

Aus dem
Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. Ulrich Joos -

**Prognostische Relevanz
der Cytokeratin-Expression oraler Leukoplakien
und Plattenepithelkarzinome**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Jogschies, Mirco
aus Brake/Unterweser

2007

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Horst Bürger

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2007

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
des Universitätsklinikums Münster

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. Ulrich Joos -

Referent: Prof. Dr. Dr. Johannes Kleinheinz

Koreferent: Prof. Dr. Horst Bürger

ZUSAMMENFASSUNG

Prognostische Relevanz der Cytokeratin-Expression oraler Leukoplakien und
Plattenepithelkarzinome

Mirco Jogschies

Keratin-Proteine bilden die größte Klasse der Intermediärfilamente (bis zu 85% des Totalproteins) und werden im ganzen Körper durch Epithelzellen expremiert, in denen sie ein komplexes Netzwerk ausbilden, welches cytoskelettale Strukturen, Zellmembran und Zellkern miteinander verbindet. Veränderungen der Cytokeratin-Expression können mit maligner Transformation und verändertem Zellverhalten assoziiert sein. Die vorliegende Arbeit untersucht die prognostische Relevanz der Cytokeratin-Expression von oralen Leukoplakien und Plattenepithelkarzinomen verschiedener Lokalisation. MATERIAL UND METHODE: Untersucht wurde die Expression von Cytokeratin (CK) 5/6, 8/18, 1, 10, 14, 19 in Gewebeproben von 140 Patienten mit oralen Leukoplakien (OL) und 192 Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) verschiedener Lokalisation, welche mittels des Tissue Microarray-Verfahren in einen Paraffinblock eingebracht wurden. Die Expression wurde mit immunohistochemischen Methoden dargestellt und lichtmikroskopisch ausgewertet. SIGNIFIKANTE ERGEBNISSE: Tumoren aller Lokalisation haben gegenüber Leukoplakien einen signifikanten Expressionsverlust von CK 1. Die Expression von CK 8/18 und CK 19 ist für die Tumoren aller Lokalisationen signifikant höher als bei Leukoplakien. Der positive Nachweis von CK 5/6 liegt bei 100% für die Leukoplakien und bei 95,7% für die Plattenepithelkarzinome. Orale Plattenepithelkarzinome des Mundbodens zeigten im Vergleich mit Leukoplakien gleicher Lokalisation eine signifikant höhere Expression von CK 8/18. Die CK -Expression von CK 1, CK 8/18 und CK 10 oraler Plattenepithelkarzinome der Zunge ist im Vergleich mit Leukoplakien gleicher Lokalisation signifikant erhöht. Die Expression von CK 8/18 und CK 19 ist in Leukoplakien mit Dysplasie signifikant höher als bei nichtdysplastischen Leukoplakien. Bei der CK-Expression oraler Leukoplakien, Dysplasien und Karzinomen zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression von CK 8/18 und CK 19, sowie einen signifikante Senkung der Expression von CK 1, mit steigendem Grad der malignen Transformation des pathologisch veränderten Epithels.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2007

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Orale Leukoplakien.....	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Epidemiologie.....	2
1.1.3	Ätiologie.....	3
1.1.4	Klinik.....	6
1.1.5	Therapie.....	7
1.2	Orale Plattenepithelkarzinome.....	9
1.2.1	Definition.....	9
1.2.2	Epidemiologie.....	9
1.2.3	Ätiologie.....	10
1.2.4	Klinik.....	11
1.2.5	Therapie.....	12
1.3	Cytokeratine.....	13
1.3.1	Definition der Cytokeratine.....	13
1.3.2	Klassifikation der Cytokeratine.....	13
1.3.3	Struktureller Aufbau und Polymerisationsverhalten der Cytokeratine.....	15
1.3.4	Cytokeratin-Expression oraler Epithelien.....	16
1.3.5	Spezifische Cytokeratin-Expression oraler Leukoplakien.....	17
1.3.6	Spezifische Cytokeratin-Expression oraler Plattenepithel- karzinome.....	18
1.4	Tissue Microarrays.....	20
1.4.1	Entwicklungsgeschichte.....	20
1.4.2	Technische Grundprinzipien.....	20
1.4.3	Anwendungsgebiete.....	22
1.5	Fragestellung der Arbeit.....	24

2.	MATERIAL UND METHODE.....	25
2.1	Patientenkollektiv.....	25
2.2	Erstellung des Patientenkollektivs.....	25
2.3	Erstellung der Tissue Microarrays.....	26
2.4	Immunohistochemisches Färbeprotokoll für CK 5/6, CK 8/18, CK 1, CK 10, CK 14 und CK 19.....	27
2.5	Auswertung.....	29
3.	ERGEBNISSE.....	30
3.1	Analyse des Patientenkollektivs.....	30
3.2	Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Leukoplakien und oralen Plattenepithelkarzinome.....	32
3.2.1	Cytokeratin-Expression der oralen Leukoplakien.....	32
3.2.2	Cytokeratin-Expression der oralen Plattenepithelkarzinome.....	32
3.2.3	Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Leukoplakien und oralen Plattenepithelkarzinome aller Lokalisationen.....	33
3.2.4	Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Plattenepithelkarzinome und oralen Leukoplakien des Mundbodens.....	36
3.2.5	Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Plattenepithelkarzinome und oralen Leukoplakien der Zunge.....	38
3.2.6	Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Leukoplakien mit und ohne Dysplasie.....	41
3.2.7	Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Leukoplakien mit Dysplasie und oralen Plattenepithelkarzinome.....	43
3.2.8	Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Leukoplakien, Dysplasien und Plattenepithel- Karzinome.....	45
4.	DISKUSSION.....	49
4.1	Ergebnisse.....	52
4.1.1	CK 1- und CK 10-Expression.....	52
4.1.2	CK 5/6- und CK 14-Expression.....	55
4.1.3	CK 8/18-Expression.....	57

4.1.4	CK 19-Expression.....	60
4.2	Spezifische Cytokeratin-Expression zum Nachweis von Lymphknotenmetastasen.....	61
4.3	Einfluß von Anti-Oxidanzien auf die Cytokeratin- Expression.....	62
5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	65
6.	DANKSAGUNG.....	80
7.	LEBENS LAUF.....	81
8.	ANHANG.....	I
8.1	Abkürzungen.....	I

1. Einleitung

1.1 Orale Leukoplakien

1.1.1 Definition

Der Begriff orale Leukoplakie (OL) wurde zuerst in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts durch den ungarischen Dermatologen Ernst Schwimmer (1877) beschrieben und hat im Laufe der Zeit, aufgrund variierender Definitionen, zu zahlreichen Missverständnissen und Verwirrungen geführt (Scheifele, C., Reichert, P.A. 1998; Scuibba, J.J. 1995).

Im Auftrag der WHO (World Health Organisation) wurde die Leukoplakie erstmalig 1978 definiert und in Malmö 1983 und Upsalla 1994 durch eine Expertengruppe aus Epidemiologen, Klinikern und Pathologen nochmals überarbeitet. Heutzutage definiert man die OL als: eine weiße Läsion der Mundschleimhaut, die keiner anderen definierbaren Erkrankung zugeordnet werden kann. Einige orale Leukoplakien gehen in Neoplasien über. Anhand der letzteren Aussage werden OL auch als präkanzeröse Läsionen bezeichnet (Bornstein, M.M. et al. 2004; Scheifele, C., Reichart, P.A. 1998).

Durch ihr klinisches Erscheinungsbild werden OL nach Pindborg, J.J. et al., als Empfehlung der WHO (Pindborg, J.J. et al. 1997), wie folgt eingeteilt:

- homogene Leukoplakien; können zusätzlich in flach, gewellt, gefaltet oder bimssteinartig eingeteilt werden (hat keine klinische Relevanz)
- inhomogene Leukoplakien; man kann diese noch weiter unterteilen in:
 - > verruköse Leukoplakien
 - > ulzerierte Leukoplakien
 - > noduläre Leukoplakien (Candida-Leukoplakien)
 - > Erythro-Leukoplakie
- Proliferative verruköse Leukoplakie (PVL)

(nach Bornstein, M.M. et al. 2004; Dunsche, A., Härle, F. 2000; Lindenmüller, I.H., Lambrecht, J.T. 2006).

In Deutschland ist die Leukoplakie-Einteilung von Ö. Sugár und J. Bánóczy aus dem Jahr 1959 ebenfalls noch verbreitet, die drei verschiedene klinische Formen kennt:

- Leukoplakia simplex (homogen OL)
- Leukoplakia verrucosa (inhomogene OL)
- Leukoplakia erosiva (inhomogene OL)

(nach Dunsche, A., Härle, F. 2000)

Da aber nur vergleichsweise wenig Leukoplakien eine echte Präkanzerose darstellen, wird bei histologischen Begutachtungen der Dysplasiegrad, zur Festlegung des Ausmaßes zellulärer Entartung, zunehmend verwendet. Die Abweichung von der Norm spiegelt das prämaligne Potential des dysplastischen Gewebes wieder und kann in vier Schweregrade eingeteilt werden: keine, geringgradige, mittelgradige und schwergradige Dysplasie. Zu den hochgradigen Dysplasien gehört auch das Carcinoma in situ, welches ein Karzinom ohne invasives Wachstum darstellt. (Dunsche, A., Härle, F. 2000; Maerker, R., Burkhardt, A. 1998).

1.1.2 Epidemiologie

Malignome der Mundhöhle und des Oropharynx (mehr als 90% sind Plattenepithelkarzinome; OSCC) sind ein globales Gesundheitsproblem und stehen an elfter Stelle der weltweiten Krebserkrankungen. Im Jahr 2000 gab es ca. 390.000 Neuerkrankungen an Mundhöhlenkrebs, von denen etwa ein Drittel in den Industrienationen, zwei Drittel in weniger entwickelten Länder auftraten und ein geographisch abhängiges Verhältnis Mann zu Frau von 2-15:1 aufwiesen. In Deutschland und anderen Industrienationen gab es eine deutliche Zunahme der Inzidenz und Mortalität innerhalb der letzten 40 Jahre (Stewart, B.W., Kleihues, P. 2003).

Die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland beträgt etwa 3.000 für Frauen und 7.800 für Männer, wobei die Mortalität deutscher Männer seit Mitte der neunziger Jahre rückläufig ist (Batzler, W.U. et al. 2002).

Die orale Leukoplakie (OL) ist eine Läsion mit einem prämaligen Potential, dessen Entartungswahrscheinlichkeit nicht für alle Erscheinungsformen gleich ist. Mittlerweile werden bestimmte Charakteristika wie z.B. Dysplasiegrad, klinische Erscheinung und Lokalisation zur Graduierung des malignen Potentials benutzt (Petti, S. 2003).

In Querschnittsuntersuchungen wurde die Prävalenz von OL vor der WHO-Definition von 1978 zwischen 0,2% und 17%, danach zwischen 1,4% und 10,5% angegeben. Als repräsentative Werte für die westlichen Industriestaaten wurden 1,4% für die Niederlande, 2,9% für die USA und 3,6% in Schweden betrachtet. Nach Aussage von Bornstein et al. (Bornstein, M.M. et al. 2004) liegt die globale Prävalenz zwischen 0,2% und 24,4%, wobei er diese Schwankungen durch unterschiedliches Patientengut (selektiert und unselektiert, unterschiedliche Größe von Patientengruppen), geographischen Varianzen mit den dadurch verbundenen Sitten und Gebräuchen (z.B. Art und Menge des Tabakkonsums oder Kauen von Betelnüssen) und der

verwendeten Definition in der jeweiligen Untersuchung, erklärt. Zwei Studien aus Deutschland (D; 2000) und China (Ch; 2001) ergaben für die Altersgruppen von 35-44 eine Prävalenz von 0,5% (Ch; n=1573) bis 1,6% (D; n=655) sowie 1,0% (D; n=1367) und 1,1% (Ch; n=1515) für die Gruppe 65-74 Jahre. Eine repräsentative amerikanische Population von n=16.128 (Daten von 1988-1994) ergab einen Wert von 0,42%, welcher 1986 noch 2,9% betrug und auf die Verringerung des Tabakkonsums zurückgeführt wird (Scheifele, C. et al. 2003).

OL treten bei Männern am häufigsten im Alter von 45-64 Jahren, bei Frauen zwischen 35-64 Jahren auf, womit der Altersgipfel jenseits des 50. Lebensjahr liegt. Gleichzeitig steigt das Entartungsrisiko mit zunehmendem Lebensalter. Bei deutlich häufigeren Vorkommen tabakassoziierter Läsionen und homogenen OL bei Männern, beträgt das geschlechtsspezifische Verhältnis von Männern zu Frauen 1,3-3:1, während umgekehrt Frauen eine höhere Prävalenz für oralen Lichen Planus haben (Bornstein, M.M. et al. 2004; Von Arx, T. et al. 2002).

Nach der Einteilung von Sugár und Bánóczy liegt das Entartungsrisiko der verschiedenen klinischen OL-Formen für die Leukoplakia simplex bei 3%, für die Leukoplakia verrucosa bei 11% und für die Leukoplakia erosiva bei etwa 38%. Bei histologischer Begutachtung der Epitheldysplasien geht man von 3% Entartung bei Leukoplakien ohne oder mit geringer Dysplasie, 4% bei mittelgradiger Dysplasie und 43% bei hochgradiger Dysplasie aus (Dunsche, A., Härle, F. 2000).

Scheifele und Reichart (Scheifele, C., Reichart, P.A. 1998) untersuchten in einer klinisch prospektiven Untersuchung an 101 Patienten die Prävalenz tumorassoziierter Leukoplakien, welche sich nach Literaturangaben zwischen 11% und 67% befinden sollte. Die eigenen Untersuchungen ergaben eine Prävalenz von 15,8% dem Tumor koinzidierender Leukoplakien und 4% vom Tumor lokal unabhängige Leukoplakien und führten zur Annahme, dass die OL fakultativer und nicht obligater Zustand der schrittweisen Karzinogenese sind.

Die proliferative verruköse Leukoplakie (PVL) ist eine seltene Variante der OL mit sehr hoher Entartungstendenz zwischen 63,3% und 100% und unklarer Ätiologie. Sie tritt gehäuft in höherem Lebensalter auf (Altersgipfel in der 7. Lebensdekade) und betrifft zu 80% Frauen (Lindenmüller, I.H., Lambrecht, J.T. 2006).

1.1.3 Ätiologie

Als ätiologischen Hauptfaktoren für die Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms und der oralen Leukoplakie werden heute Tabak (in den verschiedensten Formen), Alkohol, kauen von Betelnüssen und Fehlernährung angesehen. Nebenbei gibt es aber noch weitere Risikofaktoren, wie Virusinfektionen (HPV), Candida albicans-Infektionen, Immunsuppression, Alter oder Dysplasiegrad (Dietrich, T. et al. 2004; Reichert, P.A. 2001). Tabak wird weltweit

geraucht, gekaut oder geschnupft, wobei sich extreme geographische Unterschiede des Gebrauchs in der jeweils dort vorherrschenden Prävalenz widerspiegeln. Tabak enthält mehr als 3.000 verschiedene chemische Verbindungen, wovon viele toxische und karzinogene Eigenschaften besitzen. Die wichtigsten Karzinogene stellen die aromatischen Kohlenwasserstoffe und die tabakspezifischen N-Nitrosamine (TSNA) dar, wobei letztere als die ursächlichen Agenzien bei oraler Karzinogenese und Entstehung von OL angesehen werden (sowohl beim rauchen oder kauen). Nach Angaben der WHO wird ein globaler, jährlicher Zigarettenkonsum von 1650/Erwachsener über 15 Jahren geschätzt. Dieser ist in industrialisierten Ländern höher (2590 Zigaretten/Erwachsener), als in sich entwickelnden Ländern (1410 Zigaretten/Erwachsener). 2001 rauchten in Deutschland 36,8% der Männer und 21,7% der Frauen bei einer Konsumsteigerung um 7,5% zwischen 1997 und 2001. Auch der Konsum von Zigarren und Zigarillos stieg zwischen 1995 und 1997 um 50%, obwohl sie ein deutlich höheres Risiko für die Entwicklung von Mundhöhlenkrebs als Zigaretten haben. Es besteht eine enge Korrelation zwischen gerauchten Zigaretten und Entwicklung präkanzeröser Läsionen, oralen Epitheldysplasien (OED) sowie oralen Karzinomen (ca. 2,4- bis 15-fach bei täglichem Konsum von mehr als 20 Zigaretten). Heute wird auch der Marihuana-Konsum mit einem erhöhten Risiko, besonders bei jüngeren Patienten, bewertet. Der Gebrauch von Kautabak („smokless tobacco“) findet vorwiegend in den USA und Skandinavien statt und wird mit einer geringen Prävalenz von oralen Präkanzerosen und oralen Karzinomen verbunden. Schnupftabak („snuff“) wird ebenfalls überwiegend in Skandinavien und den USA konsumiert, variiert geographisch stark in seiner Zusammensetzung und seiner karzinogenen Potenz. Amerikanischer „snuff“ hat ein ca. 4-mal höheres Risiko der Entwicklung eines Mundhöhlenkarzinoms, während schwedischer „snuff“ (ist nicht fermentiert und hat einen geringeren TSNA-Anteil) kein erhöhtes Risiko aufweist (Neville, B.W., Day, T.A. 2002). Das Betelkauen ist weit verbreitet in Süd- und Südostasien und hat, besonders in Verbindung mit Tabak, eine sehr hohe Inzidenz für orale Präkanzerosen und Karzinome (Dietrich, T. et al 2004; Reichart, P.A., Way, T.H. 2006).

Als zweitwichtigster Faktor muß chronischer Alkoholabusus angesehen werden, wobei Alkohol selbst kein Karzinogen ist, aber mit Tabak synergistisch agiert. Das Risiko für die Entwicklung eines oralen Karzinoms ist bei Rauchern, die nicht trinken 2- bis 4-fach höher als bei Nichtrauchern und Nichttrinkern. Bei stark trinkenden Rauchern (75 g Alkohol/20 Zigaretten pro Tag) erhöht sich das Risiko auf das etwa 30-fache (Matthias, C. 2005). Ein alleiniger Alkoholkonsum steigert das Risiko der Entstehung einer Leukoplakie nur etwa auf das 1,5-fache. Ausschließlicher Tabakkonsum korreliert deutlich enger mit dem Vorkommen OED als ausschließlicher Alkoholkonsum. Chronischer Konsum von Alkohol verändert die Permeabilität der oralen Mukosa, insbesondere für TSNA und aromatische Kohlenwasserstoffe. (Matthias, C. 2005; Neville, B.W., Day, T.A. 2002; Reichart, P.A. 2000 und 2001; Thomas, G. et al. 2003).

Durch Alkohol- und Tabakabusus entstehen ernsthafte, ernährungsbedingte Folgen, wie eine Vermehrung reaktiver freier Radikale und Auftreten einer Immunsuppression. Ein voll funktionbereites Immunsystem ist wichtig für die körpereigene Krebsabwehr, da reaktive Oxidanzien und freie Radikale phenotypische und genotypische Veränderungen bewirken, welche von der Mutation zur Neoplasie führen. Anti-Oxidanzien und Radikalfänger (z.B. Vitamin A, E, C und β -Karotin) neutralisieren metabolische Stoffwechselprodukte (einschließlich reaktiver Oxidanzien), greifen bei der Aktivierung von Prokarzinogenen ein, behindern die DNA-Bindung von Karzinogenen, unterbinden die Replikation transformierter Zellen und können wahrscheinlich sogar zu einer Regression von präkanzerösen Läsion führen. Eine Mangelernährung ist charakterisiert durch den geweblichen Abbau von anti-oxidativen Proteinen. Alkohol-, tabak-, und/oder mangelernährungsbedingte Immunsuppression bewirkt unter anderem eine verminderte Speicheldrüsenfunktion und Immunität der oralen Mukosa, eine Reduktion von CD4-Helferzellen oder Abschwächung der NK-Zell-Aktivität (Enwonwu, C.O., Meeks, V.I. 1995). Zahlreiche Studien belegen, dass eine vermehrte Einnahme von Früchten, Gemüse, Vitamin C und Ballaststoffen das Krebsrisiko für den oberen digestiven Trakt deutlich reduzieren können (Neville, B.W., Day, T.A. 2002; Reichart, P.A. 2001; Thomas, G. et al 2003).

Wegen der zunehmenden Lebenserwartung wird es auch zu einer höheren Prävalenz von Schleimhautveränderungen bei älteren Patienten kommen. Die Gründe hierfür sind z.B. die erhöhte Permeabilität der Mukosa für alle Arten von schädlichen Noxen durch Epithelatrophie, erhöhte Empfindlichkeit gegenüber mechanischen Einflüssen (loser Zahnersatz) oder Hyposalivation, infolge vorliegender internistischer Grunderkrankungen und Medikamentennebenwirkungen (von Arx, T. et al. 2002).

Über den Zusammenhang von Leukoplakien und Candida-Infektionen wurde erstmals in den sechziger Jahren berichtet und der Begriff „Candida-Leukoplakie“ dadurch geprägt. Der eigentlich harmlose *Candida albicans* wird erst durch prädisponierende Faktoren zum pathogenen Organismus, wovon einer der Tabakabusus (Zigarettenrauchen) ist. Orale Leukoplakien sind zwischen 11% und 31% mit *Candida* besiedelt und bewirken, über erhöhte Produktion karzinogener Nitrosamine und Veränderung der p53-Tumorsuppressorgen-Expression, ein erhöhtes Transformationsrisiko (Bornstein, M.M. et al. 2004).

Auch die humanen Papillomaviren (HPV) vom Typ 16 und 18, bekannt für ihr onkogenes Potential in Karzinomen des Uterus cervix, konnten in oralen präkanzerösen Läsionen und Karzinomen nachgewiesen werden. In etwa 50% der oropharyngealen und 14% der Zungen-Karzinomen wurde HPV-16-DNA mittels PCR-Analyse gefunden, was eine HPV-16-Infektion zu einem möglichen Risikofaktor macht (Reichart, P.A. 2001).

Idiopathische Leukoplakien bei Nichtrauchern, ohne nachweisbare mechanische und chemische Ursachen, werden auf Mangel von Vitamin B₁₂, Folsäure, Eisen, Ferritin oder Transferrin zurückgeführt und können nach Bestimmung des Serumspiegels substituiert werden (Dunsche, A., Härle, F. 2000).

Die Ätiologie der proliferativen verrukösen Leukoplakie ist gegenwärtig immer noch unklar. Eine Beteiligung des HPV wird sehr kontrovers diskutiert und auch Tabak scheint eine eher untergeordnete Rolle als auslösender Faktor zu spielen, da nur ein Drittel bis ein Viertel der Erkrankten rauchen (Lindenmüller, I.H., Lambrecht, J.T. 2006).

1.1.4 Klinik

Leukoplakien werden klinisch in die homogenen (planen) und inhomogenen (gefleckten) Leukoplakien unterschieden. Die inhomogenen unterteilen sich weiter in verruköse, noduläre (Candida-Leukoplakien), ulzerierte (erosive) und Erythroleukoplakien (Dunsche, A., Härle, F. 2000):

- homogene Leukoplakien (Leukoplakia simplex) kennzeichnen sich durch eine gleichförmige weiße Veränderung mit glatter oder runzeliger Oberfläche
- verruköse Leukoplakien (Leukoplakia verrucosa) sind exophytische Läsion mit warziger Oberflächenstruktur
- ulzerierte Leukoplakien (Leukoplakia erosiva) sind leicht erhabene und fleckige Läsionen mit Erosions- und Exulzerationsbezirken
- noduläre Leukoplakien (Candida-Leukoplakie) sind leicht erhabene Läsionen mit rundlichen, roten und/oder weißlichen Vörwölbungen; typische Lokalisation ist der Mundinnenwinkel
- Erythroleukoplakien sind weißliche Läsionen, die auch rötliche Areale beinhaltet (Bornstein, M.M. et al 2004; Dunsche, A., Härle, F. 2000; Maerker, R., Burkhardt, A. 1998; Reibel, J. 2003)

Eine proliferative verruköse Leukoplakie (PVL) ist eine, sich über Jahre entwickelnde, multifokal auftretende exophytische Läsion, die oftmals initial als solitäre homogene Leukoplakie beginnt. Diese sehr seltene Erkrankung neigt nach chirurgischer Entfernung zu Rezidiven und hat ein sehr hohes Entartungsrisiko zwischen 63,3% und 100%. Da Mehrfachlokalisationen zum Erscheinungsbild dieser Läsion gehören, kann sie überall im Mundhöhlenbereich auftreten, wobei die Gingiva des Unterkiefers am häufigsten und der Gaumen zu 80% betroffen ist (Lindenmüller, I.H., Lambrecht, J. T. 2006).

Weiterhin wird auch eine sog. „Präleukoplakie“ beschrieben, welche als graue bis grauweiße Schleimhautalteration mit unscharfer Begrenzung klinisch in Erscheinung tritt (Maerker, R., Burkhardt, A. 1998).

Nach Neville und Day (Neville, B.W., Day, T.A. 2002) sind die bukkale Mukosa (21,9%) und Gingiva/Sulkusepithel des Unterkiefers (25,2%) die bevorzugten Lokalisationen einer oralen Leukoplakie. Das größte Entartungsrisiko bzw. den höchsten Dysplasiegrad weisen aber

Leukoplakien des Mundbodens (42,9%) auf, obwohl dort nur etwa 8,6% gefunden werden können.

Orale Leukoplakien weisen unterschiedliche Dysplasiegrade auf. Während die meisten homogenen Leukoplakien keine bis wenig Epitheldysplasien aufweisen, sind sie in verrukösen und nodulären Leukoplakien häufig anzutreffen (Jaber, M.A. et al. 2003).

Die hochgradige Dysplasie und das Carcinoma in situ müssen als Präkanzerosen im engeren Sinne aufgefasst werden. Sie können in 5%-10% der Leukoplakien nachgewiesen werden (Maerker, R., Burkhardt, A. 1998). Die histologische Dysplasiebeurteilung ist neben dem klinischen Erscheinungsbild die wichtigste Untersuchung, um das Entartungsrisiko einzuschätzen, wobei sich das Risiko von Läsionen ohne oder geringgradiger Dysplasie nur schwer vorausgesagt werden kann (Bornstein, M.M. et al. 2004; Dunsche, A., Härle, F. 2000).

1.1.5 Therapie

Da Leukoplakien oftmals anfänglich keine oder nur geringe Beschwerden verursachen, werden sie häufig vom Patienten nicht bemerkt („patient delay“) und nur durch Zufall, während der zahnärztlichen Kontrolluntersuchung, sofern diese regelmäßig stattfindet, entdeckt. Daher ist es wichtig, im Sinne einer (Sekundär-)Prävention, grundsätzlich eine eingehende Schleimhautinspektion durchzuführen und pathologisch veränderte Bereiche ggf. biopsiert werden. Eine histologische Untersuchung ist oft unumgänglich um Anwesenheit und Grad einer Dysplasie, als wichtigsten Indikator für die potentielle Malignität, neben klinischem Erscheinungsbild, Lokalisation und Größe der Läsion, zu bestimmen (Bornstein, M.M. et al. 2004). Van der Waal, I. et al. (Van der Waal, I. et al. 2000) schlagen z.B. vor, ähnlich der TMN-Klassifikation bei oralen Karzinomen, orale Leukoplakien nach Größe und Dysplasiegrad einzuteilen.

Die Behandlung der Leukoplakie richtet sich grundsätzlich nach der Klinik und histologischem Dysplasiegrad. Grundsätzlich sollte nach Risikofaktoren gesucht und diese, wenn möglich, eliminiert werden (z.B. rauchen, Alkohol oder mechanische Irritationen). Bei klinisch homogenen Läsionen, Lokalisationen in risikoarmen Gebieten der Mundschleimhaut (bukcale Mukosa, Alveolarmukosa, Gaumen) und Rückbildungstendenz, reicht die regelmäßige Kontrolle und konservative Behandlung (Bánkfalvi, Á. et al. 2006; Maerker, R., Burkhardt, A. 1998).

Eine lokale Applikation von Vitamin A-Säure (0.05-0,1% in Mundgel) oder kortikoidhaltige Salben, im Sinne einer Chemoprävention, kann in einigen Fällen zu deutlichen Rückbildungen und Verbesserung des Dysplasiegrades führen. Vitamin E (α -Tocopherol) und Vitamin C (Ascorbinsäure) zeichnen sich ebenfalls durch eine antioxidative Wirkung aus, womit auch sie in der Lage sind, den anfallenden oxidativen Streß aus Stoffwechselprozessen und äußeren Noxen abzubauen (Bánkfalvi, Á. et al. 2006; Zöller, J.E., Scheer, M. 2000).

Matthias (Matthias, C. 2005) spricht ebenfalls die Wirkung von Cox-2-Hemmer zur Chemoprevention, bei deutlich geringerer Konzentration als im Rahmen der antiinflammatorischen und analgetischen Therapie, an. Ihre präventiven Eigenschaften sind z.B. Reduktion der Zellproliferation, Angiogenesehemmung, Restitution des Immunsystems, sowie Reduktion mutagener Eigenschaften exogener Karzinogene.

Bei Patienten mit einer verdächtigen Läsion oder Lokalisation mit hohem Risiko (Zungenrand, Zungenunterseite, Mundboden) sollte die Veränderung, möglichst vollständig, exziiert und der ggf. resultierende Defekt mit einem Transplantat gedeckt werden. Nach histologischer Feststellung des Dysplasiegrades werden weitere therapeutische Maßnahmen getroffen (Tabelle 1.1). Patienten ohne oder mit geringgradiger Dysplasie bedürfen einer regelmäßigen Kontrolluntersuchung: im 1. Jahr alle 3 Monate, im 2. Jahr alle 6 Monate und danach alle 12 Monate. Läsionen mit mittel-/hochgradiger Epitheldysplasie und Carcinoma in situ sollen total exziiert werden, soweit dies nicht vorher geschehen ist, und müssen ebenfalls in regelmäßigen Abständen (lebenslang) kontrolliert werden: im 1. Jahr alle 4 Wochen, im 2. Jahr alle 8 Wochen und ab dem 3. Jahr alle 12 Wochen (Bánkfalvi, Á. et al. 2006; Maerker, R., Burkhardt, A. 1998).

keine/geringe Dysplasie	<ul style="list-style-type: none"> - totale Exzision anstreben - regelmäßige Nachkontrolle: <ul style="list-style-type: none"> > 1. Jahr alle 3 Monate > 2. Jahr alle 6 Monate > danach alle 12 Monate
mittel-/hochgradige Dysplasie Carcinoma in situ	<ul style="list-style-type: none"> - totale Exzision anstreben - bei primär unvollständiger Entfernung Totalexzision nachholen - lebenslange Nachkontrollen: <ul style="list-style-type: none"> > 1. Jahr alle 4 Wochen > 2. Jahr alle 8 Wochen > ab 3. Jahr alle 12 Wochen

Tabelle 1.1 Therapeutisches Vorgehen bei inhomogenen oder sich in Risikolokalisation befindlichen Leuko-Plakien (mod. nach Bánkfalvi, Á. et al. 2006; Maerker, R., Burkhardt, A. 1998)

Neben der konventionellen chirurgischen Exzision werden teilweise auch andere Methoden wie z.B. Photoablation mittels Er:Yag-Laser, Photovaporisation mittels CO₂-Laser und thermische Destruktion mittels Kryochirurgie für die Behandlung eingesetzt. Die Rezidivrate bei Anwendung von CO₂-Lasern liegt mit 10%-22% unterhalb der nach Skalpellexzision mit 17%-35%. (Dunsche, A., Härle, F. 2000; Maerker, R., Burkhardt, A. 1998).

1.2 Orale Plattenepithelkarzinome

1.2.1 Definition

Orale Plattenepithelkarzinome (oral squamous cell carcinoma, OSCC) stellen bösartige (maligne) epitheliale Neoplasien dar und besitzen die Fähigkeit zur lymphogenen Metastasierung. Ursprungsort dieser Veränderung, welche de novo oder sich aus bestehenden Epitheldysplasien entwickelt, kann das Plattenepithel der gesamten Mundhöhle (incl. der Zunge und Lippen) sein.

Histologisch unterscheidet man folgende Differenzierungsgrade:

- Carcinoma in situ (CIS)
- hochdifferenzierte Plattenepithelkarzinome
- mäßig bis gut differenzierte Plattenepithelkarzinome
- schlecht differenzierte Plattenepithelkarzinome
- anaplastische Karzinome

Der Grad der Keratinisierung wird durch das sog „Grading“ (G) beschrieben:

- G₁ = mehr als 75% der Tumorzellen keratinisiert = hochdifferenziert
- G₂ = 25% bis 75% der Tumorzellen keratinisiert = mäßig differenziert
- G₃ = weniger als 25% der Tumorzellen keratinisiert = schlecht differenziert
- G₄ = keine der Tumorzellen keratinisiert = anaplastisch

Zusätzliche Unterscheidungskriterien sind z.B. atypische mitotische Aktivität, wechselnde Zellgröße und Zellform der Tumorzellen (Zellpolymorphie), Verschiebung des Kern-Plasma-Verhältnisses zugunsten des Kerns, abnorme und unterschiedliche Kernformen (Kernpolymorphie), Größenzunahme/zahlenmäßige Zunahme und Atypien der Nukleoli, Abweichungen im DNA-Gehalt oder Nachweis spezifischer Tumormarker. Die meisten OSCC sind mäßig bis gut differenziert

(Anneroth, G. et al. 1987; Bryne, M. et al. 1989; Hees, H., Sinowatz, F. 1996; Metelmann, H.R. 1998).

1.2.2 Epidemiologie

Das orale Plattenepithelkarzinom stellt über 90% aller Malignome des oberen Aerodigestivtraktes dar und liegt weltweit an elfter Stelle (390.000 Neuerkrankungen pro Jahr) der Krebserkrankungen (Matthias, C. 2005; Stewart, B.W., Kleihues, P. 2003).

Das Verhältnis dieser Erkrankung von Männern zu Frauen liegt bei 2-15:1. In den anderen westlichen Industrienationen und in Deutschland stieg die Inzidenz und Mortalität seit den siebziger Jahren deutlich an, wobei seit Mitte der Neunziger Jahre zumindest die Mortalität bei deutschen Männern rückläufig ist (durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate ungefähr bei 50%). Die Inzidenz variiert geografisch dennoch sehr stark, wobei die höchsten Raten in Indien, Australien, Frankreich, Südamerika (Brasilien) und Südafrika zu verzeichnen sind. Die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland beträgt für Frauen ungefähr 3.000 und für Männer ca. 7.800 pro Jahr und macht etwa 1%-4% aller Tumorerkrankungen aus (Batzler, W.U. et al. 2002; Neville, B.W., Day, T.A. 2002; Sciubba, J.J. 2000; Stewart, B.W., Kleihues, P. 2003). Ursächlich für die unterschiedliche geografische Häufigkeit sind Umweltfaktoren wie Tabak- und Alkoholkonsum, sozioökonomischer Status und ein ungesunder Lebensstil (Reichart, P.A. 2000; Stewart, B.W., Kleihues, P. 2003).

1.2.3 Ätiologie

Die Risikofaktoren für die Entstehung oraler Mundhöhlenkarzinome (OSCC) und oraler Leukoplakien (OL) sind identisch, wie bereits in Kapitel 1.1.3 erwähnt. Tabak und Alkohol stellen hierbei die wichtigsten ätiologischen Faktoren dar und lassen sich zu 80% der oralen Karzinogenese zuschreiben (La Vecchia, C. et al 1997; Reichart, P.A. 2000). Tabak wird in geraucher, gekauter oder geschnupfter Form konsumiert und hat toxische und karzinogene Eigenschaften. Für die orale Karzinogenese stellt das Rauchen die wichtigste Form dar, wobei eine starke Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Gebrauch und Karzinomentstehung besteht. Der Gebrauch von „smokeless tobacco“, der vorwiegend in Skandinavien und den USA konsumiert wird, ist mit einem sehr niedrigen Risiko assoziiert, während das Betelkauen, in Verbindung mit Tabak, eine hohe Inzidenz für die Entstehung eines OSCC besitzt. Alkohol selbst stellt kein Karzinogen dar, agiert aber mit Tabak synergistisch. Während Raucher, die keinen Alkohol konsumieren, ein 2-4fach höheres Risiko für Kopf-Hals-Karzinom verglichen mit nichtrauchenden Nichttrinkern haben, steigt es auf das 30fache bei gleichzeitigem starkem Alkoholkonsum (75 g Alkohol / 20 Zigaretten pro Tag) an (Matthias, C. 2005; Stewart, B.W., Kleihues, P. 2003). Ein alleiniger Konsum von Alkohol, ohne Tabakkonsum lässt die Inzidenz auf das 1,5-6fache steigen (La Vecchia, C. et al. 1997). Einen weiteren Risikofaktor stellen auch die humane Papillomaviren (HPV) der Subtypen 16 und 18 dar, welche in 14%-50% der OSCC nachgewiesen werden konnten (Reichart, P.A. 2001). Weitere ätiologische Faktoren sind Immunsuppression (insbesondere für die Entstehung von Unterlippenkarzinomen), Vitamin A- und Eisenmangel, ungesunder Lebensstil (z.B. Mangelernährung und schlechte Mundhygiene), diverse Industriegifte (z.B. benzolhaltige Dämpfe oder Teerbestandteile), Behandlung mit

ionisierenden Strahlen oder chronische Prothesenreize. Eine genetische Prädisposition und familiäre Häufung tritt ebenfalls in Erscheinung und kann das Risiko für die OSCC-Entstehung auf das 3-5fache steigern (Matthias, C. 2005; Zöller, J.E., Scheer, M. 2000).

1.2.4 Klinik

Karzinome zeigen sich klinisch als endophytische oder exophytische Neoplasien mit meist superfizieller Oberfläche, welche lokal infiltrierend wachsen. Ulzerationen oder Infektionen zeigen sich häufig erst in fortgeschrittenen Stadien und gehen mit Schmerzen und Funktionseinschränkungen einher, während kleine Tumoren oftmals als lokale Entzündungen oder mechanische Irritationen (z.B. durch schlecht sitzende Prothesen) angesehen werden. Topographisch lassen sie sich am häufigsten im Mundboden (36,2%) finden:

- Mundboden	36,2%
- Zunge	21,8%
- Mundschleimhaut	15,1%
- andere Teile des Mundes	10,2%
- Lippe (insbesondere die Unterlippe)	8,1%
- Gaumen	4,5%
- Tonsille	2,3%
- Oropharynx	1,9%
- sonstiger Mundbereich	0,1%

(Tabelle 1.2: Lokalisation des OSCC nach absteigender Häufigkeit; nach Bánkfalvi, Á. et al. 2006)

Klinische Symptome die bereits auf ein fortgeschrittenes Tumorwachstum hinweisen sind z. B. Foetor ex ore bei nekrotischem Zerfall des Tumors, Schluckbeschwerden, Kieferklemme, eingeschränkte Zungenbewegung, Sensibilitätsstörungen, motorische Ausfallerscheinungen, äußere Schwellungen, Fistelbildungen und Zahnlockerungen. Der Untersuchungsbefund zeigt fast immer eine derbe, nicht verschiebliche Konsistenz des Tumors. Bei gleichzeitigem Befall der Lymphknoten sind diese zuerst hart, verschieblich und nicht schmerzhaft, während es nach Kapseldurchbruch auch hier zur Fixation kommt. Als erstes werden beim oralen Plattenepithelkarzinom die submentalen und submandibulären Lymphknoten befallen und breiten sich von dort weiter in die Halsregion aus (Bánkfalvi, Á. et al. 2006; Hees, H., Sinowatz, F. 1996; Metelmann, H.R. 1998).

1.2.5 Therapie

Präoperativ müssen Patienten mit oralen Karzinomen ein Staging durchlaufen, durch das der allgemeine Gesundheitszustand, Metastasierungen, Tumorgroße/-ausdehnung und Zahnstatus erfasst wird. Da viele Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) starke Raucher und Trinker waren oder noch sind, liegen häufig Mangelernährungserscheinungen und pulmonale oder vaskuläre Begleiterkrankungen vor, sodass die Therapie grundsätzlich auf die individuelle Situation abgestimmt werden muß (Goodwin, W.J. Jr., Byers, P.M. 1993). Wenn postoperativ eine Radiatio notwendig ist, muß eine Zahnsanierung erfolgen, da periapikale Läsionen, Karies und retinierte Zähne eine Ursache für spätere Osteoradionekrosen sein können (Lockhart, P.B., Clark, J. 1994). Eine Fluoridierungsschiene sollte grundsätzlich zur Vermeidung einer Strahlenkaries angefertigt und während der Radiatio, sowie nach Beendigung der Bestrahlung, getragen werden (Regezi, J.A. et al. 1976). Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Abgewöhnung des Rauchens, da bei Fortführung ein deutlich erhöhtes Rezidivrisiko besteht (Day, G.L. et al. 1994). Das weitere therapeutische Vorgehen wird vom sog. TNM-Stadium (Tumor-Nodus lymphaticus-Metastasen) und der Lokalisation bestimmt und erfolgt überwiegend chirurgisch. Das TNM-System zeigt hierbei den Grad der Ausbreitung eines malignen Tumors an, wobei T für das lokale Tumorwachstum, N für den Befall regionärer Lymphknoten und M für das Auftreten von Fernmetastasen steht. Eine prä- oder postoperative Radiatio oder adjuvante Chemotherapie kann in Kombination angewendet werden. Während bei kleinen Tumoren (T1, N0) eine Exzision mit entsprechend großem Sicherheitsabstand ausreicht, wird bei fortgeschrittenem Tumorwachstum die kombinierte Therapie angewendet und mit entsprechenden Methoden zur funktionellen Rehabilitation ergänzt. Trotz moderner Therapieverfahren ist die Prognose insgesamt als ungünstig zu bezeichnen, mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate bei Männern von 39% und bei Frauen von 55% (Bánkfalvi, Á. et al. 2006).

1.3 Cytokeratine

Das Cytoskelett einer Eukaryontenzelle besteht aus einem hochgradig strukturierten, dreidimensionalen Fasersystem. Es setzt sich i.d.R. aus drei funktionell und morphologisch unterschiedlichen Einheiten: Mikrofilamente (F-Actin), Mikrotubuli und Intermediärfilamente (IF) sowie interzellulären Zellverbindungen (Desmosomen, Hemidesmosomen, Zonula adhaerens), Spectrinen und Laminen. Während Mikrofilamente und Mikrotubuli, aufgrund einer evolutionär hochgradigen Konservierung, sich im Cytoskelett sehr ähnlich sind, variieren die IF in Anzahl, Menge und Zusammensetzung. Sie setzen sich aus mehr als 50 verwandten, unterschiedlich strukturierten Proteinen zusammen und umfassen ca. 1% des körperlichen Gesamtproteins. Alle vorkommenden Filamentproteine werden durch mindestens 67 bekannte Gene des humanen Genoms enkodiert (Fuchs, E., Cleveland, D.W. 1998; Hesse, M. et al. 2001; Lodish et al. 2001).

1.3.1 Definition der Cytokeratine

Die Keratin-Proteine bilden die größte Klasse der Intermediärfilamente (bis zu 85% des Totalproteins) und werden im ganzen Körper durch Epithelzellen expremiert, in denen sie ein komplexes Netzwerk ausbilden, welches cytoskelettale Strukturen, Zellmembran und Zellkern miteinander verbindet. Ursprünglich wurden die α -helikal oder β -gefalteten Hauptproteine des verhornenden Epithels und epidermale Zellprodukte, wie Haare oder Hornsubstanzen (z.B. Nägel, Hörner oder Wolle) als Keratine bezeichnet (Rudall, K.M. 1952). Weiterhin unterschied man das sog. „Prekeratin“ (Tonofilamente in nichtverhornenden Epidermiszellen) und die „Cytokeratine“ als Bezeichnung für nichtepidermale Keratine (Crounse, R.G. 1966; Franke, W.W. et al. 1978). Heutzutage bezeichnet man jedoch sämtliche IF-Filamente des Typs I und II aller epithelialer Zellen synonym als Keratine bzw. Cytokeratine (CK).

1.3.2 Klassifikation der Cytokeratine

Cytokeratin(CK)-Filamente sind ein Translationsprodukt (lokalisiert auf den Chromosomen 12 und 17) einer größtenteils heterogenen und komplexen Multigenfamilie, welche sich offensichtlich über die evolutionäre Entwicklung von Organismen mit einem Endoskelett aus Organismen mit einem Exoskelett (Eumetazoen oder Gliederfüßer), von einem ursprünglichen Gen entwickelte (Coulombe, P.A., Omary, M.B. 2002; Fuchs, E. 1995). Die ca. 20 (humanen)

unterschiedlichen CK haben Molekulargewichte zwischen 40.000 und 68.000 kDa, isoelektrische Punkte zwischen pH 5 und pH 8 und treten in epithelialen Zellen meist paarweise auf.

Ihre Einteilung kann unter folgenden Gesichtspunkten erfolgen: nach ihren Ladungsverhältnissen, ihrer mRNA-Hybridisierung, ihrer Immunreaktion, ihrer Aminosäuresequenz oder Peptidmusters einordnen (Fuchs, E. 1995; Eichner, R. et al. 1986; Steinert, P.M., Roop, D.R.1988). Weiterhin lassen sie sich auch sog. „harte“ und „weiche“ Keratine entsprechend der exprimierenden Epithelien unterscheiden. Die „harten“ Keratine (Typ I: Ha1-8 und Typ II: Hb1-6) sind typisch für Hornprodukte der Epidermis (z.B. Haare, Nägel = die sog. trichozytischen Keratine), Retikulumzellen des Thymus und den Papillae filiformes der Zunge (Coulombe, P.A., Omary, M.B. 2002; Heid, H.W. et al. 1988 a und b), während die „weichen“ in alle anderen Epithelien vorkommen (Moll, R. et al. 1982).

Durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Moll, R. et al. 1982) wurde die Nummerierung der ca. 20 humanen CK etabliert und ist bis heute allgemein akzeptiert.

Die **Subklasse A** (IF-Typ II) umfaßt die **neutral-basischen CK 1-8** mit Molekulargewichten zwischen 52 und 68 kDa und isoelektrischen Punkten zwischen pH 5,8 und 8,0, sowie die Hb-(1-4) α -Keratine der Haare (Eichner, R. . et al. 1986; Heid, H.W. et al. 1988a und b).

Die **Subklasse B** (IF-Typ I) enthält die **sauren CK 9-20** mit Molekulargewichten zwischen 40 und 64 kDa und isoelektrischen Punkten zwischen pH 4,8 und pH 6,1. Auch zu dieser Klasse werden α -Haar-Keratine vom Typ Ha 1-4 gezählt (Eichner, R. . et al. 1986; Heid, H.W. et al. 1988a und b).

A (neutral-basisch)	B (sauer)	Vorkommen
CK 1 CK 2	CK 9 CK 10	mehrschichtig-verhornendes Epithel (Epidermis)
CK 3	CK 12	Hornhaut (Cornea)
CK 4	CK 13	mehrschichtig-unverhorntes Epithel
CK 5	CK 14 CK 15	Basalzellen komplexer Epithelien sowie Myoepithelzellen
CK 6	CK 16 CK 17	mehrschichtig-unverhorntes Plattenepithel, Proliferation
CK 7	CK 19	einschichtiges Epithel, luminale Drüsenzellen
CK 8	CK 18 CK 20	einschichtiges Epithel, luminale Drüsenzellen

Tabelle 1.3: Klassifikation der Cytokeratine nach ihrem isoelektrischen Punkt und deren zelluläres Vorkommen

Vor kurzer Zeit konnte eine weiteres „saurer“ CK (23) in kanzerösen Pankreaszellen entdeckt werden (Coulombe, P.A., Omary, M.B. 2002).

1.3.3 Struktureller Aufbau und Polymerisationsverhalten der Cytokeratine

Der strukturelle Aufbau der Cytokeratine (CK) ist prinzipiell gleich mit denen aller Intermediärfilamente (IF) (siehe Abbildung 1.1). Sie besitzen eine stabartige, α -helikale Zentraldomäne mit hypervariablen Regionen, die reich an Serin- und Glycin-Sequenzen sind (Steinert, P.M., Roop, D.R. 1988). Bei der Dimer-Polymerisation zu IF können die CK, aus strukturellen Gründen, nur heteropolymere Keratinfilamente aus den Subklassen I und II bilden und somit als obligat heterogen bezeichnet werden. Saure CK mit relativ kleinem Molekulargewicht (Typ I) binden sich hierbei an einem basischen CK (Typ II) mit relativ größerem Molekulargewicht, wobei die Differenz ca. 7-10 kDa beträgt (Hatzfeld, M., Franke, W.W, 1985). Eine entscheidende Rolle für diese obligate Heterogenität spielt die, nur bei Typ II vorkommenden, H1-Domäne des Carboxy-Ende (Kopf), da sie eine Schlüsselrolle bei der Erfassung und Polymerisierung (Kontrollregion der phosphorylierungs-abhängigen IF-Polymerisation) benachbarter Moleküle spielt (Steinert, P.M., Parry, D.A. 1993)

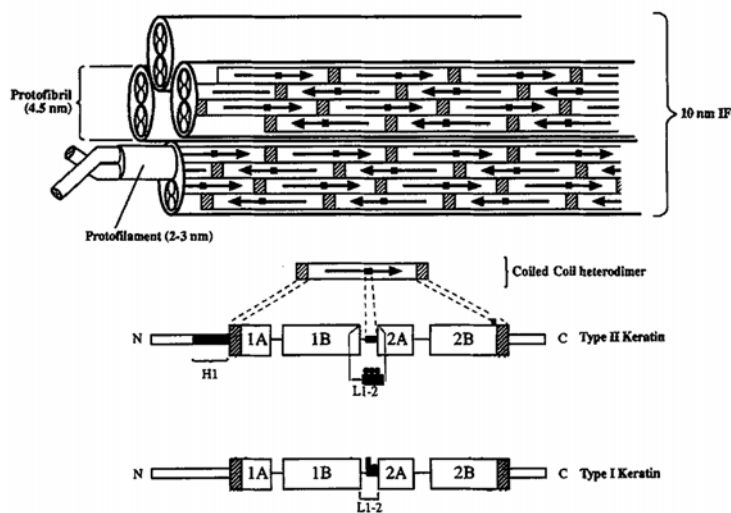


Abbildung 1.1:

Schematische Darstellung des Aufbaus von Cytokeratinen. Der Pfeil zeigt die Richtung vom „Kopf“- zum „Schwanz“-Ende (Pfeilspitze) innerhalb der Zentraldomäne (coiled-coil-Dimer).

Bei den Protofibrillen ist die antiparallele Ausrichtung der Dimere (Steinert, P.M., Parry, D.A. 1993) abgebildet. Am „Kopf“-Ende vom Typ II-CK ist die H1-Domäne zu sehen. (mod. aus Fuchs, E. 1994)

Grundsätzlich wird die sauer-basische Paarung *in vivo* und *in vitro* aufrechterhalten, wobei sich *in vitro* auch Paarungen zwischen Typ I- und Typ II-CK ergeben, die *in vivo* nicht üblich sind (z.B. zwischen nichtepidermalen und epidermalen CK). Auch gibt es die sog. „promiscuity of cytokeratins“ (engl. promiscuity = Vermischung), bei der heterologe CK-Komplexe aus Monomeren unterschiedlicher Rassen (z.B. Mensch und Rind) bilden können (Hatzfeld, M., Franke, W.W. 1985). *In vivo* werden aber überwiegend nur gewebespezifische Kombinationen ausgebildet, mit Ausnahme von CK 19, dass sich mit jedem basischen CK unspezifisch paaren kann (Bader, B.L. et al. 1986).

Innerhalb der Gruppen A und B liegt die Sequenzhomologie bei ca. 60%, während sie zwischen den Typ I- und Typ II-CK nur zu etwa etwa 30% vorherrscht (Steinert, P.M. 1985).

1.3.4 Cytokeratin-Expression oraler Epithelien

Expression von Cytokeratinen (CK) beschreibt, zu welchem Zeitpunkt und unter welchen Bedingungen bestimmte CK im Cytoskelett einer spezifischen Zelle nachweisbar sind. Grundsätzlich werden nicht nur ausschließlich CK in Zellen exprimiert, sondern auch andere IF können nachgewiesen werden (die sog. Coexpression). Da sich viele cytoskelettale Komponenten in einem ständigen Prozess des reaktiven Auf- und Abbaus, als dynamische Antwort auf einwirkenden „Stress“, befinden lässt der Nachweis spezifischer IF-Expressionsmuster Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad der Zelle zu.

In jeder Epithelzelle findet sich mindestens ein spezifisches CK-Paar (Typ I/Typ II) und oft auch mehrere.

Die Expression ist hierbei abhängig von:

1. Epitheltyp
2. Differenzierungsgrad des Epithels
3. Zellproliferation

Das orale Epithelgewebe kann morphologisch und nach differenzierungsspezifischen Expressionsmustern in drei Klassen eingeteilt werden:

1. **mehrschichtiges, verhornendes (keratinisiertes) Plattenepithel (mastikatorische Mukosa):**
 Gingiva
 Schleimhaut des harten Gaumens
2. **mehrschichtiges, nichtverhornendes (nichtkeratinisiertes) Plattenepithel (auskleidende Mukosa):**
 Alveolarmukosa
 Schleimhaut des Vestibulum oris
 Schleimhaut der Wangen und Lippen
 Schleimhaut des Mundbodens und ventrale Seiten der Zunge
 Schleimhaut des weichen Gaumens
3. **spezialisierte Mukosa des Zungenrückens**

Zellen oraler Epithelien enthalten, wie andere epitheliale Zellen auch, CK als einen Bestandteil ihres Cytoskeletts, welche als wertvolle Informationsquelle über das Differenzierungsverhalten und -ausmaß als **Marker** liefern können.

Die spezifische Verteilung der CK innerhalb der verschiedenen oralen Epithelien (siehe Abbildung 1.2) wurde vielfach untersucht und führte zu der Erkenntnis das CK5/14 (und CK 19

in nichtkeratinisiertem Epithel) in allen Basalzellschichten mehrschichtiger Epithelien exprimiert werden. Mit Beginn der Differenzierung kommen jedoch suprabasal (postmitotisch) ein oder mehrere neue CK epithelspezifisch dazu (Dale, B.A. et al. 1990; Presland, R.B., Dale, B.A. 2000; Reibel, J. et al. 1989):

- keratinisiert : CK 1/CK10, CK 2
- nichtkeratinisiert : CK 4/CK 13
- Sulcusepithel/Gingivasaum : CK 4/CK 13
- Verbindungsepithel (junctional epithelium) : CK 8, CK 13, CK 16, CK 18, CK 19

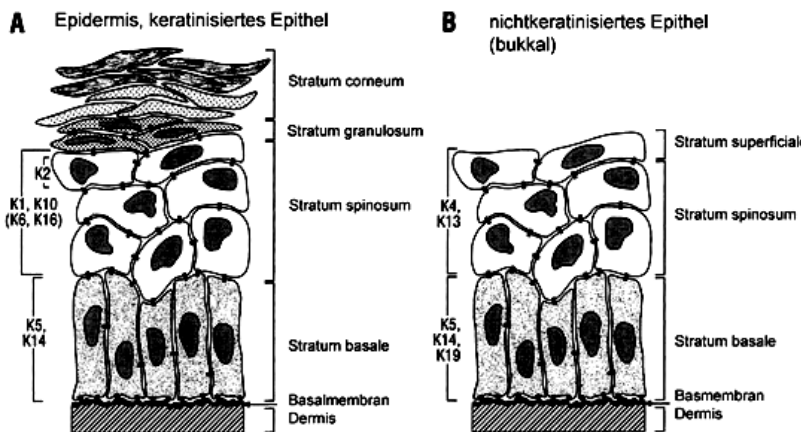
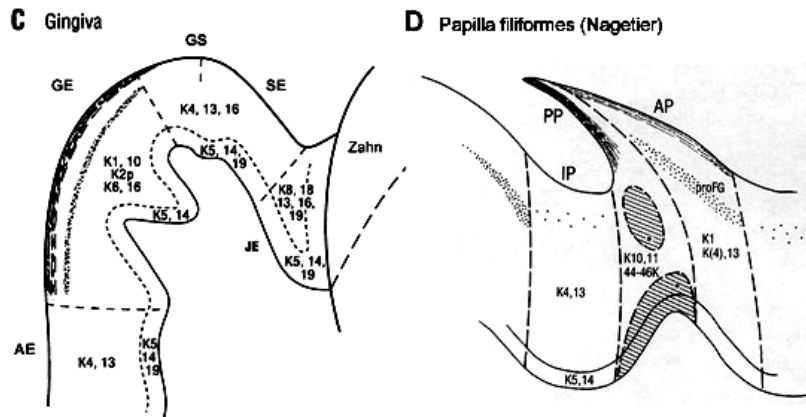


Abbildung 1.2:

Schematische Darstellung der verschiedenen Epithelien und deren CK-Expression (K).

A. keratinisiertes Epithel (Epidermis, gingiva, harter Gaumen)

B. nichtkeratinisiertes Epithel (bukkales Epithel als Beispiel)



C. Gingiva

(GE=Gingivaepithel, SE=Sulkusepithel, GS=Gingivasaum, AE=Alveolarepithel, JE=Verbindungsepithel/Junctional epithelium)

D. Papilla filiformes eines Nagetiers (AP=anteriorer Teil, PP= posteriorer Teil, IP=interpapilläre Region)

(A-C mod. aus Presland, R.B., Dale, B.A. 2000, B.A.; D aus Dale, B.A. et al. 1990)

1.3.5 Spezifische Cytokeratin-Expression oraler Leukoplakien

Morgan, P.R. et Su, L. (Morgan, P.R., Su, L. 1994) und Reibel, J. (Reibel, J. 2003) beschreiben wesentliche Unterschiede im CK-Expressionsmuster oraler Leukoplakien (OL) verglichen mit

nicht pathologisch veränderten oralen Epithelien. Bei OL kommt es zur suprabasalen Expression des CK-Paares 5/14, welches normalerweise nur basal nachweisbar ist, und zur Reduktion bzw. Verlust der differenzierungsspezifischen CK 4/13 oder CK 1/10 wenn gleichzeitig eine Epitheldysplasie vorliegt. Je höher der Dysplasiegrad ausgeprägt ist, desto stärker ist die Reduktion, bis zum völligen Verlust bei schwersten Dysplasien. Auch eine Co-Expression dieser epithelarttypisch getrennten CK-Paare wird für dysplastische OL und auch orale Plattenepithelkarzinome (OSCC) in einigen Fällen beschrieben. Leukoplakien mit Dysplasie von nichtkeratinisierter Mukosa zeigen einen deutlich erhöhten Nachweis von CK 1, wie es bei keratinisierter Mukosa vorkommt. Leukoplakien keratinisierter und spezialisierter Mukosa haben ähnliche Muster wie normales orales Epithel, außer bei Vorliegen einer Dysplasie (Cintorino, M. et al. 1990). Weiterhin ist eine gesteigerte Expression von CK 6 und CK 16 als sog. „fast cell turnover“-Keratine im Rahmen einer Hyperproliferation bei OL ohne und mit Dysplasie nachweisbar, was auch durch Vigneswaran et al. (Vigneswaran et al. 1989) schon beschrieben wurde. CK 8/18, die in Form von mRNA basal und im unteren Str. spinosum vorliegen, aber normalerweise nicht in Proteinform zu finden sind, wurden in einigen Leukoplakien (besonders von nichtverhornenden Epithelien) mit Dysplasien zu über 50% und Microinvasion nachgewiesen. Die CK 8-Expression korreliert mit dem Dysplasiegrad in Leukoplakien und ist bei OL ohne Dysplasie nicht vorhanden (Gires, O. et al. 2006). Weiterhin signifikant ist die Expression von CK 19 bei OL mit und ohne Dysplasie, welches eigentlich nur in Basalzellen von nichtverhornenden und nicht in verhornenden oralen Epithelien zu finden ist. In mittelgradigen bis schwergradigen Dysplasien keratinisierter und nichtkeratinisierter oralen Epithelien lässt sich eine starke basale und suprabasale Expression nachweisen. Sie ist aber auch bei Entzündungen und HPV-Befall vorhanden und stellt somit keinen zuverlässigen Marker dar. Während ein chronischer Tabakkonsum das Expressionsmuster von CK 1, 2 und 19 bukkaler Mukosa nicht beeinflusst (Reibel, J. et al. 1991), kommt es bei der tabakassoziierten Karzinogenese sehr früh zur Nichtexpression von CK 5 (Sawant, S.S. et al. 2003; Upsani, O.S. et al. 2004; Vaidya, M.M. et al. 1998). Eine Hochregulation der CK 14/17-Expression in Verbindung einer Suppression von CK 4/13 ist assoziiert mit Progression der malignen Transformation (Ohkura, S. et al. 2005).

1.3.6 Spezifische Cytokeratin-Expression oraler Plattenepithelkarzinome

Die CK-Expression in oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) zeigt wesentliche Unterschiede zu pathologisch unveränderten oralen Epithelien. Während CK 5 bei fast allen OSCC konstant expremiert wird, sind z.B. die CK 1, 2, 10 und 11 nur entsprechend dem Grad der Keratinisation nachweisbar (Vigneswaran, N. et al. 1989). Nur schlecht differenzierte OSCC zeigen eine

Reduktion oder sogar vollständigen Verlust von CK 5 und/oder CK 14. Gut differenzierte OSCC zeigen ein normales Expressionsmuster mit Epitheldifferenzierung in Form von CK 4/13 bzw. CK 1/10, aber schlecht differenzierte OSCC weisen eine deutliche Störung der Epitheldifferenzierung und Reifung, bis zum Verlust der Expression auf (Bloor, B.K. et al. 2001; Cintonio, M. et al. 1990; Morgan, P.R., Su, L. 1994; Ogden, G.R. et al. 1993a). Die Expression von CK 8/18, welche normalerweise nicht in oralen Epithelien exprimiert werden, variiert invers mit dem Grad der Differenzierung (Morgan, P.R., Su, L. 1994; Ogden, G.R. et al. 1993 c). CK 8 zeigt eine hohe Spezifität und Sensivität bei transformierten Epithel, wie Karzinome, Metastasen und auch Epitheldysplasien in Leukoplakien und ist ein guter Marker für die Erkennung früher Stadien von maligner Gewebetransformation (Gires, O. et al. 2006). Balm et al. (Balm, A.J. et al. 1996) vermuten, dass die CK 18- Expression, von vorher CK 18-negativen Epithelien, de novo nach maligner Transformation auftritt und eine Rückkehr zu der in der Embryogenese normalen Expression oraler Epithelien darstellt. Die Nichtexpression von CK 19 geht einher mit erhöhtem invasivem Potential, während eine erhöhte CK 19-Expression die Invasivität durch Senkung der migratorischen Kapazität reguliert (Crowe, D.L. et al. 1999). Eine suprabasale CK 19-Expression in oralen Epithelien kann als Marker für die Diagnose von oralen Präkanzerosen benutzt werden und stellt gleichzeitig ein initiales Geschehen während der orale Karzinogenese dar (Nie, M. et al. 2002). Bei den meisten SCC des Kopf und Halses kommt es zu einer de novo Überexpression von CK 7/8/18/10/17/19 basal und suprabasal und einer Reduktion normaler Marker (CK 4/5/13/14) in nichtkeratinisiertem Epithel. Kleinere Tumoren korrelieren mit Expression von CK 10/19, Ohne Lymphknotenbefall kommt es vermehrt zur CK 18-Expression und Tumoren mit Fernmetastasen sind gekennzeichnet durch Fehlen von CK 13-Expression (Depondt, J. et al. 1999). Die suprabasale Expression von CK 19 und Nachweis von CK 8/18 ist assoziiert mit dem Grad der Malignität (Ogden, G.R. et al. 1993c). CK 5, 6 und 14 korrelieren signifikant mit der Tumorgroße sowie Lymphknotenbefall und die CK 8/18- und CK 19-Expression mit einer verminderten Überlebensrate (Fillies, T. et al. 2006).

1.4 Tissue Microarrays

1.4.1 Entwicklungsgeschichte

Die Grundlage der Tissue Microarrays (TMA) wurde im Jahr 1986 durch Hector Battifora, im Rahmen der sog. „Sausage“-Technik, geschaffen. Hierbei wurden Gewebeproben von verschiedenen Präparaten gemeinsam in einen Paraffinblock eingebracht, um diese so hergestellten Präparate, im Vergleich zu konventionellen immunohistochemischen Färbetechniken, deutlich schneller und effizienter zu begutachten und möglichst große Patientenkollektive bezüglich prognostischer Relevanz biologischer Variablen zu vergleichen. Durch technische Weiterentwicklungen wurden die vergleichsweise ungeordneten und noch deutlich größeren Präparate, in Hinsicht auf Verfahrenspräzision und Anzahl signifikant erhöht. Heutzutage können bis zu 1.000 Gewebeproben auf einem Objektträger aufgebracht und in einem einzigen Arbeitsschritt immunohistochemisch untersucht werden, was die Identifizierung prognostisch relevanter Biomarker positiv begünstigt hat. Dieses gelang durch Einsatz eines, für das National Institute of Health entwickelten Stanzgerätes der Firma Beecher Instruments (Beecher Instruments Inc., Microarray Technology, Sun Prairie, Wisconsin), mit welchem man erstmalig genormte zylindrische Proben (mit definiertem Durchmesser) in einen Paraffinblock einbrachte und somit ein Probenraster bekam. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass von verschiedenen Patienten stammende Gewebeproben, selbst bei großen Fallzahlen, identischen Inkubationsbedingungen unterliegen und die Ergebnisse nicht durch methodische Unregelmäßigkeiten beeinflusst werden. Die durch Kononen. et al. (Kononen, J. et al. 1998) zuerst beschriebene TMA-Technik ist mittlerweile durch zahlreiche Studien in Hinsicht auf Praktikabilität und Kosteneffizienz als ein „high throughput-tool“ (deutsch etwa Hochdurchsatz-Werkzeug) untersucht und anerkannt (Bubendorf, L. et al. 2001; Merseburger, A.S. et al. 2003; Moch, H. et al. 2001)

1.4.2 Technische Grundprinzipien

Aus einem als „donor“ (englisch für Spender) bezeichneten Paraffinblock werden, über das Stanzgerät der Firma Beecher, Gewebebiopsien entnommen, nachdem die Biopsieregion durch HE(Hämatoxylin-Eosin)-Färbung und anschließender histologischer Begutachtung repräsentativ ausgesucht wurde. Anschließend werden diese Biopsien in den sog. „recipient“ (englisch für Empfänger), einen leeren neuen Block, eingebracht. Das Stanzgerät benutzt hierbei zwei dünnwandige Hohladeln, wobei die erste aus dem „recipient“-Block Paraffin entnimmt (wird

danach verworfen) und die zweite aus dem „donor“-Block die Gewebeprobe gewinnt, welche dann in den Hohlraum des Empfängerblocks überführt wird (Siehe Abbildung 1.3). Aus jedem einzelnen Gewebeblock können theoretisch 300 Proben entnommen werden (bei einer Probengröße von 18x18mm), wobei jede einzelne Probe wiederum in 300 Schichten geschnitten werden kann. Das bedeutet, dass rein theoretisch 90.000 (300x300) in situ Analysen eines Probekblocks möglich sind, wenn jede Probe einen Durchmesser von mindestens 18 mm hätte (Bubendorf, L. et al. 2001).

Der Nadeldurchmesser wurde mittlerweile von 3 mm auf 0,6 mm reduziert, ohne das es zu einem Verlust der Beurteilungsfähigkeit morphologischer Strukturen kommt (Hoos, A., Cordon-Cardo, C. 2001). Durch vielfache Wiederholung dieses Vorganges entsteht ein sog. Geweberaster, wobei die Platzierung der einzelnen Biopsien und die Abstände zwischen ihnen über eine digitale Präzisionssteuerung genau kontrolliert werden und mehrere hundert bis eintausend Proben enthalten kann. Abhängig von der Blockdicke können daraus 200-300 aufeinander folgende 5µm dicke Schnitte angefertigt werden, welche dann z.B. normal immunohistochemisch untersucht werden können. Durch Anordnung der Proben in einem schachbrettartigen Raster wurde eine Basis für eine automatisierte Konstruktion und Analyse der Arrays geschaffen, wie es z.B. der ATA-27 automated arrayer (Beecher Instruments) leistet (Bubendorf, L. et al. 2001; Moch, H. et al. 2001; Sharma-Oates, A., et al. 2005; Simon, R., Sauter, G. 2002).

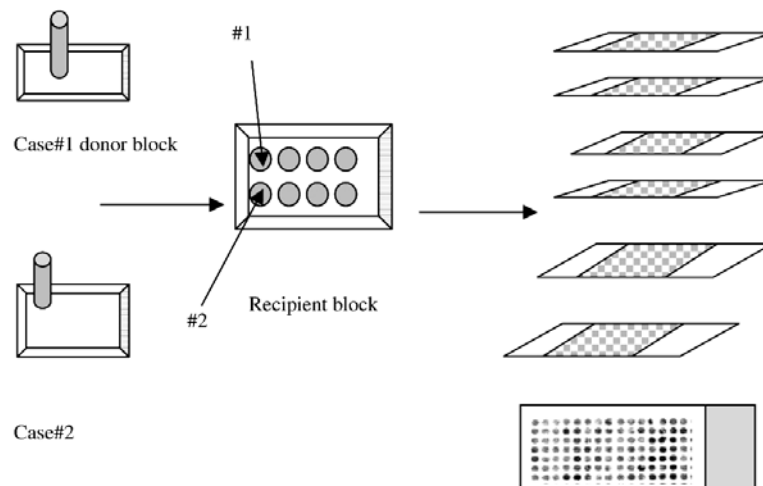


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Konstruktion eines TMA-Blocks. Nach Gewinnung zylinderförmiger Gewebeprobe aus dem „donor“-Block und deren Einbringung in den „recipient“-Block wird das entstehende Geweberaster zu feinen Schnitten verarbeitet (aus Sharma-Oates, A. et al. 2005)

1.4.3 Anwendungsgebiete

Nach der Sequenzierung des menschlichen Genoms wurde eine Fülle von Informationen über die Struktur der menschlichen Gene bekannt. Anhand dieser umfangreichen Daten kam es zur Entwicklung von „high-throughput“-Analyse-Methoden wie z.B. cDNA-Microarrays zur gleichzeitigen Expressions-Analyse zehntausender Gene in einem Experiment. Da hiermit jedoch nur die Gene, aber nicht deren Funktion identifiziert werden können, ist eine Analyse-Methode für ihre Funktion erforderlich. Neuere Technologien wie z.B. Protein-Arrays oder Echtzeit-PCR(polymerase-chain-reaction)-Untersuchungen erleichtern die Analyse von verschiedenen Geweben, haben aber den Nachteil, dass sie zersetzte Gewebe benutzen und die gesuchten Gene den einzelnen Geweben nicht mehr zuzuordnen sind (Simon, R., Sauter, G. 2002). Zur qualitativen Beurteilung der Gene und ihrer Bedeutung für den Zellstoffwechsel bietet sich ein Screening mittels FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) oder RNA-ISH (RNA in situ Hybridisierung) und TMAs an (Bubendorf, L. et al. 2001).

FISH wird zur in situ („vor Ort“) Visualisierung von DNA-Sequenzen in Geweben, Zellen Zellkernen oder Chromosomen benutzt, wobei DNA-Sonden verwendet werden. Diese, mit komplementären Nukleisäuresequenzen zur gesuchten und Markermolekülen (z.B. Biotin oder Digoxigenin) gekoppelten Sonden werden über Antigene (mit Fluoreszenzfarbstoff markiert) lokalisiert. Um die Ankopplung der markierten Sonde möglich zu machen, muß die Ziel-DNA allerdings als Einzelstrang vorliegen, was über Hitzedenaturierung erreicht wird. Bei der anschließenden Renaturierung zum Doppelstrang verbinden sich nun Ziel-DNA und Sonden-DNA und können über die spezifischen, fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper im Präparat, mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops, sichtbar gemacht werden (Lodish, H. et al. 2001). Weitere in situ Methoden zur Anwendung mit TMAs wären die Immunohistochemie (ICH) zur Darstellung von Proteinen und die RNA-Lokalisation über RNA-ISH. Die RNA-Lokalisation ist allerdings umstritten, da Fixierer und chemische Bestandteile des Paraffins potentiell Einfluß auf die Vollständigkeit der RNA, sowie auf einige Proteine und Lipide nehmen können, was wiederum die Ergebnisse beeinflusst. Durch Einführung von sog. „Cryoarrays“, gefrorene Gewebeproben, welche in einem speziellen Präparat („optimal cutting temperature compound; O.C.T.) eingebettet sind, versuchte man diese Limitationen zu umgehen (Hoos, A., Cordon-Cardo, C. 2001).

TMAs haben entsprechend des Designs und der damit verbundenden Fragestellung vielfältige Anwendungsgebiete, wenn es um die in situ Analyse von Geweben geht und können z.B. in verschiedene Typen unterteilt werden:

- **Multitumor TMAs:** enthalten Proben verschiedener Tumorgewebe, mit denen man für jede Tumorart z.B. Vorkommen von spezifischen Proteinen, DNA oder RNA bestimmen kann
- **Normal tissue TMAs:** werden zur Evaluation von mögliche Genen als diagnostische

Marker oder Therapeutika erstellt

- **Progression TMAs** : enthalten Tumorgewebe einer Tumorart in verschiedenen Stadien und dienen der Feststellung ob z.B. bestimmte Gene in den verschiedenen Phasen der Tumorentstehung und –entwicklung unterschiedlich stark expremiert werden
- **Prognosis TMAs**: enthalten Proben von Tumoren mit verfügbaren Follow-up-Daten um die prognostische Relevanz bestimmter Proteine oder DNA/RNA zu ermitteln (Simon, R., Sauter, G. 2002)

Für die Tumorforschung ergeben sich folgende Anwendungsgebiete für TMAs:

- Feststellung von intra- und extrazellulären Verteilungsmustern bestimmter Moleküle
- Informationsübertragung von bestimmten Molekülen auf Protein-, RNA- oder DNA-Level
- Überprüfung von Hypothesen in vivo, die z.B. in Tierversuchen gewonnen wurden
- Erforschung mutmaßlicher Tumorgene oder deren Produkte in verschiedenen Tumor-Stadien
- Ergebnisüberprüfung von cDNA-Microarrays an repräsentativen TMA-Probenzahlen
- Verbindung von molekularbiologischen und pathohistologischen mit Patientendaten (Spyro, M. et al. 2001)

Außerhalb der Tumorforschung gibt es natürlich weitere vielfältige Einsatzgebiete für TMAs, wie z.B. die Altersforschung, Antigenforschung oder Entwicklung neuer Färbmethoden.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die globale Prävalenz von oralen Leukoplakien (OL) liegt zwischen 0,2% und 24,4% (Bornstein, M.M. et al. 2004). Nach der Einteilung von Sugár und Bánóczy liegt das Entartungsrisiko der verschiedenen klinischen OL-Formen für die Leukoplakia simplex bei 3%, für die Leukoplakia verrucosa bei 11% und für die Leukoplakia erosiva bei etwa 38%. Bei histologischer Begutachtung der Epitheldysplasien geht man von 3% Entartung bei Leukoplakien ohne oder mit geringer Dysplasie, 4% bei mittelgradiger Dysplasie und 43% bei hochgradiger Dysplasie aus (Dunsche, A., Härle, F. 2000). Für die Therapie wäre die Bestimmung von prognostisch relevanten Markern, welche frühzeitig die maligne Transformation anzeigen, sehr hilfreich.

Die vorliegende Arbeit untersucht die prognostische Relevanz von Cytokeratin-Expressionen in oralen Leukoplakien im Vergleich zu oralen Plattenepithelkarzinomen. Diese Proteine sind Teil des Cytoskeletts einer Zelle und werden entsprechend der Epithelart und Lokalisation in einem typischen Muster expremiert. Abweichungen des Expressionsmusters, im Vergleich zu nicht pathologisch veränderten Epithelien, können somit eine Aussage über eine mögliche maligne Transformation geben. Diese Arbeit untersucht daher die Cytokeratinexpression von 140 oralen Leukoplakien und 192 oralen Plattenepithelkarzinomen in Abhängigkeit von der jeweiligen Lokalisation. Ziel ist die Bestimmung von prognostischen Markern, welche eine mögliche Entartung frühzeitig anzeigen und gleichzeitig zu weiteren individuellen Therapiemaßnahmen führen.

2. Material und Methode

2.1 Patientenkollektiv

Untersucht wurde die Expression von Cytokeratin (CK) 5/6, 8/18, 1, 10, 14, 19 in Paraffin eingebetteten Gewebeproben von 140 Patienten mit oralen Leukoplakien (OL) und 192 Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) verschiedener Lokalisation, die in der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Münster behandelt wurden.

Die Lokalisationen der OL und OSCC verteilten sich auf Zunge, Mundboden, Alveolarfortsatz, Gaumen, Unterlippe, Wange, Sonstige und unbekannt.

Die Begutachtung der Proben erfolgte am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Westfälischen Wilhelms Universität Münster.

Einschlußkriterien für Patienten in der vorliegenden Studie waren,

1. histologische Zuordnung des untersuchten Gewebes als orale Leukoplakie nach Definition der WHO (Pindborg, J.J. et al. 1997) oder orales Plattenepithelkarzinom
2. genügend beurteilbares Gewebe

2.2 Erstellung des Patientenkollektivs

Bei der Erstellung des Patientenkollektivs wurden die jeweiligen Krankenakten des Untersuchungszeitraums von 1986 bis 1999 der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Münster ausgewertet.

Die Untersuchungsbefunde der pathologischen Begutachtung, die zugehörige Journalnummer, Diagnosedatum, Lokalisation des Biopsie, Patientename wurden dokumentiert und anschließend in eine Datenmaske übertragen (Microsoft Office Professional 2003: Excel).

Mit Hilfe der Journalnummer der Untersuchungsbefunde wurden im Archiv des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie der Westfälischen Wilhelms Universität Münster die zugehörigen histologischen Schnitte herausgesucht. Zur Auswahl repräsentativen Gewebematerials für das Tissue Microarray-Verfahren, wurde lichtmikroskopisch durch Professor Dr. H. Bürger, Facharzt für Pathologie, eine Begutachtung durchgeführt. Nach endgültiger Erstellung des Untersuchungskollektivs wurden die den Schnitten zugehörigen, in Paraffinblöcke eingebetteten Gewebebiopsien, aus dem Archiv herausgesucht.

2.3 Erstellung der Tissue Microarrays

Nach der zuvor erstellten Datenmaske wurden die Blöcke und Schnitte den zu erstellenden Tissue Microarrays (TMA) zugewiesen. Nach folgendem Schema wurde die Feldbezeichnung zugeordnet:

Jeweils einhundert Gewebeproben wurden auf einen „Block“ verteilt und mit römischen Zahlen von I-IV durchnummeriert, da der Empfängerblock nur maximal vierhundert Biopsien enthalten sollte. Ein „Block“ setzt sich aus 10 mal 10 Feldern zusammen, die horizontal alphabetisch mit Buchstaben (A-J) und vertikal durchnummeriert (1-10) wurden.

Der TMA-Block erhielt nun eine Bezeichnung mit einer Kombination aus einer römischen und einer arabischen Zahl und enthielt je zwei Proben des Gewebes:

Paraffin-Block	Block	Reihe	Zellen	Datensatz
I.1	I	A	a1a2	Patient 1

Tabelle 2.1: Schema der Feldbezeichnung für einen Datensatz

Anschließend erfolgte die Sortierung der Datensätze und Zuordnung der Felder im TMA-Block, sowie der Schnitte und der dazugehörigen Gewebeblöcke in identischer Reihenfolge. Nach erneuter lichtmikroskopischer Begutachtung und Markierung mit einem Stift durch Professort Dr. H. Bürger, Facharzt für Pathologie, konnten durch Auflegen der markierten Schnitte auf die Gewebeblöcke der repräsentative Abschnitt der Biopsie festgelegt werden. Mittels eines speziellen Stanzgerätes (Beecher Instruments Inc., Microarray Technology, Sun Prairie, Wisconsin) wurden zur Erstellung des Arrays je 2 Biopsien mit einem Durchmesser von 0,6 mm aus den Geberblock entnommen und in den Empfängerblock überführt. Dies ergab bei einem Untersuchungskollektiv von 332 Patienten 664 Biopsien (332 x 2) für den Empfängerblock.

2.4 Immunohistochemisches Färbeprotokoll für CK 5/6, CK 8/18, CK 1, CK 10, CK 14 und CK 19

1. **Anfertigung von 4 µm dicken Schnitten und Aufbringen dieser auf Objektträger.**
2. **Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin:**
 - a. Eintauchen in 0,25 M NH₄-Ac
 - b. Trocknung bei 60° C
 - c. Inkubation in 50 mg/ml Poly-L-Lysin bei Raumtemperatur für 30 min
 - d. Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur
3. **Entparaffinisierung der Schnitte:**
 - a. Inkubation für 2 x 10 min in Xylol
 - b. Inkubation für 2 x 5 min in 99%igem Alkohol
 - c. Inkubation für 1 x 5 min in 96%igem Alkohol
 - d. Inkubation für 1 x 5 min in 80%igem Alkohol
 - e. Inkubation für 1 x 5 min in 70%igem Alkohol
 - f. zweimalige Spülung mit Aqua dest.
4. **Vorbehandlung:**
 - a. Inkubation für 30 min in Methanol mit Zusatz von 0,3%igem H₂O₂
 - b. Abkühlen bei Raumtemperatur für 20 min
5. **Antikörperfärbung mit dem Catalysed Signal Amplification System (CSA) der Firma DAKO (DAKO, Glostrup, Denmark)**
 - a. Primärantikörper (monoklonale Maus-Antikörper):

Antikörper	Hersteller	Klon	Vorbehandlung	Verdünnung
CK 5/6	DAKO, Glostrup, Denmark	D5/16B4	Autoklav (10 min)	1 : 80
CK 8/18	Dianova, Hamburg, Germany	K8.8/DC10	Autoklav (10 min), Citratpuffer	1 : 40
CK 1	Novocastra, Newcastle, UK	34ßB4	Heißdampf (30 min), Citratpuffer	1 : 150
CK 10	DAKO, Glostrup, Denmark	DE-K10	Heißdampf (30 min), Citratpuffer	1 : 400
CK 14	Dianova, Hamburg, Germany	LL002	Heißdampf (30 min), Citratpuffer	1 : 50
CK 19	Quartett GmbH, Berlin, Germany	KS19.1	Heißdampf (30 min), Citratpuffer	1 : 80

- b. Inkubation für jeweils 30 min bei Raumtemperatur
- c. Spülung mit TBST-Puffer und Einlegen in TBST-Pufferbäder für 5 min
- d. Link-Antikörper
 - biotinylierte Kanninchen Anti-Maus Immunglobuline, Inkubation für 15 min

- e. Spülung mit TBST-Puffer und Einlegen in TBST-Pufferbäder für 5 min
 - f. Streptavidin-Biotin-Komplex
 - Streptavidin, an Meerrettich-Peroxidase konjugiertes Biotin in PBS-Puffer mit einer antimikrobiellen Substanz und stabilisierendes Protein, Inkubation für 15 min
 - g. Spülung mit TBST-Puffer und Einlegen in TBST-Pufferbäder für 5 min
 - h. Amplifikationsreagenz
 - Biotinyltyramid und Wasserstoffperoxid in PBS, stabilisierendes Protein und eine antimikrobielle Substanz, Inkubation für 15 min
 - i. Spülung mit TBST-Puffer und Einlegen in TBST-Pufferbäder für 5 min
 - j. Streptavidinperoxidase
 - an Meerrettich-Peroxidase konjugiertes Streptavidin in PBS, stabilisierendes Protein und eine antimikrobielle Substanz, Inkubation für 15 min
 - k. Spülung mit TBST-Puffer und Einlegen in TBST-Pufferbäder für 5 min
 - l. Substrat-Chromogen-Lösung
 - Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) in Tris-HCl-Pufferkonzentrat, Inkubation für 5 min
 - m. Spülung mit Aqua dest.
 - n. Hämatoxylin-Gegenfärbung
 - Inkubation für 45 sec
- 6. Abdeckung aus frischem Aqua dest. mit KAISER`s Glycerin Gelatine**

2.5 **Auswertung**

Die pathohistologische Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch durch Professor Dr. H. Bürger, Facharzt für Pathologie des Gerhardt-Domagk-Instituts für Pathologie der Westfälischen Wilhelms Universität Münster. Hierbei wurden die Reaktionen quantitativ wie folgt gewertet:

1=keine Reaktion

2=Reaktion

Eine statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Chi²-Test über das statistische Auswertungsprogramm SPSS für Windows, Release 14.0.1 (07.Dezember.2005), der Firma SPSS Inc.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv umfasste 192 Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC), 140 Patienten mit oralen Leukoplakien (OL), von denen 23 Patienten Epitheldysplasien (Dys) hatten. Sämtliche Tumoren wurden postoperativ nach dem TMN-System klassifiziert. Klinische und histopathologische Details für die Patienten mit OSCC und OL (mit Dys) sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 wiedergegeben.

Alter (Durchschnitt)	59 Jahre (Minimum: 31 Jahre, Maximum: 90 Jahre)
Geschlecht	154 Männer (80,2%) 38 Frauen (19,8%)
T-Stadium	T 1: 95 Patienten (49,5%) T 2: 82 Patienten (42,7%) T 3/T 4: 15 Patienten (7,8%)
N-Stadium	negative Lymphknotenmetastasen: 135 Patienten (70,3%) positive Lymphknotenmetastasen: 57 Patienten (29,7%)
histologisches Grading	G1: 44 gut differenzierte Karzinome (22,9%) G2: 75 mäßig differenzierte Karzinome (39%) G3: 73 schlecht differenzierte Karzinome (38,1%)

Tabelle 3.1: Klinische und histopathologische Details der OSCC-Patienten

Alter (Durchschnitt)	54 Jahre (Minimum: 22 Jahre, Maximum: 86 Jahre)
Geschlecht	84 Männer (60%) 56 Frauen (40%)
Dysplasiegrad	Grad 0: 117 Patienten (83,6%) Grad 1: 6 Patienten (4,3%) Grad 2: 8 Patienten (5,7%) Grad 3: 9 Patienten (6,4%)

Tabelle 3.2: Klinische und histopathologische Details der OL-Patienten (ohne und mit Dysplasien)

3.2 Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Leukoplakien und oralen Plattenepithelkarzinome

3.2.1 Cytokeratin-Expression der oralen Leukoplakien

Die Anzahl der positiven und negativen Expressionen für die Cytokeratine 1, 5/6, 8/18, 10, 14, 19 ist in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Lokalisation	CK 1		CK 5/6		CK 8/18		CK 10		CK 14		CK 19	
	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
Zunge	30	12	42	0	0	42	6	36	42	0	5	38
Mundboden	7	4	12	0	3	9	5	7	12	0	2	9
Alveolarfortsatz	15	3	18	0	0	18	9	7	18	0	1	17
Gaumen	8	2	12	0	0	12	7	5	12	0	2	10
Unterlippe	5	0	8	0	0	8	3	5	8	0	3	5
Wange	15	4	23	0	0	23	8	13	23	0	1	22
Unbekannt	6	3	12	0	0	12	7	6	12	0	2	10

Tabelle 3.3 Cytokeratin-Expression oraler Leukoplakien in Abhängigkeit von der Lokalisation

3.2.2 Cytokeratin-Expression der oralen Plattenepithelkarzinome

Die Anzahl der positiven und negativen Expressionen für die Cytokeratine 1, 5/6, 8/18, 10, 14, 19 ist in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Lokalisation	CK 1		CK 5/6		CK 8/18		CK 10		CK 14		CK 19	
	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
Zunge	17	20	44	1	28	18	16	23	36	1	9	27
Mundboden	29	30	67	1	45	22	23	35	56	1	27	29
Alveolarfortsatz	1	2	5	0	3	1	0	3	2	1	1	2
Gaumen	3	2	6	0	4	3	2	3	5	1	1	5
Unterlippe	1	2	3	0	3	0	1	2	3	0	0	3
Wange	3	1	5	0	3	2	3	2	5	0	1	4
Sonstige	11	19	35	5	23	11	9	20	32	0	15	14
Unbekannt	6	7	15	1	11	5	5	8	14	0	8	6

Tabelle 3.4 Cytokeratin-Expression oraler Plattenepithelkarzinome in Abhängigkeit von der Lokalisation

3.2.3 Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Leukoplakien und oralen Plattenepithelkarzinome aller Lokalisationen

Die statistische Analyse für die CK-Expression mit dem Chi²-Test zeigte für die oralen Leukoplakien und Plattenepithelkarzinome folgende Signifikanzen:

Tumoren aller Lokalisation haben gegenüber Leukoplakien einen signifikanten Expressionsverlust von CK 1 ($p < 0,001$). Die Expression von CK 8/18 ist für die Tumoren aller Lokalisationen signifikant höher als bei den Leukoplakien ($p < 0,001$). Gleiches konnte für die Expression von CK 19 ($p < 0,001$) ermittelt werden (siehe Tabelle 3.3 und Abbildung 3.3-3.5).

Der positive Nachweis von CK 5/6 liegt bei 100% ($n=127$) für die Leukoplakien und bei 95,7% ($n=180$ positiv; $n=8$ negativ) für die Plattenepithelkarzinome. Der negative Nachweis war jeweils bei einer Tumor-Probe aus der Zunge, Mundboden und Sonstige, sowie 5 Proben unbekannter Lokalisation zu finden. Der positive Nachweis von CK 14 liegt bei 100% ($n=127$) für die Leukoplakien und bei 97,5% ($n=153$ positiv; $n=4$ negativ) für die Plattenepithelkarzinome. Der negative Nachweis war jeweils bei einer Tumor-Probe aus der Zunge, Mundboden, Alveolarfortsatz und Gaumen zu finden.

Die Expressionen für CK 10 zeigten keine Signifikanzen.

CK-Expression	n Gesamt	Leukoplakien		Karzinome		Signifikanz
		pos.	neg.	pos.	neg.	
CK 1	268	86	28	71	83	$p < 0,001$
CK 8/18	309	3	124	120	62	$p < 0,001$
CK 19	279	16	111	62	90	$p < 0,001$
CK 5/6	310	0	127	180	3	ns
CK 10	279	45	79	59	96	ns
CK 14	284	127	0	153	4	ns

Tabelle 3.5: CK-Expressionen oraler Leukoplakien und Plattenepithelkarzinome aller Lokalisationen. Es zeigten sich Signifikanzen CK 1, CK 8/18 und CK 19 (ns = nicht signifikant).

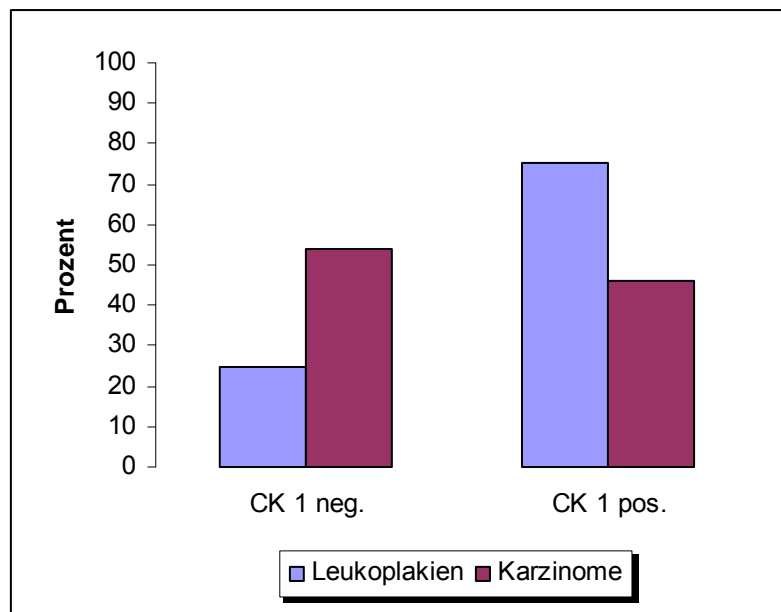


Abbildung 3.1:

Darstellung der positiven und negativen CK 1-Expression oraler Leukoplakien (n=114) und Plattenepithelkarzinome (n=154) in Prozent. Es zeigte sich ein signifikanter Expressionsverlust von CK 1 ($p < 0,001$) der Plattenepithelkarzinome gegenüber den Leukoplakien.

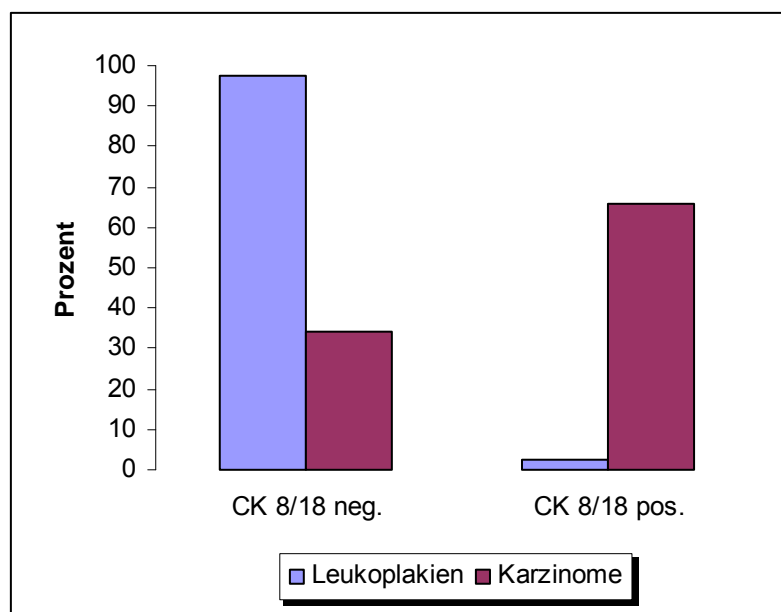


Abbildung 3.2:

Darstellung der positiven und negativen CK 8/18-Expression oraler Leukoplakien (n=127) und Plattenepithelkarzinome (n=182) in Prozent. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von CK 8/18 ($p < 0,001$) bei den Plattenepithelkarzinomen gegenüber den Leukoplakien.

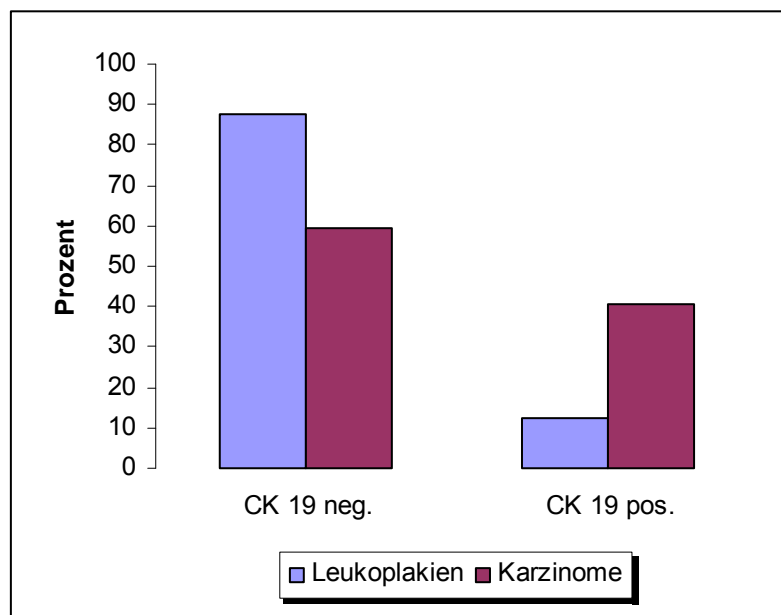


Abbildung 3.3:

Darstellung der positiven und negativen CK 19-Expression oraler Leukoplakien (n=127) und Plattenepithelkarzinome (n=152) in Prozent. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von CK 19 ($p < 0,001$) bei den Plattenepithelkarzinomen gegenüber den Leukoplakien.

3.2.4 Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Plattenepithelkarzinome und oralen Leukoplakien des Mundbodens

Die statistische Analyse für die CK-Expression mit dem Chi²-Test zeigte für die oralen Leukoplakien und Plattenepithelkarzinome des Mundbodens folgende Signifikanz:

Orale Plattenepithelkarzinome des Mundbodens zeigten im Vergleich mit Leukoplakien gleicher Lokalisation eine signifikant höhere Expression ($p = 0,006$) von CK 8/18 (siehe Tabelle 3.4 und Abbildung 3.6).

Die Expression von CK 1, CK 5/6, CK 10, CK 14 und CK 19 war nicht signifikant.

CK-Expression	n Gesamt	Leukoplakien		Karzinome		Signifikanz
		neg.	pos.	neg.	pos.	
CK 8/18	79	9	3	22	45	$p = 0,006$
CK 1	70	4	7	30	29	ns
CK 5/6	80	0	12	1	67	ns
CK 10	70	7	5	35	23	ns
CK 14	69	0	12	1	56	ns
CK 19	67	9	2	29	27	ns

Tabelle 3.6: CK-Expressionen oraler Leukoplakien und Plattenepithelkarzinome des Mundbodens. Es zeigten sich eine Signifikanz für CK 8/18 (ns = nicht signifikant).

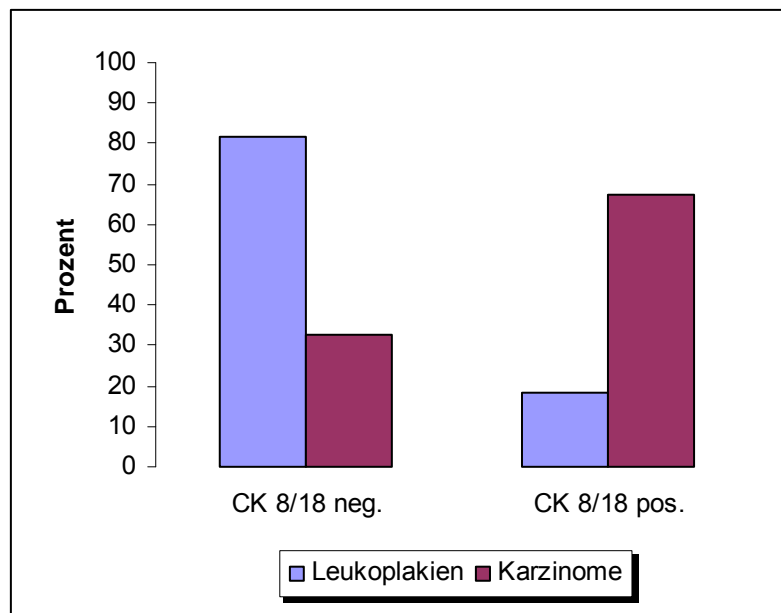


Abbildung 3.4:

Darstellung der positiven und negativen CK 8/18-Expression oraler Leukoplakien (n=11) und Plattenepithelkarzinome (n=67) des Mundbodens in Prozent. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von CK 8/18 ($p = 0,006$) bei den Plattenepithelkarzinomen gegenüber den Leukoplakien.

3.2.5 Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Plattenepithelkarzinome und oralen Leukoplakien der Zunge

Die statistische Analyse für die CK-Expression mit dem Chi²-Test zeigte für die oralen Leukoplakien und Plattenepithelkarzinome der Zunge folgende Signifikanzen:

Die CK 1-Expression von oralen Plattenepithelkarzinomen der Zunge ist im Vergleich mit den Leukoplakien signifikant erhöht ($p = 0,021$). Auch der positive Nachweis für CK 8/18 ($p < 0,001$) und CK 10 ($p = 0,007$) war bei den Karzinomen signifikant höher (siehe Tabelle 3.5 und Abbildung 3.7-3.9).

Die Expressionen von CK 5/6, CK 14 und CK 19 zeigten keine statistisch signifikante Unterschiede.

CK-Expression	n Gesamt	Leukoplakien		Karzinome		Signifikanz
		neg.	pos.	neg.	pos.	
CK 1	79	12	30	20	17	$p = 0,021$
CK 8/18	88	42	0	18	28	$p < 0,001$
CK 10	81	36	6	23	16	$p = 0,007$
CK 5/6	87	0	42	1	44	ns
CK 14	79	0	42	1	36	ns
CK 19	79	38	5	27	9	ns

Tabelle 3.7: CK-Expressionen oraler Leukoplakien und Plattenepithelkarzinome der Zunge. Es zeigten sich Signifikanzen für CK 1, CK 8/18 und CK 10 (ns = nicht signifikant).

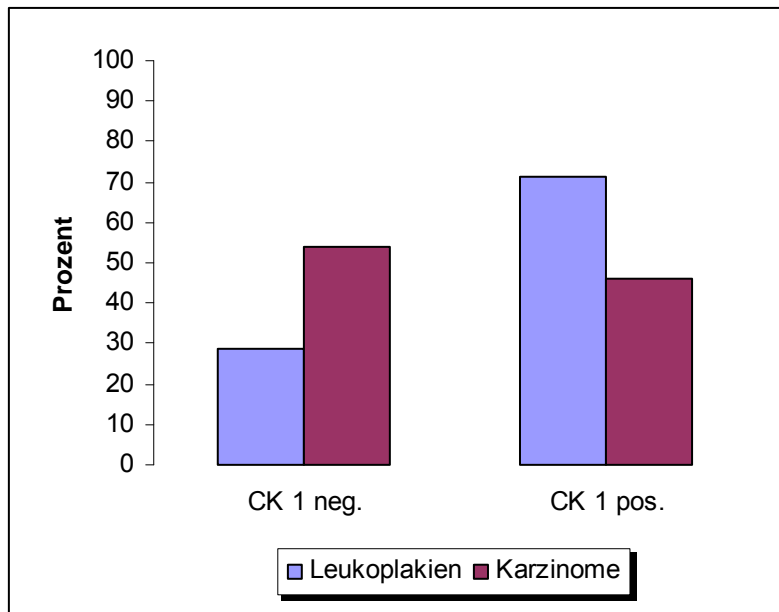


Abbildung 3.5:

Darstellung der positiven und negativen CK 1-Expression oraler Leukoplakien (n=42) und Plattenepithelkarzinome (n=37) des Mundbodens in Prozent. Es zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Expression von CK 1 ($p = 0,021$) bei den Plattenepithelkarzinomen gegenüber den Leukoplakien.

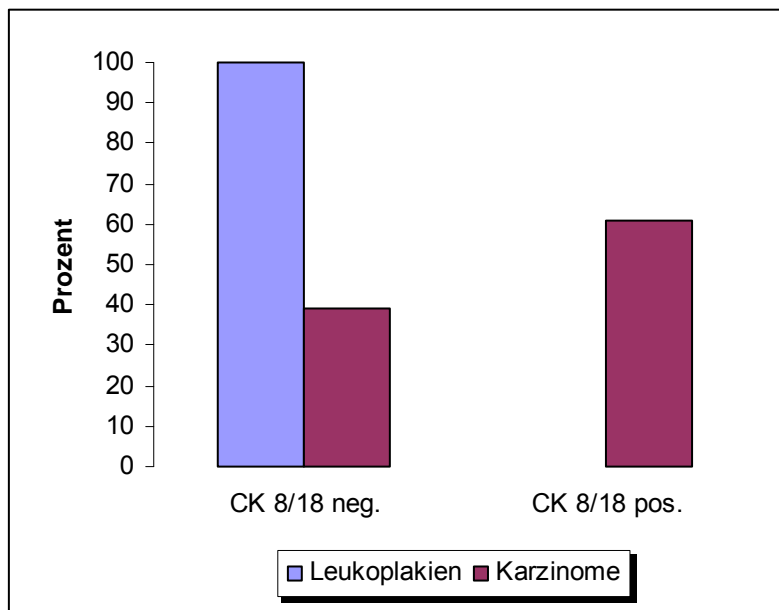


Abbildung 3.6:

Darstellung der positiven und negativen CK 8/18-Expression oraler Leukoplakien (n=42) und Plattenepithelkarzinome (n=46) des Mundbodens in Prozent. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von CK 8/18 ($p < 0,001$) bei den Plattenepithelkarzinomen gegenüber den Leukoplakien.

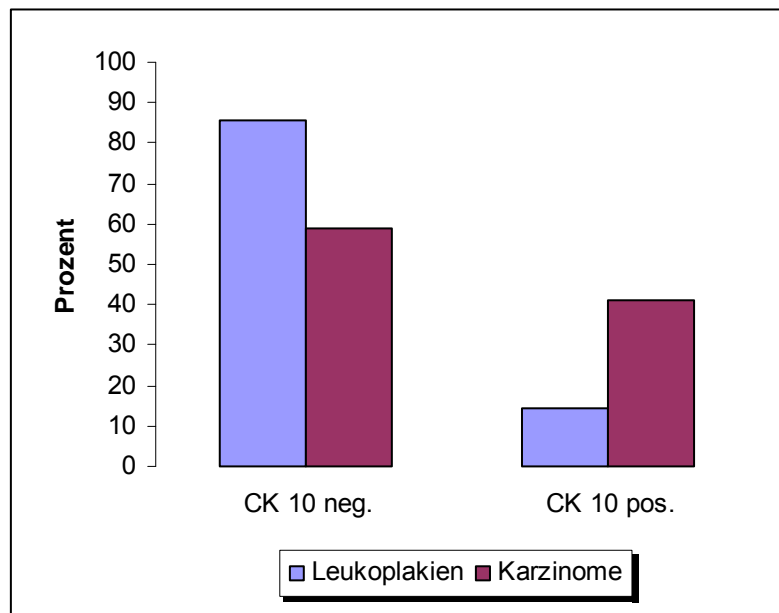


Abbildung 3.7:

Darstellung der positiven und negativen CK 10-Expression oraler Leukoplakien (n=42) und Plattenepithelkarzinome (n=39) des Mundbodens in Prozent. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von CK 10 ($p = 0,007$) bei den Plattenepithelkarzinomen gegenüber den Leukoplakien.

Für die anderen Lokalisationen erfolgte keine statistische Analyse, da es aufgrund der jeweils geringen Fallzahlen nicht sinnvoll war.

3.2.6 Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Leukoplakien mit und ohne Dysplasie

Die statistische Analyse für die CK-Expression mit dem Chi²-Test zeigte für die oralen Leukoplakien mit und ohne Dysplasie folgende Signifikanz:

Die Expression von CK 8/18 ist in Leukoplakien mit Dysplasie signifikant höher ($p = 0,03$) als bei den nichtdysplastischen Leukoplakien. CK 19 wird ebenfalls deutlich vermehrt ($p = 0,021$) in Leukoplakien mit Dysplasie exprimiert (siehe Tabelle 3.6 und Abbildung 3.10-3.11).

Alle anderen untersuchten CK-Expressionen zeigten keine Signifikanzen.

CK-Expression	n Gesamt	Leukoplakien ohne Dysplasie		Leukoplakien mit Dysplasie		Signifikanz
		neg.	pos.	neg.	pos.	
CK 8/18	128	104	1	20	3	$p = 0,03$
CK 19	128	96	10	16	6	$p = 0,021$
CK 1	114	22	73	6	13	ns
CK 5/6	128	0	105	0	23	ns
CK 10	125	66	37	14	8	ns
CK 14	127	0	104	0	23	ns

Tabelle 3.8: CK-Expressionen oraler Leukoplakien ohne und mit Dysplasie. Es zeigten sich Signifikanzen für CK 8/18 und CK 19 (ns = nicht signifikant).

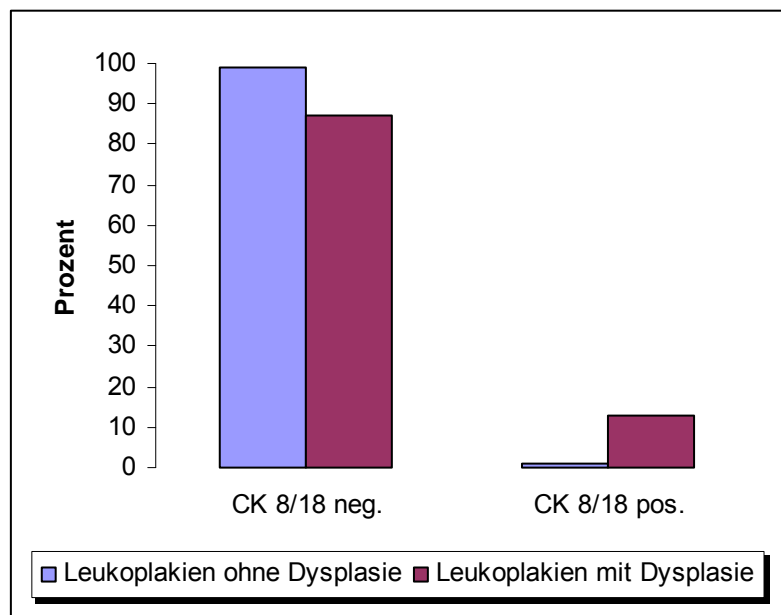


Abbildung 3.8:

Darstellung der positiven und negativen CK 8/18-Expression oraler Leukoplakien ohne (n=105) und mit (n=22) Dysplasie in Prozent. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von CK 8/18 ($p = 0,03$) bei den Leukoplakien mit Dysplasie gegenüber den Leukoplakien ohne Dysplasie.

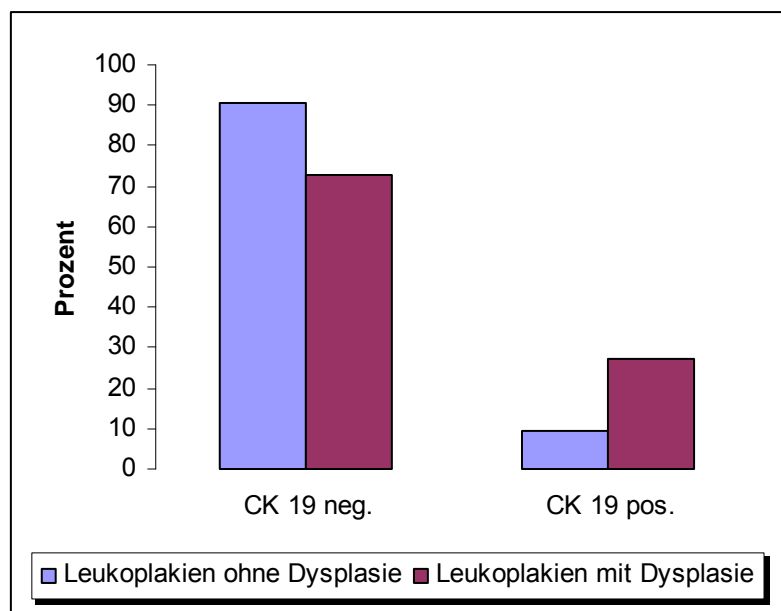


Abbildung 3.9:

Darstellung der positiven und negativen CK 19-Expression oraler Leukoplakien ohne (n=106) und mit (n=23) Dysplasie in Prozent. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von CK 19 ($p = 0,021$) bei den Leukoplakien mit Dysplasie gegenüber den Leukoplakien ohne Dysplasie.

3.2.7 Analyse der Cytokeratin-Expression der oralen Leukoplakien mit Dysplasie und oralen Plattenepithelkarzinome

Die statistische Analyse für die CK-Expression mit dem Chi²-Test zeigte für die oralen Leukoplakien mit Dysplasie und oralen Plattenepithelkarzinome folgende Signifikanz:

Die Expression von CK 8/18 ist in oralen Plattenepithelkarzinomen signifikant gesteigert ($p < 0,001$) gegenüber den oralen Leukoplakien mit Dysplasie (siehe Tabelle 3.7 und Abbildung 3.12).

Die übrigen CK-Expressionen zeigten keine Signifikanzen.

CK-Expression	n Gesamt	Leukoplakien mit Dysplasie		Karzinome		Signifikanz
		neg.	pos.	neg.	pos.	
CK 8/18	203	20	3	60	120	$p < 0,001$
CK 1	172	6	13	83	70	ns
CK 5/6	204	0	23	3	178	ns
CK 10	176	14	8	96	58	ns
CK 14	178	0	23	4	151	ns
CK 19	172	16	6	89	61	ns

Tabelle 3.9: Signifikante CK-Expressionen oraler Leukoplakien mit Dysplasie und oraler Plattenepithelkarzinome. Es zeigte sich eine Signifikanz für CK 8/18 (ns = nicht signifikant).

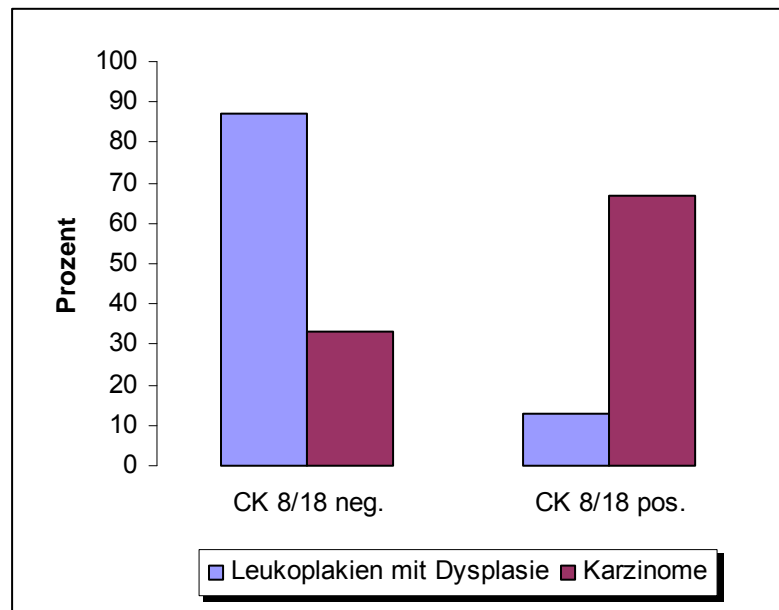


Abbildung 3.10:

Darstellung der positiven und negativen CK 8/18-Expression oraler Leukoplakien mit Dysplasie (n=23) und oraler Plattenepithelkarzinome (n=180) in Prozent. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von CK 8/18 ($p < 0,001$) bei den Plattenepithelkarzinomen gegenüber den Leukoplakien mit Dysplasie.

3.2.8 Analyse der Cytokeratin-Expression oraler Leukoplakien, Dysplasien und Plattenepithelkarzinome

Die statistische Analyse für die CK-Expression mit dem Chi²-Test zeigte für die oralen Leukoplakien, Dysplasien und oralen Plattenepithelkarzinome folgende Signifikanzen:

Bei der statistischen Evaluation der CK-Expression von oralen Leukoplakien (OL), Dysplasien (Dys) und Karzinomen (OSCC) zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression von CK 8/18 ($p < 0,001$) und CK 19 ($p < 0,001$), sowie eine signifikante Senkung der Expression von CK 1 ($p < 0,001$), mit steigendem Grad der malignen Transformation des pathologisch veränderten Epithels (siehe Tabelle 3.8 und Abbildung 3.13).

Keine Signifikanzen konnten für die Expression von CK 5/6, CK 10 und CK 14 ermittelt werden.

CK-Expression	n Gesamt	Leukoplakien ohne Dysplasie		Leukoplakien mit Dysplasie		Karzinome		Signifikanz
		neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	
CK 1	267	22	73	6	13	83	70	$p < 0,001$
CK 8/18	308	104	1	20	3	60	120	$p < 0,001$
CK 19	278	96	10	16	6	89	61	$p < 0,001$
CK 5/6	309	0	105	0	23	3	178	ns
CK 10	279	66	37	14	8	96	58	ns
CK 14	282	0	104	0	23	4	151	ns

Tabelle 3.10: Signifikante CK-Expressionen oraler Leukoplakien, Dysplasien und oraler Plattenepithelkarzinome. Es zeigten sich Signifikanzen für CK 1, CK 8/18 und CK 19 (ns = nicht signifikant).

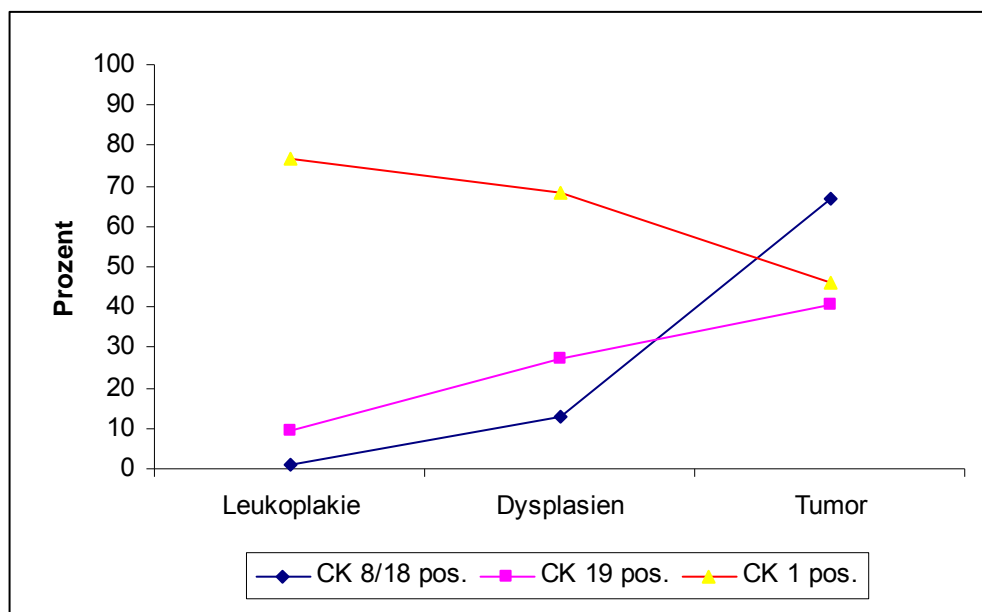


Abbildung 3.11:

Prozentuale Darstellung der positiven CK 1-, CK 8/18- und CK 19-Expression oraler Leukoplakien, Dysplasien und oraler Plattenepithelkarzinome. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von CK 8/18 ($p < 0,001$) und CK 19 ($p < 0,001$) sowie ein Expressionsverlust von CK 1 ($p < 0,001$) mit zunehmendem Grad der malignen Transformation.

Eine direkte Gegenüberstellung der Expression von CK 1 und CK 10 (suprabasales CK-Paar keratinisierter Mukosa) zeigt für OL, Dys und OSCC eine stabile Expression von CK 10, während bei steigendem Grad der malignen Transformation eine deutliche Senkung von CK 1 auftritt.

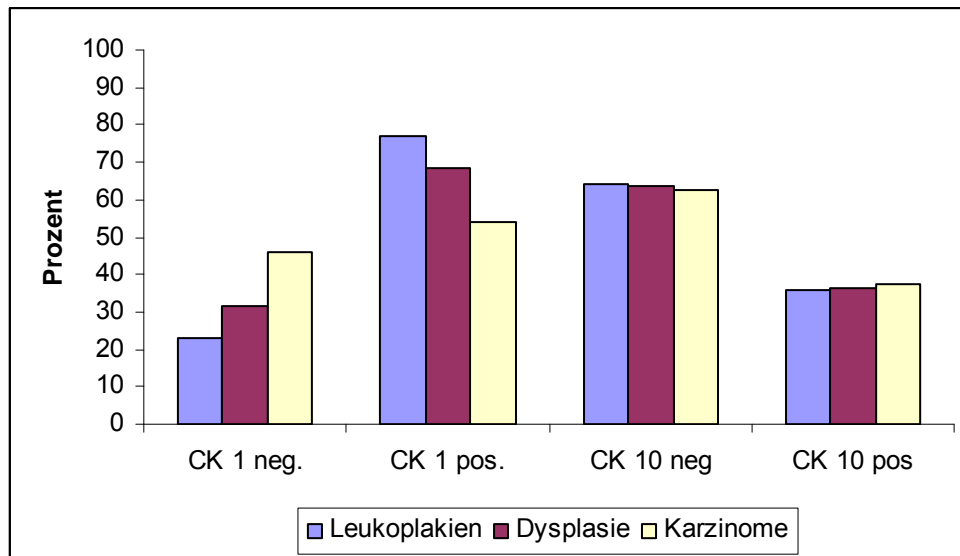


Abbildung 3.12:

Prozentuale Darstellung der negativen und positiven CK 1- und CK 10-Expression oraler Leukoplakien, Dysplasien und oraler Plattenepithelkarzinome. Es zeigt sich eine stabile positive und negative Expression von CK 10, während die CK 1-Expression mit zunehmender maligner Transformation deutlich geringer wird.

Eine direkte Gegenüberstellung der Expression von CK 5(/6) und CK 14 (basales Basis-CK-Paar aller oraler Epithelien) zeigt für OL, Dys und OSCC eine stabile Expression für beide.

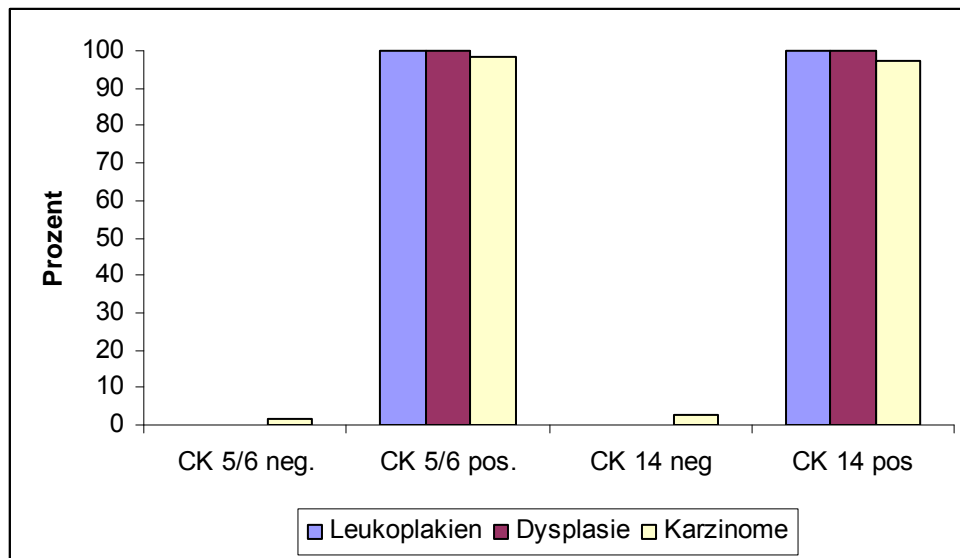


Abbildung 3.13:

Prozentuale Darstellung der negativen und positiven CK 5(/6)- und CK 14-Expression oraler Leukoplakien, Dysplasien und oraler Plattenepithelkarzinome. Es zeigt sich, dass nur wenige OSCC negativ für CK 5(/6) und CK 14 sind. Alle anderen Proben zeigen unabhängig von dem Grad der malignen Transformation eine stabile positive Expression beider CK.

4. Diskussion

Malignome der Mundhöhle und des Oropharynx (mehr als 90% sind Plattenepithelkarzinome; OSCC) sind ein globales Gesundheitsproblem und stehen an elfter Stelle der weltweiten Krebserkrankungen. Die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland beträgt etwa 3.000 für Frauen und 7.800 für Männer, wobei die Mortalität deutscher Männer seit Mitte der neunziger Jahre rückläufig ist (Batzler, W.U. et al. 2002).

Die orale Leukoplakie (OL) ist eine Läsion mit einem prämaligen Potential und einer globalen Prävalenz zwischen 0,2% und 24,4% (Bornstein, M.M. et al. 2004).

Für die individuelle prognostische Beurteilung und Einleitung effektiver Therapiemaßnahmen bei oralen Leukoplakien ist die Erkennung und Validierung zuverlässiger Marker, die mit der malignen Transformation pathologisch veränderter oraler Epithelien assoziiert sind, das primäre Ziel. Die Größe, das Erscheinungsbild und auch die Lokalisation des veränderten oralen Epithels kann durch eine visuelle und palpatorische klinische Untersuchung und zelluläre Veränderungen durch eine zusätzliche pathohistologische Begutachtung nach Probeexzision beurteilt werden.

Durch molekularbiologische Fortschritte wurden in jüngster Zeit zahlreiche Marker, die mit der oralen Karzinogenese assoziiert zu sein scheinen, entdeckt und hinsichtlich ihrer prognostischen und therapeutischen Relevanz untersucht. Eine kosteneffiziente und praktikable Möglichkeit hierfür bietet das 1998 erstmals beschriebene (Kononen, J. et al. 1998) Tissue Microarray-Verfahren (TMA), bei welchem selbst große Fallzahlen identischen Inkubationsbedingungen unterliegen und die Ergebnisse somit keinen methodischen Unregelmäßigkeiten unterliegen. Der Einsatz von TMAs ist somit besonders gut geeignet hohe Zahlen von Gewebeproben auf das Vorhandensein von spezifischen Markern zu screenen (Bubendorf, L. et al. 2001; Moch, H. et al. 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Cytokeratine (CK) bilden die größte Klasse der Intermediärfilamente einer Eukaryontenzelle (bis zu 85% des Gesamtproteins) und werden im ganzen Körper durch Epithelzellen, nach einem epithelspezifischen Muster, expremiert. Da sich viele cytoskelettale Komponenten in einem ständigen Prozess des reaktiven Auf- und Abbaus, als dynamische Antwort auf einwirkenden „Stress“ befinden, lässt der Nachweis spezifischer CK-Expressionsmuster Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad der Zelle zu (Moll, R. 1993). Bei der CK-Expression von normalen Platten- und Zylinderepithelien kann man spezifische Verteilungsmuster finden (siehe Tabelle 4.1). Die Typ II-CK 1, 2, 4, 5, 6 und Typ I-CK 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17 sind typisch bei mehrschichtigen Epithelien (Plattenepithelien), wobei sich die CK 5/14 bzw. CK 5/17 als sog. Basis-CK in allen Plattenepithelien nachweisen lassen. Die CK

5/14-Paarung findet sich in der undifferenzierten Basalschicht aller mehrschichtigen Plattenepithelien und Myoepithelzellen, bei mehrreihigen Plattenepithelien wird zusätzlich noch CK 17 exprimiert. Alle anderen typischen plattenepithelialen CK stellen Differenzierungsmarker dar, welche entsprechend des Reifegrades dazukommen (Tseng, S.C.G. et al. 1982). CK 7, und 8 vom Typ II und CK 18, 19, 20 vom Typ I sind spezifisch für einfache, kubische Zylinderepithelien, mit der Basis-CK-Paarung 8/18. Die CK 3 und CK 12 sind ausschließlich in der Cornea (zusätzlich CK 5 und 14) zu finden (Moll, R. 1993). In mehrreihigen Epithelien wie z.B. dem respiratorischen Epithel, finden sich aber auch Kombinationen platten- und zylinderepithelialer CK (5/19).

Bei Wundheilungsprozessen, aber auch bei mechanisch stark belasteten Hautbezirken (z.B. Fußsohle) und proliferativen Erkrankungen (z.B. Keratosen) treten CK 6 und CK 16 zusätzlich auf (Coulombe, P.A., Omary, M.B. 2002). Haarfollikel enthalten neben den harten CK ebenfalls das CK-Paar 1/10 und CK 5, 6, 14, 16 (Heid, H.W. et al. 1988 a und b). Harte CK lassen sich aber auch in den Papillae filiformes der Zunge (mit CK 1, 2, 10, 11, 14, 19) und Stammzellen des Thymus (mit CK 1, 2, 10, 11, 14, 15, 16, 19) nachweisen (Heid, H.W. et al. 1988 a und b). Typische Differenzierungsmarker für unverhorntes Plattenepithel (z.B. orale Mukosa, Ösophagus oder Cervix uteri) sind CK 4/13, wobei Entzündungen oder hyperplastischen Prozessen zu einem starken Anstieg an CK 6 und zusätzlicher Expression von CK 8, 18, 19 führen (Wild, G.A. et al. 1987).

CK 20 wird unter anderem im Foveaepithel des Magen und Darm, in den Merkelzellen der Haut sowie in den Deckzellen von Übergangsepithel exprimiert (Moll, R. 1993).

<i>spez. CK-Expression für</i>	<i>basische CK (Typ II)</i>	<i>saure CK (Typ I)</i>
einschichtige Epithelien		
- duktale Epithelien	7, 8	18, 19
- intestinale Epithelien	8	18, 19
- sekretorische Epithelien	8	18
mehrschichtige Epithelien		
- verhornendes Plattenepithel	1, 5	10, 14
- nichtverhorn. Plattenepithel	4, 5	13, 14
- suprabasale Schichten vieler Epithelien	1, 2	9, 10, 11

- Cornea	3, 5	12, 14
Wundheilung/Hyperproliferation	6	16
Haare	1, 5, 6	10, 14, 16
Papillae filiformes der Zunge	1, 2	10, 11, 14, 19
Stammzellen des Thymus	1, 2	10, 11, 14, 15, 16, 19

Tabelle 4.1: Übersicht der typischen CK-Expressionen verschiedener Epithelien

Bei maligner Transformation bleibt i. d. R. das zelluläre Differenzierungsprogramm erhalten, aber auch Ausnahmen sind beschrieben: z.B. der Verlust von CK 4 und 13 bei Oropharynx-Karzinomen (Moll, R. 1993). CK 20 wird bei benignen und malignen gastrointestinalen Epithelien, Urothel Merkel-Zellen und auch Geschmacksknospen expremiert. Es besitzt keinen diagnostischen Wert in der oralen Karzinogenese (Barrett, A.W. et al. 2000).

Oftmals kommt es allerdings vor, dass einer sog „Neoexpression“ von CK auftritt, welche in gesundem Gewebe nicht vorkommen. Man vermutet, dass die Malignität mit dem Auftreten spezifischer CK korreliert (Caulin, C. et al. 1993).

Das orale Epithelgewebe kann morphologisch und nach differenzierungsspezifischen Expressionsmustern in drei Klassen eingeteilt werden: 1. mehrschichtiges, verhornendes (keratinisiertes) Plattenepithel (mastikatorische Mukosa), 2. mehrschichtiges, nichtverhornendes (nichtkeratinisiertes) Plattenepithel (auskleidende Mukosa), 3. spezialisierte Mukosa des Zungenrückens.

Die unterschiedlichen Epithelien bestehen aus sich ständig erneuender Zellpopulation von Keratinozyten (sich differenzierende und keratinproduzierende Zellen), deren Proliferation sich auf das Stratum basale begrenzt. Die suprabasalen Zellen unterziehen sich, regionsspezifisch, morphologischen und biochemisch Veränderungen, wobei die reifenden Zellen der mastikatorische Schleimhaut keratinisieren, während die Zellen der auskleidenden Mukosa nicht-keratinisieren und die spezialisierte Mukosa eine Mischung der beiden Differenzierungsmuster aufweist.

Durch immunohistologische Methoden sind Proteine in Zellen oder Geweben nachweisbar. Bei der „in situ-Hybridisierung“ lassen sich jedoch aktive Gen-Transkriptionen, über die mRNA des gesuchten Proteins, darstellen. Der zelluläre Nachweis von CK-mRNA korrespondiert jedoch nicht zwingend mit der immunohistologisch nachweisbaren CK-Expression. Einige Proteine können auch ohne entsprechende mRNA nachgewiesen werden, denn diese ist sehr kurzlebig oder alternativ noch ohne Translation gespeichert. Nach Dale et al. (Dale, B.A. et al. 1990) kann

man drei wesentliche Aussagen zur differenzierungsspezifischen CK-Expression treffen. Erstens kommt es mit fortschreitender Differenzierung zu einer Erniedrigung basalzellspezifischer CK-mRNA (CK 5 und 14). Zweitens wird die Expression differenzierungsspezifischer CK (und assoziierter Proteine) durch den Umfang ihrer Gen-Transkription reguliert. Drittens werden die verschiedenen CK-mRNAs in unterschiedlichem Ausmaß expremiert, was die regionale Komplexität und schwierigen Aspekte der gewebespezifischen Differenzierung wiedergibt (Dale, B.A. et al. 1990).

Während CK5/14 (und CK 19 in nichtkeratinisiertem Epithel) in allen Basalzellschichten oraler, mehrschichtiger Epithelien expremiert wird, kommen suprabasal (postmitotisch) mit Beginn der Differenzierung ein oder mehrere neue CK epithelspezifisch dazu. Eine suprabasale Expression von CK 1/10 und CK 2 ist typisch für keratinisierte Mukosa ist, CK 4/13 für nichtkeratinisierte Mukosa und Sulcusepithel/Gingivasaum, sowie CK 8, CK 13, CK 16, CK 18, CK 19 für das Verbindungsepithel (junctional epithelium). Bukkale Mukosa expremiert zusätzlich sehr sporadisch CK 1 und CK 10, wobei die mRNA dieser CK in vielen anderen Zellen präsent ist, und es ihr wohl erlaubt schnell auf äußere Stimuli mit höheren funktionellen Anforderungen (z.B. durch rauchen) zu reagieren. Während das CK-Paar 6/16 in der Epidermis nur bei Hyperproliferation oder bei der Wundheilung expremiert wird, ist es in einigen mehrschichtigen Epithelien wie Zunge, Gaumen, Gingiva, Ösophagus, Harrfollikeln, Hand- oder Fußsohle grundlegend nachweisbar. Die CK 8 und CK 18 als Marker für einschichtige Epithelien, wie Leber oder Niere, liegen zwar als RNA-Transkripte in den oralen Epithelien vor, sind aber normalerweise nicht nachweisbar (Ausnahme: Verbindungsepithel). In vielen malignen Prozessen ist eine hohe Expression von CK 8 und CK 18 zu verzeichnen (Presland, R.B., Dale, B.A. 2000). In neuerer Zeit konnte die Expression eines Cytokeratin 23, nur in Form einer CK-mRNA, bei kanzerösen Pankreaszellen nachgewiesen werden (Coulombe, P.A., Omary, M.B. 2002).

4.1 Ergebnisse

4.1.1 CK 1- und CK 10-Expression

Die Gewebeproben von oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) aller Lokalisationen wiesen gegenüber den oralen Leukoplakien (OL) ohne und mit Dysplasien (Dys) einen signifikanten Expressionsverlust von CK 1 ($p < 0,001$) auf. Ein direkter Vergleich der Expression von CK 1 und CK 10 zeigte für OL, Dys und OSCC eine stabile Expression von CK 10, während bei steigendem Grad der malignen Transformation eine deutliche Senkung von CK 1 auftritt. CK 1 ($p = 0,021$) und CK 10 ($p = 0,007$) waren in OSCC der Zungen gegenüber den OL gleicher

Lokalisation signifikant erhöht. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit entspricht im Wesentlichen der bisherigen Literatur.

Bloor, B.K. et al. (Bloor, B.K. et al. 2001) zeigten das gering- bis mittelgradig dysplastische Epithelien und gut differenzierte OSCC, aus überwiegend nichtkeratinisierter Mukosa, ein normales Expressionsmuster mit Epitheldifferenzierung für CK 1/10 und 4/13 aufwiesen, schwere Dysplasien und schlecht differenzierte OSCC, jedoch durch Verlust dieser CK, eine deutliche Störung der Epitheldifferenzierung und Reifung hatten. Während bei geringgradigen Dysplasien ein Nachweis von CK 4/13 und CK 1/10 möglich war, zeigten mittelgradige Dysplasien eine reduzierte CK 4/13- und gesteigerte CK 1/10-Expression. In schwergradigen Dysplasien waren weder mRNA noch Protein nachweisbar. Ein Vergleich dieser CK in Dysplasien wurde als Störung der Schichtordnung und Differenzierung im Rahmen einer präneoplastische Veränderung interpretiert. Dieses Ergebnis wird für CK 1 auch durch Cintonino, M. et al. und Sawant, S.S. et al. (Cintonino, M. et al. 1990; Sawant, S.S. et al 2003) beschrieben. OSCC der Zunge zeigten bei Depondt, J. et al. (Depondt, J. et al. 1999) häufig eine de novo Überexpression von CK 10, wobei dieses aber auch mit einer kleinen Tumorgroße korrelierte. T1- und T2-Tumoren waren dabei häufiger CK 10-positiv als T3- und T4- Tumoren. Man kam hierbei zu dem Schluß, dass die Epitheldifferenzierung durch das Tumorwachstum beendet wird.

Während einige CK (CK 6, CK 16, CK 13 und CK 8) nicht in pathologisch unveränderter Epidermis exprimiert werden, kommt es zu Nachweis bei verschiedenen Stadien der Karzinogenese und Verlust von CK 1- und CK 10-Expression. Experimente mit transgenen Mäusen, die humanes CK 10 in Hauttumoren exprimierten, zeigten keine Unterschiede in Anzahl oder Grad der Malignität, im Vergleich zu negativen Kontrollgruppen. Jedoch konnte eine signifikant spätere Tumorentstehung in den transgenen Mäusen festgestellt werden und führte zu dem Schluß, dass eine Präsenz von CK 10 die Tumorentstehung deutlich hinauszögert (Santos, M. et al. 1997)

Es konnte gezeigt werden, dass die CK 1- gegenüber der CK 10-Expression innerhalb des co-exprimierten Paares dominiert. Eine Erklärung hierfür kann zum einen die Paarung mit anderen suprabasalen CK (z.B. CK 16) sein, oder das CK 1 früher in der endgültigen Zelldifferenzierung auftritt und die Expression von CK 10 abhängig von CK 1 ist. Letzteres wurde für mRNA und Protein bei Versuchen mit Zellkulturen und Epidermis beobachtet, wobei die Transkription von CK 10 erst startete, als beträchtliche Mengen von CK 1-Transkripten vorlagen (Bloor, B.K. et al. 1999).

Trotz einer histologisch nachgewiesenen Cornifizierung, wurde CK 1 bei einigen Leukoplakien und schlecht differenzierten OSCC nichtkeratinisierter Mukosa nicht exprimiert, oder schwankte in Häufigkeit und Intensität während Leukoplakien von mastikatorischer und spezialisierter Mukosa keine Differenz zu vergleichbarer, gesunder Mukosa aufwiesen (Ermich, T. et al. 1989; Schulz, J. et al. 1992).

Bei mittel- bis hochgradigen Dysplasien und bei Carcinoma in situ des Mundbodens und der Zunge fanden Heyden, A. et al. keine, bei OSCC nur in wenigen suprabasalen Arealen, eine Expression von CK 10 (Heyden, A. et al. 1992).

In Literaturübersichten (Morgan, P.R. Su, L. 1994; Reibel, J. 2003; Upsani, O.S. et al. 2004) wird eine reduzierte oder keine Expression der differenzierungsspezifischen CK 1/10 bei Epitheldysplasien beschrieben, welche mit steigendem Grad der Dysplasie in der Ausprägung korreliert. Bei gut differenzierten OSCC ist die CK 1/10-Expression nicht reduziert, fällt aber deutlich mit sinkender Differenzierung. Weiterhin kommt es zu einer anormalen Expression von CK 1 und/oder 10 in gut differenzierten Tumoren aus nichtkeratinisiertem Epithel, wie z.B. bukkale Mukosa (Upsani, O.S. et al. 2004). CK 1, 2, 10, 11 sind bei OSCC nur entsprechend dem Grad der Keratinisation nachweisbar (Vigneswaran, N. et al. 1989). Mit Fortschreiten der Tumorentwicklung kommt es zu einer progressiven Unterbrechung der Zellreifung/-differenzierung der Keratinozyten, was durch einen suprabasalen Verlust der CK 1/10-Expression angezeigt wird und somit einen prognostischen Wert für die Beurteilung der Tumorprogression prämaligener Läsionen darstellt (Kannan, S. et al. 1994).

CK 10 ist das Typ I-Keratin der sich differenzierenden Schichten der Epidermis und anderen verhornenden Epithelien. Bei mutierten transgenen CK 10-negativen Mäusen zeigten sich bis zu 6 Wochen postnatal, Hautläsionen, die schweren Formen einer epidermolytischen Hyperkeratosis (wird durch Mutationen der CK 1- oder CK 10-Gene verursacht) ähnlich waren (Coulombe, P.A., Omary, M.B. 2002).

Bei der TMA-Analyse von Gen-Profilen oraler Leukoplakien und OSCC, konnte für OL eine 2-fach gesteigerte Expression von CK 10, für die OSCC jedoch eine kaum nachweisbare Expression festgestellt werden. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass sämtliche hochregulierten Gene bei OSCC aus Zungeleukoplakien um das 0,5-fache runterreguliert waren (Odani, T. et al. 2006). Ogden, G.R. stellte in 3 Studien von 1993 (Ogden, G.R. et al. 1993 a, b, c) eine Co-Expression von CK 10 und CK 13 bei gut differenzierten und einen Verlust von CK 10 bei schlecht differenzierten OSCC fest.

Rauchen hat keinen Einfluß auf die CK 1-Expression bei tabakassoziierten Leukoplakien bukkaler Mukosa (Reibel, J. et al. 1991) und CK 10 konnte bei Leukoplakien bukkaler Mukosa chronischer Tabak-Kauer nicht nachgewiesen werden (Vaidya, M.M. et al. 1998). Van der Velden, L.A. et al. stellten in einer Studie von 1999 eine Hochregulation von dem Verhornungsmarker CK 10 bei gleichzeitigen Verlust von Markern für mehrschichtige Epithelien (CK 4/13) für Leukoplakien nichtkeratinisierter Mukosa fest.

Bei Radiatio-bedingter Mukositis (3 Wochen nach Beginn der Radiatio) kommt es zu einer gesteigerten Expression von CK 1/10 während der initialen Phase der Mukositis, was die Autoren mit Proliferation zur Protektion der Epithelien vor Strahlenschäden erklären (Bonan, P.R. et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnten, bis auf die Lokalisation Zunge, keine Signifikanzen für die CK 10-Expression von OL und OSCC ermittelt werden. Dies kann zum einen mit den hohen Anteilen kleiner Fallzahlen der ausgewerteten Literatur, den teilweise einseitigen Lokalisationen bzw. untersuchten Epithelarten und den hohen Zahlen von OSCC dieser Arbeit begründet sein. Weiterhin wurde in der Auswertung nur eine positive oder negative Reaktion gewertet, während die Intensität nicht berücksichtigt wurde.

4.1.2 CK 5/6- und CK 14-Expression

Der positive Nachweis von CK 5/6 liegt bei 100% (n=127) für die Leukoplakien und bei 95,7% (n=180 positiv; n=8 negativ) für die Plattenepithelkarzinome. Der negative Nachweis war jeweils bei einer Tumor-Probe aus der Zunge, Mundboden und Sonstige, sowie 5 Proben unbekannter Lokalisation zu finden. Der positive Nachweis von CK 14 liegt bei 100% (n=127) für die Leukoplakien und bei 97,5% (n=153 positiv; n=4 negativ) für die Plattenepithelkarzinome. Der negative Nachweis war jeweils bei einer Tumor-Probe aus der Zunge, Mundboden, Alveolarfortsatz und Gaumen zu finden. In sämtlichen durchgeführten Analysen dieser Arbeit konnten keine Signifikanzen festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt nur zum Teil mit der ausgewerteten Literatur überein.

Ähnliche Ergebnisse für die Expression von CK 5 und CK 14 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf und Halses (HNSCC) und OL wurde durch einige Autoren veröffentlicht (Balm, A.J. et al. 1996; Bonan, P.R. et al. 2006; Ermich, T. et al. 1989, Ogden, G.R. et al 1993 a, Sesterhenn, A.M. et al. 2005, van der Velden, L.A. et al. 1999). Depondt, J. et al. (Depondt, J. et al. 1999) fanden für Tumoren aus nichtkeratinisierten Epithel eine deutliche Reduktion von CK 5/14. Die Expression von CK 5/6 und CK 14 in OSCC korreliert signifikant mit Tumorgroße und Lymphknotenbefall (Fillies, T. et al. 2006).

Als Hinweis für eine anormale Differenzierung wurde festgestellt, dass mittel- bis hochgradige Dysplasien und Carcinoma in situ eine basale und suprabasale Expression von CK 14 zeigen und Zellen am Übergang zwischen normalen und dysplastischen Epithel CK 13 und CK 14 coexpressieren. OSCC (gut- bis schlecht differenzierte) zeigen hingegen generell gleichmäßige CK 14-Expression, wobei es aber auch Regionen mit CK 14-negativen Basalzellen gibt (Heyden, A. et al. 1992).

Sich enddifferenzierende Epithelzellen reduzieren normalerweise ihre CK 14 mRNA-Expression. Die Regulation der CK 14-Expression scheint hierbei mit dem Grad zellulärer Pluripotenz assoziiert zu sein. Schlecht differenzierte pluripotente Zellen, wie embryonale epidermale Basalzellen, expressieren nur eine geringe Menge von CK 14, während normale adulte Epithelzellen, die eine Zelldifferenzierung durchlaufen, eine deutlich intensivere

Expression haben. Ein zeitweiliger Verlust von CK 14 in Basalzellen von Karzinomen ist daher wohl mit einer zellulären Störung und Ausbildung embryonal-ähnlicher Epithelzellen zurückzuführen (Heyden, A. et al. 1992).

Eine stark erhöhte Expression von CK 14 mRNA in prämaligen Läsionen (Leukoplakien, Epitheldysplasien und Carcinoma in situ) wird als spätes Stadium der malignen Transformation bzw. Progression der Malignität aufgefaßt und sinkt in OSCC wieder deutlich ab (Marley, J.J. et al. 1994; Ohkura, S. et al. 2005; Su, L. et al. 1996).

Schnupftabak hat keinen Einfluß auf die Expression von CK 5/6 in vestibulärer Mukosa (Merne, M. et al. 2002), rauchen führt jedoch zu einem Verschwinden der CK 5-Expression in Präkanzerosen und OSCC bukkaler Mukosa bei tabakassoziierten Tumoren (Upsani, O.S. et al. 2004; Vaidya, M.M. et al. 1998). Die Nicht-Expression von CK 5 und CK 14 in oralen Präkanzerosen und OSCC wird von Sawant, S.S. et al. (Sawant, S.S. et al. 2003) als eine frühe Veränderung während der tabakassoziierten oralen Karzinogenese angesehen.

Weitere Literatursauswertungen und Studien über CK-Expressionen von OSCC und Dysplasien zeigten, dass Epitheldysplasien durch eine suprabasale Expression von CK 5 und CK 14 (normalerweise nur basal nachweisbar) gekennzeichnet sind, während es zu einer gesteigerten Expression von den „fast cell turnover“-Keratinen CK 6 und CK 16 in Leukoplakien mit und ohne Dysplasie, bei invasiven Karzinomen jedoch zur Reduktion, kommt. OSCC hingegen zeigen einen Verlust bzw. Reduktion von CK 5 und/oder CK 14 (Morgan, P.R. Su, L. 1994; Reibel, J. 2003; Sawant, S.S. et al. 2003; Upsani, O.S. et al. 2004; Su, L. et al. 1996).

Nach Vaidya, M.M. et al. (Vaidya, M.M. et al. 1998) kommt es bei OSCC bukkaler Mukosa bei mehr als 50%, bei OSCC der Zunge in der Mehrheit der Fälle (hier auch CK 14) und bei vielen OSCC der Alveolar-Mukosa zur Nicht-Expression von CK 5. Bei Radiatio-bedingter Mukositis (3 Wochen nach Beginn der Radiatio) kommt es zu einer gesteigerten suprabasalen Expression von CK 14 und erhöhter Expression von CK 6/16 während der initialen Phase der Mukositis. Die Autoren erklären den Anstieg von CK 6/16 mit einer epithelialen Repopulation und Versuch der Wundheilung (Bonan, P.R. et al. 2006).

Bei der Untersuchung von Plattenepithelien p63-negativer Mäuse (z.B. Haut oder Zunge) konnte festgestellt werden, dass diese kein Str. spinosum, Str. granulosum und Str. corneum entwickelten und eine irreguläre Expression von CK 5 und CK 14 aufwiesen. Die Kontrolle der Expression durch p63, einem nukleären Transkriptions-Faktor, der für die Expression von keratinozytischen Differenzierungsmarkern (z.B. Involucrin und Loricrin) verantwortlich ist, konnte auch bei in vitro-Studien an transformierten humanen Keratinozyten festgestellt werden. Bei Abschluß der Zelldifferenzierung, oder durch andere Mechanismen (z.B. hohe Kalziumkonzentrationen), kommt es zu einer Runterregulierung aller p63-Isoformen. In Plattenepithelkarzinomen kann eine p63-Expression nachgewiesen werden, ausdifferenzierte Zellen sind dagegen negativ für diesen Marker (Reis-Filho, J. S et al. 2003).

Bei CK 5- und CK 14-Gen-negativen Mäusen wurden schwere Blasenbildungen der Haut und oralen Mukosa beobachtet und sie starben kurz nach ihrer Geburt. Die Blasenbildung tritt bereits bei der Geburt auf und war bei CK 5-Gen-negativen Mäusen deutlich schwerer ausgeprägt. CK 5-Gen-negative Basalzellen wiesen keine zytoplasmatischen Intermediärfilamente auf und waren besonders sensitiv auf mechanische Traumen. Mutationen der CK 5 und CK 14-Gene führen zu schweren Formen von Epidermolysis bullosa simplex (Coulombe, P.A., Omary, M.B. 2002; Fuchs, E. 1994).

Auch hier sind die teilweise abweisenden Ergebnisse der ausgewerteten Literatur mit den zum Teil geringen Fallzahlen, den teilweise einseitigen Lokalisationen bzw. untersuchten Epithelarten, unterschiedlich verwendeten Antikörpern und deren Auswertung, sowie den hohen Fallzahlen von OL und OSCC dieser Arbeit zu erklären.

4.1.3 CK 8/18-Expression

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Expression von CK 8/18 in sämtlichen Analysen eine signifikante Steigerung in den OSCC gegenüber den OL mit jeweils $p < 0,001$. Eine Ausnahme war nur der direkte Vergleich von Leukoplakien und Dysplasien, wo die Signifikanz bei $p = 0,03$ lag. Diese Ergebnisse lassen sich auch in der ausgewerteten Literatur wiederfinden.

CK 8 und CK 18 können in fetaler bukkaler und linguale Mukosa bis zur 27. Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden (Vaidya, M.M. et al. 2000). CK 8 und CK 18 sind in gesundem oralen und pharyngealen Epithel normalerweise nicht nachweisbar (Depondt, J. et al. 1999). Eine Ausnahme stellt nur das Verbindungsepithel (junctional epithelium) für die Expression von CK 18 dar (Presland, R.B., Dale, B.A. 2000). Eine Transfektions-Studie von CK 8 und CK 18 in 3T3 Fibroblasten zeigte das beide zusammen exprimiert stabile Proteine und Filamente innerhalb des Cytoskeletts ausbilden, die einzelnen Polypeptide alleine exprimiert jedoch instabil sind (Dale, B.A. et al 1990).

Die de novo-Expression von CK 18, in vorher negativen Epithelien, tritt nach der malignen Transformation auf und stellt eine Rückkehr zu der, in der Embryogenese normalen, Expression fetaler oraler Mukosa dar (Balm, A.J. et al. 1996). Das Basis-Paar CK 8/18, welches als typische Marker für einschichtige Epithelien gilt (Presland, R.B., Dale, B.A. 2000), ist auch mit einer deutlich verminderten Überlebensrate bei primären OSCC assoziiert (Fillies, T. et al. 2006).

Dieses Paar scheint eine sehr wichtige Rolle in vielen Schritten der Pathogenese und Progression von Plattenepithelkarzinomen zu spielen. Die Transfektion bukkaler Mukosa-Zellen führte z.B. zu einer signifikant veränderten Zellmorphologie mit erhöhter Zellmortalität, was als eine Voraussetzung für ein invasives Tumorverhalten angesehen wird (Raul, U. et al. 2004).

Ähnliche Ergebnisse konnten für Vimentin-positive Melanome von Zell-Kulturen gezeigt werden, die nach Transfektion mit CK 8 und CK 18, ein deutlich gesteigertes migratorisches Verhalten und Invasivität der Basalmembran-Matrix aufwiesen. Hierbei hat die Co-Expression von Vimentin und CK 8/18 eine Steigerung der cytoskeletalen Interaktionen mit fokalen Kontakten des extrazellulären Raumes zur Folge, die Integrin-vermittelt zu einer Steigerung der Migration führen (Chu, Y.W. et al. 1996).

Leukoplakien ohne Dysplasien weisen keine CK 8-Expression auf, dysplastische Läsionen hingegen sind, korrelierend zum Grad der Dysplasie, positiv. OSCC zeigen in der überwiegenden Mehrheit der Fälle, sowie auch Lymphknotenmetastasen, eine moderate bis starke Expression. Während ein, an den Tumorrand angrenzendes, hyperplastisches Gewebe basal schwach positiv für CK 8 ist, weisen benachbarte invasive Karzinomzellen eine starke Expression auf. Dies macht CK 8 zu einem sehr spezifischem und sensitiven Marker für die Erkennung früher Stadien von malignen Gewebetransformationen (Dysplasien und Carcinoma in situ) und zur Beurteilung von Tumorrändern (Gires, O. et al. 2006; van der Velden, L.A. et al. 1999; Xu X.C., et al 1995).

Andere Autoren erwähnen einen positiven Nachweis von CK 8/18 bei einigen Leukoplakien nichtverhornender Mukosa, bei mehr als 50% der Epitheldysplasien und Microinvasionen. Der überwiegende Anteil der Leukoplakien zeigt hier jedoch auch keinen positiven Nachweis, obwohl die entsprechende mRNA basal und unterhalb des Stratum spinosum vorliegt (Morgan, P.R. Su, L. 1994; Reibel, J. 2003; Su, L. et al. 1996; Vaidya, M.M. et al. 1998; van der Velden, L.A. et al. 1999).

Mit sinkendem Differenzierungsgrad eines Tumors steigt die CK 8/18-Expression (Upsani, O.S. et al. 2004). Einige Jahre zuvor wurde dieses auch schon von Ogden, G.R. et al. (Ogden, G.R. et al. 1993 b, c) dadurch bestätigt, dass sowohl in gut- als auch schlechtdifferenzierten OSCC CK 8 nachgewiesen werden konnte und die Stärke der Expression von CK 8/18 mit dem Grad der Malignität assoziiert ist.

Eine Null-Mutation von CK 19 in Mäusen verursacht keine phenotypischen Veränderungen. In einfache Epithelien überschneidet sich die CK 19-Expression signifikant mit der von CK 18, einem anderem Typ I-Keratin. Eine Kreuzung von CK 18- und CK 19-Gen-negativen Mäusen führte zu einem Tod der Feten zwischen dem 9. und 10. Embryonaltag. Es wurde das Auftreten von schweren Zytolysen in trophoblastischen Riesenzellen beobachtet, was zu dem Schluß führte, dass ein funktionierendes Keratin-Netzwerk für die strukturelle Integrität in diesem Embryonalstadium essentiell ist. Abnormalitäten in den Throphoblasten, neben schwerwiegenden Plazenta-Defekten, konnten ebenfalls bei Embryonen von Kreuzungen CK 8- und CK 19-Gen-negativer Mäuse beobachtet werden, die auch um den 10. Tag der Embryonalentwicklung starben.

Im Gegensatz zu epidermalen CK, scheinen Mutationen von CK einfacher Epithelien betroffene Individuen für eine Erkrankung zu prädisponieren als per se eine Erkrankung zu verursachen. Diese Behauptung wird durch vielzählige Studien mit transgenen Tieren bestätigt. Auch wenn CK 8- und CK 18-Mutationen bei Patienten mit kryptogenen Lebererkrankungen nachweisbar sind, sind sie auch bei Patienten mit Lebererkrankungen alkoholischer oder viraler Genese zu finden. Dieses führt zu dem Schluß, dass eine Prädisposition für Lebererkrankungen durch eine Mutation von CK 8 und CK 18 generell verursacht wird, aber weitere genetische und/oder umweltbedingte Faktoren erst den Ausbruch verursachen (Coulombe, P.A., Omary, M.B. 2002). In Experimenten mit CK 8-Null-Mäusen konnte gezeigt werden, dass CK 8/CK 18-Intermediärfilamente zum Erhalt der Integrität von Hepatozyten-Oberflächenmembranen gegen mechanischen Stress beitragen. Allerdings wurde auch gezeigt, dass CK 8-Null-, CK 18-Null- und ARG89-->Cys CK 18-mutierte Mäuse hoch sensitiv auf chemischen Stress (z.B. Griseofulvin oder Acetaminophen) reagieren. Mit CK 8 und CK 18 transfektierte Fibroblasten wiesen eine gesteigerte Resistenz gegen Chemotherapeutika auf. Normale und maligne Epithelzellen mit CK 8- oder CK 18-Mutationen sind deutlich sensitiver für einen TNF- α -vermittelten Zelltod in Gegenwart von CHX (Cycloheximid). Die Apoptose stellt einen programmierten Zelltod mit begleitender minimaler Entzündung dar und wird zur normalen Gewebe-Homeostasis oder Elimination anormaler Zellen benötigt. In vitro-Studien konnten unter anderem drei Mitglieder der TNF-Familie (TNF- α , Fas L und TRAIL) identifiziert werden, die diesen Vorgang einleiten können. Auch konnte gezeigt werden, dass CK8 und CK 18 eine Resistenz gegen eine Fas-vermittelte Apoptose, durch eine Mikrotubuli-abhängige Modulation von Fas gegen die Oberflächenmembran, bewirkt (Gilbert, S. et al. 2001). Durch Transfektion mit dem CK 8-Gen konnte gezeigt werden, dass phenotypische Eigenschaften von Zell-Kulturen fetaler bukkaler Mukosa verändert wurden und zu einer malignen Transformation führten. Transgene Mäuse, die humanes CK 8 exprimieren zeigten schwere epidermale und Haarfollikel-Dysplasien mit begleitender Veränderung der Expression epidermaler Differenzierungsmarker. CK spielen ebenfalls eine Rolle bei zellulärer Reaktion auf mechanischen Stress und Apoptose. Hieraus lässt sich schließen, dass die CK-Expression nicht nur während der oralen Karzinogenese verändert ist, sondern diese wohl auch beeinflussen kann (Ranganathan, K. et al. 2006).

Bei einer Radiatio-bedingten Mukositis (3 Wochen nach Beginn der Radiatio) kommt es zu keiner Expression von CK 8/18 (Bonan, P.R. et al. 2006).

4.1.4 CK 19-Expression

CK 19 zeigte in den statistischen Analysen der vorliegenden Arbeit signifikante Expressionssteigerungen von OSCC gegenüber Leukoplakien aller Lokalisationen ($p < 0,001$), Dysplasien gegenüber den Leukoplakien ($p = 0,021$) und OSCC gegenüber Leukoplakien und Dysplasien ($p < 0,001$). Ein direkter Vergleich von Leukoplakien des Mundbodens und der Zunge mit OSCC gleicher Lokalisation, sowie der Vergleich von OSCC mit Dysplasien, zeigte keine statistischen Signifikanzen. Die vorliegenden Ergebnisse werden mehrheitlich in der ausgewerteten Literatur wiedergespiegelt.

CK 19 ist ebenfalls ein spezifischer Marker für einfache, kubische Zylinderepithelien (Moll, R. 1993), kann aber auch in respiratorischem Epithel (z.B. in Kombinationen platten- und zylinderepithelialer Keratine = CK 5/19), in den Papillae filiformes der Zunge und Stammzellen des Thymus nachgewiesen werden (Heid, H.W. et al. 1988 a und b). Entzündungen oder hyperplastischen Prozessen mit einem starken Anstieg an CK 6 können zusätzlich zur Expression von CK 8, 18, 19 führen (Wild, G.A. et al. 1987).

In normaler Gingiva ist CK 19 nur in den spärlich verstreuten Merkel-Zellen nachweisbar, bei Entzündungsgewebe kommt es aber zum Nachweis größerer Regionen in der Basalzellschicht und bei Fortschreiten auch in suprabasalen Zellen. Dieses ist deutlich ausgeprägter für mRNA als für Protein (Bosch, F.X. et al. 1989). CK 19 kann in den Basalzellen von normalen nichtverhornenden oralen Epithelien, aber nicht in verhornenden nachgewiesen werden. In mittel- bis schwergradigen Epitheldysplasien, ob keratinisiert oder nicht, lässt sich eine starke Expression basal und suprabasal finden (Reibel, J. 2003; Takeda, T. et al. 2006).

Gut differenzierte OSCC sind negativ für CK 19, weniger differenzierte hingegen zeigen steigenden Nachweis (besonders bei nichtkeratinisierte Mukosa). Die Malignität steigt mit progressivem Verschwinden der CK 1- und progressiver Steigerung der CK 19-Expression (Cintorino, M. et al. 1990; Ermich, T. et al. 1989; Nie, M. et al. 2002; Nie, M. et al. 1999; Schulz, J. et al. 1992; Su, L. et al. 1996). Eine suprabasale Expression von CK 19 korreliert mit mukosaler Instabilität und prämaligener Veränderung, kann aber auch in normalem oralen und Larynx-Epithel nachgewiesen werden (van der Velden, L.A. et al. 1999). Die Regulation der CK 19-Expression (und auch CK 14) ist während der dysplastischen Veränderung und bei Karzinomen, im Vergleich zu normalen Epithel, deutlich gestört (Su, L. et al. 1996).

Eine Expression von CK 19 ist mit einer geringen Tumorgroße assoziiert (Depondt, J. et al. 1999). Crowe, D.L. et al. (Crowe, D.L. et al. 1999) konnten in einer in vitro-Studie mit OSCC-Zell-Kulturen den Nachweis erbringen, dass die Kulturen mit nachweisbarer CK 19-Expression weniger invasiv waren, als die ohne Nachweis. Sie schlussfolgerten hierbei, dass eine Nichtexpression von CK 19 mit erhöhtem invasivem Potential einhergeht und eine CK 19-Expression die Invasivität durch Senkung der migratorischen Kapazität reguliert. Eine CK 8/18-

und CK 19-Expression korreliert aber auch signifikant mit einer verminderten Überlebensrate (Fillies, T. et al. 2006).

Die suprabasale Expression von CK 19 und der Nachweis von CK 8/18 ist mit dem Grad der Malignität assoziiert und kann auch in Präkanzerosen nachgewiesen werden (Ogden, G.R. et al. 1993 c). Während weitere Autoren CK 19 bei suprabasaler Expression ebenfalls als Marker für Prämalignität ansehen, die Expression gleichzeitig ein initiales Geschehen während der oralen Karzinogenese darstellt (Heyden, A. et al. 1992; Nie, M. et al. 2002; Xu, X.C. et al. 1995) und zur Ermittlung des Differenzierungsgrades von OSCC benutzt werden kann (Nie, M. et al. 1999), halten andere Autoren CK 19 weder als sensitiven noch spezifischen Marker für Prämalignität bzw. verlässlichen Marker für diagnostische oder prognostische Zwecke bei OSCC für geeignet (Coltrera, M.D. et al. 1992; Depondt, J. et al. 1999; Hamakawa, H. et al. 1998). Morgan, P.R. et Su, L. (Morgan, P.R., Su, L. 1994) erwähnen zwar eine signifikante Expression von CK 19 bei Leukoplakien mit und ohne Dysplasien, da aber dieses auch bei Entzündungsprozessen und HPV-Befall auftritt, halten sie es ebenfalls nicht für einen zuverlässigen Marker.

Bei einer Untersuchung zur Feldkanzerisierung konnte an Gewebeproben, die vom Wundrand nach Tumorexzision mit mind. 1 cm tumorfreiem Rand entnommen wurden, eine suprabasale Expression von CK 19 (und basal von CK 8 bei 30%) in bukkaler Mukosa und Epithel des Mundbodens nachgewiesen werden. Diese, häufig durch Tumoren befallenen Lokalisationen, waren bei tumorfreien Patienten CK 19-negativ. Dieses Ergebnis stärkt den Verdacht, dass ein sog. „field change“ stattgefunden hat, bei dem das den Tumor umgebene Gewebe verändert wurde und zu entsprechenden Rezidiven führen kann, obwohl der Tumor in sano entfernt wurde (Ogden, G.R. et al. 1993 b).

Das vestibuläre Sulkusepithel der OK-Front zeigte in einer Studie von 2002 zu 100% einen positiven Nachweis von CK 19 bei durch schwedischen „snuff“ verursachten Läsionen (Merne, M. et al. 2002). Auch tabakassoziierte Leukoplakien sind durch eine suprabasale Expression in hyperkeratinisierten Arealen gekennzeichnet (Reibel, J. et al. 1991).

4.2 Spezifische Cytokeratin-Expression zum Nachweis von Lymphknotenmetastasen

Einige Studien haben zusätzlich zur Expression von CK in pathologisch veränderten oralen Epithelien auch die Expressionsmuster von Lymphknoten tumorerkrankter Patienten untersucht. Das Hauptziel der Erkennung von Lymphknotenmetastasen bei Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses (HNSCC) ist es, eine Neck Dissection nur in den pN+ -Fällen durchführen zu müssen. Die potentielle Möglichkeit einer intraoperativen quantitativen RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) zeigte sich hierbei als äußerst sensitiv. Eine

postoperative Untersuchung cervikaler Lymphknoten von 18 HNSCC-Patienten, mittels RT-PCR, auf den Nachweis von CK 5, CK 14 und CK 17 zeigte bei histopathologisch positiven Lymphknoten (Makro- und Mikrometastasen) deutlich höhere mRNA-Mengen für CK 17 und CK 14, als negative Lymphknoten. CK 5 hatte hierbei keine signifikanten Resultate. CK 17 konnte Mikrometastasen >450 µm zu 100 % sicher anzeigen (Garrel, R. et al. 2006). Eine Studie zur Eignung der mRNA von CK 13, CK 19 und CK 20 für die Erkennung von Mikrometastasen in cervikalen Lymphknoten oraler Karzinome zeigte einen positiven CK 13-Gen-Nachweis bei 14,4 % mit gleichzeitigen Nachweis von Mikrometastasen, obwohl die untersuchten Lymphknoten histologisch als metastasenfrem eingestuft wurden. Die mRNA von CK 19 und CK 20 zeigten hierbei nur eine geringe Sensitivität. CK 13 mRNA scheint somit ein guter Marker für Mikrometastasen in cervicalen Lymphknoten oraler Karzinome zu sein (Hamakawa, H. et al. 2000). Bei 1328 Lymphknoten von 31 HNSCC-Patienten wurde die Expression von CK 19 mRNA, mit Hilfe von RT-PCR, zum Nachweis von Mikrometastasen überprüft. In histologisch positiven Lymphknoten war die Expression signifikant höher als bei den negativen Lymphknoten. Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, dass RT-PCR für CK 19 mRNA eine sensitive und zuverlässige Methode zur Erkennung kanzeröser Zellen in Lymphknoten darstellt. (Tao, L. et al. 2006). Die Analyse von 153 cervikalen Lymphknoten, mittels RT-PCR, auf den Nachweis von CK 14 mRNA zeigte ebenfalls eine hohe Sensitivität bei der Erkennung von Mikrometastasen in histologisch negativen Lymphknoten. Die Identifikation von Mikrometastasen in Lymphknoten von HNSCC-Patienten durch RT-PCR kann hierbei deutlich der bestmöglichen Behandlung metastasierender Karzinome förderlich sein (Shores, C.G. et al. 2004).

4.3 Einfluß von Anti-Oxidanzien auf die Cytokeratin-Expression

Der Einfluß von Anti-Oxidanzien und Radikalfänger (z.B. Vitamin A, E, C und β -Karatol) auf die CK-Expression war ebenfalls Gegenstand einiger veröffentlichter Studien. Ihre Hauptaufgaben bestehen darin metabolische Stoffwechselprodukte und reaktive Oxidanzien zu neutralisieren, Eingriff bei der Aktivierung von Prokarzinogenen, Behinderung der DNA-Bindung von Karzinogenen, Unterbindung der Replikation transformierter Zellen und sie können wahrscheinlich sogar zu einer Regression von präkanzerösen Läsion führen. Eine Mangelernährung führt zu einem geweblichen Abbau von anti-oxidativen Proteinen wie z.B. GSH (Glutathion oder γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin). GSH als zelluläres Anti-Oxidanz fungiert z.B. als Modulator der T-Zell-Aktivierung agiert und hat protektive Effekte gegenüber chemisch bedingten oralen Karzinomen und Leukoplakien. Alkohol-, tabak-, und/oder mangelernährungsbedingte Immunsuppression bewirkt unter anderem eine verminderte

Speicheldrüsenfunktion und Immunität der oralen Mukosa, eine Reduktion von CD4-Helferzellen oder Abschwächung der NK-Zell-Aktivität (Enwonwu, C.O., Meeks, V.I. 1995). Vitamin A (Retinol) und Provitamin A (β -Carotin) binden auf zellulärer Ebene an nukleäre Rezeptoren der Genexpression und führen über die Regulation der Genexpression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, zu einer Zelldifferenzierung und -proliferation. Während Vitamin A bei systemischer Gabe zu massiven Nebenwirkungen führen kann (z.B. mukotane Reaktionen, Kopfschmerz, Thrombozytopenie, Lebertoxizität oder Osteoporose) ist das β -Carotin einer Sättigungskinetik im Körper unterworfen und hat als einzige Nebenwirkung eine reversible Gelbverfärbung der Haut zur Folge. Das ebenfalls eingesetzte Vitamin E (α -Tocopherol) wird in Membransystemen und LDL inkorporiert und behindert dort das Abfangen von freien Radikalen zur Oxidation. Eine Hypervitaminose ist nicht möglich, da mit zunehmender Aufnahme die Resorption im Dünndarm vermindert wird. Zur Regeneration des membrangebundenen α -Tocopherol ist unter anderen Ascorbinsäure in der Lage. Vitamin C (Ascorbinsäure) zeichnet sich durch eine hohe antioxidative Wirkung aus, womit es in der Lage ist, den anfallenden oxidativen Streß aus Stoffwechselprozessen und äußeren Noxen abzubauen (Bánkfalvi, Á. et al. 2006; Zöller, J.E., Scheer, M. 2000).

Bei der Untersuchung chemisch induzierter Karzinome von bukkaler Hamstermukosa wurde eine basale und suprabasale Expression (im Str. spinosum) von CK 10, CK 13 und CK 8 in Dysplasien und oralen Karzinomen nachgewiesen. Nach Behandlung mit GSH oder Vitamin E kam es zu einer Senkung der Protein-Expression, was dazu führte, dass die Versuchstiere weniger und kleinere Tumoren ausbildeten. Auch weniger Dysplasien, Carcinoma in situ konnten histologisch gefunden werden (Schwartz, J.L. et al. 1995). Studien mit kultivierten neonatalen Keratinozyten zeigten eine Steigerung der Schichtenbildung und Expression von CK 1 und CK 10/11 nach Entfernung von Vitamin A (Retinol) aus dem Serum, in dem die Kulturen gezüchtet wurden. Dieser Effekt war nach Zugabe von Retinylacetat reversibel und führte zu dem Schluß, dass eine Regulation der Keratin-Expression bei der Gentranskription zur mRNA stattfindet. Bei einem Überschuß an Retinoiden stieg ebenfalls die Expression von CK 13, CK 15 und CK 19, die Expression von CK 4, CK 5 und CK 14 blieb hingegen unbeeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die CK individuell verschieden auf die Retinoide reagieren (Dale, B.A. et al. 1990; Lindberg, K., Rheinwald, J.G. 1990).

Die CK-Expression ist bei vielen pathologischen Prozessen wie z.B. Psoriasis, Gingivitis und Hyperkeratosis verändert. Auch in oralen Präkanzerosen (z.B. Leukoplakien oder orale submuköse Fibrosen) und Karzinomen ist diese Veränderung nachweisbar. Hierbei kann man zwei verschiedene Muster beobachten: 1. Nicht-Expression von epitheltypischen CK und 2. anormale Expression von CK, die normalerweise nicht expremiert werden (Ranganathan, K. et al. 2006)

Die Bewertung der prognostischen Relevanz von Cytokeratin-Expressionsmustern braucht grundsätzlich immer große Datenmengen eines epidemiologisch relevanten Patientenkollektivs. Die vorliegende Arbeit betrachtet zwar eine verhältnismäßig große Fallzahl, im Vergleich mit der ausgewerteten Literatur, kann aber bestenfalls nur weiteren Studien anregen und Vergleiche zu den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen ziehen.

Im Wesentlichen stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit der bekannten Literatur überein. Alle Autoren fanden eine deutliche Veränderung der Zelldifferenzierung und des epitheltypischen CK-Expressionsmuster während der malignen Transformation oraler Epithelien. Die regionale Differenzierung von oralen Epithelien basiert auf einer intrinsischen Spezialisierung regionaler Keratinozyten-Stammzellen. Fetale Zellen des Mundbodens zeigen in Kulturen ein deutlich anderes CK-Expressionsmuster (Expression von CK einfacher Epithelien und hohe Raten von CK 19) als adulte Zellen des Mundbodens, aber vergleichbar mit dem von spezialisierter nichtkeratinisierter Mukosa (Weichgaumen) und einigen Kulturen von OSCC. Die Transformation oraler Zellen ist gekennzeichnet durch eine frequente Rückkehr zu einer fetalen CK-Expression (Lindberg, K., Rheinwald, J.G. 1990). Cytokeratine scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose zu spielen, da Mutationen oder Abwesenheit zu dramatischer Steigerung der Zellapoptose über Aktivierung von TNF- oder Fas- Rezeptoren, durch Modifikation oder Interaktion mit diesem, führen (Coulombe, P.A., Omary, M.B. 2002).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass alle bisherigen Studien einen starken Anhalt dafür geben, dass die CK-Expression pathologisch veränderter Epithelien eine prognostische Relevanz zur Beurteilung von Präkanzerosen und oralen Plattenepithelkarzinomen hat. Man sollte hierbei jedoch beachten, dass die Cytokeratine nicht die einzigen potenziellen Bio-Marker sind. Weitere Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen expremierten cytoskelettalen Intermediärfilamenten und ggf. auch anderen zellulären Faktoren können helfen, die bisherigen Erkenntnisse der oralen Karzinogenese zu erweitern.

5. Literaturverzeichnis

1. **Anneroth, G., Batsakis, J., Kyba, N. (1987):**
Review of the literature and recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas
Scand J Dent Res 95: 229-249
2. **Bader, B.L., Magin, T.M., Hatzfeld, M., Franke, W.W. (1986)**
Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19 an exceptional tailless intermediate filament protein.
EMBO J 5: 1865-1875
3. **Balm, A.J., Hageman, P.C., van Doornewaard, M.H., Groeneveld, E.M., Ivanyi, D. (1996)**
Cytokeratin 18 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck.
Eur Arch Otorhinolaryngol 253(4-5): 227-233
4. **Bánkfalvi, Á., Piffkó, J., Joos, U. (2006)**
Klinische Oralpathologie
Verlag MIB GmbH, Münster, 1.Aufl.
5. **Barrett, A.W., Cort, E.M., Patel, P., Berkovitz, B.K. (2000)**
An immunohistological study of cytokeratin 20 in human and mammalian oral epithelium.
Arch Oral Biol 45(10): 879-887
6. **Batzler, W.U., Bertz, J., Eisinger, B., Hentschel, S., Husmann, G., Kieschke, J. Lehnert, M., Oberhausen, R., Schmidtman, I., Schneider, D. (2002)**
Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends.
Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken, 3.Aufl. S.16-19
7. **Beecher Instruments (August 2006)**
Automated arrayer
http://www.beecherinstruments.com/prod_autoarr.html

8. **Bloor, B.K., Seddon, S.V., Morgan, P.R. (2001)**
Gene expression of differentiation-specific keratins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma.
Oral Oncol 37(3): 251-261
9. **Bonan, P.R., Kaminagakura, E., Pires, F.R., Vargas, P.A., Almeida, O.P. (2006)**
Cytokeratin expression in initial oral mucositis of head and neck irradiated patients.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 101(2): 205-211
10. **Bornstein, M.M., Benguerel, M.C., Magnin, P., Meier, E., Buser, D. (2004)**
Die orale Leukoplakie : Eine retrospektive Untersuchung klinischer und histologischer Daten.
Schweiz Monatsschr Zahnmed 114(7): 680-686
11. **Bosch, F.X., Ouhayoun, J.P., Bader, B.L., Collin, C., Grund, C., Lee, I., Franke, W.W. (1989)**
Extensive changes in cytokeratin expression patterns in pathologically affected human gingiva.
Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 58(1): 59-77
12. **Bryne, M., Koppang, H.S., Lilleng, R., Stene, T., Bang, G., Dabelsteen, E. (1989)**
New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas
J Oral Pathol Med 18: 432-437
13. **Bubendorf, L., Nocito, A., Moch, H., Sauter, G. (2001)**
Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies.
J Pathol. 195(1): 72-79
14. **Caulin, C., Bauluz, C., Gandarillas, A., Cano, A., Quintanilla, M. (1992)**
Changes in keratin expression during malignant progression of transformed mouse epidermal keratinocytes.
Exp Cell Res 204: 11 – 21
15. **Chu, Y.W., Seftor, E.A., Romer, L.H., Hendrix, M.J. (1996)**
Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility.
Am J Pathol 148(1): 63-69

16. **Cintorino, M., Petracca, R., Vindigni, C., Tripodi, S.A., Leoncini, P. (1990)**
Topography-related expression of individual cytokeratins in normal and pathological (non-neoplastic and neoplastic) human oral mucosa.
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 417(5): 419-426
17. **Coltrera M.D., Zarbo, R.J., Sakr, W.A., Gown, A.M. (1992)**
Markers for dysplasia of the upper aerodigestive tract. Suprabasal expression of PCNA, p53, and CK19 in alcohol-fixed, embedded tissue.
Am J Pathol 141(4): 817-825
18. **Coulombe, P.A., Omary, M.B. (2002)**
“Hard” and “soft” principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments.
Curr Opin Cell Biol 14: 110-122
19. **Crouse, R.G. (1966)**
Epidermal keratin and epidermal prekeratin.
Nature 211(55): 1301-1302
20. **Crowe, D.L., Milo, G.E., Shuler, C.F. (1999)**
Keratin 19 downregulation by oral squamous cell carcinoma lines increases invasive potential.
J Dent Res 78(6): 1256-1263
21. **Dale, B.A., Salonen, J., Jones, A.H. (1990)**
New approaches and concepts in the study of differentiation of oral epithelia.
Crit Rev Oral Biol Med 1(3): 167-90
22. **Day, G.L., Blot, W.J., Shore, R.E., McLaughlin, J.K., Austin, D.F., Greenberg, R.S., Liff, J.M., Preston-Martin, S., Sarkar, S., Schoenberg, J.B. (1994)**
Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol
J Natl Cancer Inst 86: 131-137
23. **Depondt, J., Shabana, A.H., Sawaf, H., Gehanno, P., Forest, N. (1999)**
Cytokeratin alterations as diagnostic and prognostic markers of oral and pharyngeal carcinomas. A prospective study.
Eur J Oral Sci 107(6): 442-454

24. **Dietrich, T., Reichart, P.A., Scheifele, C. (2004)**
Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population.
Oral Oncol 40(2): 158-163
25. **Dunsche, A., Härle, F. (2000)**
Die Krebsvorstufen der Mundschleimhaut – eine Übersicht.
Laryngo-Rhino-Otol 79: 423-427
26. **Eichner, R., Sun, T.T., Aebi, U. (1986)**
The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments
J Cell Biol 102(5): 1767-1777
27. **Enwonwu, C.O., Meeks, V.I. (1995)**
Bionutrition and oral cancer in humans.
Crit Rev Oral Biol Med 6(1): 5-17
28. **Ermich, T., Schulz, J., Raabe, G., Schumann, D. (1989)**
Pattern of oral cytokeratins. III. SDS-electrophoretic analysis and immunoblotting of cytokeratins in leukoplakias and squamous cell carcinomas of the oral mucosa.
Biomed Biochim Acta 48(7): 393-401
29. **Fillies, T., Werkmeister, R., Packeisen, J., Brandt, B., Morin, P., Weingart, D., Joos, U., Buerger, H. (2006)**
Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity.
BMC Cancer 6:10
30. **Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M., Weber, K. (1978)**
Different intermediatesized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy.
Proc Natl Acad Sci U S A 75: 5034-5038
31. **Fuchs, E. (1994)**
Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength.
J Cell Biol 125(3): 511-516

-
32. **Fuchs, E., (1995)**
Keratins and the skin.
Annu Rev Cell Dev Biol 11: 123-153
33. **Fuchs, E., Cleveland, D.W. (1998)**
A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease.
Science 279: 514-519
34. **Garrel, R., Dromard, M., Costes, V., Barbotte, E., Comte, F., Gardiner, Q., Cartier, C., Makeieff, M., Crampette, L., Guerrier, B., Boulle, N. (2006)**
The diagnostic accuracy of reverse transcription-PCR quantification of cytokeratin mRNA in the detection of sentinel lymph node invasion in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a comparison with immunohistochemistry.
Clin Cancer Res 12: 2498-2505
35. **Gilbert, S., Loranger, A., Daigle, N., Marceau, N. (2001)**
Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation.
J Cell Biol 154(4):763-773
36. **Gires, O., Mack, B., Rauch, J., Matthias, C. (2006)**
CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck.
Biochem Biophys Res Commun 343(1): 252-259
37. **Goodwin, W.J. Jr., Byers, P.M. (1993)**
Nutritional management of the head and neck cancer patient
Med Clin North Am 77: 597-610
38. **Hamakawa, H., Bao, Y., Takarada, M., Fukuzumi, M., Tanioka, H. (1998)**
Cytokeratin expression in squamous cell carcinoma of the lung and oral cavity: an immunohistochemical study with possible clinical relevance.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 85(4):438-443
39. **Hamakawa, H., Fukuzumi, M., Bao, Y., Sumida, T., Kayahara, H., Onishi, A., Sogawa, K. (2000)**
Keratin mRNA for detecting micrometastasis in cervical lymph nodes of oral cancer.
Cancer Lett 160(1): 115-123

-
40. **Hatzfeld, M., Franke, W.W. (1985)**
Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides.
J Cell Biol 101: 1826-1841
41. **Hees, H., Sinowatz, F. (1996)**
Allgemeine und spezielle Pathologie
Deutscher Ärzte-Verlag, 3. Auflage, S. 118-137
42. **Heid, H.W., Moll, I., Franke, W.W. (1988a)**
Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles.
Differentiation 37: 137-157
43. **Heid, H.W., Moll, I., Franke, W.W. (1988b)**
Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. II. Concomitant and mutually exclusive synthesis of trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicle, nail bed and matrix, lingual papilla, thymic reticulum).
Differentiation 37: 215-230.
44. **Hesse, M., Magin, T.M., weber, K. (2001)**
Genes for intermediate filament proteins.
J Cell Sci 114: 2569-2575
45. **Heyden, A., Huitfeld, H.S., Koppang, H.S., Thrane, P.S., Bryne, M., Brandtzaeg, P. (1992)**
Cytokeratins as epithelial differentiation markers in premalignant and malignant oral lesions.
J Oral Pathol Med 21: 7-11
46. **Hoos, A., Cordon-Cardo, C. (2001)**
Tissue Microarray Profiling of Cancer Specimens and Cell Lines: Opportunities and Limitations
Lab Invest 81: 1331-1338

-
47. **Jaber, M.A., Porter, S.R., Speight, P., Eveson, J.W., Scully, C. (2003)**
Oral epithelial dysplasia: clinical characteristics of western European residents.
Oral Oncol 39(6): 589-596
48. **Kannan, S., Balaram, P., Jagadeesh Chandran, G., Radhakrishna Pillai, M., Mathew, b., Nalinakumari, K.R., Krishnan Nair, M. (1994)**
Alterations in expression of terminal differentiation markers of keratinocytes during oral carcinogenesis.
Pathobiology 62: 127-133
49. **Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G., and Kallioniemi, O. P. (1998)**
Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens.
Nat Med, 4: 844-847
50. **La Vecchia, C., Travani, A., Franceschi, S., Levi, F., Corrao, G., Negri, E. (1997)**
Epidemiology and Prevention of oral cancer
Oral Oncol 33: 302-312
51. **Lindberg, K., Rheinwald, J.G. (1990)**
Three distinct keratinocyte subtypes identified in human oral epithelium by their patterns of keratin expression in culture and in xenografts.
Differentiation 45: 230-241
52. **Lindenmüller, I.H., Lambrecht, J.T. (2006)**
Proliferative verrulöse Leukoplakie – Ein Fallbericht
Schweiz Monatsschr Zahnmed 116(5): 509-515
53. **Lockhart, P.B., Clark, J. (1994)**
Pretherapy dental status of patients with malignant conditions of the head and neck
Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 77: 236-41,
54. **Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L. Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E. (2001)**
Molekulare Zellbiologie.
Spektrum Akademischer Verlag, 4.Aufl.

-
55. **Maerker, R., Burkhardt, A. (1998)**
Erkrankungen der Mundschleimhaut und Lippen.
In: Horch, H.H. (Hrsg.) Praxis der Zahnheilkunde, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie.
Urban & Schwarzenberg, Bd. 2, 3. Aufl. S. 214-219
56. **Marley, J.J., Robinson, P.A., Hume, W.J. (1994)**
Expression of Human Cytokeratin 14 in normal, premalignant and malignant oral tissue following isolation by plaque differential hybridisation
Eur J Cancer B Oral Oncol 30B(5): 305-311
57. **Matthias, C. (2005)**
Weiße Flecken in der Mundschleimhaut. Harmlose Läsion oder Präkanzerose?
MMW-Fortschr Med 147: 1006-1008
58. **Merne, M., Heinaro, I., Lähteenoja, H., Syrjänen, S. (2002)**
Proliferation and differentiation markers in snuff-induced oral mucosal lesions
J Oral Pathol Med 31: 259-266
59. **Merseburger, A.S., Horstmann, M., Hennenlotter, J., Stenzl, A., Kuczyk, M. (2003)**
Die Tissue-Microarray-Technik als neues „high throughput-tool“ für den Nachweis differentieller Proteiexpression.
J Urol Urogynaekol 3: 7-11
60. **Metelmann, H.R. (1998)**
Tumoren im Kopf-Halsbereich
In: Horch, H.H. (Hrsg.) Praxis der Zahnheilkunde, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie.
Urban & Schwarzenberg, Bd. 2, 3. Aufl. S. 251-318
61. **Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. (2001)**
Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology?
Adv Anat Pathol 8(1): 14-20
62. **Moll, R. (1993)**
Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors
Veröff Pathol. 142: 1-197

-
63. **Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, R. (1982)**
The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia tumors and cultured cells.
Cell 31: 11-24
64. **Morgan P.R., Su, L. (1994)**
Intermediate filaments in oral neoplasia. I. Oral cancer and epithelial dysplasia.
Eur J Cancer B Oral Oncol 30B(3): 160-166
65. **Neville, B.W., Day, T.A. (2002)**
Oral cancer and precancerous lesions.
CA Cancer J Clin 52: 195-215
66. **Nie, M., Zhong, L., Zeng, G., Li, B. (2002)**
The changes of cytokeratin 19 during oral carcinogenesis.
Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 37(3):187-190
67. **Nie, M., Li, B., Zeng, G., He, Z., Chen, Q., Zhou, M., Luo, G., Zeng, X. (1999)**
Changes of simple epithelial cytokeratin during oral carcinogenesis
Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 17(3): 208-209, 220
68. **Odani, T., Ito, D., Li, M.H., Kawamata, A., Isobe, T., Iwase, M., Nagumo, M. (2006)**
Gene expression profiles of oral leukoplakia and carcinoma: genome-wide comparison analysis using oligonucleotide microarray technology.
Int J Oncol 28(3): 619-624
69. **Ogden, G.R., Chisholm, D.M., Adi, M., Lane, E.B. (1993 a)**
Cytokeratin expression in oral cancer and its relationship to tumor differentiation.
J Oral Pathol Med 22(2): 82-86
70. **Ogden, G.R., Lane, E.B., Hopwood, D.V., Chisholm, D.M. (1993 b)**
Evidence for field change in oral cancer based on cytokeratin expression.
Br J Cancer 67(6): 1324-1330
71. **Ogden, G.R., McQueen, S., Chisholm, D.M., Lane, E.B. (1993 c)**
Keratin profiles of normal and malignant oral mucosa using exfoliative cytology.
J Clin Pathol 46(4): 352-356

72. **Ohkura, S., Kondoh, N., Hada, A., Arai, M., Yamazaki, Y., Sindoh, M., Takahashi, M., Matsumoto, I., Yamamoto, M. (2005)**
Differential expression of the keratin-4, -13, -14, -17 and transglutaminase 3 genes during the development of oral squamous cell carcinoma from leukoplakia.
Oral Oncol 41(6): 607-613
73. **Petti, S. (2003)**
Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review.
Oral Oncol 39(8): 770-780
74. **Pindborg, J.J., Reichart, P.A., Smith, C.J. van der Waal, I. (1997)**
Collaboration with LH Sobin and pathologists in 9 countries.
In: World Health Organization (Hrsg). International Histological Classification of Tumours. Second Edition : Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa.
Springer Verlag, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Milan, Paris, Santa Clara, Singapore, 2. Aufl.
75. **Presland, R.B., Dale, B.A. (2000)**
Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease.
Crit Rev Oral Biol Med 11(4): 383-408
76. **Ranganathan, K., Kavitha, R., Sawant, S.S., Vaidya, M.M. (2006)**
Cytokeratin Expression in oral submucous fibrosis – an immunohistochemical study.
J Oral Pathol Med 35: 25-32
77. **Raul, U., Sawant, S., Dange, P., Kalraiya, R., Ingle, A., Vaidya, M. (2004)**
Implications of cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: induction of transformed phenotype.
Int J Cancer 111(5): 662-668
78. **Regezi, J.A., Courtney, R.M., Kerr, D.A. (1976)**
Dental management of patients radiated for oral cancer.
Cancer 38: 994-1000
79. **Reibel, J. (2003)**
Prognosis of oral pre-malignant lesions: Significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics.
Crit Rev Oral Biol Med 14(1): 47-62

-
80. **Reibel, J., Clausen, H., Dale, B.A., Thacher, S.M. (1989)**
Immunohistochemical analysis of stratum corneum components in oral squamous epithelia.
Differentiation 41: 237-244
81. **Reibel, J., Kenrad, B., Schwartz, O. (1991)**
Architectural organization of human oral epithelium as visualized by keratin staining pattern in tobacco-associated leukoplakias
J Oral Pathol Med 20: 265-270
82. **Reichart, P.A. (2000)**
Primärprävention des Mundhöhlenkarzinoms und oraler Präkanzerosen
Mund Kiefer GesichtChir 4: 357-364
83. **Reichart, P.A. (2001)**
Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures.
Clin Oral Investig 5(4): 207-213
84. **Reichart, P.A., Way, T.H. (2006)**
Oral cancer and pre-cancer in Myanmar: a short review.
J Oral Pathol Med 35(4):193-196
85. **Reis-Filho, J. S., Simpson, P.T., Martins, A., Preto, A., Gärtner, F., Schmitt, F.C. (2003)**
Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray.
Virchows Arch 433 : 122-132
86. **Rudall, K.M. 1952**
The proteins of the mammalian epidermis.
Adv Protein Chem 7: 253 – 290
87. **Santos, M. Ballestin, C., Garcia-Martin, R., Jorcano, J.L. (1997)**
Delays in malignant tumor development in transgenic mice by forced epidermal keratin 10 expression in mouse skin carcinomas.
Mol Carcinog 20(1): 3-9

-
88. **Sawant, S.S., Naresh, K.N., D'Cruz, A., Ogale, S.B., Vaidya, M.M. (2003)**
Demonstration of cytokeratin-5 non-expression in tobacco related oral carcinogenesis—
use of reverse transcriptase polymerase chain reaction as a sensitive assay.
Oral Oncol 39(8): 789-795
89. **Scheifele, C., Reichart, P.A. (1998)**
Orale Leukoplakien bei manifestem Plattenepithelkarzinom
Mund Kiefer GesichtsChir 2: 326-330
90. **Scheifele C., Reichart, P.A., Dietrich, T. (2003)**
Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population.
Oral Oncol 39(6): 619-625
91. **Schulz, J., Ermich, T., Kasper, M., Raabe, G., Schumann, D. (1992)**
Cytokeratin pattern of clinically intact and pathologically changed oral mucosa.
Int J Oral Maxillofac Surg 21(1): 35-39
92. **Schwartz, J.L., West, K., Shklar, D.P., Shklar, G. (1995)**
Altered cytokeratin expression in carcinogenesis inhibition by antioxidant nutrients.
Nutr Cancer 24(1): 47-56
93. **Sciubba, J.J. (1995)**
Oral leukoplakia.
Crit Rev Oral Biol Med 6(2): 147-160
94. **Sciubba, J.J. (2000)**
Oral precancer and cancer: etiology, clinical presentation, diagnosis and management
Compend Contin Educ Dent 21: 892-898, 900-902
95. **Sesterhenn, A.M., Mandic, R., Dunne, A.A., Werner, J.A. (2005)**
Cytokeratins 6 and 16 are frequently expressed in head and neck squamous cell
carcinoma cell lines and fresh biopsies.
Anticancer Res 25(4): 2675-2680
96. **Sharma-Oates, A., Quirke, P., Westhead, D.R. (2005)**
TmaDB: a repository for tissue microarray data.
BMC Bioinformatics. 6: 218

-
97. **Shores, C.G., Yin, X., Funkhouser, W. Yarbrough, W. (2004)**
Clinical evaluation of a new molecular method for detection of micrometastases in head and neck squamous cell carcinoma.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 130(8): 937-942
98. **Simon, R., Sauter, G. (2002)**
Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors.
Exp Hematol 30(12): 1365-1372
99. **Spyro, M., Kallioniemi, A., Kauraniemi, P., Elkahloun, A., Kallioniemi, O.P. (2001)**
Clinical and functional target validation using tissue and cell microarrays
Curr Opin Chem Biol 6: 97-101
100. **Steinert, P.M. (1985)**
Intermediate Filaments: conformity and diversity of expression and structure.
Annual Review of Cell Biology 1: 41 – 65
101. **Steinert, P.M., Parry, D.A. (1993)**
The conserved H1 domain of the type II keratin 1 chain plays an essential role in the alignment of nearest neighbor molecules in mouse and human keratin 1/keratin 10 intermediate filaments at the two- to four-molecule level of structure.
J Biol Chem 268(4): 2878-2887
102. **Steinert, P.M., Roop, D.R. (1988)**
Molecular and cellular biology of intermediate filaments.
Annu Rev Biochem 57: 593-625
103. **Stewart, B.W., Kleihues, P. (2003)**
Head and Neck Cancer.
WHO World Cancer Report, IARC Press, Lyon 2003
104. **Su, L., Morgan, P.R., Lane, E.B. (1996)**
Keratin 14 and 19 expression in normal, dysplastic and malignant oral epithelia. A study using in situ hybridization and immunohistochemistry.
J Oral Pathol Med 25(6): 293-301

105. **Takeda, T., Sugihara, K., Hirayama, Y., Hirano, M., Tanuma, J.T., Semba, I. (2006)**
Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK 19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias.
J Oral Pathol Med 35: 369-375

106. **Tao, L., Lefevre, M., Ricci, S., Saintigny, P., Callard, P., Perie, S., Lacave, R., Bernaudin, J.F., Lacau St Guilty, J. (2006)**
Detection of occult carcinomatous diffusion in lymph nodes from head and neck squamous cell carcinoma using real-time RT-PCR detection of cytokeratin 19 mRNA.
Br J Cancer 94(8): 1164-1169

107. **Thomas, G., Hashibe, M., Jacob, B.J., Ramadas, K., Mathew, B., Sankaranarayanan, R., Zhang, Z.F. (2003)**
Risk factors for multiple oral premalignant lesions.
Int J Cancer 107(2): 285-291

108. **Tseng, S.C.G., Jarvinen, M.J., Nelson, W.G., Huang, J.W., Woodcock-Mitchell, J., Sun, T.T. (1982)**
Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies.
Cell 30: 361-372

109. **Upasani, O.S., Vaidya, M.M., Bhisey, A.N. (2004)**
Database on monoclonal antibodies to cytokeratins.
Oral Oncol 40: 236-256

110. **Vaidya, M.M., Sawant, S.S., Borges, A.M., Naresh, N.K., Purandare, M.C., Bhisey, A.N. (2000)**
Cytokeratin expression in human fetal tongue and buccal mucosa.
J Biosci. 25(3): 235-242

111. **Vaidya, M.M., Sawant, S.S., Borges, A.M., Ogale, S.B., Bhisey, A.N. (1998)**
Cytokeratin expression in precancerous lesions of the human oral cavity.
Oral Oncol 34(4): 261-264

112. **van der Velden, L.A., Manni, J.J., Ramaekers, F.C., Kuijpers, W. (1999)**
Expression of intermediate filament proteins in benign lesions of the oral mucosa.
Eur Arch Otorhinolaryngol 256(10):514-519

-
- 113. van der Waal, I., Schepman, K.P., van der Meij, E.H. (2000)**
A modified classification and staging system for oral leukoplakia.
Oral Oncol 36(3): 264-266
- 114. Vigneswaran, N., Peters, K. P., Hornstein, O.P., Haneke, E. (1989):**
Comparison of cytokeratin, filaggrin and involucrin profiles in oral leukoplakias and squamous carcinomas.
J Oral Pathol Med 18: 377-390
- 115. von Arx, T. Koch, S., Hardt, N. (2002)**
Veränderungen der Mundschleimhaut
Schweiz Monatsschr Zahnmed 112: 326-329
- 116. Wild, G. A., Lobeck, H., Mischke, D. (1987)**
Keratinexpression im normalen und maligne transformierten Plattenepithel der Kopfdarmschleimhaut.
Laryngol Rhinol Otol 66: 615-621
- 117. Zöller, J.E., Scheer, M. (2000)**
Stand und Perspektiven der Chemoprävention bei oralen Plattenepithelkarzinomen und deren Vorläuferläsionen.
Mund Kiefer GesichtChir 4(Suppl. 1): 160-168
- 118. Xu, X.C., Lee, J.S., Lippman, S.M., Ro, J.Y., Hong, W.K., Lotan, R. (1995)**
Increased expression of cytokeratins CK8 and CK19 is associated with head and neck carcinogenesis.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 4(8): 871-876

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Personen danken, die mich beim Erstellen der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Als erstes danke ich natürlich meinen Eltern, die mich viele Jahre stets angespornt und gefördert haben. Ohne ihre Unterstützung wäre mir sicherlich vieles nicht, oder nur unter sehr erschwerten Bedingungen, möglich gewesen.

Weiterhin danke ich Professor Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz für die Überlassung des Themas und Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Fillies danke ich für seine freundschaftliche Hilfsbereitschaft und auch kritischen Diskussionen, die mich ständig vorangetrieben haben, diese Arbeit auch zum Abschluß zu bringen.

Ein besonderer Dank für die freundliche und engagierte Kooperation bei der Auswertung dieser Studie richtet sich an Professor Dr. med. Horst Bürger.

Zu guter Letzt danke ich allen Kollegen und Freunden für das Verständnis und die Unterstützung.

7. Lebenslauf

- 10.12.1972 geboren in Brake/Unterweser, Niedersachsen, ledig
Mutter: Annelore Jogschies, geb. Sloma
Vater: Richard Johann Jogschies
- 1979 - 1983 Besuch der Grundschule Nordenham / Friedrich-August-Hütte
- 1983 - 1985 Besuch der Orientierungsstufe Nordenham / Friedrich-August-Hütte
- 1985 - Mai.1992 Besuch des Gymnasiums Nordenham
- 30.05.1992 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
- 01.10.1992 - 30.09.1996 Wehrdienst im Marinesanitätsdienst mit Unteroffiziersausbildung und Ablegung der Prüfung zum Rettungssanitäter
- 01.04.1996 - 28.11.2001 Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen
- 20.02.1997 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
- 11.09.1998 Zahnärztliche Vorprüfung
- 28.11.2001 Zahnärztliche Prüfung
- 03.12.2001 Approbation als Zahnarzt
- 02.01.2002 - 30.09.2005 Tätigkeit als Truppenzahnarzt bei der Bundeswehr mit wechselnden Dienststellen im In- und Ausland
- seit 01.10.2005 Freistellung vom aktiven Dienst und Tätigkeit als Weiterbildungsassistent in der Poliklinik und Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Münster

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

ATA	automated arrayer
Arg	Arginin
ca.	circa
CD4	CD steht für: Cluster of differentiation; ist ein Erkennungsmolekül, z.B. an der Oberfläche von T-Helferzellen oder Monozyten
cDNA	complementary Desoxy Ribonuclein Acid
CHX	Cycloheximid
CIS	Carcinoma in situ
CK	Cytokeratine
Cox	Cyclooxygenase
CSA	Catalysed Signal Amplification
Cys	Cystein
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DNA	Desoxy Ribonuclein Acid
dest.	destilla
F-Actin	fibrilläres Actin
Fas L	Oberflächenprotein; L steht für Ligand
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G	histologisches Grading
GSH	Glutathion oder γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin
HCL	Chlorwasserstoffsäure
HE	Hämatoxillin-Eosin
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HPV	humaner Papilloma-Virus
ICH	Immunohistochemie
i.d.R.	in der Regel
IF	Intermediärfilamente
kDa	Kilo-Dalton
LDL	Low-Density-Lipoprotein
n	bezeichnet in der Statistik die Anzahl der Merkmalsausprägungen; Fallzahlen
neg.	negativ
NK	natural killer
ns	nicht signifikant

OED	orale Epitheldysplasie
OL	orale Leukoplakie
OSCC	oral squamous cell carcinoma
O.C.T	optimal cutting temperature
p53	p steht für Tumorsupressorprotein
p63	p steht für Tumorsupressorprotein
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pN+	positive Lymphknotenmetastase
pos.	positiv
PVL	Proliferative verruköse Leukoplakie
RNA	Ribonuclein Acid
RNA-ISH	Ribonuclein Acid in situ Hybridisierung
RT	reverse transcription
SCC	squamous cell carcinoma
Str.	Stratum
T	definierte Tumorgröße
TBST	Tris-Buffered Saline/Tween
TMA	Tissue Microarray
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNM	Tumorsize Nodus Metastasis
TRAIL	Tumor necrosis Factor related apoptosis-induced ligand
TSNA	tabakspezifischen N-Nitrosamine
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel