosionen gekennzeichnet [33].

Der Lichen planus tritt bevorzugt im mittleren und hohen Lebensalter ab 56 Jahren auf. Der Großteil der betroffenen Patienten ist weiblich (78%) [34]. Der Lichen planus ist histopathologisch gesehen mit starkem Eindringen von T-Lymphozyten in die subepitheliale Zone verbunden [35]. Meist ist die Schleimhaut para-oder orthokeratinisiert oder die Basalzellschicht atrophisch. Das maligne Entartungspotenzial zum Plattenepithelkarzinom liegt bei ca. 0,07%-5,6 % [36, 37].

Spontane Abheilung des Lichen planus sind in Abhängigkeit von ihrer Form möglich. Der retikuläre Lichen planus hat eine hohe Wahrscheinlichkeit spontan abzuheilen (in ca. 40% der Fälle), während erosive und atrophische Formen sich meistens nicht von alleine bessern und spontan wiederauftreten [38]. Kortikoidhaltige Haftsalben werden zur Behandlung des Lichen planus empfohlen. Bei lang anhaltenden, wiederkehrenden und lokalisierten Formen kann eine Exzision und histologische Untersuchung erfolgen.

Die Prognose ist abhängig von der Art des Lichen planus. So neigen die erosiven und atrophischen Formen zur Entartung und bedürfen engmaschiger Kontrolle, sowie gegebenenfalls einer Exzision.

Der Lichen planus gilt in dieser Untersuchung als Beispiel einer prämaligen Kondition. Hierbei konnte untersucht werden, ob in dem Stadium der prämaligen Kondition die MAGE–A-Antigene nachzuweisen sind.

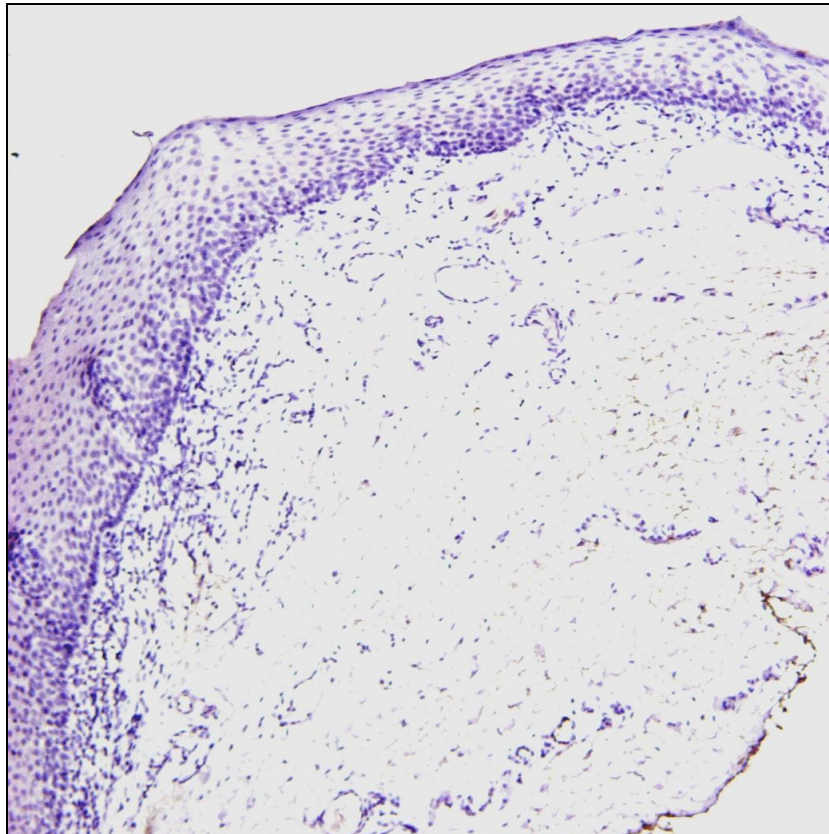


Abbildung 4: Lichen planus (Nr. 08 2079.1), 100x Vergrößerung HE-Färbung

1.1.4.3 Epulis

Epulis ist ein weichgeweblicher raumfordernder Prozess auf der Gingiva. Dieser Begriff beschreibt nur die Topographie (aus dem griechischen: epi ulon: auf dem Zahnfleisch sitzend). Meist entstehen Epulitiden entzündlich, chronisch oder traumatisch reaktiv aus Granulation.

Nach der Histologie werden 4 verschiedene Formen von Epulitiden unterschieden [39].

1. Epulis granulomatosa:

Sie entspricht einer überschießenden Granulationsgewebekonstruktion. Die Epulis granulomatosa tritt hauptsächlich im Jugend- und frühen Erwachsenenalter auf. Sie entwickelt sich meistens im Oberkiefer. Klinisch erscheint die Epulis granulomatosa als gestielte, wenige Millimeter bis zu 2 cm große, rötliche Auftreibung. Oberflächlich befinden sich oft weißliche Beläge und Ulzerationen. Entwickelt sich diese Läsion in der Schwangerschaft wird sie als Epulis gravidarum bezeichnet.

Histologisch ist das Gewebe läppchenförmig gegliedert und enthält verschiedene Zelltypen, wie Erythrozyten, Lymphozyten und Granulozyten.

Therapeutisch empfiehlt sich die Abtragung mit dem darunterliegenden Periost, z.B. mit dem Skalpell oder dem CO₂- Laser.

Prognostisch gesehen rezidiert diese Form der Epulis häufig. Tritt ein Rezidiv auf, empfiehlt sich auch im Bereich der Nachbarzähne eine Exzision des Gewebes durchzuführen [40].

2. Epulis fibrosa

Die Epulis fibrosa ist vermutlich ein Spätstadium der Epulis granulomatosa. Dafür sprechen die Ähnlichkeit des klinischen Erscheinungsbildes und die gleiche Altersverteilung.

Histologisch gesehen sieht man selten Entzündungszellen, aber kollagenfaserverreiches Gewebe mit wenigen Blutgefäßen.

Die Therapie entspricht der der Epulis granulomatosa.

3. Epulis gigantocellularis (peripheres Riesenzellgranulom)

Die Epulis gigantocellularis entwickelt sich hauptsächlich im Seitenzahnbereich zwischen dem 40-60ten Lebensjahr, kann aber auch im zahnlosen Kiefer auftreten. Die Riesenzellepulis umfasst eine Größe von 2-5 cm. Beschwerden werden meist durch ihre Größe verursacht.

Makroskopisch ähnelt die Epulis gigantocellularis der Epulis granulomatosa. Histologisch sind Riesenzellen mit bis zu 20 Kernen pro Schnittebene vorzuweisen, die osteoklastäre Funktionen aufweisen. Es können Knochenneubildungen vorkommen.

Die Epulis gigantocellularis sollte operativ entfernt werden. Die Kompakta wird auskürretiert, damit Rezidive vermieden werden können [40].

4. Epulis fissurata

Die Epulis fissurata entsteht durch eine Dauertraumatisierung, z.B. durch eine schlecht sitzende Prothese. Klinisch ist die Gingiva verdickt und teilweise ulzeriert.

Histologisch ist das Bindegewebe zellarm und das Plattenepithel verbreitert.

Therapeutisch muss der Reizfaktor beseitigt werden bevor eine Abtragung des überschießenden Gewebes erfolgen kann.

Die Epulitiden dienen in meinen Untersuchungen als Beispiel von reaktiv verändertem Gewebe.

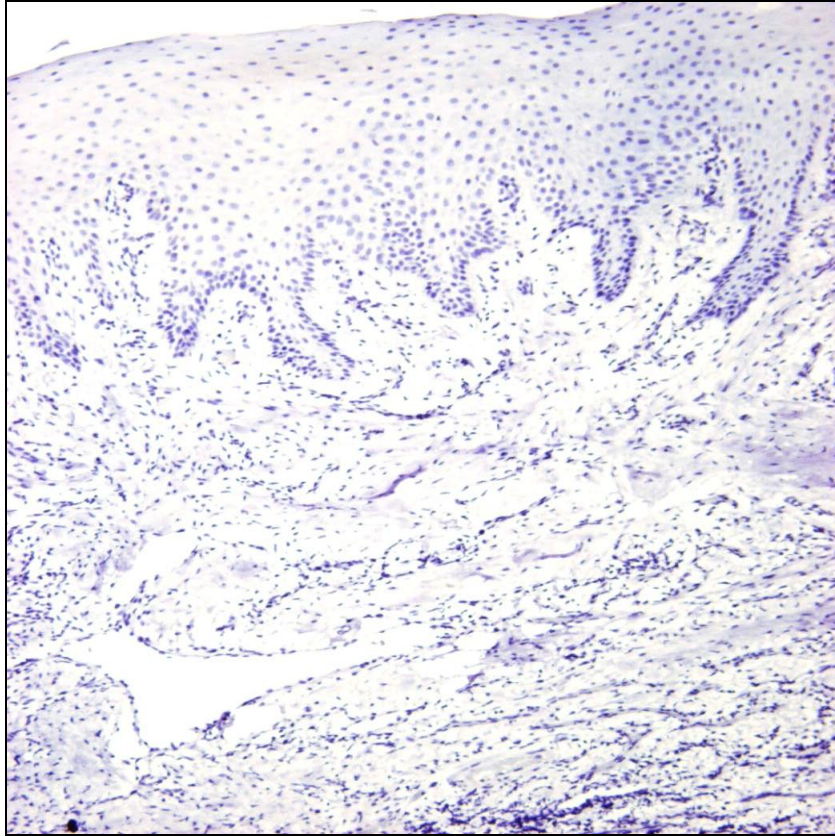


Abbildung 5: Epulis granulomatosa (Nr. 06 24776), 100x Vergrößerung, HE-Färbung

1.1.4.4 Follikuläre Zysten

Eine Zyste ist definiert als ein ein- oder mehrkammeriger Hohlraum mit flüssigen oder breiigem Inhalt. Eine echte Zyste ist hierbei mit Epithel ausgekleidet. Die folliculäre Zyste ist die zweithäufigste Form der odontogenen Zysten mit ca. 16%. Folliculäre Zysten entwickeln sich aus der Flüssigkeitszunahme zwischen Zahnkrone und Schmelzepithel eines noch nicht durchgebrochenen Zahnes. Meist entstehen sie durch Entwicklungsstörungen. Laut der WHO gehören folliculäre Zysten zu den odontogenen Tumoren (dysgenetischen Tumoren) und sie entstehen typischerweise an der Krone eines noch nicht durchgebrochenen Zahnes. Am häufigsten ist der untere Weisheitszahn betroffen, dann der obere und untere Eckzahn, gefolgt vom oberen Weisheitszahn. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 14-25ten Lebensjahr [41]. Das Zahnsäckchen, das eine Krone umgibt wird hierbei zum Zystenbalg und die Zyste hat eine epitheliale Auskleidung, die hier durch das Schmelzepithel entsteht.

Histopathologisch gesehen besitzt die follikuläre Zyste ein zweischichtiges Epithel aus lockerem kollagenem Bindegewebe, selten mit einem mehrreihigem Flimmerepithel und Becherzellmetaplasien.

Klinisch macht sich die follikuläre Zyste durch die Persistenz von Milchzähnen, das Fehlen bleibender Zähne oder durch Zahnstellungveränderungen bemerkbar. Bis zu einer radiologischen Aufhellung von <2,5 mm stellt man die Diagnose Zahnfollikel, bei weiterer Größenzunahme bezeichnet man die Aufhellung als follikuläre Zyste. Selten treten Symptome auf, weshalb diese Erkrankung meist in einem späten Stadium erkannt wird.

Die Therapie richtet sich nach der Größe der Zyste. Es wird entweder eine Zystektomie, d.h. die vollständige Entfernung der Zyste oder die Zystostomie, d.h. die Fensterung der Zyste gewählt. Im Erwachsenenalter schließt die Zystenentfernung die Entfernung des Zahnes mit ein. Im Kindesalter wird versucht, den Zahn zu erhalten und einzustellen.

Die Prognose ist bei vollständiger Entfernung der Zyste gut. Es kann zu Rezidiven kommen (Residualzyste).

Die Zahnsäckchen und die follikulären Zysten dienen in der Untersuchung als Beispiel von reaktiv verändertem Gewebe.

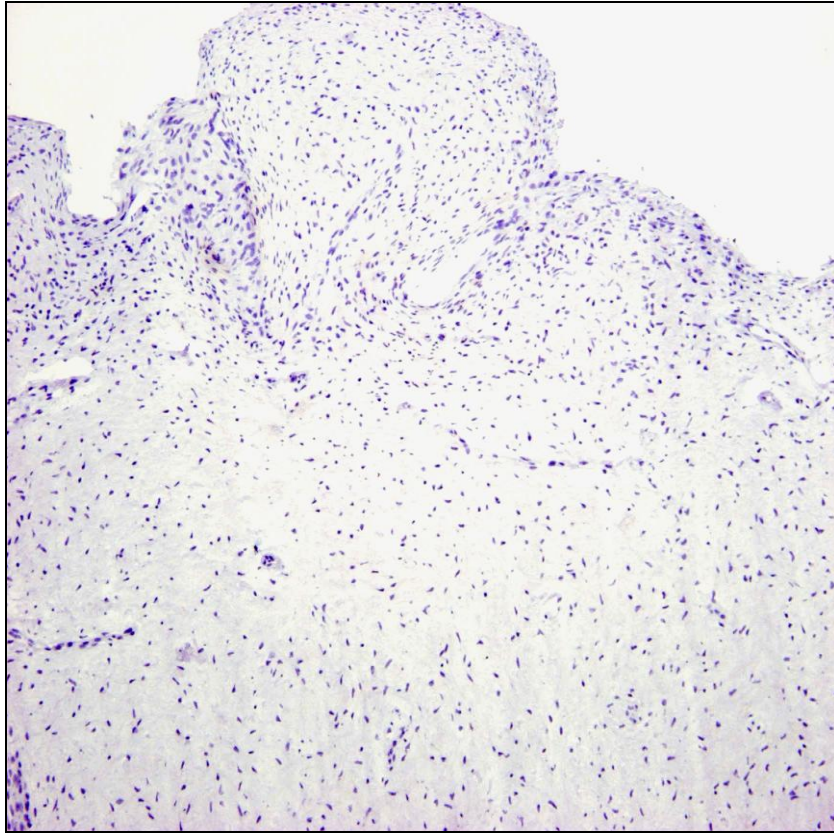


Abbildung 6: Zahnsäckchen (Nr. 03 22096), 100x Vergrößerung, HE-Färbung

1.1.4.5 Ulzera

Ulzera sind eine der häufigsten Beschwerden in der oralen Mukosa. Sie gehören in den Bereich der Sekundäreffloreszenzen und stellen Gewebedefekte dar, die über das Epithel hinaus in die Tiefe reichen und narbig abheilen. Sie sind meistens mit einer Fibrinschicht bedeckt und entstehen durch das Platzen einer subepithelialen Blase [32].

Ulzera weisen eine Vielfalt von Ursachen auf. Der Großteil der Ulzera wird durch ein physikalisches oder chemisches Trauma verursacht, auch bei Radiotherapie, Chemotherapie, viralen Gründen (HSV 1, HIV, Epstein-Barr Virus, Cytomegalie), bakteriellen Infektionen und Lichen Planus finden sich Ulzera. Die oralen Ulzera treten auch in ca. 9% der Fälle bei der chronisch entzündlichen Erkrankung Morbus Crohn auf [35]. Ebenso sind sie bei der Collitis Ulzerosa in der Mundhöhle zu finden.

Die Therapie der Ulzera ist von ihrer Ursache abhängig. Reizfaktoren müssen beseitigt werden. Nach Möglichkeit muss die Grunderkrankung behandelt werden, so können z.B. virale Erkrankungen mit Virusstatika behandelt werden.

Die Ulzera dienen in den Untersuchungen als Beispiel von entzündlich verändertem Gewebe.

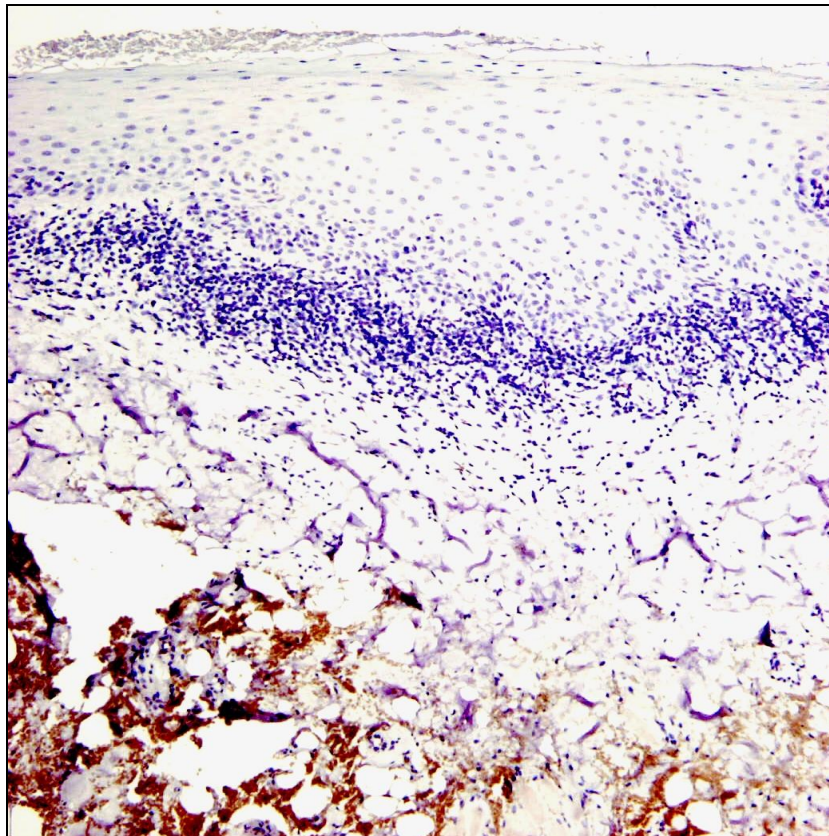


Abbildung 7: Ulzera (Nr. 08 11345), 100x Vergrößerung, HE-Färbung

1.1.4.6 Dysplasie und Carcinom in situ

Dysplasien sind Veränderungen der Zellstrukturen. Hierbei werden vier Entdifferenzierungsgrade unterschieden. Die Zellunterschiede werden anhand folgender Tabelle erfasst und können dadurch einem der Grade zugeordnet werden (siehe Tabelle 1, 2 und Abbildung 8).

Architektur	Zytologie
irreguläre Epithelschichtung	abnorme Variation der Kerngröße
Verlust der Basalzellpolarität	Kernpleomorphismus
Zunahme der Mitoserate	abnorme Zellgröße
Tropfenförmige Retezapfen	abnorme Zellform
abnorme oberflächliche Mitosen	Zunahme der Kern-Plasma Relation
Dyskeratose	Zunahme der Kerngröße
Keratin in Retezapfen	Atypische Mitosefiguren
	Zunahme der Anzahl und Größe der Kerne

Tabelle 1: Kriterien für eine Dysplasie [29]

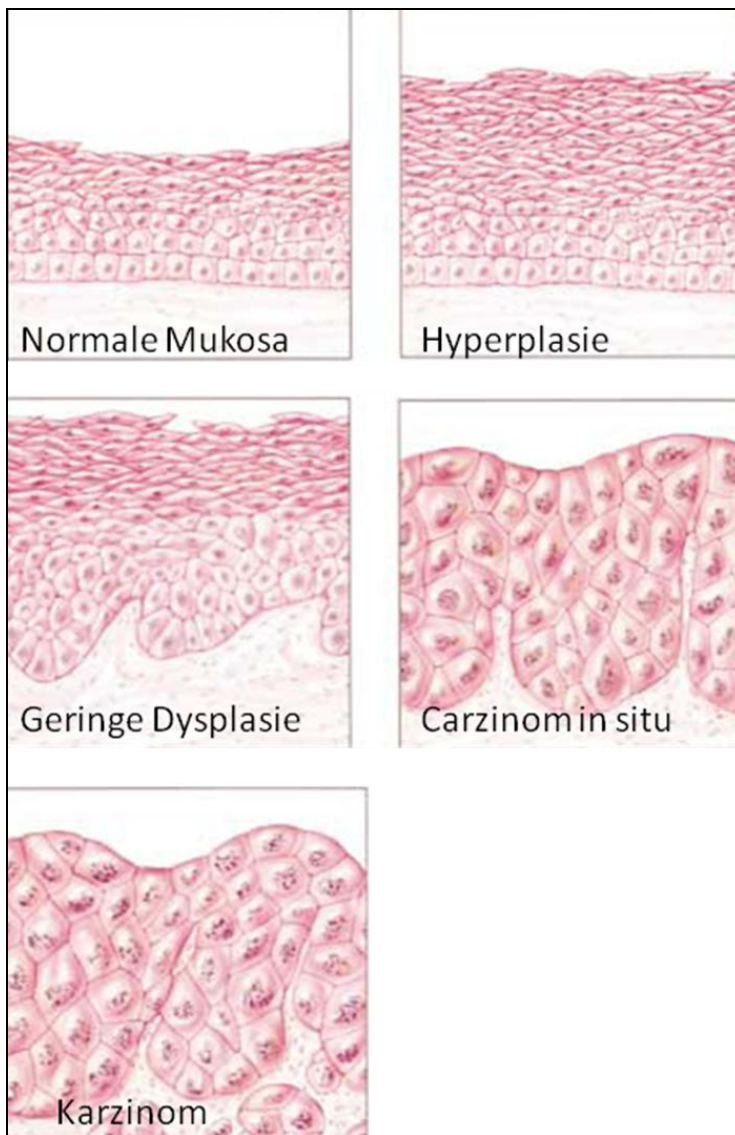


Abbildung 8: Bilder von Forastiere A. et al. [42]. HE-Färbung von histopathologischen Schnitten zur Darstellung von Zellveränderungen/-Strukturen der verschiedenen Dysplasiegrade, des Carcinom in situ, sowie des invasiven Karzinoms.

2005 WHO Klassifikation	Squamous Intraepithelial Neoplasia (SIN)	Ljubljana Classification Squamous Intraepithelial Lesions (SIL)
1.Plattenepithelhyperplasie		Plattenepithelhyperplasie
geringgradige Dysplasie	SIN 1	Basal/parabasale Zellhyperplasie*
mittelgradige Dysplasie	SIN 2	Atypische Hyperplasie**
hochgradige Dysplasie	SIN 3***	Atypische Hyperplasie**
Carcinoma in situ	SIN 3***	Carcinoma in situ
<p>* Basale/Parabasale Zellhyperplasie erinnert histologisch an einen geringgradige Dysplasie, aber die leichte Form ist eine gutartige Läsion und die spätere ist eine geringgradige Präkanzerose</p> <p>** "Risikoreiches Epithel". Die Ähnlichkeit reicht zur mittel-und hochgradigen Dysplasie.</p> <p>*** Der Fürsprecher für SIN kombiniert hochgradige Dysplasien und Carcinoma in situ.</p>		

Tabelle 2: Klassifikationsschema: Histologische Kennzeichen der Präkanzerosen [29].

Laut Tabelle 2 definiert die WHO folgendermaßen:

Hyperplasie

Die Hyperplasie beschreibt die Zunahme der Zellanzahl. Dies kann entweder im Stratum spinosum (Akanthose) oder Str. basale/parabasale statt finden. Die Struktur der Zellen zeigt eine regelmäßige Schichtung ohne Atypien.

Dysplasie/Intraepitheliale Plattenepithelneoplasie/Atypische Hyperplasie

Dysplasie bezeichnet eine gestörte Plattenepithelarchitektur. Die intraepitheliale Plattenepithelneoplasie und atypische epitheliale Hyperplasie werden synonym verwendet. Es ist schwierig, zwischen der epithelialen Hyperplasie und der geringgradigen Dysplasie zu unterscheiden.

Geringgradige Dysplasie

Die gestörte Plattenepithelarchitektur bezieht sich auf das untere Drittel des Epithels. Zusätzlich gibt es zytologische Atypien.

Mittelgradige Dysplasie

Die gestörte Plattenepithelarchitektur dehnt sich bis ins mittlere Drittel des Epithels aus. Zytologische Atypien kommen vor.

Schwergradige Dysplasie

Mehr als zwei Drittel des Epithels sind von der gestörten Plattenepithelarchitektur und zytologischen Atypien betroffen.

Carcinoma in situ

Hier finden bereits maligne Transformationen und eine Aufhebung der Epithelschichtung statt, jedoch keine Stromainvasion.

1.1.5 Diagnostik

Der wichtigste Schritt bei der Früherkennung von oralen Präkanzerosen bleibt eine gezielte Anamnese und eine gründliche klinische Diagnostik.

Papanicolaou entdeckte für die vaginale Schleimhaut die Exfoliativzytologie [43]. Sie ist fester Bestandteil der gynäkologischen Vorsorgeuntersuchung zur Erkennung von Gebärmutterhalskrebs. In der Mundschleimhaut wandte Montgomery das erste Mal dieses Verfahren, auch Bürstenbiopsie genannt, an [44]. Heute beträgt die Sensitivität 79% und die Spezifität 93%. In 80% der Fälle konnte in einer Untersuchung mit der oralen Bürstenbiopsie die Malignität einer Läsion erkannt werden [45]. Daher ist es weiterhin nötig, einen klinisch begründeten Verdacht einer histomorphologischen Untersuchung zu unterziehen.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Färbung der Schleimhaut mit Toluidinblau dar [46]. Dabei wird Toluidinblau auf die betroffene Schleimhaut aufgetragen. Bleibt die Blaufärbung auch nach Reinigung mit Essigsäure bestehen, kann dies auf eine gestörte Verhornung hindeuten. Die Sensitivität dieser Methode liegt bei 77%, die Spezifität bei 67% [47].

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit der photodynamischen Diagnose mit 5-Aminolävulinsäure. 5-ALA reichert sich im Tumorgewebe vermehrt an. Nach Umwandlung in Protoporphyrin kann es Lichtenergie aufnehmen. Diese Methode hat eine hohe Sensitivität (96%), aber nur eine geringe Spezifität (73%) mit einer hohen Rate falsch positiver Ergebnisse [48].

Bleibt eine veränderte Schleimhautläsion länger als 14 Tage bestehen, so ist der Goldstandard eine Biopsie mit histopathologischer Untersuchung [46]. Bei einer Inzision sollte im Gegensatz zu einer in-toto Entfernung darauf geachtet werden, dass das entnommene Gewebestück repräsentativ für seine Tiefenausdehnung und den Randbereich ist. Eine Fadenmarkierung ist für die spätere histopathologische Untersuchung zur anatomischen Zuordnung nützlich. Das biopsierte Material wird für die histopathologische Untersuchung entsprechend aufbereitet und anschließend untersucht. Eine Unterscheidung in Bezug zur Malignität der Präkanzerose muss getroffen werden (Grading). Bei einer histologisch gesicherten Präkanzerose folgt nach Möglichkeit die vollständige Exzision.

1.2 Antigene

1.2.1 Allgemeines

Die MAGE-A-Antigene wurden 1991 von Thierry Boon das erste Mal beschrieben, hierbei handelte es sich im Speziellen um das MAGE-A1-Antigen [49]. MAGE steht für „Melanoma associated genes“, eine Genfamilie, die aus einer humanen Melanomzelllinie kloniert wurde.

Die MAGE-Antigene werden in zwei Subgruppen unterteilt, die Gruppe I betrifft die MAGE-Gene A, B, C (auch cancer/testis Antigene genannt) und die Gruppe II die, die im normalen menschlichen Organismus exprimiert werden [50]. Die Gruppe I der MAGE-Gene wird vor allem in malignen Zellen beobachtet. Im normalen Gewebe befinden sie sich auf den Keimzellen des Hoden, des Ovars und der Plazenta [51-53]. Müller-Richter et al. konnte die Gruppe I der MAGE-

Antigene 2008 auch in fetalen Keratinozyten nachweisen [54]. Diese Untergruppe verbindet eine Gemeinsamkeit. Sie beinhalten alle eine zentrale Region von 200 Aminosäuren, in deren Bereich sie eine Homologie aufweisen, die als MAGE homology domain bezeichnet wird [55]. Dieser ist in Proteinen von multi-zellulären Organismen wie Drosophila und Aspergillus vorhanden, jedoch nicht in Einzellern [56].

Die MAGE-A-Antigenfamilie ist eine Untergruppe der Subgruppe I (C/T-Antigene), die auf dem X-Chromosom 28 kodiert sind [57, 58], aus 12 Genen bestehen und ursprünglich durch CTL Epitope Cloning entdeckt wurden.

Die Keimzellen im Hoden, der Plazenta und die fetalen Keratinozyten sind immunprivilegierte Bereiche, hier werden keine MHC Moleküle präsentiert, weshalb keine Peptidbindung stattfinden kann. Neben den MAGE-Antigenen sind auch die GAGE und BAGE [59] Antigene in dieser Sparte anzusiedeln. Die physiologische Funktion der MAGE-Antigene oder MAGE kodierten Proteinantigene kennt man bis heute nicht im Detail. Ihre spontane Immunität in Krebspatienten ist sowohl zellulär, als auch human [6]. Im Gegensatz zu anderen C/T-Antigenen werden MAGE-A-Antigene von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen erkannt und stellen somit vielversprechende Tumorantigene für eine Immuntherapie gegen Karzinome dar [49, 60]. Dies funktioniert bei MAGE-A1 folgendermaßen: Es ist ein tumorspezifisches Peptid, das an Major Histocompatibility Komplexe binden kann, die dann mit T-Zellen reaktiv sind [61] und somit die erhoffte Immunantwort auslösen.

Cancer/testis-Antigene sind intrazelluläre Antigene, die aufgrund ihres tumorspezifischen Expressionsmuster hervorragende Tumormarker sind [51, 54]. Auch zeigte sich, dass Tumoren im Kopf-Hals-Bereich verschiedene MAGE-Antigene unterschiedlich stark exprimieren. Hierbei ist MAGE-A4 das Gen, das mit der größten Häufigkeit anzutreffen ist, gefolgt von MAGE-A3 und MAGE-A12, wie Ries J. et al. 2009 in einer Untersuchung feststellen konnten [62].

1.2.2 Funktion der MAGE-Antigene

MAGE-Antigene wurden schon in einem frühem Stadium der Spermatogenese gefunden, sowohl MAGE-A1 als auch -A4 wurden im Zellkern und dem Zytoplasma von Spermatogonien und primären Spermatozyten entdeckt, jedoch nicht in Spermatisden und Sertoli Zellen [63].

MAGE-A-Antigene sind ausschließlich in den Keimzellen vorhanden. Dies legt die Vermutung nahe, dass sie während der embryonalen Entwicklung eine Rolle spielen. In den Embryonalzellen sind wesentlich weniger CpG methyliert als in normalen Zellen [50]. Nach der Embryonalentwicklung werden diese Gene durch Methylierung der Promotoren deaktiviert. Es wurde festgestellt, dass die Genaktivierung von MAGE durch Demethylierung von kritischen CpG-Dinucleotiden geschieht. Aber auch andere Faktoren sind zur Expression dieser Gene wichtig [64], wie zum Beispiel die Histondeacetylierung. Findet jetzt eine Transformation von benigner zu maligner Zelle statt, so werden die MAGE-A-Antigene wieder reaktiviert, was bedeutet, dass sie hypomethyliert werden [65].

Auch die Expression der MAGE-A1-Antigene findet hauptsächlich durch die Demethylierung des Promotors und durch Histondeacetylierung statt. Die Histondeacetylierung führt zu einer kompakten und transkriptionsaktiven Struktur [66]. Diese zwei Vorgänge sind laut Wischnewski et al. 2006 verantwortlich für die Mechanismen der Stilllegung der MAGE-A-Antigene nach der Embryonalentwicklung. Der Vorgang der Methylierung läuft folgendermaßen ab. Methyl CpG Bindungsproteine können Histondeacetylase veranlassen DNA zu methylieren. Die zwei großen MAGE-A1 Promotoren haben Ets Bindungsseiten, welche CpG Dinucleotide enthalten. CpG sind in Tumorzellen demethyliert, die MAGE-A1 exprimieren, methyliert dagegen sind sie in denen, die das Gen nicht exprimieren. Die Methylierung dieses Genes verhindert CpG Bindung von Transkriptionsfaktoren [67] und somit die Tumorgenese.

1.2.3 Funktionen der MAGE-A-Antigene während der Tumorentstehung

Tumoren entstehen aus einzelnen Zellen durch klonale Proliferation. Die Zellen erfahren irreversible genetische Veränderung, deren Akkumulation zur Entartung der Zelle führt [68]. Die Bildung dieser anormalen Zellen steigt mit dem Alter. Die Karzinogenese verläuft meist über viele Jahre hinweg unbeobachtet, bis die Auswirkungen sichtbar werden [69]. Es entstehen Mutationen in der DNA und Aberrationen in den Chromosomen des Zellkernes.

Die menschliche Tumorentstehung ist oft mit einer DNA-Hypermethylierung der Gene verbunden [67], ebenso werden die tumorassoziierten MAGE-A-Antigene in vielen Karzinomen beobachtet [70]. Die verschiedenen MAGE-A-Antigene wirken sich unterschiedlich fördernd auf die Tumorentstehung aus.

Eine Untersuchung von Alan M. Gillespie und Robert E. Coleman 1999 zeigt, dass diese Prozesse der MAGE-A1-Antigene durch Demethylierung des Promotors und durch Histon-Deacetylierung nicht erst bei invasiven Vorgängen, sondern durchaus schon in den Vorläuferläsionen stattfindet. Die beiden zeigten in ihrer Arbeit, dass die Expression von MAGE-A1 in einer Vielfalt von potenziell prä-malignen epithelialen Ovarialkarzinomen vorkommt, was darauf hindeutet, dass die MAGE-Antigene auch schon bei Vorläuferläsionen im Mund enthalten sein können [65].

Für das MAGE-A1 Protein wurde der Bindungspartner SKIP (ski interacting protein) gefunden [71]. SKIP kann Proteine miteinander interagieren lassen, die sowohl aktivierend, als auch hemmend auf die Transkription wirken. MAGE-A1 inhibiert die Expression von Genen, die zur Differenzierung notwendig sind.

Die MAGE-A2 und -A6 Antigene wurden dagegen mit einer Bindung an p53 und p73 in Verbindung gebracht. Durch diese Bindung können sie deren Funktion beeinträchtigen, das Zellwachstum steigern und die Apoptose verringern [72, 73].

MAGE-A4 hingegen bindet an das Tumorprotein Gankyrin, welches einen destabilisierenden Effekt auf pRB hat. Durch die Bindung von Gankyrin an pRB findet folgender Prozess statt: Die DNA Synthese wird angeregt und es kommt zu einem ungeplanten Eintritt von pRB in den Zellzyklus [74]. Außerdem hemmt es die Apoptose durch den Abbau von p53 [75].

Das MAGE-A11 kann die Androgen-Rezeptor Funktion erhöhen [76]. Eine Bindung eines androgenen Hormons löst normalerweise eine Kaskade von Interaktionen aus. In einer normalen Prostatazelle wird ein Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation gehalten. Die Hauptfunktion des Androgenrezeptors ist ein DNA-gebundener Transkriptionsfaktor, der die Genexpression reguliert. Bei einem Prostatakarzinom ist ihre Regulation gestört.

1.3 Fragestellungen

1.3.1 Erstes Ziel

Das frühe Erkennen von Präkanzerosen wird immer wichtiger. Valide Untersuchungen, die eine potenziell maligne Präkanzerose nachweisen, gibt es bisher noch nicht. Hierzu wurden durchaus Ansätze gefunden, die in der klinischen Anwendung aber noch nicht genügend Sicherheit bieten. So sind heute als diagnostische Hilfsmittel Toluidinblau, 5-Aminolävulinsäure, Autofluoreszenz und die Bürstenbiopsie, die bekannteste Methode, verwendbar. Jedoch ist nach einer ausführlichen klinischen Untersuchung meist immer noch die Skalpellbiopsie der Goldstandard für die histopathologische Begutachtung [77]. Hierbei soll diese Untersuchung ansetzen. Ziel ist es, zu zeigen, ab welchem Stadium der benignen/malignen Transformation der Mundschleimhaut es möglich ist, MAGE-A-Antigene nachzuweisen und damit auch dem Pathologen die Möglichkeit zu geben, maligne Transformationen sensitiver und spezifischer zu detektieren [46].

1.3.2 Zweites Ziel

Ein weiteres Ziel meiner Doktorarbeit ist es, durch die MAGE-A-Antigene schwierige Untersuchungsstellen, wie die Randzonen der Carcinoma in situ und der Dysplasien eindeutig darzustellen und somit eine sichere Grenze zwischen gesunder und erkrankter Mundschleimhaut ziehen zu können. Dies ist sowohl für die Überlebensrate als auch für die Rezidivrate eine wichtige Entscheidung, da immer in genügendem Abstand von ca. 0,5mm zum erkrankten Rand exziiert werden muss. Der Abstand variiert nach dem Schweregrad der Erkrankung. In der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchung versuchen wir mit den MAGE-A-Antigenen, die nur in malignen Zellen exprimiert werden, das einfache Erkennen zwischen maligner und benigner Schleimhaut auch bei noch sehr geringgradigen Dysplasien zu ermöglichen. Besonders interessant sind diese Bereiche durch die Feldkanzerisierung, welche bei Tabak- und Alkoholkonsum vermehrt im oberen Verdauungstrakt auftreten und öfters zu Rezidiven durch das Belassen abnormer Zellen führen.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Die Formalin fixierten Patientenbiopsien wurden mit Hilfe des Suchsystems „Pascal“ retrospektiv in den Computern der Pathologie Würzburg zufällig ausgewählt. Dabei wurden Patienten mit verschiedenen Präkanzerosen im Mund-Kopf-Hals-Bereich ausgewählt. Im Speziellen sind dies die Krankheiten Lichen ruber planus, Leukoplakie ohne Dysplasien, Leukoplakien mit Dysplasien, Epulis, Ulzera, Zahnsäcken, follikuläre Zysten, Dysplasien und Carcinomata in situ. Auch Kombinationen aus beiden Erkrankungen waren möglich. Dabei stammten die Präparate aus der Mundhöhle (Gaumen, Wange, Lippe, Mundboden, Zunge), sowie dem Larynx (Kommissuren, Stimmlippen). Alter und Geschlecht der Probanden wurden dabei durch Zufall bestimmt.

Anhand dieser Befundtexte konnten die entsprechend nummerierten Paraffinblöcke in den Archiven der Pathologie gefunden werden. Zusätzlich wurden die schon teilweise vorhandenen HE-gefärbten Präparate für später angestrebte Vergleiche herausgesucht, zum Teil auch später eigens dafür angefertigt. Die Befundtexte wurden verschiedenen Gruppen zugeordnet. Insgesamt wurden dabei 210 Patienten untersucht, wobei manche Proben aus mehreren getrennten Bereichen stammen konnten. So kann von einem Patienten Material aus der Zunge und zusätzlich aus dem Larynx stammen, jedoch unterschiedliche Diagnosen haben.

Die Gruppeneinteilung war wie folgt:

Gruppe 1: Zahnsäckchen/follikuläre Zyste

13 Patienten, davon 5 Männer und 8 Frauen.

Durchschnittsalter beträgt 14 Jahre.

Gruppe 2:Ulzera

25 Patienten, davon 16 Männer und 9 Frauen.

Das Durchschnittsalter beträgt 67 Jahre.

Die Befundtexte enthalten folgende Diagnosen: schorfbedeckte Ulzeration, mit chronisch/granulierter Entzündung, floride Ulzeration.

Gruppe 3:Epulis

26 Patienten, davon 11 Männer und 15 Frauen.

Das Durchschnittsalter beträgt 47,2Jahre.

Die Befundtexte enthalten folgende Diagnosen: Epulis granulomatosa (=überschüssiges Granulationsgewebe), Epulis gigantocellularis (Riesenzellepulis, mehrkernige Zellen mit resorptiven Eigenschaften) und Epulis fibromatosa (enthält kollagenreiches Bindegewebe).

In einigen Diagnosetexten sind zusätzlich Ulzerationen enthalten.

Gruppe 4: Lichen planus

26 Patienten, davon 13 Männer und 13 Frauen.

Das Durchschnittsalter beträgt 55,6 Jahre.

Die Befundtexte enthalten folgende Diagnosen: Lichen ruber planus, Hyperparakeratose, Plattenepithelhyperplasie, chronische Entzündung, Interface Aktivität.

Gruppe 5: Leukoplakie ohne Dysplasie

32 Patienten, davon 19 Männer und 13 Frauen.

Das Durchschnittsalter beträgt 57,1 Jahre.

Die Befundtexte enthalten folgende Diagnosen: Leukoplakie ohne Dysplasie, bei einigen Patienten sind zusätzliche Befunde im Diagnosetext erhalten. Zum Beispiel Parakeratose (=Verhornungsstörung, Zellkerne bis in die oberste Schicht erhalten), Akanthose (=Verbreiterung der Stachelzellschicht Str. spinosum der Haut), Entzündung, verrucöse Leukoplakie.

Gruppe 6: Leukoplakie mit Dysplasie

24 Patienten, davon 14 Männer und 10 Frauen.

Das Durchschnittsalter beträgt 61,7 Jahre.

Die Befundtexte enthalten folgende Diagnosen: Leukoplakie mit Dysplasie, Parakeratose, Hyperkeratose (verstärkte Verhornung des Plattenepithels der Haut), verrucöse/erosive Leukoplakie, zelluläre Atypien. Die Dysplasien werden hierbei in verschiedene Grade eingeteilt.

Gruppe 7: Dysplasie

26 Patienten, davon 16 Männer und 10 Frauen.

Das Durchschnittsalter beträgt 63 Jahre.

Die Befundtexte enthalten folgende Diagnosen: Hyperplasie (Vergrößerung des Gewebes durch Zellteilung), verrucöse Dysplasie, Candida Besiedlung.

Die Dysplasien werden hierbei in verschiedene Grade eingeteilt, d.h. es gibt geringe (Grad I), mäßige (Grad II) und schwere (Grad III) Dysplasien. Diese Grade geben den Differenzierungsgrad der Dysplasie wieder, was bedeutet, je niedriger der Grad, desto besser ist die Dysplasie differenziert (siehe Einleitung).

Gruppe 8 : Carcinomata in situ

38 Patienten, davon 30 Männer und 8 Frauen.

Das Durchschnittsalter beträgt 66,8 Jahre.

Die Befundtexte enthalten folgende Diagnosen: Carcinom in situ, schwere Dysplasien, manchmal herdförmiger, kleiner Übergang in ein invasives PE-Karzinom, Ulzera.

2.2 Datenschutz

Dem entnommenen Material der Patienten wird im Eingang in der Pathologie jeweils eine Nummer zugeordnet. Durch diese Nummer ist der Datenschutz auch während meiner Untersuchungen gewährleistet.

2.3 Geräte und Chemikalien

2.3.1 Geräte

- Schlittenmikrotom
- Silanisierte und unsilanisierte Objektträger
- Zellulosepapier
- Eindeckmaschine
- Elektromikroskop

2.3.2 Chemikalien und Instrumente

- EDTA-Puffer aus:
 - Tris EDTA ph 9
 - Aqua 1 l
 - EDTA 1,49 g
 - Tris 12,11 g
- Destilliertes Wasser
- Xylol
- Alkohol in verschiedenen Prozentzahlen (100%, 90%, 80%, 70%)
- Wasserbad
- Puffer PBS aus:
 - 72g NaCl
 - 14,8g Na₂HPO₄
 - 4,3g KH₂PO₄
- Primärantikörper MAGE-A57B (von Prof. Giulio C. Spagnoli, Onkologische Chirurgie, Institut chirurgische Forschung und Klinikmanagement, Universitätsklinik Basel, 4031 Basel, Schweiz zur Verfügung gestellt).
- Nachweissystem von der Firma DakoCytomation Inc., 6392 Via Real, Carpinteria, California, 93013, USA
- Von Advance tm HRP

- Advance HRP Link (2ter AK): sekundärer Anti-Maus und Anti-Kaninchen in Tris HCL Puffer mit Stabilisierungsprotein und antimikrobiellen Stoff
- Advance tm HRP Enzym (3ter AK): mit Meerrettichperoxidase polymerisierte AK in Tris HCL Puffer mit Stabilisierungsproteinen und antimikrobiellen Wirkstoff
- DAB: Dako Dab+Chromosom Mischung
- Puffer 200ml DAB 4ml
- Puffer 100ml DAB 2ml
- Hämatoxylin 1:5 verdünnt
- Verdünnungslösung

2.4 Studienbeschreibung

Die Paraffinblöcke wurden auf einer (-20°C) kalter Eisplatte vorgekühlt. Daraus wurden die 3µm dicken Schnitte mit Hilfe des Schlittenmikrotoms angefertigt. Im Anschluss an dieses Verfahren wurden die Schnitte ins Kaltwasserbad getaucht und dort auf silanisierte Objektträger aufgezogen (für zusätzlich angefertigte HE Schnitte wurden unbeschichtete Objektträger verwendet). Danach wurden die Schnitte im Warmwasserbad (ca. 65°C) faltenfrei aufgezogen. Sie trockneten in Ständern und wurden mittels „Tupftechnik“ abgetupft. Bei Anwendung dieser Technik wird mit einem Zellulose Tuch das Wasser zwischen Objektträger und Paraffinmaterial aufgesogen, allerdings ist dies nur auf silanisieren Trägern notwendig, da hier oft die Gefahr des Abschwimmen der Schnitte besteht. Nach dieser Vorbereitung wurden die Schnitte über Nacht getrocknet, bevor mit der Färbung begonnen wurde.

2.4.1 Färbeprotokoll

Im ersten Schritt erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte. Dies geschah indem die entnommenen Proben 25min in Xylol eingelegt wurden und danach durch eine absteigende Alkoholreihe gezogen wurden, bis jeweils keine Schlieren mehr auftraten (2x100%, 2x90%, 2x 80%, 2x70%). Falls dennoch Schlieren

auftraten, musste der Schnitt 5min im Alkohol stehen gelassen werden. Durch die zweifache Verwendung von jeweils der gleichen Alkoholprozentzahl soll eine Vermischung durch den vorigen Prozentanteil des Alkohols möglichst gering gehalten werden. Anschließend wurden die Schnitte gut mit destilliertem Wasser gespült. Nach dem Einsortieren der Schnitte in EDTA Puffer mit PH 9.0, wurden diese für 4 min auf maximale Leistung, bei ca. 900W in der Mikrowelle gekocht, wobei hier alle paar Minuten der Pufferstand im Gefäß kontrolliert wurde um die Gefahr des Austrocknens der Schnitte zu verhindern. Anschließend wurde das Gefäß mit Inhalt sofort für weitere 10min bei 180 Watt geköchelt, dabei wurde abermals häufig der Pufferstand kontrolliert. Nach erfolgter Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Objektträger in das Shandon System mit Coverplates überführt (von der Anatomical Pathology International 93 Chedvik Road Asthma, Runcorn). Dieses System lässt zwischen dem Objektträger und dem Coverplate eine Lösungsmenge von 100µl zu. Das Reagenz bleibt solange in der Lücke zwischen Schnitt und Coverplate, bis von oben eine neue Lösung nachgelegt wird. Durch den Druck verlässt die alte Lösung das Coverplate und das neue Reagenz kann auf den Schnitt einwirken.

Färbung:

Es wurden immer 100µl Reagenz pro Schnitt verwendet. Zuerst wurde für den Testlauf 5 min Puffer in die Coverplates gefüllt. Dieser Test dient dazu, eventuell vorhandene Luftblasen zwischen Objektträger und Coverplate zu entdecken, da sonst die folgenden Reagenzien zu schnell durch die Coverplates laufen würden. Nach diesem Kontrollgang wurde der Primärantikörper MAGE-A 57B 1:100 verdünnt mit 100µl pro Coverplate pipettiert. Dieser musste für eine Stunde belassen werden, danach wurde jeder Schnitt 2x5 min mit Puffer gewaschen. Jetzt wurden 100µl des 2ten Antikörper pipettiert und für 20 min belassen, hinterher 2x5min mit Puffer gewaschen, bevor anschließend der 3te Antikörper, je 100µl, für 30min belassen, danach 2x5 min mit Puffer gewaschen wurde. Als Färbereagenz wurde für 10 min DAB pipettiert, dieses wurde anschließend ebenfalls 2x5 min mit Puffer abgewaschen. Nun konnten die Objektträger aus den Coverplates heraus, in Ständer einsortiert werden, um mit der

Nachbereitung der Schnitte beginnen zu können. Hier wurden sie 3 min gegengefärbt mit Hämatoxylin und für die Färbereaktion 10 min mit Leitungswasser gewaschen. Hinterher wurden sie in Alkohol getaucht, konnten 25min im Brutschrank trocknen, oder durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen werden und anschließend mit dem Eindeckautomat eingedeckt werden.

2.5 Auswertung

2.5.1 Hard und Software

Für die Literaturübersicht wurde End-Note verwendet, die Statistik wurde mit Hilfe des Lehrstuhles für Mathematik und Statistik an der Universität Würzburg (Leitung Prof. Dr. Michael Falk) mit SAPS 15.0.1 ausgewertet.

2.5.2 HE-Färbungen

Die HE-Färbung stellt eine Standardfärbung in der histopathologischen Untersuchung dar. Hämalaun färbt alle basophilen Strukturen blau (insbesondere Zellkerne mit der enthaltenden DNA und das raue Endoplasmatische Retikulum). Alle eosinophilen Strukturen, sowie die Plasmaproteine werden rot gefärbt.

2.5.3 Die MAGE-A-Antikörper Färbung

Der Antikörper für die immunhistochemische Färbung ist ein muriner monoklonaler Antikörper. Dieser bindet an spezifische Oberflächenproteine und entfaltet seine Wirkung je nach Oberflächenprotein [78]. Der Antikörper 57B reagiert gegen eine größere Gruppe MAGE-A-Antigene und ihren Untergruppen. Es wurde inzwischen herausgefunden, dass der monoklonale Antikörper 57B nicht gegen alle MAGE Gruppen wirksam ist, sondern hauptsächlich gegen MAGE-Gen-A1, -A3, -A4, -A6, -A12 [59], wobei sich verschiedenen Studien hier hinsichtlich z.B. MAGE-A2 unterscheiden [79, 80]. Er ist nicht gegen MAGE -A8, -A9, -A10, -A11 wirksam [81]. Es zeigte sich jedoch auch, dass der Antikörper 57B eine der

stärksten Färbereaktionen im Verhältnis zu anderen, wie MA 454 (MAGE-A1) oder ES121 (NY-ESO-1) zeigt [53]. Er präsentiert ein geringeres Färbeverhalten, als z.B. CT7 [82].

Bei positiver Färbung färben sich die Zellkerne braun und das restliche Gewebe lila/blassblau. Bei negativen Ergebnissen färbt sich das komplette Gewebe lila/blassblau.

Die fertigen Präparate wurden mit Hilfe des Lichtmikroskops untersucht (Standard 20 von Zeiss), ausgewertet und in den Vergrößerungen (40fach, 100fach, 200fach) fotodokumentiert. Die direkte Beurteilung im Vergleich erfolgte nach Digitalisierung der Fotos mit Hilfe des Score Indexes.

Der Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Giulio C. Spagnoli (onkologische Chirurgie, Institut für chirurgische Forschung und Klinikmanagement, Universitätsklinik Basel, 4031 Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Zur Züchtung wurden rekombinante MAGE-A3-Antigene verwendet, in diesen immunhistologischen Schnitten erkennt der Antikörper die Antigene aus dem gesamten Präparat, sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma einer Zelle [83].

2.5.3.1 Methoden der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode zur Identifizierung zellulärer Bestandteile oder Gewebebestandteile mittels Antigen-Antikörper Reaktion. Hierbei gibt es zwei verschiedene Methoden, die indirekte und die direkte. Die Färbungen wurden mit der indirekten 3-Schritt Methode durchgeführt. Bei dieser Methode bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Es folgt ein zweiter enzymmarkierter Antikörper, welcher gegen das Fc-Fragment des ersten gerichtet ist. Wenn der erste Antikörper aus der Maus ist, darf der zweite nur aus einem anderen Tier, wie zum Beispiel Kaninchen stammen. Ein dritter Antikörper folgt, welcher enzymgekoppelt ist (siehe Abbildung 9). Danach kommt das Substrat „Chromogenreaktion“. Diese Methode ist um ein vielfaches empfindli-

cher, als die 2-Schritt Methode oder die direkte Methode, da mehr Enzymmoleküle zum Gewebsantigen gelangen, es folgt eine stärkere Farbintensität. Allerdings besteht hier eine höhere Gefahr der Kreuzreaktion [84].

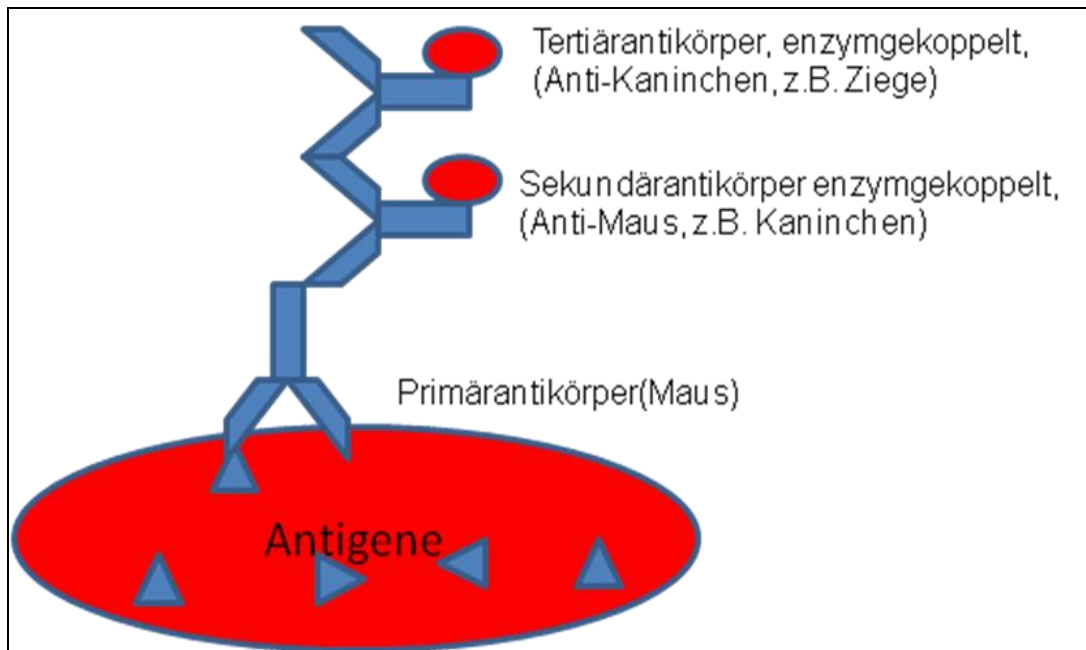


Abbildung 9: indirekte 3-Schritt-Methode

2.5.4 Auszählung der gefärbten Zellen mittels Score-Beurteilung

Die Präparate wurden mit Hilfe eines Scores beurteilt. Der Score wurde nach einem Schema von Remmele, in einer Modifikation von seiner ersten Score Beurteilung von 1986 durchgeführt [85]. Diese Beurteilung gab den geringsten InterObserverVariation (=beste Übereinstimmung der Resultate) einzelner Untersuchungen. Der Score setzt sich aus zwei Parametern zusammen. Aus SI, was die Stärke der Färbung angibt und aus PP, was den prozentual gefärbten Anteil des Präparates angibt. Aus diesen zwei Parametern ergibt sich der immunreaktive Score durch Multiplikation.

(1) SI wird in 4 Stufen unterteilt:

Stufe 0: negativ

Stufe 1: schwach positiv

Stufe 2: mäßig positiv

Stufe 3: stark positiv

(2) PP wird in 5 Stufen eingeteilt

Stufe 0: negativ

Stufe 1: <10% positive Zellen

Stufe 2: 10-50% positive Zellen

Stufe 3: 51-80% positive Zellen

Stufe 4: >80% positive Zellen

IRS ergibt sich aus SI multipliziert mit PP.

Die IRS Skala kann die Werte 0,1,2,3,4,6,8,9,12 annehmen.

2.6 Angaben zur Statistik

Die Untersuchung der Läsionsränder wurde mit Hilfe von 5 Pathologen durchgeführt. Diese bewerteten die Läsionsränder zwischen gesunder und erkrankter Mundschleimhaut auf einer Skala von „minus zwei“ bis „plus zwei“. „Minus zwei“ bedeutet hierbei, dass die herkömmliche Färbung mit HE bessere Resultate bringt. Das Ergebnis „Null“ sagt aus, dass die HE-Färbung und die MAGE-Färbung gleich gut sind und „Plus Zwei“ heißt, dass die MAGE-Färbung wesentlich besser ist (siehe Tabelle 3).

HE viel besser	HE besser	HE und MAGE gleich gut zu beurteilen	MAGE besser	MAGE viel besser
-2	-1	0	1	2

Tabelle 3: Bewertungsbogen für die Pathologen

Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe des Wilcoxon-signed-Rank und mit dem Kruskal–Wallis-Test ausgewertet.

Der Kruskal-Wallis-Test ist ein nicht-parametischer, statistischer Test, bei dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich unabhängige Gruppen hinsichtlich einer skalierten Variable unterscheiden. Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurden die verschiedenen Dysplasiegrade I/ II / III getrennt auf ihre Signifikanz geprüft.

Der Wilcoxon-signed-Rank Test ist ein nicht-parametischer Test. Dieser dient dazu, signifikante starke Abweichungen der Angaben der Pathologen untereinander zu vergleichen. Dieser kann zwei gepaarte Stichproben, oder auch mehrere, wie in diesem Fall, auf ihre Gleichheit prüfen.

Diese Untersuchung wurde zweimal durchgeführt. In der ersten Untersuchung war es den Pathologen möglich, das ganze Präparat zu betrachten und eigene Übergangsbereiche zwischen gesundem und erkranktem Gewebe zu identifizieren. Im zweiten Durchlauf wurde ihnen ein photographierter Bereich vorgelegt, in dem der Übergang benigne/maligne Schleimhaut genau festgelegt war. Dies wurde mit Hilfe einer PowerPoint Präsentation präsentiert (Die Präsentation befindet sich im Anhang). Für diese beiden Durchgänge wurden jeweils dieselben Präparate verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Positivkontrolle

Als Positivkontrolle dienten Präparate aus der Plazenta, dem Hoden und ein invasives Karzinom aus der Wange. Diese zeigten alle deutliche Reaktionen mit dem Antikörper, wie auch schon vergangene Untersuchungen beweisen konnten [86]. Die Ansicht einer solchen Positivkontrolle ist in Abbildung 10 dargestellt.

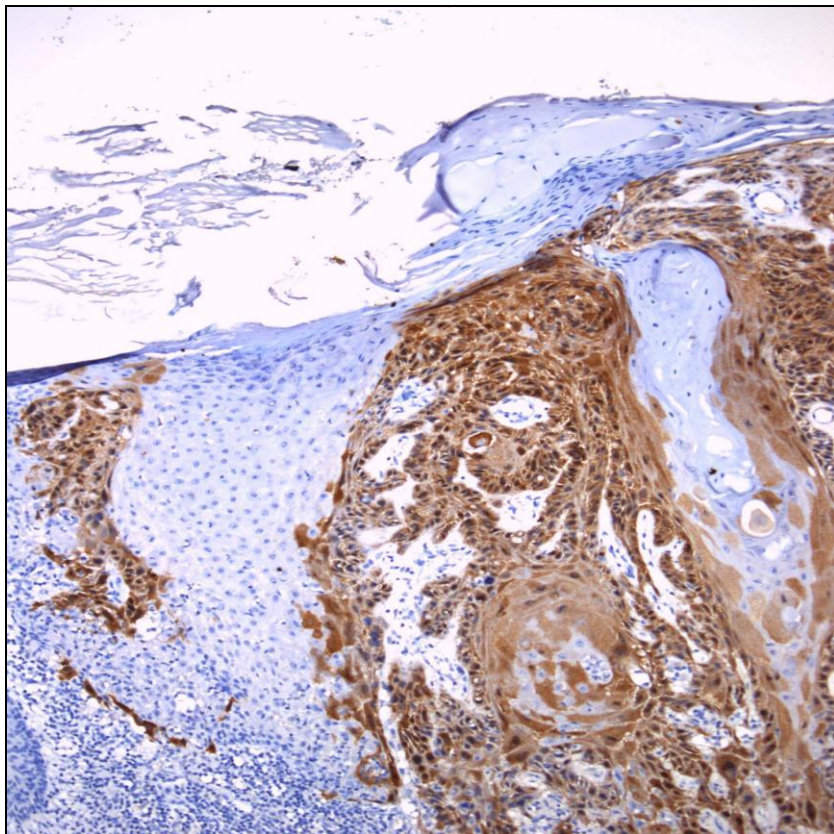


Abbildung 10: Expression von MAGE-A-Antigenen in normalen Zellen und einem invasiven Karzinom

3.2 MAGE-A in oralen Schleimhautläsionen

3.2.1 Zahnsäckchen/ Zysten

Von den 13 Präparaten konnte bei keinem ein Antigennachweis erbracht werden. Abbildung 11 zeigt eine HE-Färbung ohne MAGE-A-Antigennachweis einer nicht gefärbten follikulären Zyste in zwei verschiedenen Vergrößerungen.

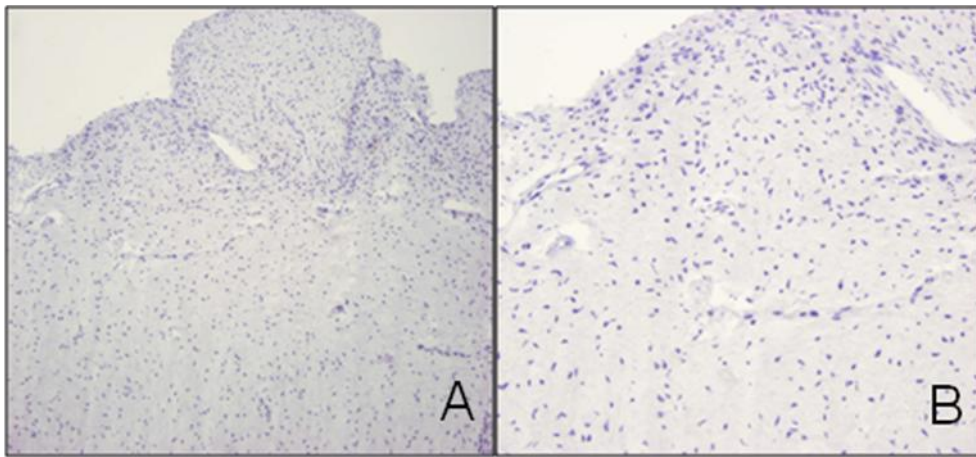


Abbildung 11: nicht gefärbte follikuläre Zyste (Nr.03 22096), 100x Vergrößerung (A), 200x (B) mit Antikörper MAGE 57B

3.2.2 Ulzera

Von den 25 Untersuchungen erbrachte kein Präparat einen Antigennachweis. Abbildung 12 zeigt eine HE-Färbung ohne MAGE-A-Antigennachweis eines nicht gefärbten Ulcus in zwei verschiedenen Vergrößerungen.

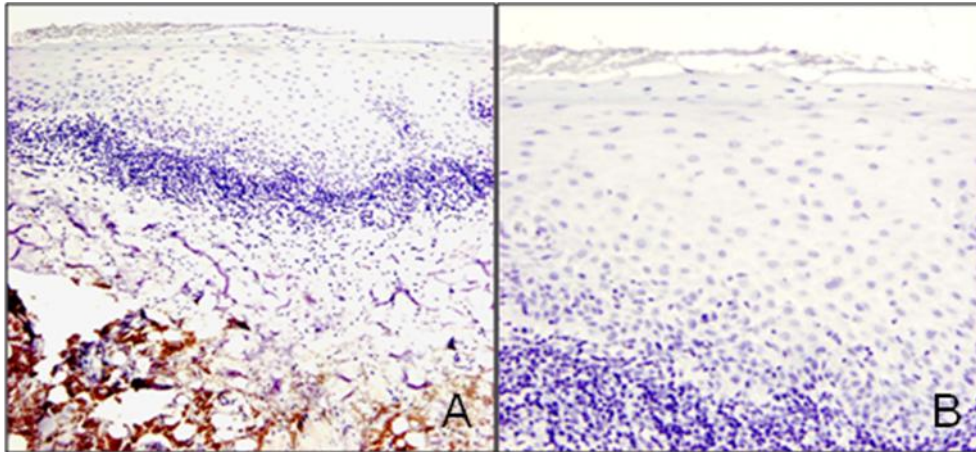


Abbildung 12: nicht gefärbtes Ulcus (Nr.08 11345), 100x Vergrößerung (A), 200x (B) mit Antikörper MAGE 57B

3.2.3 Epulis

Von den 26 untersuchten Präparaten zeigte keines einen Nachweis für die MAGE-A-Antigene. Die Präparate stellten sich somit als reine HE-Färbung dar. Abbildung 13 zeigt eine nicht angefärbte Epulis granulomatosa in zwei verschiedenen Vergrößerungen.

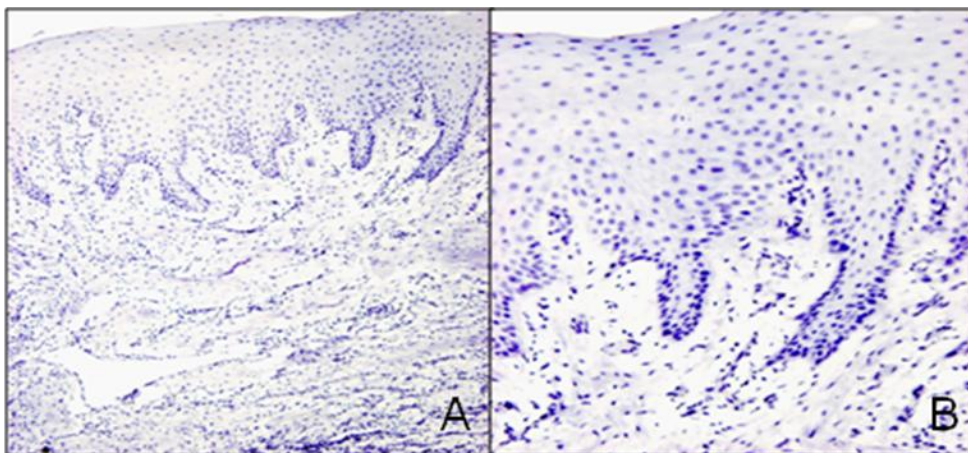


Abbildung 13: nicht gefärbte Epulis granulomatosa (Nr. 06 24776), 100x Vergrößerung (A), 200x (B) mit Antikörper MAGE 57B

3.2.4 Lichen planus

Keines der 26 Präparate zeigte einen Antigennachweis. Abbildung 14 zeigt eine HE-Färbung ohne MAGE-A-Antigennachweis eines Lichen planus in zwei verschiedenen Vergrößerungen.

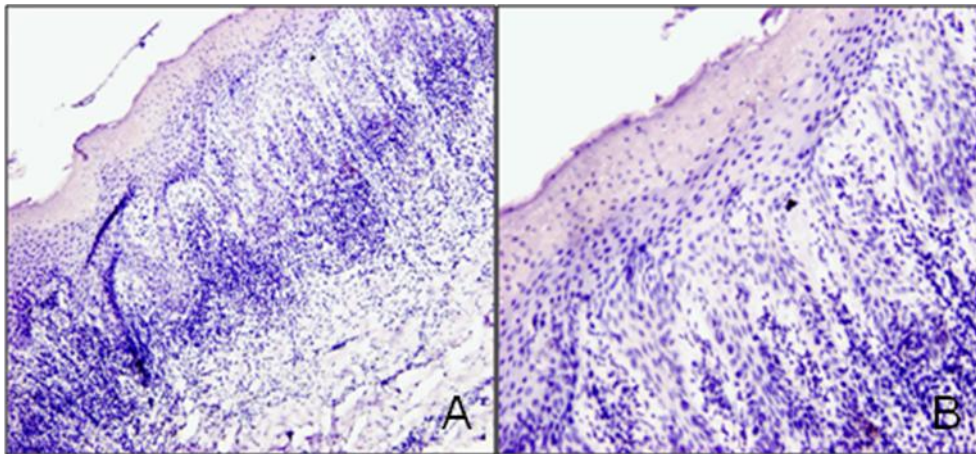


Abbildung 14: nicht angefärbter Lichen planus (Nr.08 1629), 100x Vergrößerung (A), 200x (B) mit Antikörper MAGE 57B

3.2.5 Leukoplakie ohne Dysplasie

Es wurden 33 Präparate untersucht, die, von einer Ausnahme abgesehen, keinen Nachweis für die gesuchten Antigene zeigten. Laut Befundtext handelte es sich bei diesem Fall um eine Leukoplakie ohne Dysplasie des Gaumens mit erosiver Entzündung. Abbildung 15 zeigt eine HE-Färbung einer Leukoplakie ohne MAGE-A-Antigennachweis in zwei verschiedenen Vergrößerungen.

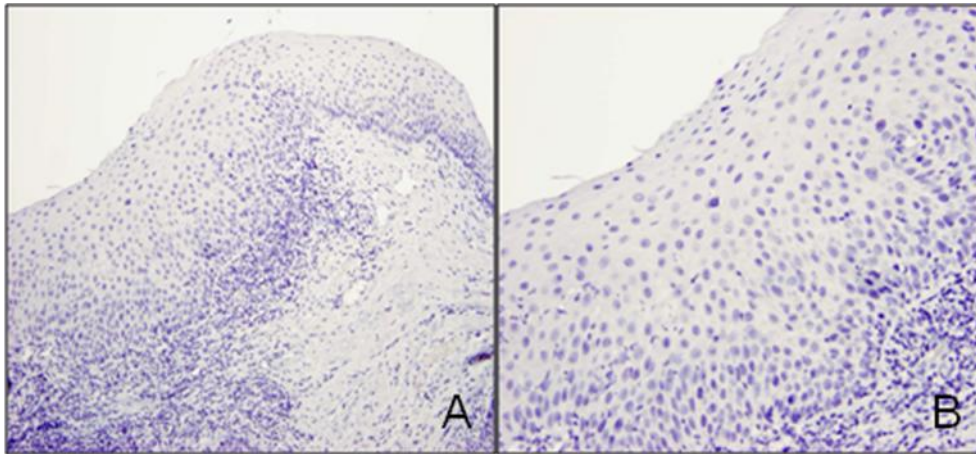


Abbildung 15: nicht gefärbte Leukoplakie (Nr. 07 10026.2), 100x Vergrößerung (A), 200x (B) mit Antikörper MAGE 57B

3.2.6 Leukoplakie mit Dysplasie

Bei der Leukoplakie mit Dysplasie zeigten sich 8 von 24 untersuchten Präparaten positiv, d.h. 33,33% und 66,67% negativ. Hier wurde der geringste Durchschnittsscore der drei gefärbten prämaligen Erkrankungen mit 2,4 erreicht. Abbildung 16 zeigt eine immunohistochemische Färbung einer Leukoplakie mit Dysplasie.

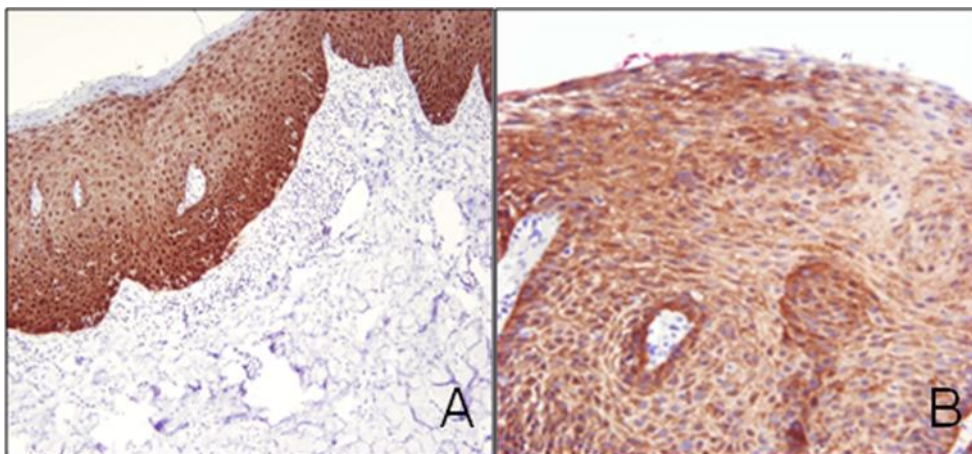


Abbildung 16: Leu+Dys (Nr. 06 7589.2), 100x Vergrößerung (A), 200x (B) braune Epithelfärbung der Dysplasie mit Antikörper MAGE 57B

3.2.7 Dysplasie

Bei der Dysplasie wurden 26 Fälle untersucht, dabei waren 65,38% positiv, d.h. 17 Präparate zeigten einen positiven, 9 Stück einen negativen Score. Betrachtet man den Score in Abhängigkeit vom Grading, dann kann man keine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern feststellen, PP und SI hingegen zeigen eine Korrelation, was bedeutet, dass mit wachsender Prozentzahl der Dysplasiefärbung, die Färbung auch intensivierter wird. Der Durchschnittsscore liegt bei 3,2 und somit etwas niedriger, als bei den Carcinomata in situ. Die Färbereaktion wird in Abbildung 17 sichtbar.

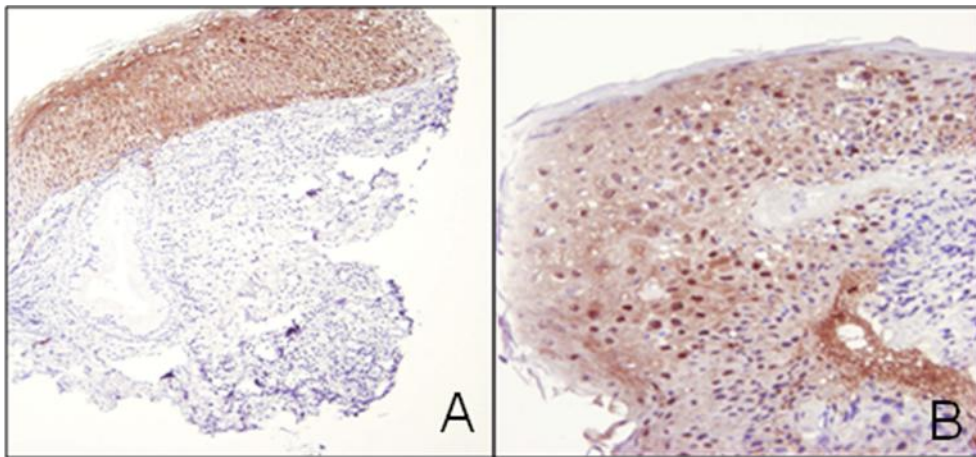


Abbildung 17: Dys (Nr. 05 703), 100x Vergrößerung (A), 200x (B) braune Epithelfärbung der Dysplasie mit Antikörper MAGE 57B

3.2.8 Carcinomata in situ

Bei den 38 Präparaten mit dem Befundtext Carcinoma in situ waren 23/38 bei den Untersuchungen positiv gefärbt, was bedeutet, dass 60,53% eine Färbung zeigten, und 39,47% negativ waren. Der Durchschnittsscore liegt bei 3,8. Die Abbildung 18 zeigt die Färbungen eines Carcinom in situ.

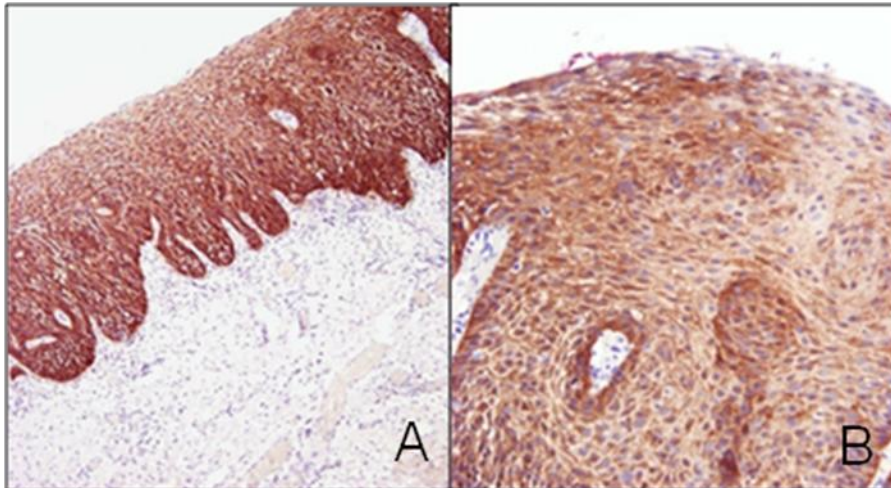


Abbildung 18: Cis (Nr. 04 7931), 100x Vergrößerung (A), 200x (B) braune Epithelfärbung mit Antikörper MAGE 57B

3.2.9 Grading im Vergleich

3.2.9.1 Grading im Verhältnis zu Anfärbequote

In folgendem Diagramm (Abbildung 19) ist dargestellt, dass die prozentual häufigste Färbung beim Grad 2 und 3 liegt. Die Höhe der Entdifferenzierung ist nicht linear mit der prozentualen Anfärbung korreliert. Bei Grad I ist die geringste Abfärbung zu finden und bei Grad II und III die höchste.

Aus Tabelle 4 ist zudem ersichtlich, wie groß die Gruppengrößen der verschiedenen Gradings sind und das insgesamt deutlich mehr Präparate von Männern untersucht wurden. Das Alter steigt mit dem Differenzierungsgrad III auf 67 Lebensjahre an.

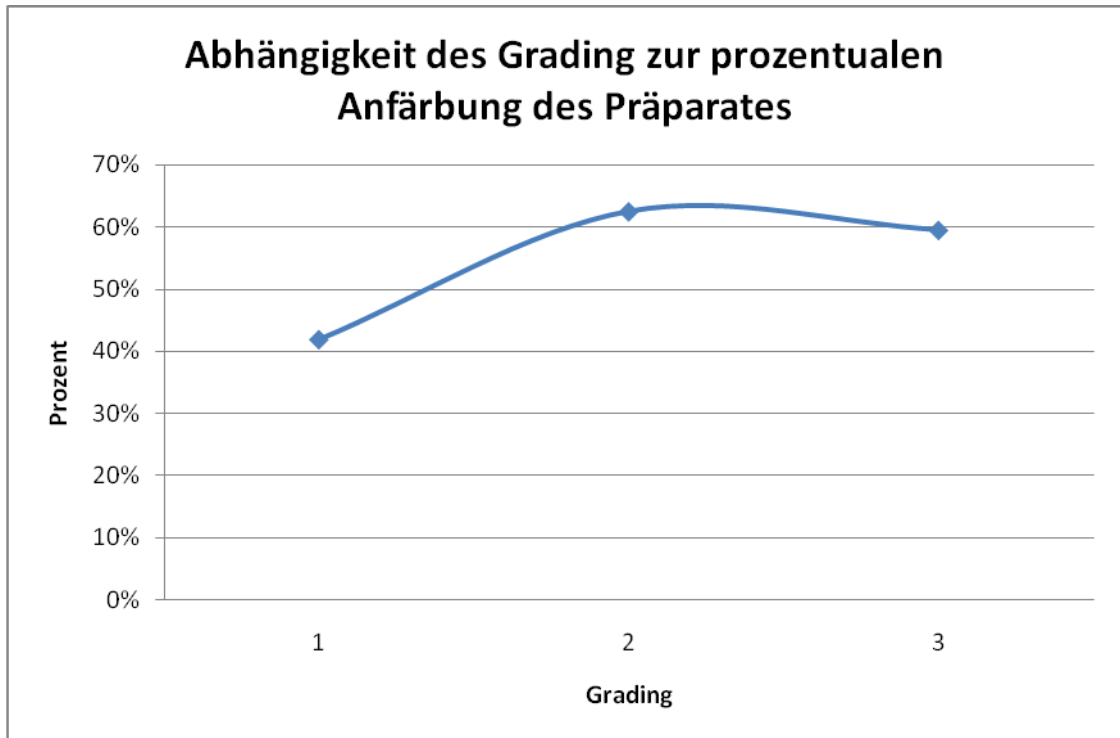


Abbildung 19: Grading in Relation zur prozentualen Anfärbung

Patienten	Grad	Score	Männer	Frauen	Alter	positive
34	1	2,46	19	12	64	41,90%
16	2	3,56	9	7	57,2	62,50%
42	3	3,69	33	9	67,23	59,50%

Tabelle 4: prozentuale Anfärbung zum Grading

3.2.9.2 Grading im Verhältnis zum Score

Das Grading im Verhältnis zum Score verdeutlicht, dass der Score beim gut differenzierten Gewebe des Grades I sehr gering ist. Den stärksten Score finden wir bei Grad III mit 3,7 Punkten und den kleinsten bei Grad I mit 2,4 Punkten (siehe Tabelle 4 und Abbildung 20).

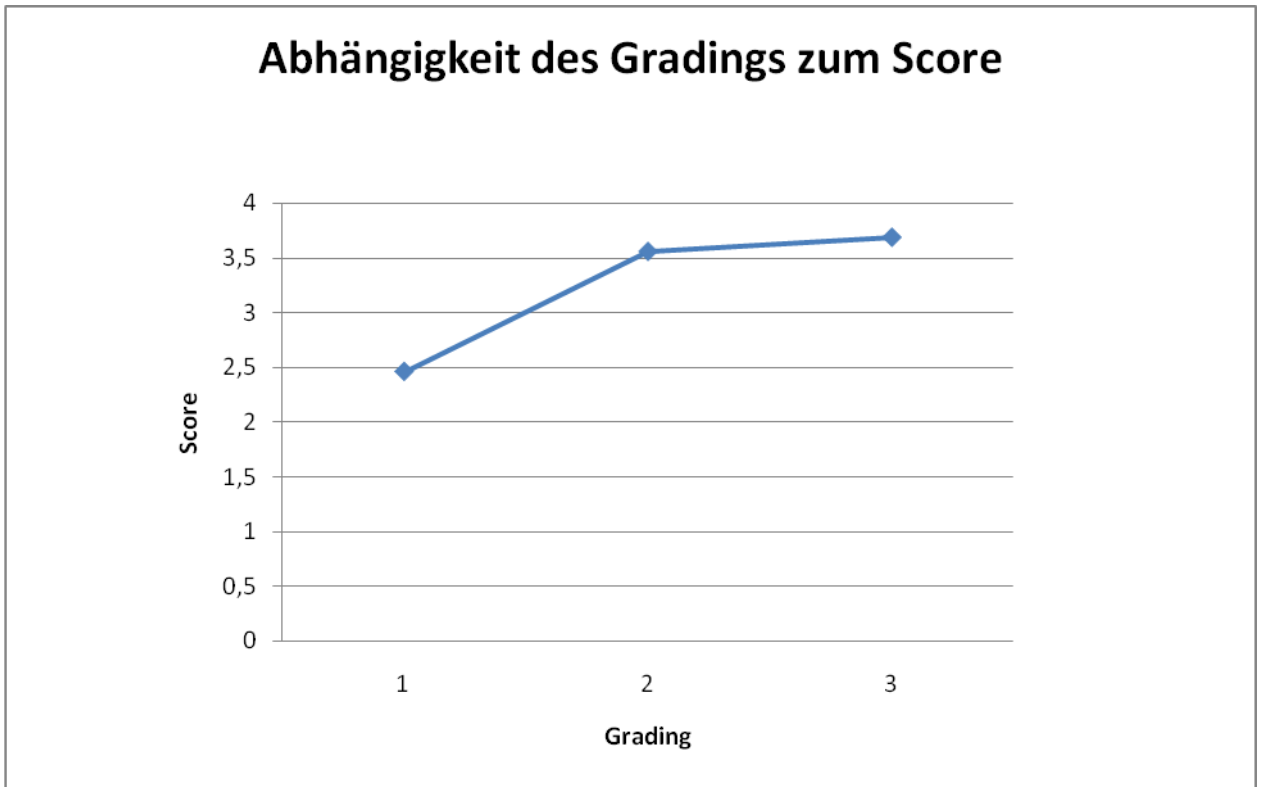


Abbildung 20: Grading in Relation zum Score

3.3 Beurteilung der Resektionsränder

Bei der Beurteilung der Resektionsgrenzen stellte sich heraus, dass sich die Übergänge von erkranktem zu gesundem Gewebe sehr gut darstellen lassen und die Grenze zwischen den verschiedenen Geweben eindeutig sichtbar wird. Zur Veranschaulichung dienen Abbildung 21 A und B, ein Carcinom in situ. Hier wird das MAGE 57B gefärbte Präparat mit einem HE gefärbtem Präparat verglichen. Dabei lässt sich erkennen, dass auf dem MAGE 57B gefärbten Präparat die Grenze zwischen benigner und maligner Schleimhaut eindeutig sichtbar wird. Ebenso bei der Abbildung 22, einer Dysplasie, und der Abbildung 23, einer Dysplasie mit Leukoplakie. Sowohl bei der Dysplasie, bei der Dysplasie in Verbindung mit der Leukoplakie und dem Carcinom in situ sind gut sichtbare Grenzen zwischen benigner und maligner Schleimhaut erkenntlich. Auch konnte man bei jedem der Dyplasiegrade I-III zu diesem Ergebnis gelangen.

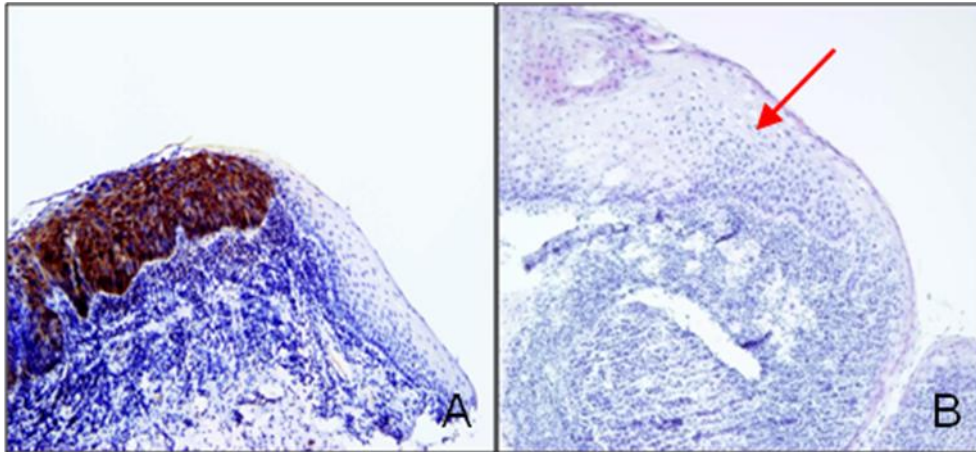


Abbildung 21: Vergleich der Färbemethoden eines Cis (Nr. 04 1124): (A) 100x Vergrößerung mit Antikörper 57B: Das Carcinom ist durch den MAGE-A-Antikörper 57B gefärbt. Es ist eine deutliche Abgrenzung zur regulären Epithelschichtung im gesunden, HE-gefärbten Präparat sichtbar. (B) 100 x Vergrößerung der HE-Färbung. Der Pfeil markiert die Grenze zwischen dem Carcinom in situ mit aufgehobener Zellschichtung und dem regulären Epithel.

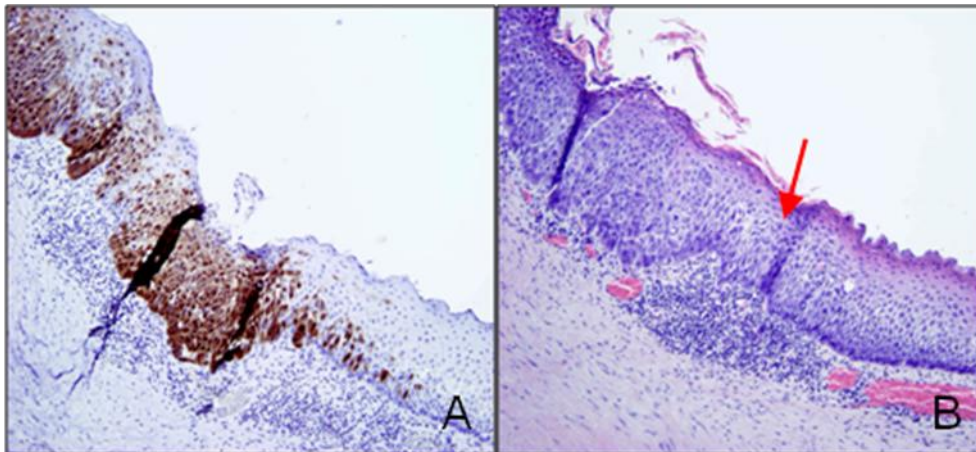


Abbildung 22: Vergleich der Färbemethoden bei einer Dysplasie Grad III (Nr. 08 6173): (A) 100x Vergrößerung mit Antikörper 57B. Die Dysplasie Grad III ist durch den MAGE-A-Antikörper 57B gefärbt, man erkennt dysplastische Bereiche mit Basalzellhyperplasien, ungerichteter Zellschichtung und verminderter Zelladhäsion. In der Vergrößerung sind versprengten Zellen im subepithelialen Bereich sichtbar. (B) 100x Vergrößerung der HE-Färbung. Der Pfeil markiert den Übergang der Dysplasie in reguläres Epithel mit Entzündungszellen.

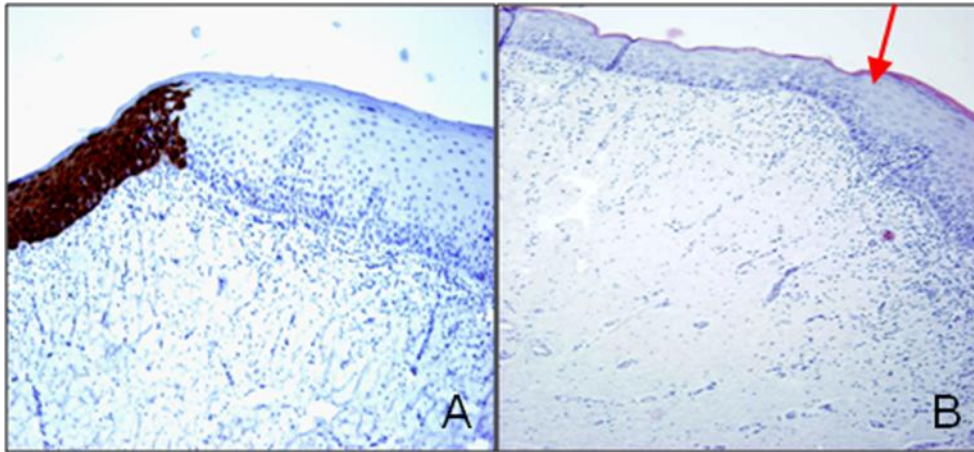


Abbildung 23: Vergleich der Färbemethoden einer Leu+ Dys (Nr. 06 7589.2): (A) 100x Vergrößerung mit Antikörper 57B. Eine deutliche Grenze zwischen der Dysplasie Grad II (durch MAGE-A-Antikörper 57B gefärbt) und der regulären Epithelschichtung (HE-gefärbt) ist erkennbar. (B) 100x Vergrößerung der HE-Färbung. Der Pfeil markiert den Übergang der leichtmäßigen Dysplasie in das regulär geschichtete Epithel.

3.3.1 Ergebnisse der Inter observer Untersuchung

Es wurden 9 Dysplasien mit Grad III, 4 Dysplasien mit Grad II und 5 Dysplasien mit Grad I untersucht. Bei der Untersuchung der Resektionsränder mit der Inter observer Untersuchung kam folgendes Ergebnis zustande. Die HE-Färbung wurde einmal als „viel besser“ bewertet. Die HE Färbung wurde von 22 Untersuchern als „besser“ gewertet, während die „neutrale“ Beurteilung 34mal erfolgte. Die MAGE-Färbung wurde 28-mal als „besser“ angegeben und die MAGE-Färbung wurde 2-mal mit „viel besser“ bewertet. Dies bedeutet, dass im Schnitt, bei Beachtung der Wertung von -2 bis +2, öfters positive Ergebnisse für die MAGE-Färbung angegeben wurden (die Präsentation, die es zu beurteilen galt, befindet sich im Anhang).

3.3.2 Ergebnisse der Untersuchung mit den Präparaten

Es wurden in dieser Untersuchung ebenso 9 Dysplasien mit Grad III, 4 Dysplasien des Grades II und 5 Dysplasien vom Grad I untersucht. Diese Methode wurde insgesamt weniger effektiv als die vorhergehende Untersuchung einges-

tuft. Das HE Präparat als „viel besser“ wurde von keinem Untersucher ausgewählt, das HE Präparat als „besser“ wurde 30 mal bewertet, als „neutral“ wurden die Präparate 34 mal bewertet. 29 mal wurde die MAGE-Färbung als „besser“ beurteilt und 2 mal als „viel besser“.

3.4 Ergebnisse der statistischen Analyse

3.4.1 Ergebnisse des Wilcoxon Test für die Untersuchung der Fotos

Es gilt die Hypothese zu beweisen: „Die MAGE-A-Antikörper-Färbung ist besser als die HE-Färbung für die Darstellung der Randbereiche zwischen benigner und maligner Schleimhaut“. Eine statistische Signifikanz wird angenommen, wenn p auf dem Niveau $\leq 0,05$ liegt.

Dysplasie Grad I

Es zeigt sich keine Signifikanz für die Dysplasie des Grades I, da $p > 0,8624$ (siehe Tabelle 5). Das heißt, die neue Methode wurde hier weder als „besser“ noch „schlechter“ klassifiziert.

Test for Location: MU0=0				
Test	Statistic		pValue	
Student's	T	0.177618	Pr> t	0.8599
Sign	M	0.5	Pr>= M	36526
Signed Rank	S	6	Pr>= S	0.8624

Tabelle 5: statistische Analyse des Dysplasiegrades I mit dem Wilcoxon Test

Dysplasie Grad II

Es zeigte sich eine Signifikanz bei der Untersuchung mit den Fotos der Dysplasie Grad II da $p < 0,0458$ (siehe Tabelle 6), d.h. die neue Methode wurde hier als besser klassifiziert.

Test for Location: MU==0				
Test	Statistic		pValue	
Student's	T	2318153	Pr> t	0.0297
Sign	M	4	Pr>= M	0.0768
Signed Rank	S	38	Pr>= S 	0.0458

Tabelle 6: statistische Analyse des Dysplasiegrades II mit dem Wilcoxon Test

Dysplasie Grad III

Es zeigte sich keine Signifikanz bei der Dysplasie vom Grad III, da $p \geq 1$ (siehe Tabelle 7).

Test for Location: MU==0				
Test	Statistic		pValue	
Student's	T	-0,27085	Pr> t	0.7894
Sign	M	-0,5	Pr>= M	1
Signed Rank	S	-3,5	Pr>= S 	1

Tabelle 7: statistische Analyse des Dysplasiegrades III mit dem Wilcoxon Test

3.4.2 Ergebnisse des Wilcoxon Test für die Fotos aller drei Dysplasiegrade zusammen

Es konnte kein signifikantes Ergebnis für alle Dysplasien zusammengefasst nachgewiesen werden, da $p \geq 0,2194$ (siehe Tabelle 8).

Test for Location: MU==0				
Test	Statistic		pValue	
Student's	T	1,234575	Pr> t	0,2203
Sign	M	4	Pr>= M	0,30409
Signed Rank	S	129	Pr>= S 	0,2194

Tabelle 8: statistische Analyse für alle drei Dysplasiegrade mit dem Wilcoxon Test

3.4.3 Ergebnisse des Kruskal Wallis bei den Fotos

Der Kruskal Wallis Test dient dazu, zu beurteilen, ob es sehr starke Abweichungen innerhalb der verschiedenen Bewertungen untereinander gegeben hat. Da $p \geq 0,1469$ gab es keine starken Abweichungen/Meinungen der Pathologen untereinander (siehe Tabelle 9).

Kruskal-Wallis Test	
Chi Square	3,8365
DF	2
Pr>Chi-Squae	0,1469

Tabelle 9: statistische Analyse für die Abweichung der Bewertungen mit dem Kruskal Wallis Test

3.4.4 Ergebnisse des Wilcoxon Test für die Präparate der drei verschiedenen Gratings getrennt

Dysplasie Grad I

Kein signifikantes Ergebnis für die Dysplasie vom Grad I, da $p \geq 1$ (siehe Tabelle 10).

Test for Location: MU==0				
Test	Statistic		pValue	
Student's	T	0	Pr> t	1
Sign	M	-0,5	Pr>= M	1
Signed Rank	S	0	Pr>= S 	1

Tabelle 10: statistische Analyse des Dysplasiegrades I mit dem Wilcoxon Test

Dysplasie Grad II

Kein signifikantes Ergebnis für die Dysplasie mit Grad II, da $p > 0,2101$ (siehe Tabelle 11).

Test for Location: MU==0				
Test	Statistic		pValue	
Student's	T	1,540658	Pr> t	0,1365
Sign	M	3	Pr>= M	0,2101
Signed Rank	S	25,5	Pr>= S 	0,2101

Tabelle 11: statistische Analyse des Dysplasiegrades II mit dem Wilcoxon Test

Dysplasie Grad III

Keine Signifikanz bei der Dysplasie des Grades III zu sehen, da $p \geq 1,00$ (siehe Tabelle 12).

Test for Location: MU==0				
Test	Statistic		pValue	
Student's	T	0,236743	Pr> t	0,8154
Sign	M	0	Pr>= M	1
Signed Rank	S	3,5	Pr>= S 	1

Tabelle 12: statistische Analyse des Dysplasiegrades III mit dem Wilcoxon Test

3.4.5 Ergebnisse des Wilcoxon Test für die Präparate aller drei Grading zusammen

Auch bei der Zusammenfassung aller drei Gradings konnte keine Signifikanz für die neue Färbemethode im Randbereich nachgewiesen werden, da $p \geq 0,3806$ (siehe Tabelle 13).

Test for Location: MU==0				
Test	Statistic		pValue	
Student's	T	0,880818	Pr> t	0,3808
Sign	M	2,5	Pr>= M	0,5966
Signed Rank	S	98,5	Pr>= S 	0,3806

Tabelle 13: statistische Analyse für alle drei Dysplasiegrade mit dem Wilcoxon Test

3.4.6 Ergebnisse des Kruskal Wallis Test für die Präparate

Es wurden keine signifikanten Abweichungen der Untersucher untereinander festgestellt, da $p \geq 0,45$ (siehe Tabelle 14).

Kruskal-Wallis Test	
Chi Square	1,5906
DF	2
Pr>Chi-Squae	0,4515

Tabelle 14: statistische Analyse für die Abweichung der Bewertungen mit dem Kruskal Wallis Test

4 Diskussion

4.1 MAGE-A-Antigene in oralen Schleimhautläsionen im Vergleich mit anderen Autoren

Der erste Untersuchungsteil der experimentellen retrospektiven Studie befasst sich mit dem Nachweis von MAGE-A-Antigenen in gutartigen, prämaligen und malignen Veränderungen der Mundschleimhaut. Die Unterscheidung zwischen diesen Stadien, die klinisch oft schwierig ist, gilt es zu verbessern. In den durchgeführten Untersuchungen reagierte nur 1/128 der gutartigen Veränderungen positiv auf die MAGE-A-Antigene. Bei der positiven Veränderung handelt es sich um eine Leukoplakie ohne Dysplasie mit erosiver Entzündung. Bei den übrigen Erkrankungen der Leukoplakien, dem Lichen, der Epulitiden, der Ulzera und den Zahnsäckchen konnten keine MAGE-A-Antigene nachgewiesen werden. Dies zeigt eine hohe Spezifität von fast 100% für die immunhistochemische Färbung mit MAGE-A-Antigenen zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen veränderter Mundschleimhaut. Die malignen Veränderungen zeigten in dieser Untersuchung eine Sensitivität zwischen 33% und 65% und eine Spezifität von 100%. Lee et al. (1996) machten die bisher einzige Studie, die sich auch auf gutartige Veränderungen in der Mundschleimhaut bezog. Er verwendete als Nachweismethode die PCR-Analyse und die Southern-Blot-Hybridisierung. Diese Methoden weisen die MAGE-A-Antigene weitaus sensitiver als die Immunhistochemie mit mAb-57B nach (siehe Kapitel 4.1.2 Sensitivität). Er fand hierbei heraus, dass sich keine MAGE-A-Antigene in der gutartig veränderten Mundschleimhaut befinden und untersuchte dabei 10 verschiedenen Läsionen, unter anderem die Ulzera, die Hyperplasie und die Keratose. Dagegen entdeckte er in einer untersuchten Dysplasie die MAGE-A-Antigene -2, -3, -4, -6 [87]. Lee et al. gelangten somit zu dem gleichen Ergebnis, wie diese Studie, dass in gutartig veränderten Läsionen keine MAGE-A-Antigene exprimiert werden und diese bei prämaligen Prozessen und malignen Tumoren auftreten.

Diese Unterscheidung zwischen gutartiger und bösartiger Veränderung des Plattenepithels wurde schon früh im Bereich der Haut entdeckt. Lüftl M. et al. haben 2004 in einer Studie feststellen können, dass man mit dem Antikörper mAb-57B zwischen gutartigen Nävi und bösartigen Melanomen unterscheiden kann. Allerdings lag die Sensitivität mit nur 29% der 38 gefärbten Melanome wesentlich niedriger, als die Sensitivität von 33-65% in dieser Studie [88]. Bei Klaus J. Busam et al. im Jahre 2000, ebenfalls eine Untersuchung der Haut, stellte sich jedoch kein einziger primäres Melanom in situ als positive Färbung dar. Bei seinem Experiment färbten sich nur 26% der invasiven Karzinome und 25% der Hautmetastasen [89]. Aubry Florence et al. haben 2001 immunhistochemische Färbungen mit dem Antikörper mAb-57B zum Auftreten von MAGE-A4 in Seminomen durchgeführt. Er nahm an, dass der Antikörper mAb-57B hauptsächlich gegen MAGE-A4 gerichtet ist [81]. Hierbei stellte sich bei den Carcinomata in situ meist nur eine Teilfärbung des erkrankten Gewebes dar. Vier Fälle der Carcinomata in situ waren bei Florence eindeutig positiv, 9 sowohl positiv als auch negativ und 2 eindeutig negativ [90]. Dies wäre allerdings auch durch die Experimente von Landry zu erklären. Er fand heraus, dass der Antikörper 57B hauptsächlich Tumoren anfärbt, die gegen das Antigen-MAGE-A4 gerichtet sind und bei Tumoren mit wenig MAGE-A4-Antigen auch nur eine schwache Färbung eintritt [81].

Zudem gilt es weiterhin, die prozentuale Anfärbung eines Tumorgebietes zu verbessern, um die genaue Ausdehnung des Gewebes zu erkennen. Scalan et al. zeigten auch auf, dass durch den Antikörper nicht das gesamte Tumorgewebe angefärbt wird. Er sagt dass 5-50% der Zellen positiv für MAGE-A-Expression in 25-33% der MAGE positiven Tumoren sind. Auch in der hier durchgeführten Studie ergibt sich eine relativ große Spanne, die jedoch bis zu 90% des Tumors anfärbt. Dieser Spanne wird durch den PP-Index Ausdruck verliehen (siehe auch Material und Methoden Kapitel 2). Diese prozentuale Anfärbung des Tumorgebietes könnte durch Kombination mit anderen Antikörpern verbessert werden, die auf weitere C/T Antigene spezialisiert sind. So z.B. auf NY-ESO-1, diese stellen ebenfalls eine Untergruppe der C/T-Antigene dar [91].

Die Ergebnisse sind also je nach Lokalisation des Tumors sehr unterschiedlich. Außerdem muss eine Analyse der Subgruppen vorgenommen werden, um z.B. die MAGE-A4 Expressionsstärke zu bestimmen. Zudem findet sich bisher nur eine vergleichende Studie für die oralen Bereiche. Aber auch die Ergebnisse an der Haut zeigen, dass die MAGE-A-Antigene gut zur Differenzierung zwischen benignen und malignen Tumoren geeignet sind.

4.1.1 Korrelation der MAGE-A-Antigene mit dem Grading

In der Gruppe Leukoplakie mit Dysplasie liegt die prozentuale Anfärbung bei 33,3%. Hier sind die Dysplasien meist nur gering bis mäßig (Grading I–II) und zeigen dadurch kein so hohes Entartungsrisiko wie die Dysplasie vom Grad III. Bei der reinen Dysplasiegruppe (ohne Leukoplakie) liegt die positive prozentuale Anfärbung höher (bei 65,3%). Die Carcinomata in situ liegen bei 56,1%. Im Gesamten lässt sich sagen, je schlechter der Tumor differenziert ist, umso höher ist die Färbequote des Schnittes. Müller-Richter et al. haben 2009 in diesen Zusammenhang in einer Studie nachgewiesen, dass umso mehr MAGE-A-Antigene exprimiert werden, umso schlechter der Tumor differenziert ist (G1=50%; G2=45%; G3=83%) [92]. David L.A. Figueiredo et al. zeigten 2005 bei der Untersuchung der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome mit der PCR-Analyse ebenfalls einen anderen Zusammenhang mit klinischen Parameter. Es wurden umso mehr MAGE-A-Antigene im Tumor exprimiert, je höher die T-Klassifikation und somit die Größe des Tumors war. Er konnte allerdings keinen Zusammenhang zwischen MAGE-A-Antigenexpression und Tumordifferenzierungsgrad feststellen [93]. Auch Ries et al. fanden 2008 in einer anderen Untersuchung keinen Zusammenhang zwischen der Expression der MAGE-A-Antigene, klinischen Parametern (TNM-Klassifikation), sowie dem Differenzierungsgrad [62, 93]. Sowohl Ries et al. als auch Figueiredo et al. haben dabei mit der PCR-Analyse gearbeitet. Müller-Richter et al. dagegen verwendeten die Immunhistochemie, deshalb lassen sich seine Ergebnisse besser mit denen dieser Untersuchung vergleichen. Ein Grund für den fehlenden Zusammenhang zwischen Score und Entdifferenzierung könnte mit der Verwendung der PCR-

Analyse zusammenhängen. Auch waren die Untersuchungen für die Expression der MAGE-A-Antigene mit dieser PCR-Analyse nicht quantitativ. Daher kann nicht beurteilt werden, ob die Expression in den einzelnen Versuchen als niedrig oder hoch einzustufen ist oder ob das Antigen nur von einem Teil der Zellen exprimiert werden kann.

4.1.2 Sensitivität im Vergleich mit anderen Autoren

Die Sensitivität schwankte je nach Untersuchungsgruppe stark. So zeigte die Leukoplakie mit der Dysplasie die geringste Sensitivität mit nur 33%, für die klinische Anwendung ein nicht ausreichendes Ergebnis. Die Sensitivität konnte bei anderen Studien durch das Nutzen der PCR-Analyse um einiges erhöht werden. Hier werden Sensitivitäten von bis zu 85% erreicht, wie es Ries in vergangenen Studien mit oralen Plattenepithelkarzinomen zeigte [62, 94]. In einer Studie von Müller-Richter et al. 2009 wurden orale Plattenepithelkarzinome immunhistochemisch untersucht, hierbei färbten sich insgesamt 55% der Patientenproben [92]. Müller-Richter et al. konnten 2007 nachweisen, dass eine hohe positive Real-Time-PCR nicht unbedingt mit einer hohen Anzahl an Quantitativer Real-Time-PCR verbunden sein muss, ebenso nicht mit einer hohen Anzahl immunhistochemisch gefärbter Präparate [54]. Die PCR-Analyse ist hochsensitiv. Die Nachteile der PCR-Analyse sind die hohe Rate falsch positiver Ergebnisse und die kostenintensive lange Untersuchungsdauer. Zudem weist die Immunhistochemie den Vorteil auf, dass zusätzlich noch anhand der Morphologie das Ergebnis überprüft werden kann.

4.1.3 Expression der Antigene

Wir haben für prä-maligne Läsionen eine hohe Spezifität von 99,22%, da es nur eine falsch positive Reaktion einer Leukoplakie gab. Für benigne und maligne Läsionen weist die Untersuchung eine Spezifität von 100% nach. Für diese positive Reaktion der Leukoplakie können verschiedene Gründe eine Rolle spielen. Zum Beispiel könnte sie bei der morphologischen Beurteilung noch keine sichtbare Dysplasie nachweisen, jedoch schon gewisse Veränderungen der

MAGE-A-Antigene aufweisen, um diese schwache Färbung zu erzeugen. Eine unterschiedlich starke Vertretung von MAGE-A-Antigenen in oralen Plattenepithelkarzinomen wurde ebenfalls nachgewiesen. So ist MAGE-A4 das häufigste Antigen, diesem folgt -A3 und danach ist -A12 anzutreffen [62]. Die MAGE-A-Antigene, die nicht vom mAb-57B erkannt werden sind MAGE -A8, -A9, -A10, [95] und -A11 [81]. Hierbei zeigten sich auch Ähnlichkeiten zu dem Verhalten der Tumoren des Ovars. So wurde bei einer Studie durch Yamada 1995 auch eine unterschiedliche Häufigkeit der Expression der verschiedenen Antigene je nach Tumor festgestellt. Zusätzlich stellte er fest, dass in benignen Tumorerkrankungen des Ovars die MAGE-A-Antigene nicht vorkommen [96]. Andere Studien zeigen ebenfalls, dass in gutartigen Veränderungen im Kopf-Hals-Bereich die MAGE-A-Antigene nicht erkannt werden. So zeigt Lee KD. auf, dass A3 nicht in gutartigen Veränderung vorkommt, jedoch zu 45% in Plattenepithelkarzinomen [97]. MAGE-A3 stellt das Antigen dar, gegen das zuerst mAb-57B entwickelt wurde. Jedoch stellte sich nach mehreren Studien heraus, dass dieser Antikörper hauptsächlich gegen MAGE-A4 wirksam ist, neben den Genen -A1, -A3, -A6, -A12 [79, 80].

Scanlan MJ. et al. haben 2002 festgestellt, dass die C/T-Antigene je nach Tumor und Lokalisation unterschiedlich stark vertreten sind. So fanden sie in einer retrospektiven Analyse heraus, dass Melanome generell die höchste Frequenz der C/T-Antigene haben, gefolgt von Sarkomen, Lungenkarzinomen, Mamma- karzinomen, Prostatakarzinomen und anderen epithelialen Karzinomen. Kolon- karzinom, Nierenkarzinom und hämatopoetische Malignome haben die gering- ste Anzahl von C/T-Antigenen. Dies hängt mit dem Auftreten von Primärtumo- ren und Metastasen der Malignome zusammen, womit nun interessant wäre, auch im Mundhöhlenbereich eine differenzierte Untersuchung von primären Tumoren und Rezidiven durchzuführen [98]. Eura et al. haben 1995 mittels PCR-Analyse feststellen können, dass die Färbung zwischen 11% und 58% liegt, je nach Tumorkalisation und gefärbtem Antigen [99]. Dies bedeutet, dass z.B. MAGE-A1 hauptsächlich im Oropharynx, Hypopharynx und dem Si- nus maxillaris lokalisiert waren weniger in der Zunge, dem Larynx und der

Mundhöhle. MAGE-A4 war bei seiner Untersuchung in allen untersuchten Gebieten schwach vertreten, außer im Oropharynx und Hypopharynx. Im Gegensatz zu den Experimenten von Landry et al. im Jahre 2000. Sie fanden in ihrer Untersuchung heraus, dass der Antikörper mAb-57B hauptsächlich gegen das Antigen MAGE-A4 gerichtet ist. Landry führte diese Analyse an Melanomen, nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen und Mammakarzinomen durch. Diese Unterschiede in der Untersuchung von Landry und Eura zeigen ebenfalls, dass die Expression der MAGE-A-Antigene von ihrer Lokalisation abhängig ist. Auch Martin Bolli et al. haben 2002 nachgewiesen, dass bei der gleichen Krankheit und Untersuchung, so zum Beispiel bei dem Plattenepithelkarzinom, die Lokalisation für das Ergebnis entscheidend ist. Er fand heraus, dass sich hier der Larynx am wenigsten mit nur 22,7%, die Vulva mit 24,3% und die Haut mit 36% färbten. Am Besten lassen sich, wie auch schon in vergangenen Untersuchungen bewiesen, das Plattenepithelkarzinom der Lunge (50%) und der Harnblase (48,1%) anfärben [100]. Andere Autoren, so Müller-Richter et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen der Lokalisation des Tumors und der Expression der MAGE-A-Antigene nachweisen [92]. Jedoch könnte man in einer weiteren Untersuchung mit umfangreicheren Gruppengrößen noch zusätzlich die Expression der Gene nach der Lokalisation (z.B. Larynx und Sinus maxillaris) getrennt werden, um diesen Einfluss zu berücksichtigen oder entsprechend auszuschließen.

4.1.4 Perspektiven des MAGE-A-Antigennachweises

Der MAGE-A-Antigennachweis weist viele Perspektiven auf und bietet Potenzial. In Spermatogonien befinden sich C/T-Antigene. Spermatogonien besitzen Stammzeleigenschaften. Diese Verbindung von C/T-Antigenen und Stammzellen legt die Vermutung nahe, dass C/T-Antigene als Marker für Tumorstammzellen nützlich sind [101]. Diese Annahme wird durch die Theorie von John Beard von 1902 unterstützt. Sie beschäftigt sich mit dem Zusammenhang von Tumorzellen und Trophoblasten. Tumorzellen unterscheiden sich kaum von den Trophoblasten. Trophoblasten könne sich zu verschiedenen Gewebearten ent-

wickeln und finden sich auch in geschädigten Gewebeanteilen des Erwachsenen. Die Trophoblastensynthese wird normalerweise durch die Entwicklung von Pankreasenzymen im Embryo gestoppt. Dieser Mechanismus fehlt bei der Entwicklung von Tumoren [102]. Auch die MAGE-A-Antigene sind auf die Keimzellen beschränkt und finden sich sonst nur durch Reaktivierung in Tumorzellen.

Ein weiteres Konzept zur Tumorentstehung stellte Alfred Knudson am Beispiel des Retinoblastoms im Jahr 1971 auf. Bis heute gilt seine „two hit theory“ als Zentrum der Pathogenese bei der Tumorentstehung. Die Theorie besagt, dass zwei aufeinanderfolgende Mutationen der Allele von Tumorsuppressorgenen zur Transformation nötig sind, da diese zur Inaktivierung beider funktionellen Kopien führt. Der erste Treffer führt zu einer Zerstörung des ersten Allels, dies kann entweder durch ein hereditären Faktor oder durch eine Mutation von somatischen Zellen statt finden. Der zweite Treffer zerstört das zweite Allel mit Heterozygotieverlust (LOH) und Transformation zum Retinoblastom. Die MAGE-Antigene stehen im engen Zusammenhang zu den Tumorsuppressorgenen und stehen somit in Verbindung zur „two hit theory“. So bindet MAGE-A4 an das Tumorprotein Gankyrin, was einen destabilisierenden Effekt auf pRB hat [74]. Das Protein Retinoblastom kann somit die Weitergabe einer mutierten DNA im Zellzyklus nicht verhindern. Auch die Gene MAGE-A2 und -A6 gehen eine Bindung mit einem weiteren Tumorsuppressor p53 und p73 ein [72, 73].

Als weiterer Prozess für die Tumorprogression und Metastasierung gilt die ektodermale-mesenchymale Transition (EMT). Thiery JP fand heraus, dass die EMT zur Entwicklung eines invasiven Carcinoms aus einem Carcinom in situ führt und zum Einbruch in Lymph- und Blutgefäße. Für die Entstehung von Metastasen wäre der umgekehrte Prozess, die mesenchymale-ektodermale Transition verantwortlich [103]. Bei der EMT verschwinden epitheliale Muster und es entsteht ein fibroblastenähnliches Erscheinungsbild. Einer dieser epithelialen Marker ist E-Cadherin, ein Tumorsuppressorgen, welches für die Zelladhäsion und Signaltransduktion zuständig ist. Dieses Tumorsuppressorgen verschwindet vermehrt bei oralen Plattenepithelkarzinomen. Da ein Zusammenhang zwi-

schen den MAGE-A-Antigenen und den Tumorsuppressorgenen besteht, ist ein Zusammenhang zwischen der EMT und dem Auftreten der MAGE-A-Antigene wahrscheinlich. Die verschiedenen C/T-Antigene, einschließlich SSX und NY-ESO befinden sich in undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen [104]. Wenn also Tumorstammzellen Vorstufen zu metastasierenden Zellen sind, dann müsste ein therapeutischer Angriff gegen die Gene, die die epithelial-mesenchymalen Transition verursachen, so z.B. gegen die C/T-Antigene statt finden.

Für den MAGE-A-Antigennachweis stehen verschiedene Perspektiven zur Diagnose und Therapie zur Verfügung. Da die immunhistochemische Untersuchung mit dem Antikörper mAb-57B nicht die erforderliche Sensitivität für die klinische Anwendung liefert, wäre eine denkbare diagnostische Perspektive, diese Methode mit einer anderen zu kombinieren. So könnte die Immunhistochemie mit mAb-57B, die die Expression der MAGE-A-Antigene zeigt, mit der Bürstenbiopsie verbunden werden. Bei der Untersuchung von Driemel et al. 2008 ist die Bürstenbiopsie als alleinige Methode zu ungenau, da nur in 80% der Fälle die richtige Diagnose gestellt werden konnte. Eine Ergänzung beider Methoden könnte zum Ausschluss von falsch positiven (wie bei der Bürstenbiopsie) und falsch negativen Präparaten führen [45]. P. Metzler et al. haben 2002 in einer Fallstudie zwei Methoden miteinander verbunden und dadurch in einem sehr frühen Stadium ein Plattenepithelkarzinom feststellen können. Er verband die Bürstenbiopsie mit der hochsensitiven PCR-Analyse auf MAGE-A-Antigene. Diese führten zusammen zum korrekten Ergebnis [105]. Durch das Verbinden dieser Methoden könnte die Sensitivität und Spezifität erhöht werden und eine frühere Diagnose maligner Prozesse gestellt werden.

Auch bietet der MAGE-A-Antigennachweis verschiedene Möglichkeiten für die Therapie von Tumorpatienten. Eine Idee ist eine Immuntherapie mit den MAGE-A-Antigenen. Es wird vielfach auf die Möglichkeit hingewiesen, dass die MAGE-A-Antigene ein potenzielles Ziel für Vakzinierung darstellen könnten [60]. Basierend auf der Immunogenität von Tumorpatienten und dem ausdrücklichem Vor-

kommen der C/T-Antigene in Tumorzellen sowie der Möglichkeit humorale und zelluläre Immunantworten auszulösen stellen die C/T-Antigene ein potenzielles Target für die Vakzinierung dar. Der Erfolg eines Antigen-spezifischen Impfstoffes hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Das geeignete spezielle Ziel-Antigen unterscheidet sich je nach Tumorlokalisierung und Art oder es können mehrere dieser Gene beinhaltet sein, was polyvalente Impfstoffe fördern würde. Ein weiterer Faktor ist die Impfstrategie. Atanackovic et al. haben 2008 hierzu Versuche mit rekombinierten Proteinen als Impfstoff durchgeführt. Dieser löste vor allem im Zusammenhang mit einem weiteren Proteinverstärker AS02B eine starke Antwort von CD4+ und CD8+ Zellen aus [98, 106]. Die Studien zielen einerseits darauf ab, die Vakzinierung als zusätzliche Behandlungsmaßnahme, anstelle von Chemotherapie oder Strahlentherapie, zu sehen und somit die starken Nebenwirkungen der bisherigen Nachbehandlungen zu reduzieren. Andererseits versuchen sie den Tumor durch Impfung direkt ohne Vorbehandlung zu reduzieren [107]. Dem Immunsystem wird schon lange eine Bedeutung in der Tumorbekämpfung beigemessen. Die Tumoren zeigen Proteinstrukturen auf ihrer Zelloberfläche, die dann von dem Immunsystem erkannt werden. Allerdings treten diese Proteine meist in zu geringer Anzahl und sehr heterogen auf, was es dem Immunsystem erschwert, diese zu eliminieren. Einige Autoren haben versucht, die Peptidanzahl auf Tumoren zu erhöhen, um sie somit dem Immunsystem leichter kenntlich zu machen. Dies könnte durch Aktivierung der MAGE-A-Antigene geschehen. Sie werden unter anderem durch die DNA-Demethylierung aktiviert [64]. Die DNA-Demethylierung findet durch das Enzym 5-aza-2-deoxycytidine(DAC) statt. Diese Aktivierung kann jedoch nur in Tumorzellen stattfinden nicht in primären Fibroblasten [108]. Adair et al. erhöhten 2008 die Anzahl der exprimierten C/T-Antigene in Tumorzellen vom Ovar durch Zugabe von DAC. Nur das MAGE-Antigen-A2 ließ sich hierbei nicht verstärken. Die Expression der Klasse I MHC Moleküle durch Zellen konnte so ebenfalls erhöht werden [109].

Auch finden erste Ansätze zur Immunsierung mit dendritischen Zellen statt. So wurde in einzelnen Fällen, zum Beispiel an primären Melanomen im Ösophagus

gezeigt, dass eine zusätzliche Behandlung des Tumors mit monozytisch abgeleiteten Zellen und Epitopen von MAGE-A-Peptiden eine verbesserte Prognose für die Überlebensrate zeigt [110].

Zusätzlich könnte man weitere Ansätze untersuchen, die genauer auf das Verhalten der MAGE-A-Antigene eingehen. Die MAGE-A-Antigene, die normalerweise nur in Keimzellen und in Tumoren vorkommen und viel Ähnlichkeit mit dem Verhalten der Trophoblasten zeigen [102] können eventuell besonders strahlensensibel sein. Eine der Eigenschaften von Tumorzellen ist ihre schnellere Reduplikationszahl und ihr empfindlicher Stoffwechsel im Vergleich zur gesunden Zelle, aus der sie hervorgehen. Die bei der Bestrahlung verwendete ionisierende Strahlung wirkt sich besonders auf schnell teilende Zellen aus. Die Schädigung betrifft dabei die DNA. Es finden Doppelstrang- und Einzelstrangbrüche statt, die letztendlich zur Apoptose der Zelle führen. Gerade Keimzellen lassen sich schon ab $<0,5$ Gy durch Bestrahlung schädigen. Dies könnte auch für die MAGE-A-Antigene zutreffen [111, 112].

4.2 Zweite Fragestellung

4.2.1 Beurteilung der Resektionsränder

Im zweiten Teil der Experimente wird die Untersuchung der Randbereiche von Präkanzerosen und Carcinomata in situ durchgeführt. Diese ist ganz besonders im Bereich der Mundhöhle wichtig, da hier durch das Einwirken verschiedener Noxen eine Feldkanzerisierung stattfinden kann. In meinen Ergebnissen zeigte sich, dass sich bei vielen Präparaten der Übergang zwischen gesunder und erkrankter Schleimhaut sehr viel deutlicher mit dem Antikörper mAb-57B als mit einer reinen HE-Färbung darstellen lässt. Wichtig ist, dass gutartige Tumoren meist einen guten Übergang zwischen benigner und maligner Schleimhaut erkennen lassen, da sie ein expansives, verdrängendes Wachstum haben im Gegensatz zum invasiven Wachstum der Karzinome. Deshalb ist diese MAGE-A-Antigen-Färbung hier besonders aussagekräftig.

4.2.2 Vergleich mit anderen Autoren und anderen Markern

Slaughter et al. prägte im Jahr 1953 den Begriff der Feldkanzerisierung [22]. Hierbei liegt eine flächenhafte Schädigung der Mundschleimhaut vor, die sich dann in ein PEC verwandelt. Bei positiver Färbung und genügend Exzisionsabstand zur gesunden Mundschleimhaut ist in den immunhistochemischen Präparaten eine eindeutige Grenze zwischen benigner und maligner Mundschleimhaut sichtbar. Dabei ist die bisher mangelnde Sensitivität wie bei den Färbungen der Tumoren insgesamt nicht zu vergessen. Auch Figueiredo et al. fanden 2005 in 58% der untersuchten Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, des Larynx und des Pharynx MAGE-A-Antigene im klinisch und pathologisch gesund erscheinenden Rand [93]. Durch die übliche HE-Färbung nicht sichtbare verbliebende MAGE-A-Antigene können eventuell zu schnelleren Rezidiven führen.

Andere Marker, die spezifisch zur Unterscheidung zwischen Tumorzelle zur gesunden Zelle vorhanden sind, wären zum Beispiel die Panzytokeratine Antikörper AE1/AE3. Diese richten sich gegen verschiedene Zytokeratinfilamente (Antigen Zytokeratin 1-19) [113]. Sie werden von allen Epithelzellen gebildet und bilden das Zytoskelett. Durch das Auftreten verschiedener Zytokeratinarten lässt sich gesundes Epithel vom Tumorgewebe differenzieren. Durch die Kombination von zwei monoklonalen Antikörpern (AE1/AE3) ermöglicht sich besonders die Anfärbung verschiedener Zytokeratine. Einzelne Studien zu Veränderungen der Mundschleimhaut wurden hierzu schon immunhistochemisch durchgeführt und eine Abhängigkeit dieses Antikörpers zur Entwicklung der Zellen konnte festgestellt werden [114]. Weitere Epithelzellmarker sind Anti-epitheliale-Membran-Antigene. EMA ist ein Oberflächenglykoprotein, welches in Karzinomen stark exprimiert ist. Beer et al. fanden 2000 heraus, dass EMA eine hohe Sensitivität mit 22/23 Plattenepithelkarzinomen der Haut zeigte [115]. Ber-EP-4 (monoklonaler Antikörper gegen epitheliale Antigene) zeigte bei dieser Untersuchung eine Sensitivität von 100% bei Basalzellkarzinomen, jedoch keine Färbung der Plattenepithelkarzinome. Andere Ergebnisse zeigen eine Zunahme des EMA und CEA mit Zunahme des Dysplasiegrades in der Mundschleimhaut

[116]. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben den MAGE-A-Antigenen mit der Transformation des Epithels auch andere Antigene verstärkt exprimiert werden. Eine Kombination von verschiedenen Antikörpern zur Erhöhung der Spezifität wäre denkbar. So z.B. MAGE-A-Antigene mit Panzytokeratin AE1/AE3 oder mit EMA.

Der Kernpunkt ist, dass der Pathologe das Karzinom in toto mit dysplasiefreien Randbereichen sieht, jedoch verbliebene MAGE-A-Antigene nachweisbar sind und diese die Entwicklung eines Rezidivs fördern.

Weitere genauere Untersuchung zur Expression der MAGE-A-Antigene in Entfernung zum Tumorgebiet sind wünschenswert, um so die Prognose der Patienten verbessern zu können und entsprechende Behandlungsmaßnahmen einzuleiten.

4.2.3 Diskussion der Statistischen Ergebnisse

Bei dem Test 1 mit den Fotos für die Dysplasie des Grades II zeigt sich ein signifikantes Ergebnis, was bedeutet, dass sich hier die MAGE-A-Antigenfärbung besser zur Erkennung des Randbereiches eignet, als die HE-Färbung. Bei der Dysplasie des Grades I und III gilt das Ergebnis, dass weder die MAGE-A-Antigene noch die HE-Färbung besser geeignet ist. Hier konnte keine Signifikanz für die untersuchten Bereiche festgestellt werden. Eine Signifikanz ist aber nicht grundsätzlich auszuschließen, da die Untersuchungsgruppen klein waren. Größere Fallzahlen würden auch hinsichtlich des einen signifikanten Ergebnisses mit der kleinsten Gruppengröße (vier Dysplasien des Grades II) zuverlässigere Ergebnisse liefern.

Die Untersuchung 1 mit den Fotos wurde von den Pathologen selbst als unzureichend eingestuft wurde, da der Übergang von krankem in gesundes Gewebe schwer per Foto darzustellen war und sie durch den vorgegebenen Bereich nicht die Möglichkeit hatten, das gesamte Präparat zu begutachten und weitere

Übergangsstellen zu beurteilen. Von Vorteil hierbei ist jedoch, dass auch jeder Pathologe die gleiche Randläsion zu beurteilen hat und nicht verschiedene Stellen innerhalb des Präparates beurteilt werden mussten, wie das in der Untersuchung 2 der Fall war, daher auch die insgesamt positivere Bewertung der Pathologen bei diesem Test.

Bei der Untersuchung 2 mit den Präparaten war es den Pathologen möglich, das ganze Präparat zu betrachten. Hier wurden die Präparate schlechter bewertet. Bei diesem Test gab es kein signifikantes Ergebnis, da $p > 0,05$. Ein Grund für das negativere Ergebnis ist, dass in einigen Carcinomata in situ (vor allem dem Dysplasiegrad III) auch invasive Anteile im Präparat zu finden sind. Diese invasiven Teile sind bei der Randbeurteilung mit im Betrachtungsfeld, lassen sich nicht eindeutig gegen gesundes Gewebe abgrenzen und verfälschen somit das Ergebnis der reinen Dysplasie.

4.2.4 Perspektiven der Randuntersuchung

Die Randbereiche eines Tumors bieten vielfältige Möglichkeiten für die Diagnostik und Therapie von prämaligen und malignen Läsionen der Mundschleimhaut. In der Routinediagnostik wird das angrenzende gesunde Gewebe vom Pathologen morphologisch begutachtet und bewertet. Dadurch können erst deutlich entartete Zellen erkannt werden. Es gilt verbessert und vermehrt nachzuweisen, wie weit sich die MAGE-A-Antigene im Abstand zum exzidierten Tumor in gesunder Schleimhaut aufhalten, um somit eine bessere Prognose für den Patienten stellen zu können. Auch müssen weiter histopathologische Möglichkeiten gefunden werden, um genauer die maligne veränderte Schleimhaut zu erkennen und somit dem Kliniker eindeutiger mitteilen zu können, wie weit exzidiert werden muss. Andere Ansätze zur Genexpression im angrenzenden Tumor stehen bereits zur Verfügung. So stellten Brennan et al. 1995 eine Studie zur Genexpression von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich von p53 auf. P53 ist ein Marker, der bei über 50% der oralen PEC mutiert ist [117]. P53 übt in der gesunden Zelle seine Funktion als „Wächter des Genoms“ im

Zellzyklus beim Übertritt der G1-Phase in die S-Phase aus. Es verhindert die Weitergabe eines genetischen Schadens an die Tochterzelle [118]. Bei einer Mutation wird der Schaden weitergegeben, das Tumorwachstum beginnt. Brennan et al. konnten nachweisen, dass sich in 53% (13/25) des histologisch negativ beurteilten Randgewebe neoplastische Zellen befanden, wovon später dann auch 5 Stück ein Rezidiv erlitten. Dagegen war in den p53 freien Zellen (12/25) kein einziges Rezidiv zu beobachten [119]. Dies wurde durch Patridge et al. ebenso belegt [120] und lässt darauf schließen, dass in den Resektionsrändern, die in der morphologische Begutachtung tumorfrei scheinen, durchaus schon Veränderungen stattfinden, die vermehrt zu einem Rezidiv führen können. Diese gilt es in ihrem Ausmaß zu erkennen und zu eliminieren.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Laut des WHO cancer reportes erkrankten 2008 weltweit rund 12,4 Millionen Menschen an Tumoren und 7,6 Millionen verstarben an deren Folgen. Laut des RKI lagen die Erkrankungsfälle der Mundhöhle und des Rachenraums im Jahr 2006 für Männer bei 7.930, bei Frauen hingegen bei 2.930. Das orale Plattenepithelkarziom entwickelt sich dabei häufig aus Präkanzerosen. Trotz den frühdiagnostischen Möglichkeiten werden prä-maligne Läsionen oft zu spät erkannt. Der Kliniker und der Pathologe sehen das Carcinom in toto entfernt, vorhandene MAGE-A-Antigene können jedoch die Prognose verschlechtern. Die MAGE-A-Antigene sind Tumorantigene in malignen transformierten Zellen. Physiologischerweise sind sie im Hoden, in der Plazenta und in fetalen Stammzellen zu finden. Diese Antigene können zur Frühdiagnose und Unterscheidung zwischen benigner, prä-maligner und maligner Schleimhaut einen entscheidenden Beitrag leisten. Ein Ziel dieser Studie war es zwischen benigner, prä-maligner und maligner Schleimhaut mit Hilfe der MAGE-A-Antigene zu differenzieren. Ein weiterer Ansatz betrifft die Feldkanzerisierung, die unter anderem in der Mundhöhle durch die Noxen wie Tabak und Alkohol statt findet. Ziel hierbei war eine genaue Unterscheidung an den Randbereichen zwischen benigner und maligner Schleimhaut mit Hilfe der MAGE-A-Antigene.

Material und Methoden

Als Material dienten retrospektiv gesuchte formalin-fixierte Biopsien von oralem Gewebe. Diese wurden zufällig ausgewählt. Die Präparate wurden verschiedenen Gruppen zugeordnet: 13 Zysten, 25 Ulzera, 26 Epulitiden, 26 Lichen ruber, 33 Leukoplakien ohne Dysplasien, 24 Leukoplakien mit einer Dysplasie, 38 Carcinomata in situ. Diese Läsionen wurden immunhistochemisch mit dem Antikörper mAb-57B angefärbt, anschließend mikroskopisch untersucht, fotografisch dokumentiert und ausgewertet. Zusätzlich wurden die gefärbten Präparate auf ihr Färbeverhalten speziell im Randbereich mit Hilfe von Pathologen

untersucht, bewertet und anschließend statistisch mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Wilcoxon Test ausgewertet.

Ergebnisse

Von den gutartigen Veränderungen der Mundschleimhaut gab es nur ein falsch positiv gefärbtes Ergebnis. Alle anderen Veränderungen von Zahnsäckchen, Ulzera, Epulitiden, Lichen ruber und Leukoplakien ohne Dysplasien zeigten keine Reaktion mit dem Antikörper. Die Leukoplakie mit Dysplasie zeigte ein Färbeverhalten von 33,3%, die Dysplasien von 65,4%, die Carcinomata in situ von 60,1%. Bei der statistischen Untersuchung des Färbeverhaltens im Randbereich konnte ein signifikantes Ergebnis bei der Dysplasie vom Grad II gefunden werden. Bei den weiteren statistischen Untersuchungen zeigte sich kein signifikantes Ergebnis für die drei Dysplasiegrade zusammen oder die Dysplasie vom Grad I und III.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MAGE-A-Antigene nicht in benignen Mundschleimhautveränderungen (Epulis, Zysten, Lichen ruber, Leukoplakien) mit der immunhistochemischen Färbemethode gefunden werden konnten. Der Nachweis der MAGE-A-Antigene bei malignen Veränderungen (Dysplasien, Carcinomata in situ) schwankt zwischen 33% und 65%. Es gab nur eine falsch positive Färbung, was bedeutet, dass die Antigene fast eine Spezifität von 100% erreichen. Somit stellen diese Antigene ein bedeutsames Mittel in der Unterscheidung zwischen benigner und maligner Veränderung dar. Für die Randuntersuchung der Präparate konnte kein durchgehend signifikantes Ergebnis festgestellt werden. So wurde nur bei der Dysplasie vom Grad II signifikant nachgewiesen, dass in der MAGE-A-Antigen Färbung der Randbereich besser zu beurteilen ist, als in der HE Färbung. Für die Dysplasien des Grades I und III, sowie für alle drei Grade zusammen kann keine Aussage getroffen werden, ob die MAGE-Antikörperfärbung oder die HE-Färbung die Ränder der Läsionen besser darstellen.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert [121].

6 Literaturverzeichnis

1. Boyle, P. and B. Levin, *world cancer report 2008*. International agency for research on Cancer, 2008.
2. Husmann, K.R.-P.G., et al., *Krebs in Deutschland 2005/2006: Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch-Institut, 23.02.2010. 7: p. 19 -23.
3. Husmann, K.R.-P.G., et al., *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch-Institut, 02/2010. 7: p. 24-27.
4. 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.
5. Karim-Kos, H.E., et al., *Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s*. Eur J Cancer, 2008. 44(10): p. 1345-89.
6. 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.
7. 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.
8. Reichart, P.A., *Orale Leukoplakie/Erythroplakie*. Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde, 2007.
9. Thomas, G., et al., *Risk factors for multiple oral premalignant lesions*. Int J Cancer, 2003. 107(2): p. 285-91.

10. Bray, I., P. Brennan, and P. Boffetta, *Projections of alcohol- and tobacco-related cancer mortality in Central Europe*. *Int J Cancer*, 2000. 87(1): p. 122-8.
11. Wynder, E.L., *Environmental causes of cancer in man*. *Med Clin North Am*, 1956. 40(3): p. 629-45.
12. Hashibe, M., et al., *Contribution of tobacco and alcohol to the high rates of squamous cell carcinoma of the supraglottis and glottis in Central Europe*. *Am J Epidemiol*, 2007. 165(7): p. 814-20.
13. Hashibe, M., et al., *Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. 18(2): p. 541-50.
14. Hashibe, M., et al., *Esophageal cancer in Central and Eastern Europe: tobacco and alcohol*. *Int J Cancer*, 2007. 120(7): p. 1518-22.
15. Rosenquist, K., et al., *Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden*. *Acta Otolaryngol*, 2005. 125(12): p. 1327-36.
16. Syrjanen, K., et al., *Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis*. *Int J Oral Surg*, 1983. 12(6): p. 418-24.
17. Kujan, O., et al., *Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006. 3: p. CD004150.
18. Brocklehurst, P., et al., *Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*. 11: p. CD004150.

19. Califano, J., et al., *Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization*. *Cancer Res*, 1996. 56(11): p. 2488-92.
20. 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.
21. Lippman, S.M. and W.K. Hong, *Molecular markers of the risk of oral cancer*. *N Engl J Med*, 2001. 344(17): p. 1323-6.
22. Slaughter, D.P., H.W. Southwick, and W. Smejkal, *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin*. *Cancer*, 1953. 6(5): p. 963-8.
23. Copper, M.P., et al., *A panel of biomarkers of carcinogenesis of the upper aerodigestive tract as potential intermediate endpoints in chemoprevention trials*. *Cancer*, 1993. 71(3): p. 825-30.
24. Franklin, W.A., et al., *Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis*. *J Clin Invest*, 1997. 100(8): p. 2133-7.
25. Prevo, L.J., et al., *p53-mutant clones and field effects in Barrett's esophagus*. *Cancer Res*, 1999. 59(19): p. 4784-7.
26. 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.
27. van Oijen, M.G. and P.J. Slootweg, *Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits?* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000. 9(3): p. 249-56.

28. van Oijen, M.G., et al., *Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and ex-smokers*. Oral Oncol, 1998. 34(4): p. 297-303.
29. Kleihues P., C.W.K.E., et al., *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*, ed. M.D. Leon Barnes, et al. 2005, Lyon: IARC Press.
30. Schwimmer, E., *Die idiopathische Schleimhautplaques der Mundhöhle (Leucoplakia buccalis)*. Arch. Dermatol. Syph, 1877. 9: p. 511-570.
31. Axell, T., et al., *Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions*. J Oral Pathol Med, 1996. 25(2): p. 49-54.
32. N. Schwenzer, M.E., *Zahnärztliche Chirurgie. Erkrankungen der Mundschleimhaut- klinische Erscheinungsbilder*, ed. G.T. Verlag. Vol. 3. 2000, New York, Stuttgart. 227-228.
33. Kramer, I.R., et al., *Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1978. 46(4): p. 518-39.
34. Fernandez-Gonzalez, F., et al., *Histopathological findings in oral lichen planus and their correlation with the clinical manifestations*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal.
35. Leao, J.C., V.B. Gomes, and S. Porter, *Ulcerative lesions of the mouth: an update for the general medical practitioner*. Clinics, 2007. 62(6): p. 769-80.
36. Rajentheran, R., et al., *Malignant transformation of oral lichen planus*. Eur J Surg Oncol, 1999. 25(5): p. 520-3.
37. Pakfetrat, A., et al., *Oral lichen planus: a retrospective study of 420 Iranian patients*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2009.

38. Andreasen, J.O., *Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1968. 25(1): p. 31-42.
39. Klein, M.O. and M. Kunkel, *Fibromyxoide Epulis mit metaplastischer Ossifikation.* Zahnärztliche Mitteilungen, 2007. 97(6): p. 48-50.
40. N. Schwenzer, M.E., *Spezielle Chirurgie.* Vol. 3. 2002, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
41. Kotrashetti, V.S., et al., *Histopathologic changes in soft tissue associated with radiographically normal impacted third molars.* Indian J Dent Res. 21(3): p. 385-90.
42. Forastiere, A., et al., *Head and neck cancer.* N Engl J Med, 2001. 345(26): p. 1890-900.
43. Papanicolaou, G.N., *A NEW PROCEDURE FOR STAINING VAGINAL SMEARS.* Science, 1942. 95(2469): p. 438-9.
44. Montgomery, P.W. and E. Von Haam, *A study of the exfoliative cytology in patients with carcinoma of the oral mucosa.* J Dent Res, 1951. 30(3): p. 308-13.
45. Driemel, O., et al., *Wertigkeit der konventionellen oralen Bürstenbiopsie* Springer Medizin Verlag 2008 56: p. 205-210.
46. Driemel, O., et al., *Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions.* J Dtsch Dermatol Ges, 2007. 5(12): p. 1095-100.
47. Onofre, M.A., M.R. Sposto, and C.M. Navarro, *Reliability of toluidine blue application in the detection of oral epithelial dysplasia and in situ and invasive squamous cell carcinomas.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2001. 91(5): p. 535-40.

48. Schleier, P., W. Zenk, and W. Dietel, *Tumors of the mouth cavity. Not all fluorescent tumors are malignant*. MMW Fortschr Med, 2002. 144(13): p. 26-8.
49. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Science, 1991. 254(5038): p. 1643-7.
50. Xiao, J. and H.S. Chen, *Biological functions of melanoma-associated antigens*. World J Gastroenterol, 2004. 10(13): p. 1849-53.
51. Costa, F.F., K. Le Blanc, and B. Brodin, *Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer*. Stem Cells, 2007. 25(3): p. 707-11.
52. Weynants, P., et al., *Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas*. Int J Cancer, 1994. 56(6): p. 826-9.
53. Nelson, P.T., et al., *Cancer/testis (CT) antigens are expressed in fetal ovary*. Cancer Immun, 2007. 7: p. 1.
54. Muller-Richter, U.D., et al., *Different expression of MAGE-A-antigens in foetal and adult keratinocyte cell lines*. Oral Oncol, 2008. 44(7): p. 628-33.
55. Chomez, P., et al., *An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family*. Cancer Res, 2001. 61(14): p. 5544-51.
56. Barker, P.A. and A. Salehi, *The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease*. J Neurosci Res, 2002. 67(6): p. 705-12.
57. Zendman, A.J., D.J. Ruiter, and G.N. Van Muijen, *Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function*. J Cell Physiol, 2003. 194(3): p. 272-88.

58. Lurquin, C., et al., *Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins.* Genomics, 1997. 46(3): p. 397-408.
59. Chambost, H., et al., *Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells.* Blood, 2000. 95(11): p. 3530-3.
60. Caballero, O.L. and Y.T. Chen, *Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy.* Cancer Sci, 2009. 100(11): p. 2014-21.
61. Traversari, C., et al., *A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E.* J Exp Med, 1992. 176(5): p. 1453-7.
62. Ries, J., et al., *Expression of melanoma-associated antigens in oral squamous cell carcinoma.* J Oral Pathol Med, 2008. 37(2): p. 88-93.
63. Takahashi, K., et al., *Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis.* Cancer Res, 1995. 55(16): p. 3478-82.
64. De Smet, C., et al., *DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter.* Mol Cell Biol, 1999. 19(11): p. 7327-35.
65. Gillespie, A.M. and R.E. Coleman, *The potential of melanoma antigen expression in cancer therapy.* Cancer Treat Rev, 1999. 25(4): p. 219-27.
66. Wischnewski, F., K. Pantel, and H. Schwarzenbach, *Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells.* Mol Cancer Res, 2006. 4(5): p. 339-49.
67. De Smet, C., et al., *The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(14): p. 7149-53.

68. Cohen, S.M. and L.B. Ellwein, *Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis*. *Cancer Res*, 1991. 51(24): p. 6493-505.
69. Cohen, H.J., *Biology of aging as related to cancer*. *Cancer*, 1994. 74(7 Suppl): p. 2092-100.
70. Wischnewski, F., et al., *Methyl-CpG binding domain proteins and their involvement in the regulation of the MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, and MAGE-A12 gene promoters*. *Mol Cancer Res*, 2007. 5(7): p. 749-59.
71. Laduron, S., et al., *MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription*. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(14): p. 4340-50.
72. Giono, L.E. and J.J. Manfredi, *The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints*. *J Cell Physiol*, 2006. 209(1): p. 13-20.
73. Jungbluth, A.A., et al., *The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation*. *Blood*, 2005. 106(1): p. 167-74.
74. Higashitsuji, H., et al., *Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas*. *Nat Med*, 2000. 6(1): p. 96-9.
75. Yang, B., et al., *MAGE-A, mMAGE-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines*. *Cancer Res*, 2007. 67(20): p. 9954-62.
76. Bai, S., B. He, and E.M. Wilson, *Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction*. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(4): p. 1238-57.
77. Scully, C., et al., *Oral cancer: current and future diagnostic techniques*. *Am J Dent*, 2008. 21(4): p. 199-209.

78. Wadle, A., et al., *Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigenen beim Pankreaskarzinom*. Magazin Forschung, 2006. 1(22-25).
79. Grobholz, R., et al., *Expression of MAGE antigens and analysis of the inflammatory T-cell infiltrate in human seminoma*. Urol Res, 2000. 28(6): p. 398-403.
80. Jungbluth, A.A., et al., *Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer*. Int J Cancer, 2000. 85(4): p. 460-5.
81. Landry, C., et al., *Monoclonal antibody 57B stains tumor tissues that express gene MAGE-A4*. Int J Cancer, 2000. 86(6): p. 835-41.
82. Prasad, M.L., et al., *Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck*. Head Neck, 2004. 26(12): p. 1053-7.
83. Juretic, A., et al., *Cancer/testis tumour-associated antigens: immunohistochemical detection with monoclonal antibodies*. Lancet Oncol, 2003. 4(2): p. 104-9.
84. Thomas Boenisch, D.A.J.F., Ron H. Stead, *Handbuch2 immunchemischer Färbemethoden*, ed. D.D. GmbH. Vol. 4. 05/00, Hamburg: Dr. Sally J. Naish.
85. Remmele, W. and H.E. Stegner, *Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue*. Pathologe, 1987. 8(3): p. 138-40.
86. Scanlan, M.J., A.J. Simpson, and L.J. Old, *The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary*. Cancer Immun, 2004. 4: p. 1.

87. Lee, K.D., et al., *Expression of the MAGE-1, -2, -3, -4, and -6 genes in non-squamous cell carcinoma lesions of the head and neck*. Acta Otolaryngol, 1996. 116(4): p. 633-9.
88. Luftl, M., G. Schuler, and A.A. Jungbluth, *Melanoma or not? Cancer testis antigens may help*. Br J Dermatol, 2004. 151(6): p. 1213-8.
89. Busam, K.J., et al., *Immunoreactivity with the anti-MAGE antibody 57B in malignant melanoma: frequency of expression and correlation with prognostic parameters*. Mod Pathol, 2000. 13(4): p. 459-65.
90. Aubry, F., et al., *MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors*. Cancer, 2001. 92(11): p. 2778-85.
91. Mashino, K., et al., *Expression of multiple cancer-testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas*. Br J Cancer, 2001. 85(5): p. 713-20.
92. Muller-Richter, U.D., et al., *MAGE-A antigens in patients with primary oral squamous cell carcinoma*. Clin Oral Investig, 2009.
93. Figueiredo, D.L., et al., *Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas*. Head Neck, 2006. 28(7): p. 614-9.
94. Ries, J., et al., *Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy*. Int J Oncol, 2005. 26(3): p. 817-24.
95. Rimoldi, D., et al., *Anti-MAGE-3 antibody 57B and anti-MAGE-1 antibody 6C1 can be used to study different proteins of the MAGE-A family*. Int J Cancer, 2000. 86(5): p. 749-51.
96. Yamada, A., et al., *Expression of MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3/-6 and MAGE-4a/-4b genes in ovarian tumors*. Int J Cancer, 1995. 64(6): p. 388-93.

97. Lee, K.D., et al., *Expression of the MAGE 3 gene product in squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Anticancer Res*, 1999. 19(6B): p. 5037-42.
98. Scanlan, M.J., et al., *Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy*. *Immunol Rev*, 2002. 188: p. 22-32.
99. Eura, M., et al., *Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas*. *Int J Cancer*, 1995. 64(5): p. 304-8.
100. Bolli, M., et al., *Tissue microarray evaluation of Melanoma antigen E (MAGE) tumor-associated antigen expression: potential indications for specific immunotherapy and prognostic relevance in squamous cell lung carcinoma*. *Ann Surg*, 2002. 236(6): p. 785-93; discussion 793.
101. Simpson, A.J., et al., *Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(8): p. 615-25.
102. Gurchot, C., *The trophoblast theory of cancer (John Beard, 1857-1924) revisited*. *Oncology*, 1975. 31(5-6): p. 310-33.
103. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(6): p. 442-54.
104. Cronwright, G., et al., *Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression*. *Cancer Res*, 2005. 65(6): p. 2207-15.
105. Metzler, P., et al., *MAGE-A as a novel approach in the diagnostic accuracy of oral squamous cell cancer: a case report*. *Head Neck Oncol*, 2009. 1: p. 39.
106. Atanackovic, D., et al., *Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance*

- depending on priming. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(5): p. 1650-5.*
107. van Baren, N., et al., *Tumoral and immunologic response after vaccination of melanoma patients with an ALVAC virus encoding MAGE antigens recognized by T cells. J Clin Oncol, 2005. 23(35): p. 9008-21.*
 108. Weber, J., et al., *Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. Cancer Res, 1994. 54(7): p. 1766-71.*
 109. Adair, S.J. and K.T. Hogan, *Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules. Cancer Immunol Immunother, 2009. 58(4): p. 589-601.*
 110. Ueda, Y., et al., *Induction of peptide-specific immune response in patients with primary malignant melanoma of the esophagus after immunotherapy using dendritic cells pulsed with MAGE peptides. Jpn J Clin Oncol, 2007. 37(2): p. 140-5.*
 111. Muller-Richter, U.D., et al., *Analysis of expression profiles of MAGE-A antigens in oral squamous cell carcinoma cell lines. Head Face Med, 2009. 5: p. 10.*
 112. Weinert, B.T., et al., *Real-time PCR analysis of genes encoding tumor antigens in esophageal tumors and a cancer vaccine. Cancer Immun, 2009. 9: p. 9.*
 113. Sun, T.T., et al., *Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. J Invest Dermatol, 1983. 81(1 Suppl): p. 109s-15s.*
 114. Farrar, M., et al., *Immunocytochemical analysis of AE1/AE3, CK 14, Ki-67 and p53 expression in benign, premalignant and malignant oral tissue*

- to establish putative markers for progression of oral carcinoma. Br J Biomed Sci, 2004. 61(3): p. 117-24.*
115. Beer, T.W., P. Shepherd, and J.M. Theaker, *Ber EP4 and epithelial membrane antigen aid distinction of basal cell, squamous cell and basosquamous carcinomas of the skin. Histopathology, 2000. 37(3): p. 218-23.*
 116. Tatemoto, Y., et al., *Immunohistochemical observations on binding of monoclonal antibody to epithelial membrane antigen in epithelial tumors of the oral cavity and skin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1987. 64(6): p. 721-6.*
 117. Boyle, J.O., et al., *The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. Cancer Res, 1993. 53(19): p. 4477-80.*
 118. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome. Nature, 1992. 358(6381): p. 15-6.*
 119. Brennan, J.A., et al., *Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med, 1995. 332(7): p. 429-35.*
 120. Partridge, M., et al., *Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. Clin Cancer Res, 2000. 6(7): p. 2718-25.*
 121. Krauss, E., et al., *MAGE-A antigens in lesions of the oral mucosa. Clin Oral Investig, 2010.*

7 **Abbildungsverzeichnis**

ABBILDUNG 1: NACH LIPPMAN [20]: MOLEKULARES (GENETISCHE UND EPIGENETISCHE) PROGRESSIONSMODELL DER MEHRSTUFIGEN KARZINOGENESE.	- 4 -
ABBILDUNG 2 : MODEL FÜR DIE KARZINOGENESE VON KOPF-HALS-PLATTENEPIHELKARZINOMEN.	- 6 -
ABBILDUNG 3: LEUKOPLAKIE OHNE DYSPLASIE (NR.06 16978), 100X VERGRÖßERUNG HE-FÄRBUNG.....	- 9 -
ABBILDUNG 4: LICHEN PLANUS (NR. 08 2079.1), 100X VERGRÖßERUNG HE-FÄRBUNG	- 11 -
ABBILDUNG 5: EPULIS GRANULOMATOSA (NR. 06 24776), 100X VERGRÖßERUNG, HE-FÄRBUNG.....	- 14 -
ABBILDUNG 6: ZAHNSÄCKCHEN (NR. 03 22096), 100X VERGRÖßERUNG, HE-FÄRBUNG.....	- 16 -
ABBILDUNG 7: ULZERA (NR. 08 11345), 100X VERGRÖßERUNG, HE-FÄRBUNG ...	- 17 -
ABBILDUNG 8: BILDER VON FORASTIERE A. ET AL. [42].....	- 18 -
ABBILDUNG 9: INDIREKTE 3-SCHRITT-METHODE	- 35 -
ABBILDUNG 10: EXPRESSION VON MAGE-A-ANTIGENEN IN NORMALEN ZELLEN UND EINEM INVASIVEN KARZINOM	- 38 -
ABBILDUNG 11: NICHT GEFÄRBTE FOLLIKULÄRE ZYSTE (NR.03 22096), 100X VERGRÖßERUNG (A), 200X (B) MIT ANTIKÖRPER MAGE 57B.....	- 39 -
ABBILDUNG 12: NICHT GEFÄRBTES ULCUS (NR.08 11345), 100X VERGRÖßERUNG (A), 200X (B) MIT ANTIKÖRPER MAGE 57B	- 40 -
ABBILDUNG 13: NICHT GEFÄRBTE EPULIS GRANULOMATOSA (NR. 06 24776), 100X VERGRÖßERUNG (A), 200X (B) MIT ANTIKÖRPER MAGE 57B.....	- 40 -
ABBILDUNG 14: NICHT ANGEFÄRBTER LICHEN PLANUS (NR.08 1629), 100X VERGRÖßERUNG (A), 200X (B) MIT ANTIKÖRPER MAGE 57B.....	- 41 -
ABBILDUNG 15: NICHT GEFÄRBTE LEUKOPLAKIE (NR. 07 10026.2), 100X VERGRÖßERUNG (A), 200X (B) MIT ANTIKÖRPER MAGE 57B.....	- 42 -

ABBILDUNG 16: LEU+DYS (NR. 06 7589.2), 100X VERGRÖßERUNG (A), 200X (B) BRAUNE EPITHELFÄRBUNG DER DYSPLASIE MIT ANTIKÖRPER MAGE 57B	- 42 -
ABBILDUNG 17: DYS (NR. 05 703), 100X VERGRÖßERUNG (A), 200X (B) BRAUNE EPITHELFÄRBUNG DER DYSPLASIE MIT ANTIKÖRPER MAGE 57B ...	- 43 -
ABBILDUNG 18: CIS (NR. 04 7931), 100X VERGRÖßERUNG (A), 200X (B) BRAUNE EPITHELFÄRBUNG MIT ANTIKÖRPER MAGE 57B.....	- 44 -
ABBILDUNG 19: GRADING IN RELATION ZUR PROZENTUALEN ANFÄRBUNG	- 45 -
ABBILDUNG 20: GRADING IN RELATION ZUM SCORE	- 46 -
ABBILDUNG 21: VERGLEICH DER FÄRBEMETHODEN EINES CIS (NR. 04 1124)	- 47 -
ABBILDUNG 22: VERGLEICH DER FÄRBEMETHODEN BEI EINER DYSPLASIE GRAD III (NR. 08 6173).	- 47 -
ABBILDUNG 23: VERGLEICH DER FÄRBEMETHODEN EINER LEU+ DYS (NR. 06 7589.2).	- 48 -

8 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: KRITERIEN FÜR EINE DYSPLASIE [29].....	- 18 -
TABELLE 2: KLASSIFIKATIONSSCHEMA: HISTOLOGISCHE KENNZEICHEN DER PRÄKANZERSEN [29].....	- 19 -
TABELLE 3: BEWERTUNGSBOGEN FÜR DIE PATHOLOGEN	- 36 -
TABELLE 4: PROZENTUALE ANFÄRBUNG ZUM GRADING.....	- 45 -
TABELLE 5: STATISTISCHE ANALYSE DES DYSPLASIEGRADES I MIT DEM WILCOXON TEST	- 49 -
TABELLE 6 : STATISTISCHE ANALYSE DES DYSPLASIEGRADES II MIT DEM WILCOXON TEST	- 50 -
TABELLE 7: STATISTISCHE ANALYSE DES DYSPLASIEGRADES III MIT DEM WILCOXON TEST	- 50 -
TABELLE 8: STATISTISCHE ANALYSE FÜR ALLE DREI DYSPLASIEGRADE MIT DEM WILCOXON TEST	- 51 -
TABELLE 9: STATISTISCHE ANALYSE FÜR DIE ABWEICHUNG DER BEWERTUNGEN MIT DEM KRUSKAL WALLIS TEST	- 51 -

TABELLE 10: STATISTISCHE ANALYSE DES DYSPLASIEGRADES I MIT DEM WILCOXON TEST	- 52 -
TABELLE 11: STATISTISCHE ANALYSE DES DYSPLASIEGRADES II MIT DEM WILCOXON TEST	- 52 -
TABELLE 12: STATISTISCHE ANALYSE DES DYSPLASIEGRADES III MIT DEM WILCOXON TEST	- 52 -
TABELLE 13: STATISTISCHE ANALYSE FÜR ALLE DREI DYSPLASIEGRADE MIT DEM WILCOXON TEST	- 53 -
TABELLE 14: STATISTISCHE ANALYSE FÜR DIE ABWEICHUNG DER BEWERTUNGEN MIT DEM KRUSKAL WALLIS TEST	- 53 -

9 Anhang

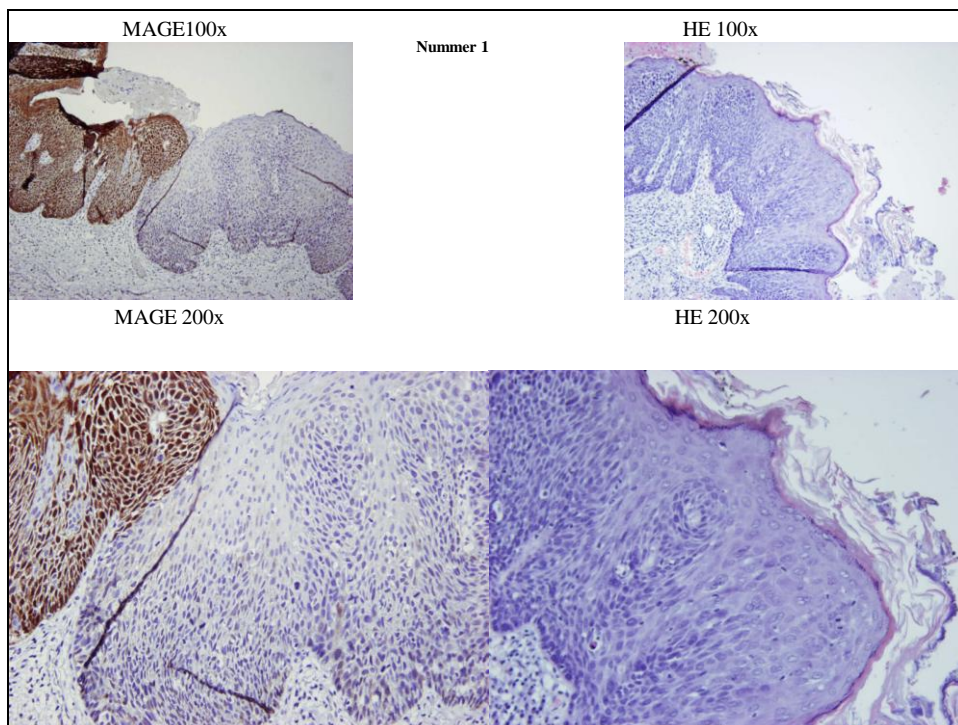
Präsentation für die Untersuchung der Läsionsränder

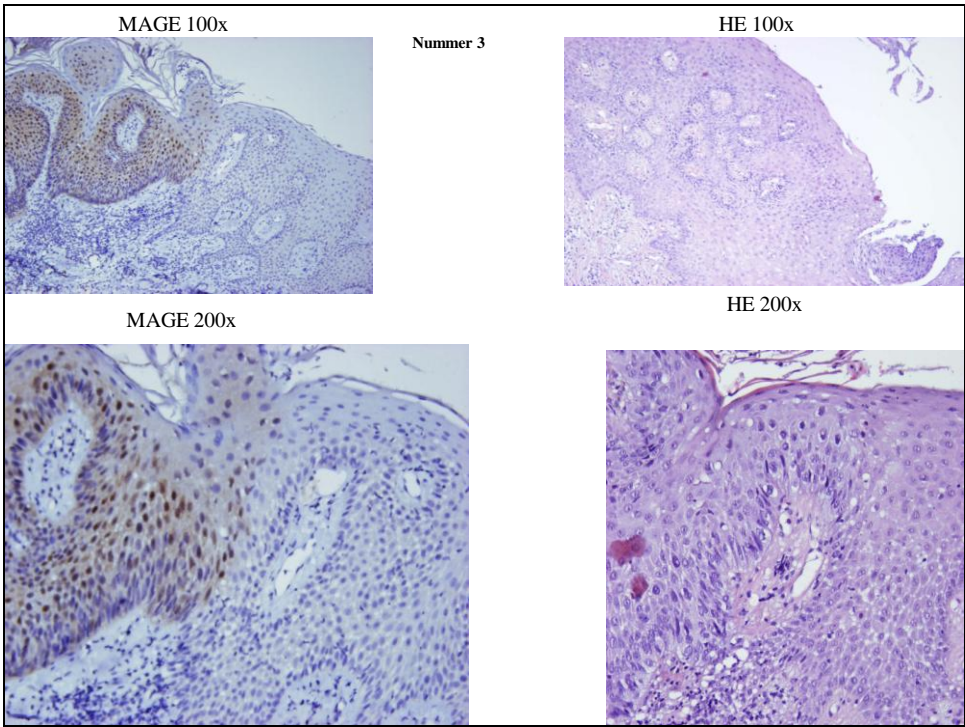
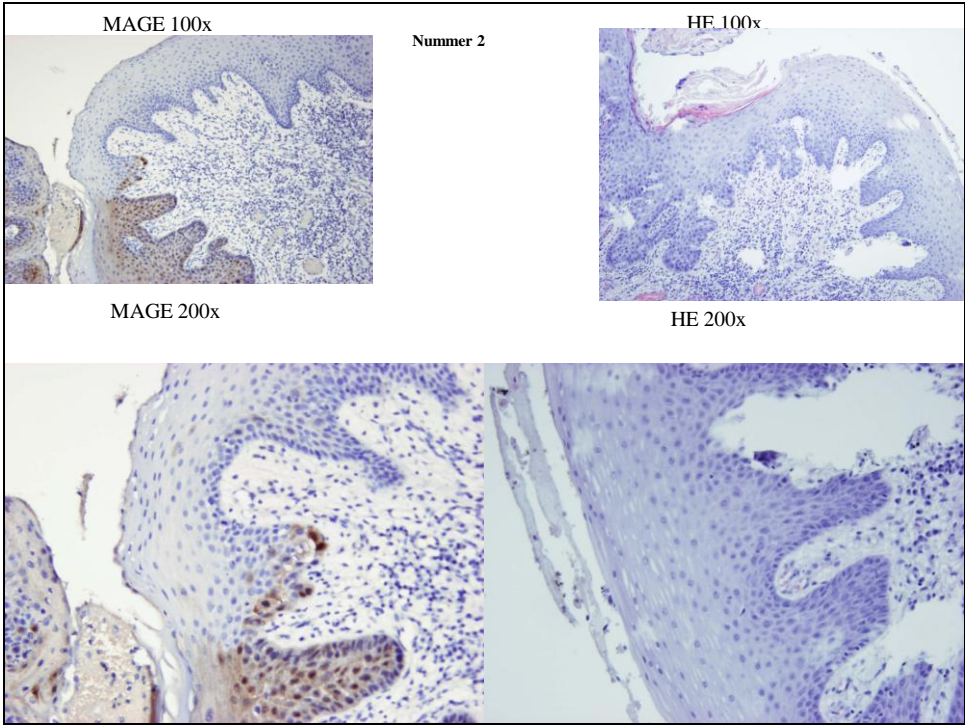
Untersuchung der Läsionsränder

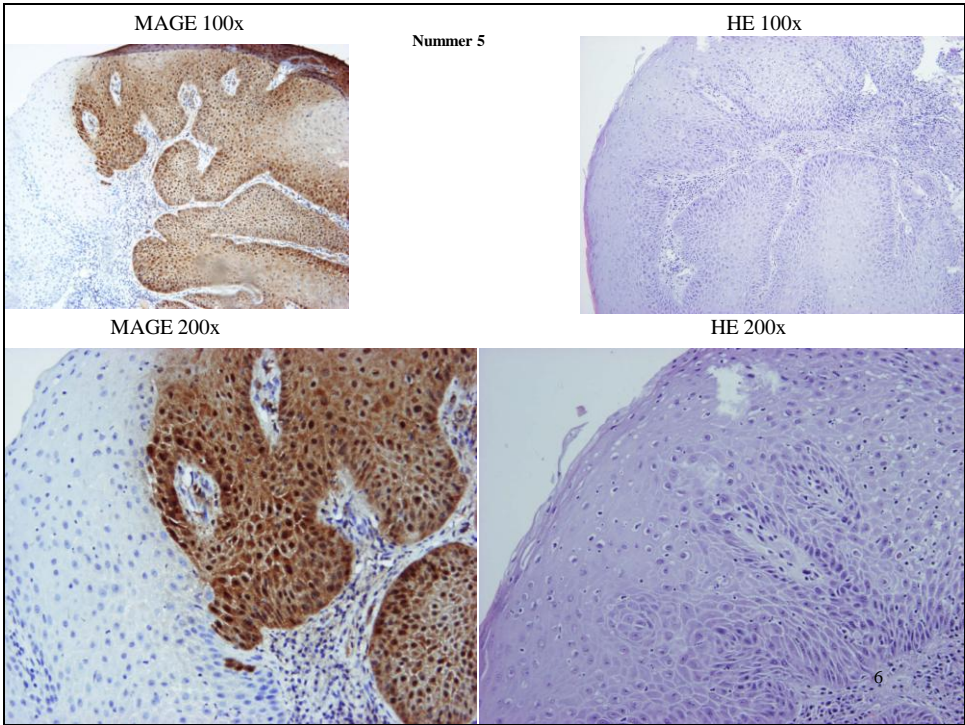
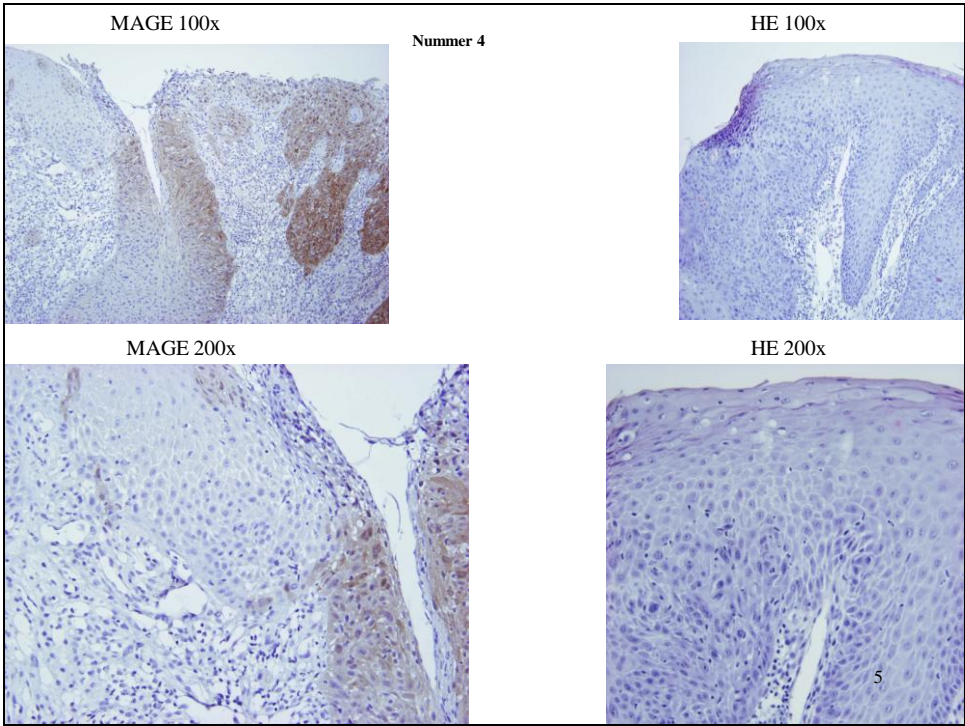
Ziel dieser Untersuchung ist es herauszufinden, ob sich die Läsionsränder von Vorläuferläsionen, wie Dysplasien und Carcinoma in situ, mit einer immunhistochemischen Untersuchung (MAGE-Färbung) besser darstellen lassen als mit der normalen HE-Färbung.

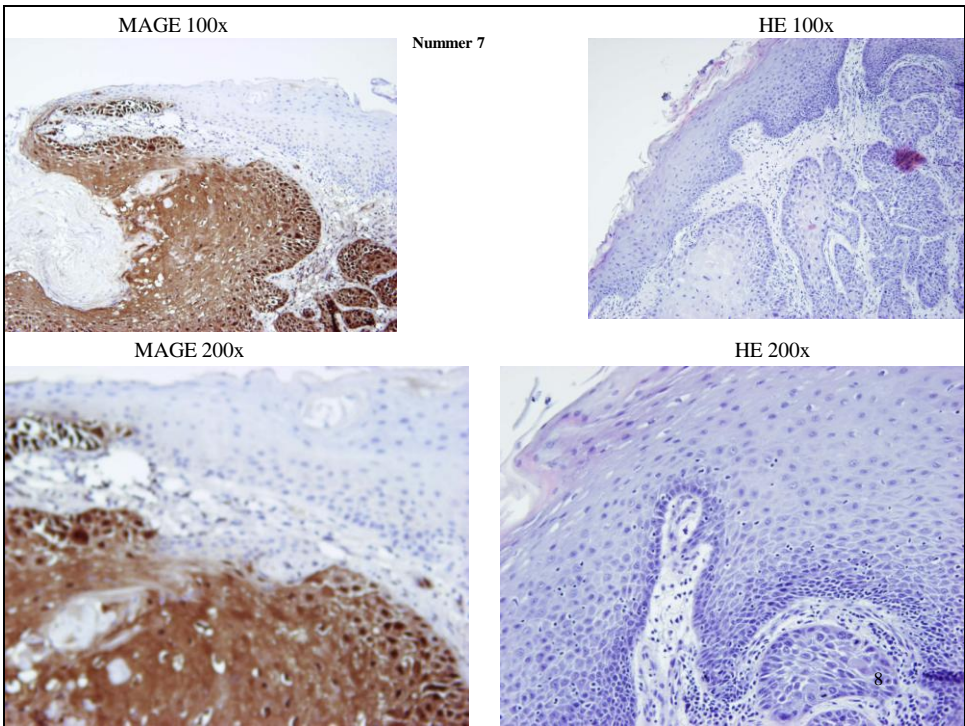
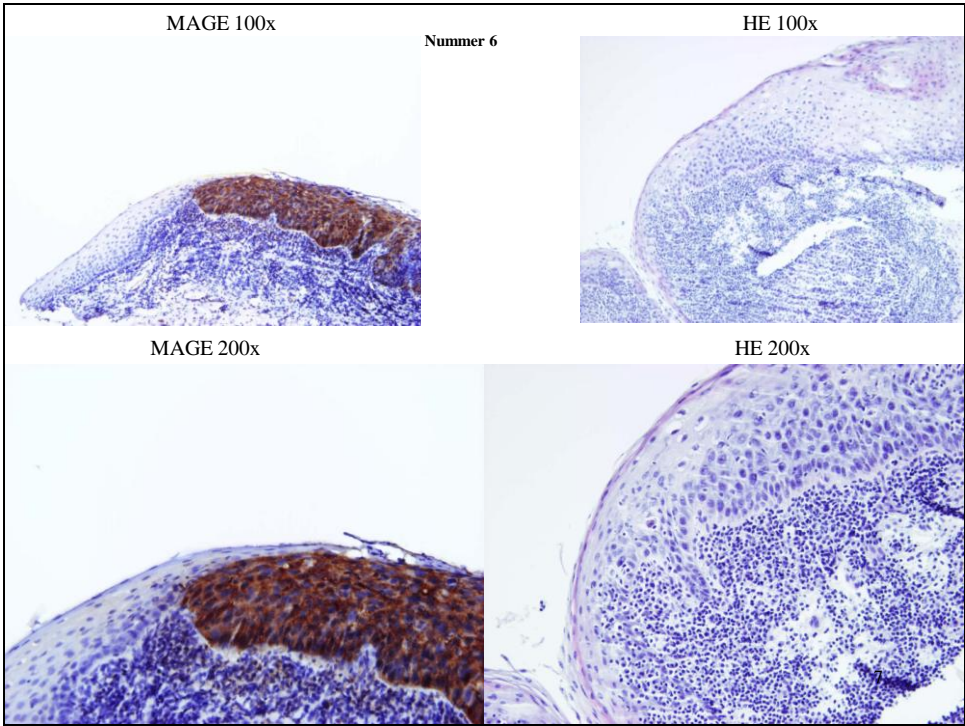
Aufgabe: Bitte beurteilen Sie auf einer Skala von -2 (HE-Präparat ist besser) bis +2 (MAGE-Präparat ist besser) in welchem der HE-gefärbten oder MAGE-gefärbten Bildern sie den Übergang von benigner zu maligner Mundschleimhaut besser erkennen können. Tragen sie dies in die beigelegte Excel Tabelle ein.

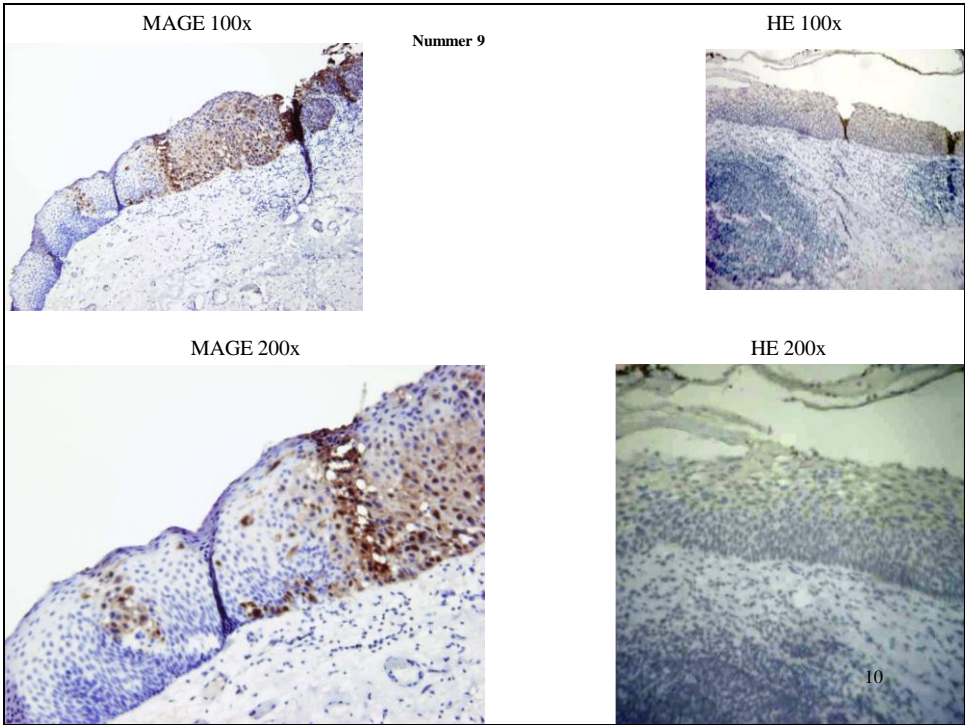
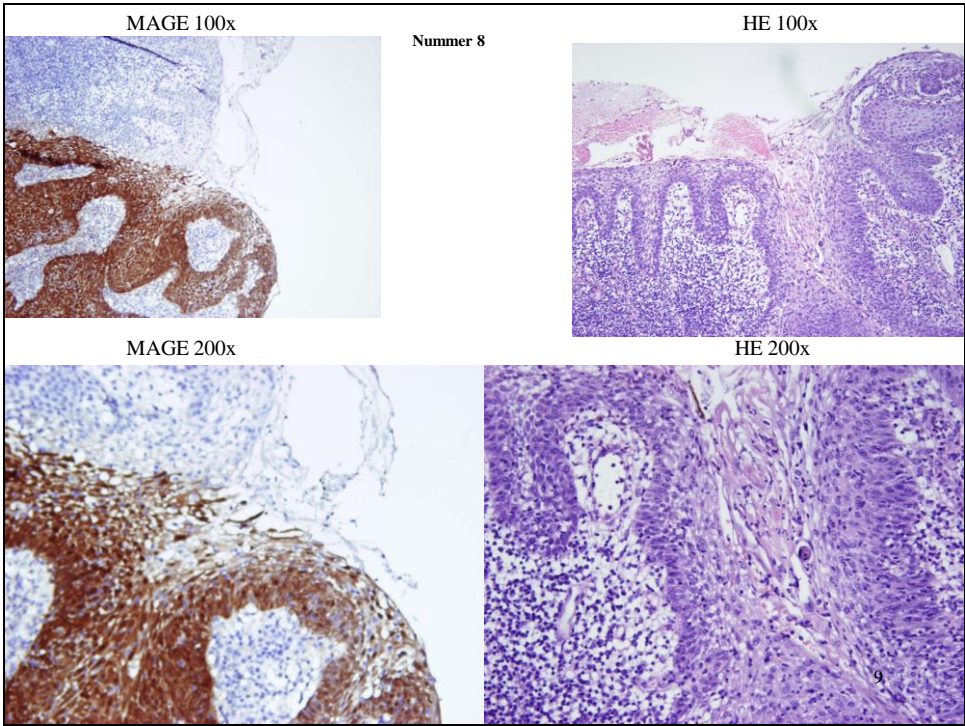
Vielen Dank für ihre Mitarbeit!

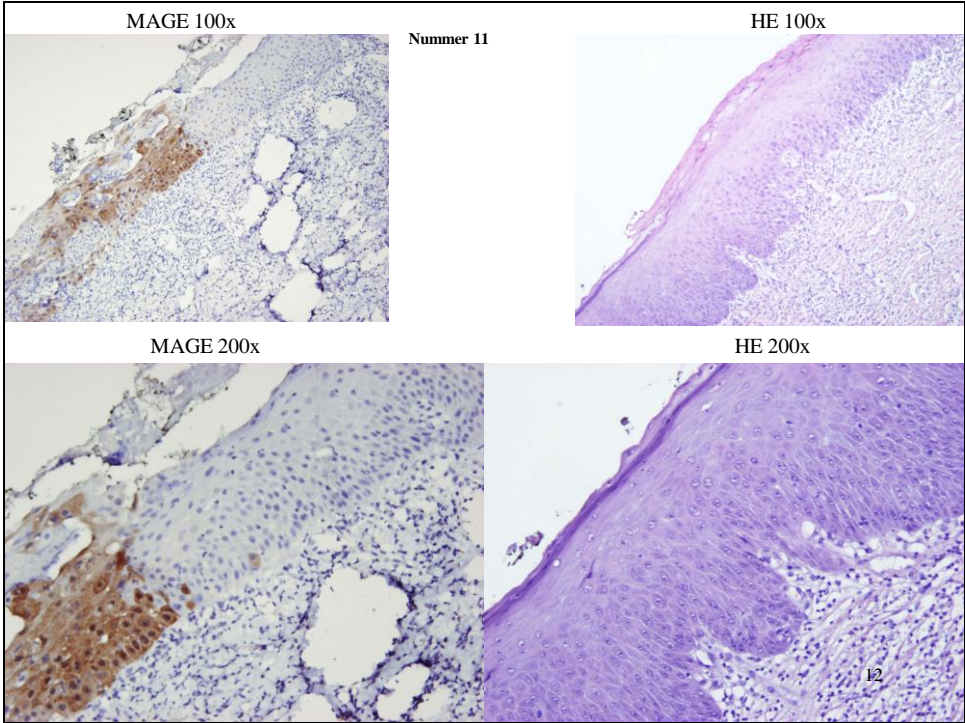
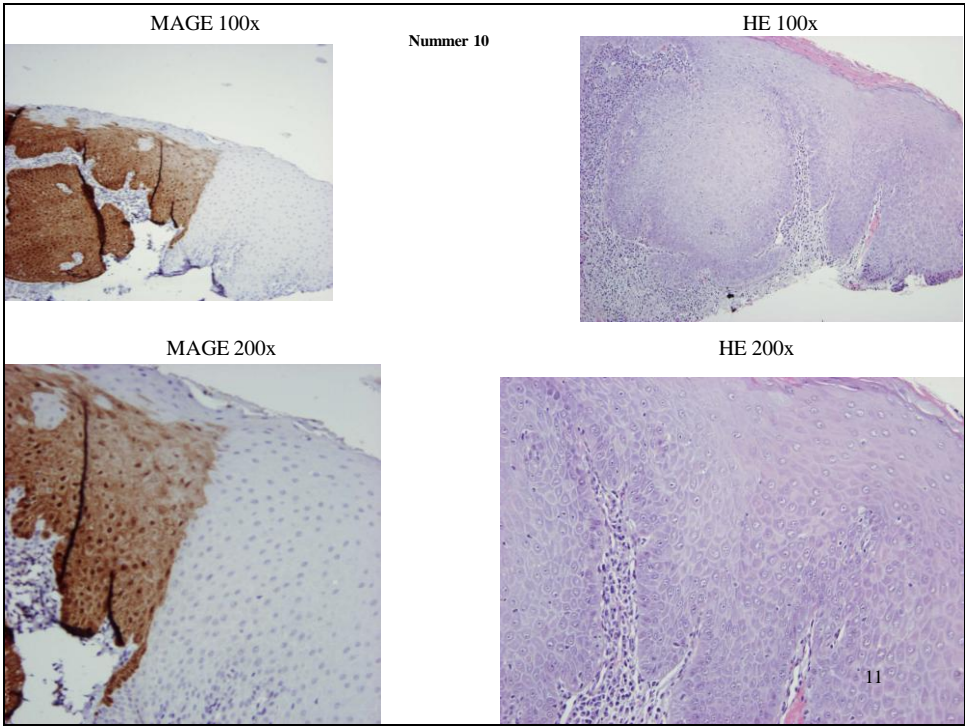


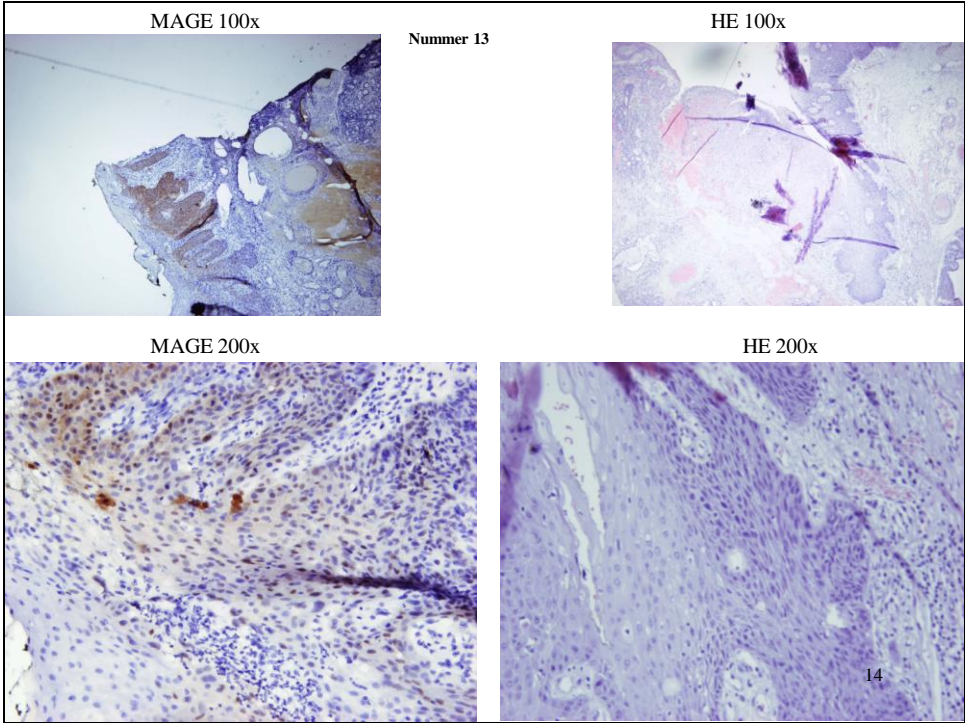
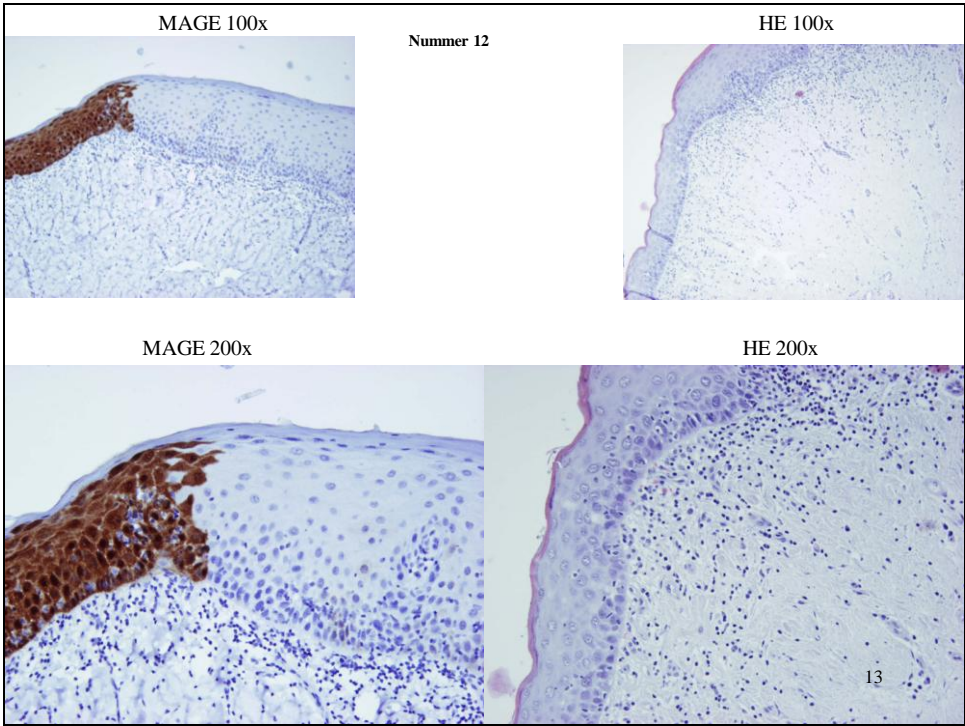


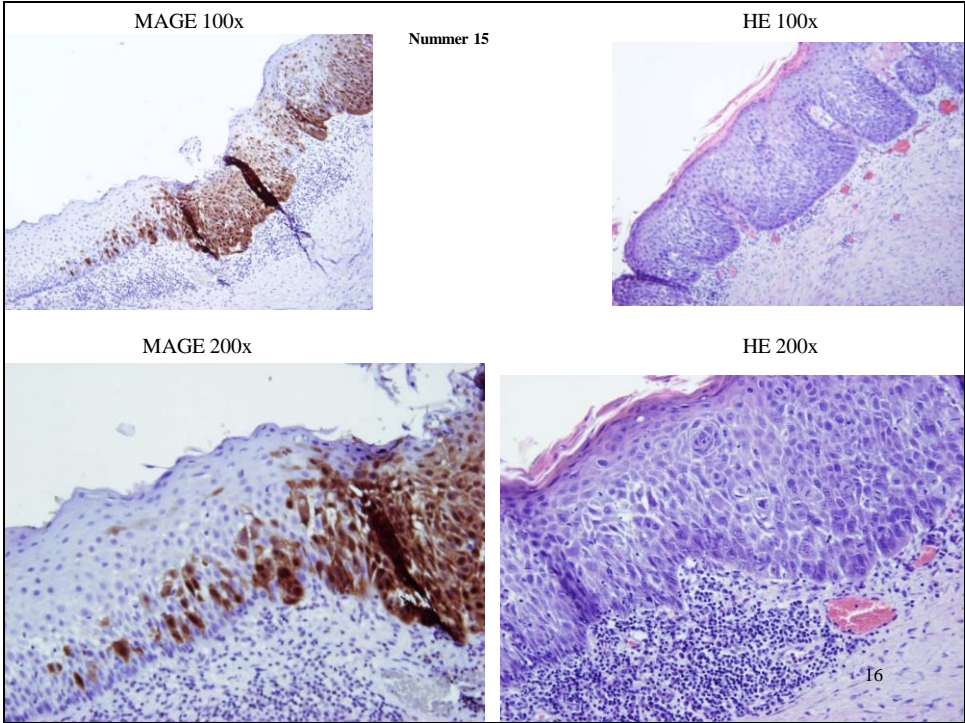
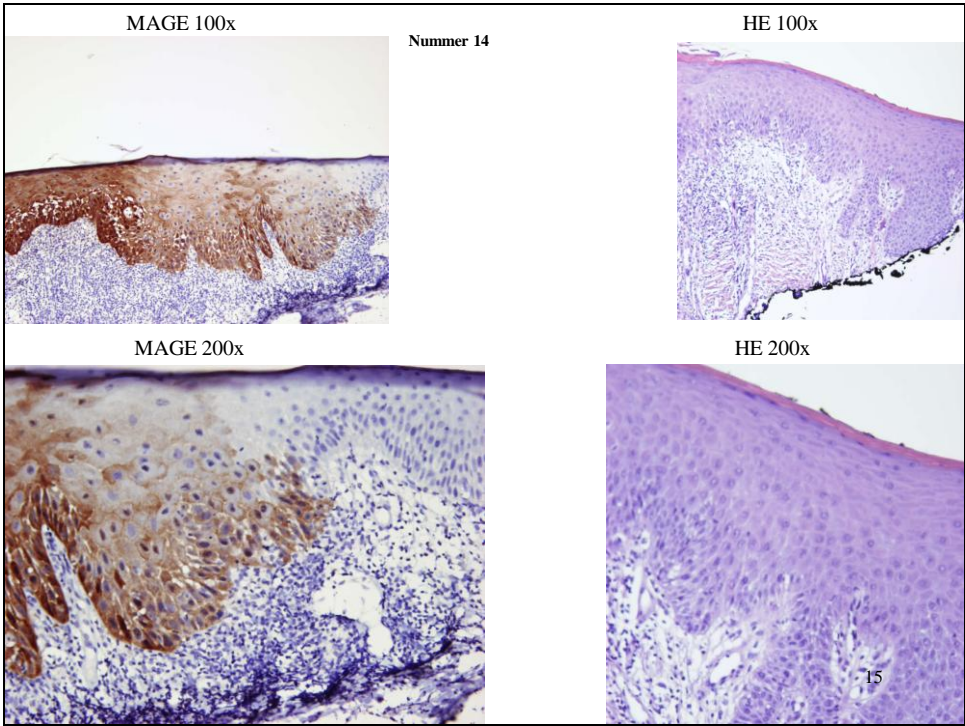


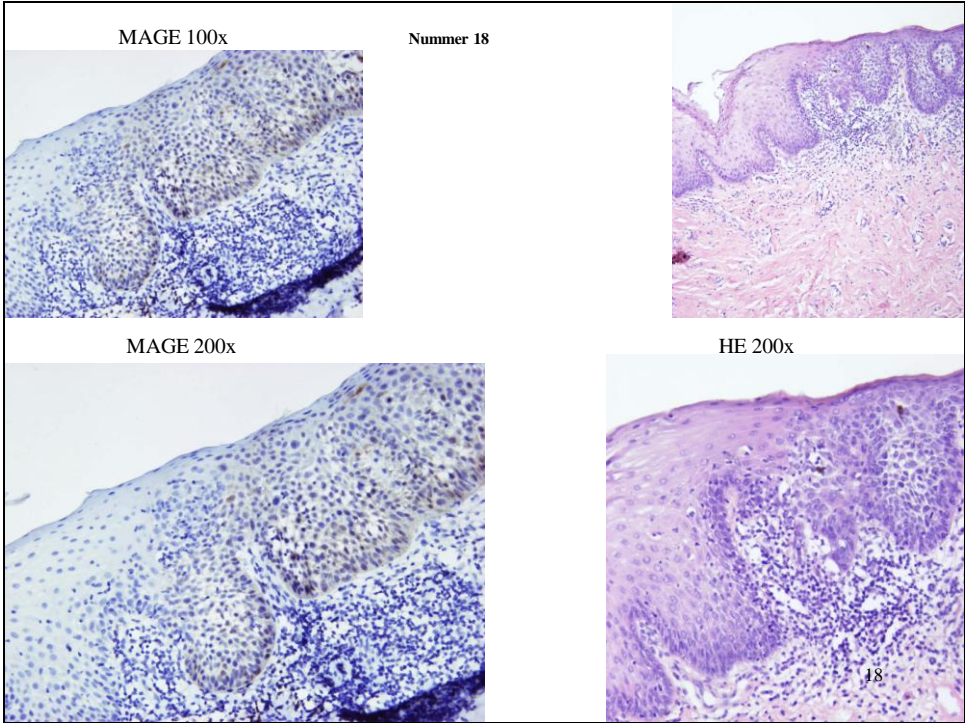
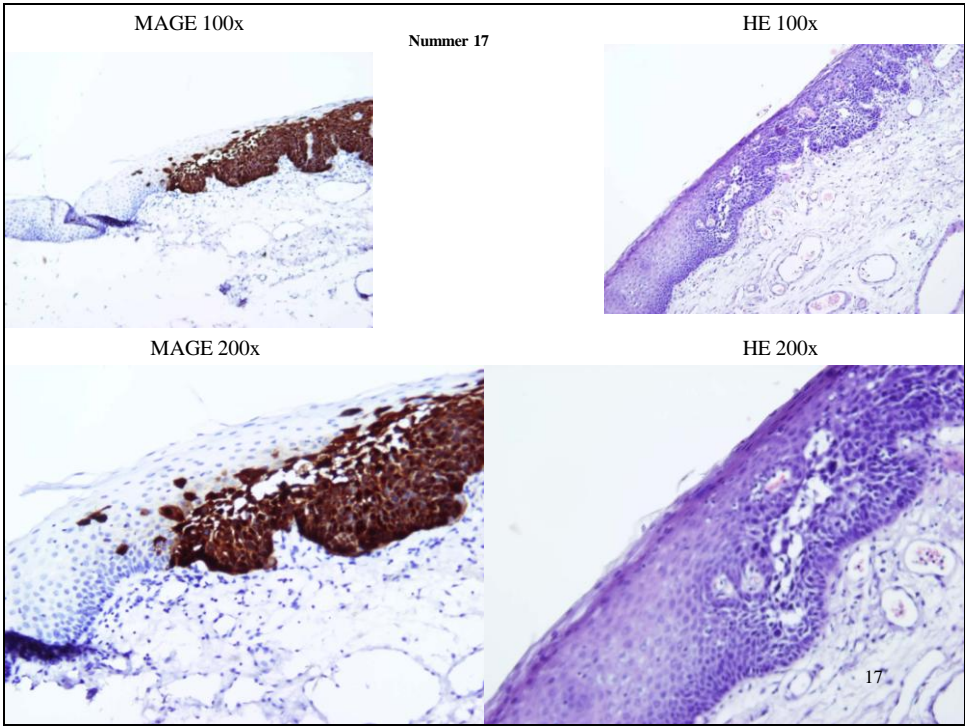


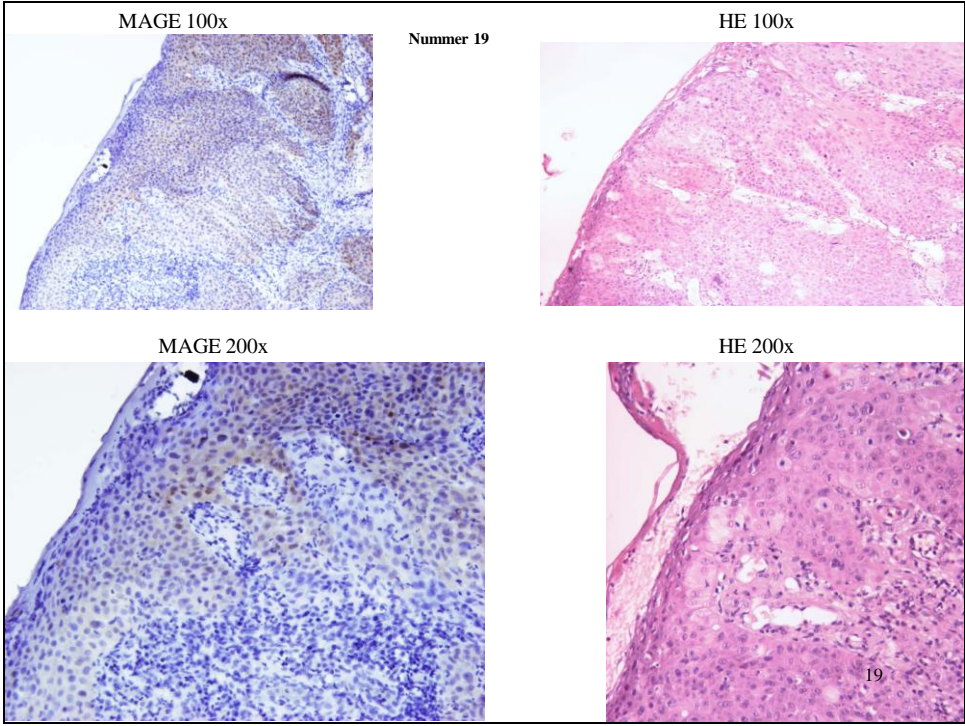












Danksagung

Bei allen, die an der Entstehung dieser Arbeit Anteil gehabt haben, möchte ich mich hiermit herzlich bedanken.

Zu Beginn möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. A. C. Kübler, ärztlicher Direktor der Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Würzburg, bedanken, der mir erst die Möglichkeit gab, meine Dissertation in seiner Abteilung zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Müller-Richter, Oberarzt in der Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Würzburg, für die interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung, umfangreiche und anhaltende Hilfsbereitschaft und das Korrekturlesen.

Ein großes Dankeschön auch Herrn Dr. Rauthe, Pathologe an der Universitätsklinik Würzburg, der mir mit seinem Fachwissen und seiner eingehenden Unterstützung zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. A. Rosenwald, Leiter des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Würzburg, möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens und für die Möglichkeit, die Forschungsarbeiten an seinem Institut durchzuführen, herzlich danken.

Des Weiteren möchte ich der Arbeitsgruppe für Immunhistochemie in der Pathologie in Würzburg danken, die mir das Einlernen in die praktische Thematik in freundlicher Atmosphäre ermöglicht haben.

Herrn Hain möchte ich für die Hilfe in der statistischen Auswertung danken.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich ganz besonders bedanken. Sie haben mich in jeder Hinsicht unentwegt unterstützt, motiviert, mir liebevoll und verständnisvoll während der gesamten Ausbildung und des Studiums zur Seite gestanden. Ich weiß das sehr zu schätzen.

Auch bei meinem Freund Stefan, der mit mir alle Höhen und Tiefen teilte, möchte ich mich hiermit herzlich bedanken.