UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG EPPENDORF

Institut für Tumorbiologie

des Zentrums für Experimentelle Medizin

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Pantel

Untersuchung des CA-SSR I im Intron 1 des egfr-Gens in oralen Leukoplakien und Mundschleimhautkarzinomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Alena Vlachová

aus Prag, Tschechien

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 13.10.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. B. Brandt

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. E. Dikomey

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. T. Löning

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 8

1.1 Orale Leukoplakie 8

1.1.1 Definition und Stellenwert 8

1.1.2 Epidemiologie und Inzidenz 8

1.1.3 Ätiologie 9

1.1.4 Differentialdiagnosen 10

1.1.5 Lokalisation 10

1.1.6 Makro- und Mikroskopie 11

1.1.7 Malignität 12

1.1.8 Therapie 13

1.2 Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut 14

1.2.1 Epidemiologie und Inzidenz 14

1.2.2 Ätiologie und Kanzerogenense 15

1.2.3 Diagnose und Staging 17

1.2.4 Metastasierung 19

1.2.5 Therapie und Prävention 19

1.2.6 Prognose 20

1.3 Der Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) 21

1.3.1 Aufbau und Funktion 21

1.3.2 Rolle des EGFR in der Tumorgenese 22

1.3.3 Die Struktur des EGFR-Gens und die polymorphe CA-SSR I Sequenz im Intron I 22

2 Material und Methoden 26

2.1 Liste der Geräte, Materialien und Chemikalien 26

2.1.1 Geräte 26

2.1.2 Verbrauchsmaterial 27

2.1.3 Kits und fertige Lösungen 27
2.1.4 Chemikalien 28
2.1.5 Standardpuffer / Standardlösungen 29
2.1.6 Molekulargewichtsstandards....30
2.1.7 Verwendete Software....30
2.1.8 Verwendete Oligonukleotide 31
2.2 Material....32
2.2.1 Patienten mit oraler Leukoplakie....32
2.2.2 Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom....32
2.3 Methoden....34
2.3.1 Entparaffinieren....34
2.3.2 Mikrodissektion 34
2.3.3 DNA-Isolierung....34
2.3.3.1 DNA-Isolierung mit dem QIAmp DNA Micro Kit (QIAGEN)....34
2.3.3.2 DNA-Isolierung nach einem alternativen Protokoll 35
2.3.3.3 DNA-Isolierung mit dem AGOWA® mag Maxi DNA Isolation Kit 36
2.3.4 Whole Genome Amplification (WGA)....36
2.3.5 Aufreinigung von DNA mit NucleoSEQ Kit® 37
2.3.6 UV/VIS-Spektrometrie....37
2.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)....38
2.3.7.1 Mikrosatelliten-PCR zur Bestimmung der CA-SSR I Länge 39
2.3.7.2 Quantitative Real-time PCR 40
2.3.8 Agarosegelelektrophorese 49
2.3.9 Kapillarelektrophoretische Aufteilung von PCR-Produkten 49
3 Ergebnisse....51
3.1 CA-SSR I – Polymorphismus in oralen Leukoplakien....51

3.1.1 Zusammenhang zwischen der CA-SSR I Länge und der Lokalisation der Leukoplakie 54

3.1.2 CA-SSR I – Polymorphismus im Normalkolektiv der Population 55

3.1.3 Vergleich der Genotypen des Patientenkollektivs mit der Normalpopulation 57

3.2 Methodenvergleich für DNA-Isolierung 58

3.3 CA-SSR I – Polymorphismus in oralen Plattenepithelkarzinomen 60

3.3.1 Allelische Imbalanzen (AI) 62

4 Diskussion 66

4.1 CA-SSR I-Polymorphismus in oralen Leukoplakien 67

4.2 CA-SSR I – Polymorphismus in oralen Plattenepithelkarzinomen und deren Vorstufen 68

4.3 Genetische Aberration des CA-SSR I in frühen Stadien der oralen Kanzerogenese 69

4.4 Materialqualität und Gewebsheterogenität 71

4.5 Feldkanzerisierung 71

4.6 EGFR-Inhibitoren als Therapie und mögliche Chemoprävention 72

5 Zusammenfassung 74

6 Literaturverzeichnis 76

7 Danksagung 89

8 Lebenslauf 90

9 Eidesstattliche Erklärung 91

Abkürzungs- und Fremdwörterverzeichnis

Min.	Minute
Sek.	Sekunde
UV	Ultraviolett
V	Volt
Primer	Oligonukleotid, das bei der PCR als spezifischer Starter verwendet wird
Abs.	absolut
Annealing	Bindung von Primern an den Matrizenstrang, bzw. Bindung von einem komplementären Strang
Assay	Test
bp	Basenpaare
CA	Basenpaar aus Cytosin und Adenin
CA-SSR I	CA - *single sequence repeat* I
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Denaturierung	Auftrennung der DNA in ihre Einzelstränge
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
Elongation	Verlängerung des 3'-Ende des Primers durch eine DNA-Polymerase in einer PCR

Exon	kodierender Abschnitt eines Gens
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
Gen	Abschnitt der DNA, der für ein Protein kodiert
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
ITB	Institut für Tumorbiologie
Intron	nicht-kodierender Abschnitt eines Gens
Kit	Reagenziensystem
lat.	lateinisch
n.s.	nicht signifikant
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Repeat	Wiederholung einer kurzen Basensequenz der DNA
RNA	Ribonukleinsäure
SOD	Superoxiddismutase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
Template	DNA, die bei einer PCR als Vorlage zur Amplifikation dient
UKE	Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg
ü.N.	über Nacht

1 Einleitung

1.1 Orale Leukoplakie

1.1.1 Definition und Stellenwert

Die Leukoplakie wurde das erste Mal 1877 von dem ungarischen Dermatologen Schwimmer beschrieben. Die erste offizielle Definition laut der WHO (*world health organisation*) lautete: Leukoplakie ist ein weißer Fleck oder Plaque, der weder klinisch noch pathologisch einer bestimmten Erkrankung zuzuordnen ist (Kramer *et al.*, 1978). In den darauf folgenden Jahrzehnten wurden auch ätiologische und histologische Diagnosekriterien berücksichtigt, so dass heutzutage die Klassifikation aus dem Jahr 1997 gilt: „**Leukoplakie ist eine nicht abwischbare, überwiegend weiße Läsion der oralen Mukosa, die weder klinisch noch histopathologisch als eine andere definierbare Schleimhautveränderung charakterisiert werden kann**“ (Axell, 1984; Pindborg, 1997). Der Terminus ist grundsätzlich eine klinische Diagnose und darf keine histologische Bedeutung erfahren (Kramer *et al.*, 1978).

Die orale Leukoplakie stellt die häufigste epitheliale Präkanzerose der oralen Mundschleimhaut dar (van der Waal *et al.*, 1997). Wie in Kap. 1.2 beschrieben wird, sind die oralen Plattenepithelkarzinome mit agressivem Verlauf und einer schlechten Prognose assoziiert. Die Inspektion der Mundhöhle und die richtige Blickdiagnose durch den (Zahn)arzt kann schon in frühen Stadien das Schicksall des Patienten beeinflussen (Mittermayer, 1993).

1.1.2 Epidemiologie und Inzidenz

Durch die im Abschnitt 1.1.1 beschriebene Entwicklung der Definition der Leukoplakie muss man von unterschiedlichen epidemiologischen Daten ausgehen: vor dem Jahr 1978, zwischen 1978 und 1997 und Gegenwärtige. Die in verschiedenen Populationen unterschiedlich ausgeprägten Risikofaktoren wie Tabakkonsum beeinflussen die Prävalenz in unterschiedlichen ethnischen und geographischen Gruppen ebenso wie die Art der jeweiligen Studie. Folglich werden einige epidemiologische Studien aufgeführt:

Tabelle 1: Auswahl epidemiologischer Studien der oralen Leukoplakie (Axell, 1987; Bouquot & Gorlin, 1986; Hogewind & van der Waal, 1988; Mathew *et al.*, 2008; Mehta *et al.*, 1972; Reichart & Kohn, 1996).

Quelle	Land	Jahr	Prävalenz in %
Mehta	Indien	1972	0,7
Bouquot JE	USA	1986	2,9
Axéll T	Schweden	1987	3,6
Hogewind WF	Holland	1988	1,4
Reichart	Deutschland	1996	0,9
Mathew AL	Indien	2008	1,59

Männer sind in der Regel häufiger betroffen als Frauen. Die Prävalenz steigt mit dem Alter (Bouquot & Gorlin, 1986; Reichart & Kohn, 1996). Die Prävalenz bei den Deutschen liegt für Männer bei 2,3% und für Frauen bei 0,9% (Reichart, 2000).

1.1.3 Ätiologie

Obwohl die Leukoplakie-Definition eine genaue ätiologische Begründung ausschließt, sind physikalische und chemische Noxen bekannt, die mit einer Leukoplakie assoziiert sind.

Faktoren, die die Entstehung der Leukoplakie begünstigen, sind mit den Risikofaktoren für das Mundschleimhautkarzinom identisch. Die zwei Wichtigsten sind Tabak und Alkohol, die aufeinander synergistisch wirken. Tabak zählt in allen Konsumformen dazu: Rauchen, Kauen oder Schnupfen. Wobei das Rauchen das höchste relative Risiko für das Mundschleimhautkarzinom darstellt (Gupta *et al.*, 1996) (Kramer *et al.*, 1978). Verständlich ist, dass die Unterschiede in der Menge und der Art des Konsums das Risiko für eine Leukoplakie in verschiedenen Ländern und Kulturkreisen variieren lassen. Alkohol allein gilt nicht als kanzerogen, ein chronischer Verbrauch schädigt allerdings die Mundschleimhaut und erleichtert das Durchdringen der karzerogenen Stoffe des Tabaks (Moreno-Lopez *et al.*, 2000; Squier *et al.*, 1986). Das alleinige Tabak-Rauchen ist ein höherer Prädiktor als der allenige Alkoholkonsum (Jaber *et al.*, 1999).

Leukoplakie kann auch mit einer Infektion mit *Candida albicans* assoziiert sein. Es wurde sogar über ein erhöhtes Transformationsrisiko der Leukoplakien berichtet

(Hornstein *et al.*, 1979). Auch die virale Infektion mit HPV (*human papilloma virus*) oder das Immunschwäche-Syndrom AIDS werden diskutiert. Wobei es unklar bleibt, ob diese Assoziationen nicht auf eine allgemeine Veränderung des Immunstatus der Patienten zurückzuführen sind.

Die meisten Leukoplakien sind allerdings sogenannten idiopathischen Ursprungs, bei diesen lässt sich keine genaue Aussage über einen Risiko- oder einen Kofaktor machen.

1.1.4 Differentialdiagnosen

Die Diagnose Leukoplakie erfolgt nach dem Außschlussprinzip, was bedeutet, dass andere durch weiße orale Schleimhautveränderungen bemerkbare Erkrankungen erst ausgeschlossen werden müssen. Zu den wichtigsten Differentialdiagnosen gehören der Lichen planus, der Lupus erythematodes, die Candidiasis, das Leuködem, die unspezifische Keratosis oder die Leukokerratosis nicotini palati (Mittermayer, 1993).

Tabelle 2: Die wichtigsten Differentialdiagnosen der Leukoplakie. Modifiziert nach Mittermayer (1993).

	Farbe	Abwischbarkeit	Basalzellen	Dysplasie
Leukoplakie	unterschiedlich weiße Flecken	nein	vermehrt	möglich
Lichen planus	weiße Streifen und Netze	nein	zerstört	keine
Lupus erythematodes	weiße Streifen mit rotem Grund	nein	zerstört	keine
Candidiasis	milchig weiß, roter Grund	ja	oft zerstört	keine
Keratosis	weiße Flecken	nein	normal	keine
Leukokeratosis nicotini palati	wie, weiß-graue eingedellte Herde	nein	normal	keine

1.1.5 Lokalisation

Die häufigsten Lokalisationen sind die Wangenschleimhaut, die Kieferschleimhaut und die Unterlippe. Zu den so genannten „*high-risk*“ Zonen gehören der Zungenrand, der Mundboden und die Unterlippe. In diesen entstehen häufiger Dysplasien bzw. Neoplasien (Waldron & Shafer, 1975). Andere Daten zeigten, dass speziell in den

westlichen Populationen, wo häufig Zigarettenrauchen und gleichzeitiges Alkoholtrinken Hauptrisikofaktoren sind, die „*high-risk*“ Zonen folgende sind: Mundboden, ventro-laterale Zunge und das Gebiet um den weichen Gaumen (Boffetta *et al.*, 1992; Mashberg & Meyers, 1976).

1.1.6 Makro- und Mikroskopie

Nach dem klinischen Erscheinungsbild werden Leukoplakien nach Pindborg, JJ (1997) in „plane-homogene“ und gefleckte-inhomogene Leukoplakien eingeteilt. Die gefleckte-inhomogene Leukoplakie weist eine viel schlechtere Prognose auf, wenn sie unbehandelt (chirurgische Exzision) bleibt. Die Entartungsrate innerhalb von 5 Jahren ist bei der Leukoplakia verucosa 24%, bei der Leukoplakia erosiva 38%. Weiteres siehe auch Tabelle 3 (Mittermayer, 1993; Pindborg, 1997).

Tabelle 3: Einteilung der Leukoplakie nach den makroskopischen Kriterien und die Malignität der jeweiligen Formen (Mittermayer, 1993; Pindborg, 1997).

Leukoplakie	plane (homogene)	gefleckte (inhomogene)
lat. Bezeichnung	Leukoplakia simplex	Leukoplakia verucosa, Leukoplakia erosiva
Morphologie	flach oder leicht erhaben glatt-spiegelnd oder stumpf-matt	rauig, körnig bis zottig unscharf begrenzt
Farbe	grauweiß bis perlweiß, gelegentlich bräunlich verfärbt (Tabakkonsum)	
Entartungsrate innerhalb 5 Jahren	geringe Malignitätsrate, etwa 3%	hohe Malignitätsrate, 24 bzw. 38%
Prognose	günstige Prognose	ohne operative Maßnahme prognostisch ungünstig

Die WHO hat 2005 eine neue histologische Klassifikation der Risikoläsionen der oralen Mukosa eingeführt. Im Gegensatz zu den vorherigen Termini wie Dysplasien, Präkanzerosen oder prämaligne Läsionen wurde eine einheitliche Bezeichnung „epitheliale Präkursorläsionen“ festgelegt. Die WHO verzichtet auch auf die genaue o.g. Definition der Leukoplakie (ebenso bei der Erythroplakie), behält aber die wesentlichen histologischen Kriterien wie Störungen der Plattenepithelarchitektur oder Zellatypien bei. Das Schema unterscheidet wie die älteren Klassifikationen eine Plattenepithelhyperplasie, geringgradige, mittelgradige und hochgradige Dysplasie und Carcinoma in situ, allerdings mit der Bezeichnung „squamöse intraepitheliale

Neoplasie“ (s. Tabelle 4). Die Begründung seitens der WHO ist die Mehrdeutigkeit des Begriffs „Dysplasie“. Die epitheliale Dysplasie ist sowohl eine Bezeichnung für die Atypie in Vorläuferläsionen als auch für die Zellveränderung eines bestehenden Karzinoms (Gale N, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Histopathologie des Kollektivs mit oralen Plattenepithelkarzinomen (s. 2.2.2) nach der neuen Einteilung durchgeführt. Die Leukoplakienpräparte (s. 2.2.1) sind noch nach der alten Klassifikation begutachtet worden. Daher werden in der vorliegenden Arbeit beide Klassifikationen im Vergleich herangezogen.

Tabelle 4: Histologische Merkmale der Stadieneinteilung der oralen Präkursorläsionen nach der WHO-Klassifikation 2005

PEH	Plattenepithelhyperplasie, Zunahme der Zellzahl ohne zytologische oder strukturelle Atypie
SIN I	basale Zellhyperplasie mit normaler Schichtung des Plattenepithels, entsprechend der geringgradigen Dysplasie
SIN II	Übergreifen der Atypien auf mittleres Drittel des Epithels. Hyperchromasie der Zellkerne, pathologische Kern-Plasma-Relation und Anisomorphie sichtbar, entsprechend einer moderaten Dysplasie
SIN III	ausgeprägte zytologische Atypien und architektonische Störung im gesamten Epithel, typische / atypische Mitosen gut sichtbar, entsprechend einer schweren Dysplasie und dem Carcinoma in situ

1.1.7 Malignität

Die orale Leukoplakie wurde als bekannte Präkursorläsion für maligne Transformation bereits histopathologisch auf Dysplasien untersucht. Eine große retrospektive Studie von Waldron und Shafer mit fast 3 300 Biopsien zeigte in 12,2 % der Fälle eine milde bis mäßige Dysplasie, 4,6 % wiesen schwere Dysplasie oder Carcinoma in situ nach und in 3,1 % der Fälle ein Mundschleimhautkarzinom (Waldron & Shafer, 1975).

Burkhardt und Seifert (1977) untersuchten 656 Leukoplakiefälle. Geringgradige Dysplasie wurde in 74 % der Fälle, eine moderate in 17 % und eine schwere

Dysplasie bzw. Carcinoma in situ in 9% der Fälle gefunden (Burkhardt & Seifert, 1977). Bánóczy untersuchte in einer Follow-up-Studie 670 Patienten mit Leukoplakie. 24% der Leukoplakien wiesen eine Dysplasie auf, 13% davon haben sich zum Karzinom entwickelt (6% aller Leukoplakien) (Banoczy, 1977).

In der folgenden Tabelle sind einige Studien aufgeführt, die die maligne Transformation der Leukoplakie untersucht haben:

Tabelle 5: Malignität der Leukoplakie, ausgewählte Studien (Banoczy, 1977; Kramer, 1969; Lind, 1987; Pindborg *et al.*, 1968; Roed-Petersen, 1971; Schepman *et al.*, 1998; Silverman, 1968; Silverman *et al.*, 1984)

Quelle	Land	Jahr	maligne Transformation in %
Silverman	USA	1968	6,0
Pindborg et *al*.	Dänemark	1968	4,4
Kramer	England	1969	4,8
Roed-Petersen	Dänemark	1971	3,6
Bánóczy	Ungarn	1977	6,0
Silverman et *al*.	USA	1984	17,5
Lind	Norwegen	1987	8,9
Schepman et *al*.	Holland	1998	12,0

Die Unterschiede in der Häufigkeit der Malignität sind zum einen auf die schon erwähnte nicht einheitliche Definition der Leukoplakie und die geographischen Unterschiede der beeinflussenden Risikofaktoren zurückzuführen. Ablesbar ist auch ein Trend der Zunahme der Malignität in den jüngeren Studien.

1.1.8 Therapie

Die WHO empfielt Leukoplakien zu biopsieren, bei geringer Dysplasie regelmäßig zu kontrolieren und bei Veränderungen die Biopsie zu wiederholen. Leukoplakien mit stärkeren Dysplasien sollten behandelt werden (Kramer *et al.*, 1978).

Die therapeutischen Ansätze sind vielfältig. Primär sollten die Differentialdiagnosen abgeklärt und die möglichen ursächlichen Faktoren (Rauchen, Alkohol) beseitigt werden. Die chirurgische Entfernung ist die Behandlung der Wahl, stellt allerdings keine sichere Prävention vor Rezidiven oder der malignen Entartung dar (Dunsche, 1992; Silverman *et al.*, 1984; Sudbo *et al.*, 2004). Die CO_2-Laserexzision wird zur

Zeit als die effektivste Therapiemethode dargestellt, aber auch hier liegen die Rezidivraten zwischen 8 und 22% (Chiesa *et al.*, 1990; Frame, 1985; Schoelch *et al.*, 1999). Ähnlich zeigen die Alternativtherapien wie Kryochirurgie, Phototherapie oder Therapie mit Retinoiden, beta-Karotiden bzw. mit Bleomycin keine deutlich besseren Erfolge. Vitamin A und die Retinoide können zwar als Prävention des Karzinoms gesehen werden (Lippman *et al.*, 1993), die Nachteile der aufgeführten Alternativtherapien bestehen allerdings in starken Nebenwirkungen, damit zusammenhängende *Non-compliance* der Patienten und ebenfalls hohe Rezidivraten (Epstein *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 1986; Piattelli *et al.*, 1999; Sankaranarayanan *et al.*, 1997; Stich *et al.*, 1988).

Zusammengefasst ist die Etablierung einer effizienten chirurgischen und/oder medikamentösen Therapie schwierig und begrenzt. Aufgrund der hohen Rezidivraten ist eine lebenslange und engmaschige Nachsorge notwendig.

Untersuchungen auf der molekularen Ebene, wie die des EGFR können die Patienten in eine Hochrisiko- und eine Niedrigrisikogruppe aufteilen und mögliche neue Therapiekonzepte (z.B. EGFR-Inhibitoren) zum Einsatz bringen.

1.2 Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut

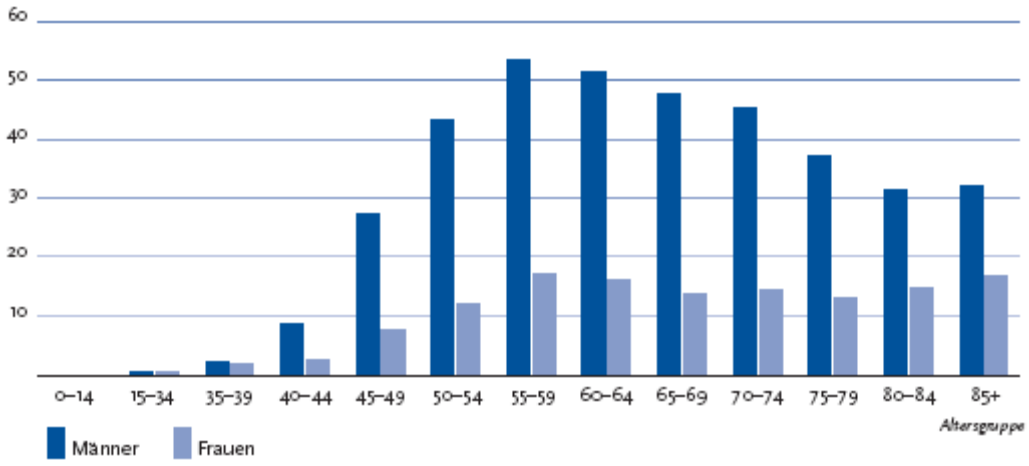
1.2.1 Epidemiologie und Inzidenz

Das orale Plattenepithelkarzinom (*oral squamous cell carcinoma;* OSCC) gehört zu den Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches (OSCC des Pharynx, Larynx und der Mundhöhle). Die malignen Tumore des Kopf-Hals Bereiches sind selten, stellen aber eine sehr große therapeutische Herausforderung dar. In den letzten 20 Jahren ist die Prognose unverändert geblieben.

Männer erkranken fast drei Mal häufiger wie Frauen. Laut der Schätzungen des Robert-Koch-Instituts (RKI) aus dem Jahr 2006 liegt die Neuerkrankungsrate in Deutschland bei 7 800 Männern und 2 600 Frauen pro Jahr. Bei den Männern liegen die Tumore des Mundes und Rachens insgesamt an der siebten Stelle (bei Frauen an 15. Stelle) aller Malignome und sind für 3,1 % der durch Krebs bedingten

Sterbefälle verantwortlich (1,0% bei den Frauen). Das mittlere Erkrankungsalter liegt für die Männer bei 61 Jahren, für die Frauen bei 63 Jahren (Wolf Ulrich Batzler *et al.*, 6. überarbeitete Auflage, 2008).

Abbildung 1: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz von Malignomen des Mund- und Rachenbereiches in Deutschland 2004. Neuerkrankungen pro 100 000 (Wolf Ulrich Batzler *et al.*, 6. überarbeitete Auflage, 2008).



1.2.2 Ätiologie und Kanzerogenense

Die WHO gründete 1967 in Koppenhagen ein Zentrum für orale Tumore und deren Krebsvorstufen (*Collaborating Centre for Oral Cancer and Pre-cancer*; unter Leitung von Pindborg, JJ.) und unterscheidet seit 1972 an der Mundschleimhaut Präkanzerosen und so genannte präkanzerose Bedingungen. Eine Präkanzerose ist eine Veränderung, aufgrund derer häufiger ein Karzinom entsteht, hierzu gehört auch die Leukoplakie. Bei präkanzerosen Bedingungen besteht ein erhöhtes Risiko für ein Karzinom. Wichtigste und häufigste präkanzerose Bedingung ist der orale Lichen planus (Axell, 1984; Kramer *et al.*, 1978; Pindborg, 1997; Pindborg, 1980).

Tabelle 6 Präkanzerosen und präkanzerose Bedingungen der Mundschleimhaut nach der WHO-Definition.

Präkanzerosen	**präkanzerose Bedingungen**
Erythroplakie	oraler Lichen planus
Leukoplakie	Plummer-Vinson-Syndrom
palatinale Keratose (bei "*reverse smoking*")	Syphilis
	Lupus ersthematodes discoides
	mit HIV-Infektion assozzierte und mit Immunsupression eingehende Zustände

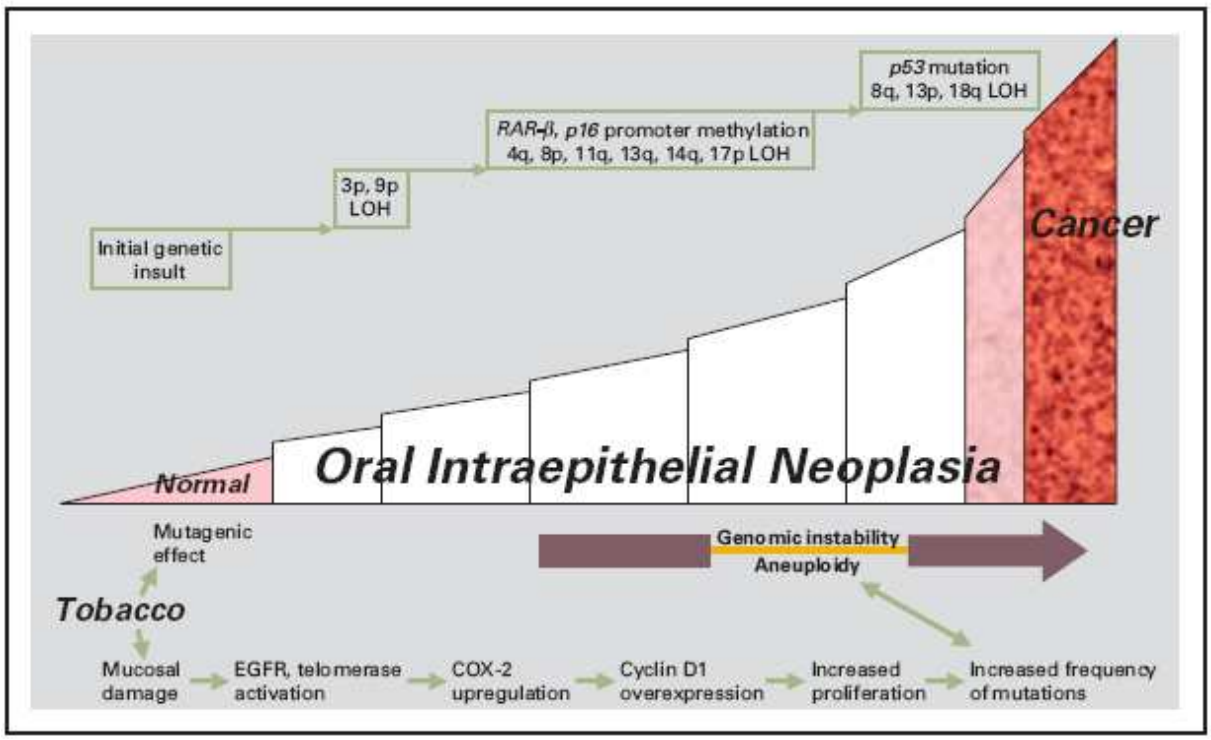
Es ist bislang nicht klar, wie viele orale Karzinome auf dem Boden einer präkanzerosen Läsion und wie viele aus einer offenbar normalen Mukosa entstehen. Mehrere Studien zeigten, dass 16 bis 62 % der oralen Karzinome zum Zeitpunkt der Diagnose mit einer Leukoplakie assoziiert sind (Bouquot *et al.*, 1988; Gundlach, 1992; Scheifele & Reichart, 1998; Schepman *et al.*, 1999). Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass die meisten Karzinome aus einer intakten Mukosa entstehen (Cowan *et al.*, 2001).

Einige Studien beschreiben häufigere Karzinome auf der Grundlage einer Leukoplakie bei Nichtrauchern als bei Rauchern (Banoczy, 1977; Einhorn & Wersall, 1967; Roed-Petersen, 1971; Silverman *et al.*, 1984). Diese Erkentnisse sollen nicht die wichtige Rolle des Tabaks in der Kanzerogenese der oralen Tumoren untergraben, sie deuten aber an, dass die Kanzerogenese eine „*Multiple Step*"-Entwicklung ist. Ein Progressionsmodel entwickelt auf der Grundlage der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen wurde von Lippman et *al.* 2005 vorgestellt. Dieser beschreibt die genetische Evolution von der Hyperplasie über die OIN bis hin zum invasiven Karzinom. In der Abbildung 2 sind die genetischen und epigenetischen Alterationen dargestellt. Am Anfang spielt die Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR und die Telomerase-Aktivierung eine Rolle. Letztere verhindert die Verkürzung der Telomere (ein die Apoptose einleitender Schritt) und begünstigt somit die Weitergabe der Mutationen. Zusätzlich finden sich Störungen in Tumorsuppressorgenen wie FHIT (*Loss of Heterozygosity* [LOH] in der

Chromosomenregion 3p14), p16 (Hypermethylierung des Promotors oder LOH in 9p21) und p53 (Inaktivierung oder Mutation, Chromosom 17p). Die Überexpression von Cyclin D1 und der COX-2 (Cyclooxygenase 2) sind auch in der Kanzerogenese involviert.

Das EGFR und die COX-2 stellen die Basis der neuen gezielten Therapie und Prävention dar (Lippman *et al.*, 2005).

Abbildung 2: Genetische Evolution der oralen Kanzerogenese von normaler Mundschleimhaut über die OIN bis zum Mundschleimhautkarzinom. Aus Lippman, S.M et *al.* J Clin Oncol; 2005



1.2.3 Diagnose und Staging

Für die frühzeitige Diagnosestellung der oralen Leukoplakie bzw. eines oralen Karzinoms ist die primäre Inspektion durch einen Arzt bzw. Zahnarzt am wichtigsten. Durch eine Inspektion lassen sich wahrscheinlich alle Karzinome diagnostizieren (Reibel, 2000). Allerdings sind die meisten Karzinome lange asymptomatisch und bei fehlenden Beschwerden wird oft keine Untersuchung durchgeführt bzw. nicht von den Patienten angestrebt. Ferner sind kleine symptomlose Tumore leicht zu übersehen. Bei der Anamnese ist ein besonderes Augenmerk auf das individuelle

Risikoprofil (Rauchen, Alkoholkonsum) des Patienten zu legen. Bei diesen Risikopatienten ist eine Vitalfärbung mit Toluidinblau empfohlen, was die Detektionsrate erhöhen kann (Warnakulasuriya *et al.*, 1998).

Das Staging der Mundschleimhautkarzinome ist für das Etablieren einer gezielten Therapie und das Ermitteln der Prognose von großer Bedeutung. Die Tumore werden nach der üblichen TNM-Klassifikation eingeteilt: T = Größe des Primärtumors, N = Befall der regionalen Lymphknoten, M = Fernmetastasen.

Tabelle 7: TNM Staging der oralen Mundschleimhautkarzinome. Nach AJCC Manual for Staging of Cancer, 1997

Primärtumor (T)	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, z.B. durch kortikale Knochen hindurch, in Zunge oder Halshaut
Lymphknotenbefall (N)	
Nx	ob ein regionaler Lymphknotenbefall vorliegt, kann nicht beurteilt werden
N0	es liegen keine regionalen Lymphknotenmetastasen vor
N1	Metastase in einem einzelnen, ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger im größten Durchmesser
N2	Metastase in einem einzelnen, ipsilateralen Lymphknoten, mehr als 3 cm und weniger als 6 cm im größten Durchmesser, oder aber multipler ipsilateraler Lymphknotenbefall oder aber bilateraler oder kontralateraler Lymphknotenbefall, in keinem Fall mehr als 6 cm im größten Durchmesser
N2a	Metastase in einem einzelnen ipsilateralen Lymphknoten von mehr als 3 cm und weniger 6 cm im größten Durchmesser
N2b	Metastase in mehreren ipsilateralen Lymphknoten, keiner davon mehr als 6 cm im größten Durchmesser
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keine größer als 6 cm in ihrem größten Durchmesser
N3	Metastase in einem Lymphknoten von mehr als 6 cm Größe im größten Durchmesser
Fernmetastasen (M)	
Mx	die Anwesenheit von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	es liegen keine Metastasen vor
M1	es liegen Metastasen vor

1.2.4 Metastasierung

Die Mundhöhlenkarzinome breiten sich erst in die umliegenden Strukturen wie den kortikalen Knochen, die Skelettmuskulatur der Zunge, die Kieferhöhle und die Haut aus.

Mehr als 30 % der Patienten haben schon bei einer elektiven Resektion (klinisches Stadium N0) Metastasen in den Halslymphknoten (Shah *et al.*, 1990). Die Zunge, einer der „*high-risk*“-Zonen, ist sehr gut durchblutet und hat zahlreiche Lymphabflüsse, so dass bei Zungenplattenepithelkarzinomen 42% der Patienten Halslymphknotenmetastasen aufweisen (Ho *et al.*, 1992).

Die Halslymphknoten zählen zu den regionalen Lymphknoten. Der Befall anderer Lymphknotenregionen gehört zur Fernmetastasierung. Außerdem finden sich Metastasen häufig in der Lunge, der Pleura, seltener in der Leber.

1.2.5 Therapie und Prävention

Die Therapie der Wahl bei den Mundhöhlenkarzinomen ist eine Totalresektion der Läsion gegebenenfalls mit anschließender Bestrahlung. Eine anschließende Radiotherapie ist bei Stadien T4 und N2-3, nach Lymphknotenkapselruptur oder Lymphgefäßinvasion indiziert. Eine Chemotherapie wird alleine nur in palliativer Absicht eingesetzt. Es haben sich mehrere Substanzen als wirksam erwiesen, die höchsten Remissionsraten haben die Kombinations-Chemotherapie mit Cisplatin bzw. Carboplatin und einer 5-Fluorouracil-Dauerinfusion. Das Konzept der Therapie ist sehr umfangreich, im Folgenden soll auf die neuen molekular-gezielten Therapien und Präventionsmaßnahmen eingegangen werden.

Mehrere potentiell präventive Substanzen greifen in die molekularen Mechanismen der oralen Kanzerogenese ein und sind somit vielversprechend für die Prävention der oralen Tumore. Retionide stehen im Glauben die Kanzerogenese zu inhibieren, indem sie mit intranukleären Retinsäurerezeptoren interagieren. Ergebnisse zeigten Zurückbildung von Leukoplakien und Prävention der oralen Karzinome, die aus der Leukoplakie entstehen (Lippman *et al.*, 1993; Lotan *et al.*, 1995). Der erhebliche Nachteil der Retionoide besteht in den starken Nebenwirkungen und der beinahe toxischen Wirkung bei klinisch relevanten Dosen. Andere Ansätze sind die in 1.2.2

genannten COX-2 und EGFR. Die COX-2 ist selektiv überexprimiert in dysplastischen Läsionen der Mundhöhle und in den oralen Karzinomen, aber nicht in der normalen nicht dysplastischen Mukosa (Sudbo *et al.*, 2003). Zu den COX-2-Inhibitoren zählen z.B. die nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID). Das EGFR ist überexprimiert in 80-100% der oralen prämalignen Läsionen und der Karzinome (Grandis & Tweardy, 1993; Shin *et al.*, 1994). Die Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) stellen eine der wichtigsten gezielten Therapien in den Tumoren des Kopf- und Halsbereichs (HNSCC) dar (Pomerantz & Grandis, 2004). Studien zeigten einen steigenden Erfolg in der Hemmung des Wachstums mit einer Kombinationstherapie der COX-2 Inhibitoren und den TKIs, auch für die HNSCC (Chen *et al.*, 2004; Torrance *et al.*, 2000).

1.2.6 Prognose

Die Prognose ist in den letzten 20 Jahren trotz ständig weiterentwickelten diagnostischen und therapeutischen Verfahren unverändert ungünstig geblieben. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 40 – 60% (Silverman, 2001). In Deutschland beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für die Mundhöhlen- und Rachenkarzinome 47 % bei Männern und 55 % bei Frauen (Wolf Ulrich Batzler *et al.*, 6. überarbeitete Auflage, 2008). Die Prognose der Patienten hängt entscheidend vom Lymphknotenstatus ab. Ab dem Stadium N1 reduziert sich die Überlebenswahrscheinlichkeit erheblich. Ein anderer Aspekt sind die häufigen Rezidive trotz kurativer Resektionen, hier sind molekulare Untersuchungen des entnommenen Gewebes auf Parameter, die Rezidive begünstigen, vorzunehmen.

An dieser Stelle sei noch mal darauf hingewiesen, dass der wichtigste Aspekt für die Senkung der Mortalität und Morbidität der oralen Karzinome die frühzeitige Erkennung der Läsionen durch einen erfahrenen Arzt bzw. Zahnarzt ist.

1.3 Der Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

1.3.1 Aufbau und Funktion

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) gehört zu der Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Die RTKs sind transmembrane, enzym-gekoppelte Rezeptoren. Das EGFR (erbB-1) gehört in die erbB-Familie. Diese umfasst noch 3 weitere RTKs: erbB-2 (oder Her2 oder Her-neu), erbB-3 (Her3) und erbB-4 (Her4).

Der 170 kDa (Chaffanet *et al.*, 1992) schwere EGFR ist aus einer extrazellulären ligandbindenden Domäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität aufgebaut. Beide Domänen sind durch eine hydrophobe Sequenz (transmembranäre Domäne) miteinander verbunden (Ullrich *et al.*, 1984). Die ligandenbindende Domäne besteht aus 612 Aminosäuren (Carpenter, 1987) und wird in 4 Bereiche aufgeteilt: zwei cysteinreiche Regionen, ein Bereich, der diese trennt und ein N-Terminus. Die Transmembranregion setzt sich aus 23 hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren zusammen und dient der Verankerung in der Membran. Die intrazelluläre Domäne umfasst 542 Aminosäuren und enthält eine Tyrosinkinaseregion. An diese binden das ATP und das zu phosphorylierende Substrat (Cadena & Gill, 1992).

Für das EGFR sind sechs direkte Liganden bekannt: EGF (epidermal growth factor), TGF (transforming *growth factor*), Amphiregulin, Betacellulin, Epiregulin und das Heparin-bindende EGF(Alroy & Yarden, 1997; Carpenter, 1999). Die Bindung eines der Liganden bewirkt eine Dimerisierung des Rezeptors mit einem anderen derselben Familie (Homodimere oder Heterodimere), wodurch die zytosolischen Tyrosinkinase-Domänen aktiviert werden, was eine gegenseitige Autophosphorylierung der Rezeptoren zur Folge hat(Carpenter, 1999).

Die Aktivierung der Kinasedomäne führt zur Phosphorylierung wichtiger intrazellulärer Proteine, die das Signal weiter übertragen was schließlich zu einer Proliferation oder Differenzierung der Zelle führt. In den meisten Zelltypen finden sich $2x10^4$ bis $2x10^5$ Rezeptoren pro Zelle.

1.3.2 Rolle des EGFR in der Tumorgenese

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression verschiedener Tumore. Zahlreiche Studien haben eine Überexpression bzw. eine Amplifikation des EGFR (erbB-1) in verschiedenen Krebsarten wie ovarialen Karzinomen, Adenokarzinomen der Lunge, ösophagealen Tumoren, Mammakarzinomen und Hirntumoren nachgewiesen (Awaya *et al.*, 2005; Brandt *et al.*, 1995; Chaffanet *et al.*, 1992; Dimova *et al.*, 2006; Hollstein *et al.*, 1988; Ro *et al.*, 1988). Im Plattenepithelkarzinom erreicht die Amplifikation des EGFRs das 2- bis 50-fache wie in den normalen epidermalen Keratinocyten (Yamamoto *et al.*, 1986). Das Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut weißt auch EGFR Überexpression und Amplifikation nach (Rikimaru *et al.*, 1992; Saranath *et al.*, 1992; Shintani *et al.*, 1999).

Die Folge einer Amplifikation und Überexpression ist eine gesteigerte Proliferation, Angiogenese und Metastasierung, sowie eine verminderte Apoptoserate und eine Assoziation mit einer schlechteren Prognose (Gullick *et al.*, 1986; Klijn *et al.*, 1994). Es wurden 3 Hauptsignalwege identifiziert, die die Entstehung und Progression von Krebs unterstützen (Brandt *et al.*, 2006):

1. Signalweg über die Phosphatidylinositol-3-Kinase, Aktivierung von Akt und Unterdrückung der Apoptose.
2. Weg über Grb2 und Sos, der zur Aktivierung von $p21^{ras}$ führt, wodurch der Zellzyklus angetrieben wird.
3. Signalweg über die Phosphorylierung der Phospholipase C-γ1, die zur PIP2-abhängingen Reorganisation des Aktins führt.

1.3.3 Die Struktur des EGFR-Gens und die polymorphe CA-SSR I Sequenz im Intron I

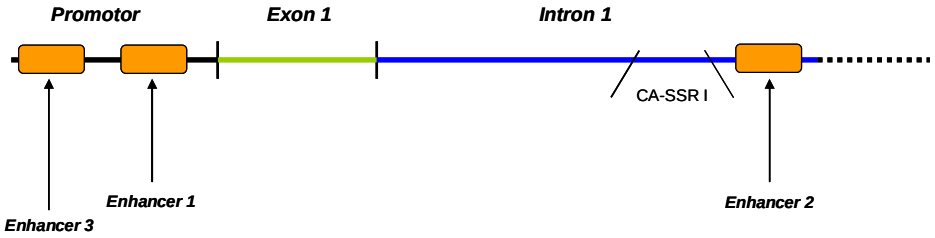
Das Gen des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert. Der Rezeptor wird von 26 Exonen kodiert. Die einzelnen Exone lassen sich wiederum den Domänen des EGFRs zuordnen. Die Exons 2-14 kodieren die

extrazelluläre Domäne, das Exon 15 die Transmembran-Domäne, die Exons 16-21 die Tyrosinkinase-Domäne und die Exons 22-26 den carboxyterminalen Bereich (Haley *et al.*, 1987).

Die 5'-Region des EGFR-Gens bildet eine regulatorische Sequenz. Diese besteht aus einem Promotor (CG-reich), der keine für Promotoren bekannten Sequenzen wie TATA oder CAAT besitzt. Deswegen kann eine Transkription an mehreren Initiationsstellen innerhalb des Promotors beginnen (Ishii *et al.*, 1985). In unmittelbarer Umgebung des Promotors befindet sich ein Enhancer (*Enhancer 1*) (Hudson *et al.*, 1990). Zwei weitere, die miteinander kooperieren, sind ein *Downstream*-Enhancer (*Enhancer 2*) im Intron 1, welcher nur in Anwesenheit eines *Upstream*-Enhancers (*Enhancer 3*), der sich vor dem Promotor befindet, funktioniert. (Maekawa *et al.*, 1989) Aufgrund dessen kann eine komplexe Regulation des Gens angenommen werden. Diese Vermutung wird durch die Erkenntnis verstärkt, dass es einen Transkriptionsfaktor gibt, der an multiplen Stellen der 5'-Region bindet. Die basale Transkription wird durch den Transkriptionsfaktor Sp1 vermittelt (Kageyama *et al.*, 1988). Zusätzlich wurde ein funktioneller Single-Nucleotid-Polymorphismus in der Sp1-Erkennungsstelle innerhalb des Promotors entdeckt. Ein Tausch der Basen (T statt G) auf der Position -216 erhöht die Aktivität des Promotors um 30% (Liu *et al.*, 2005).

Für die vorliegende Arbeit ist vor allem das 150 kBp lange Intron 1 von Bedeutung. Für einige andere Gene wurde eine wichtige regulatorische Rolle des Intron 1 beschrieben, solche besitzt es auch im EGFR.

Abbildung 3: Partielle Struktur des 5'-Endes des EGFR-Gens. In dem Promotor befinden sich mehrere Transkriptionsstartstellen (nicht dargestellt). Das Intron 1 besteht aus 150 kBp (das gesamte Gen hat 177 kBp) und beinhaltet die polymorphe Struktur CA-SSR I.



Wie in Abbildung 3 zu sehen, befindet sich im Intron 1 in der Nähe des *Downstream*-Enhancers eine polymorphe Struktur (*simple sequence repeat*-SSR) mit physiologisch 14-21 CA-Dinukleotiden (weiter auch CA-SSR I und CA-Repeat). *In vitro* zeigte sich eine abnehmende Transkriptionsaktivität des EGFR mit steigender Anzahl an CA-Repeats (Gebhardt *et al.*, 1999). *In vivo* projiziert sich dieses Phänomen auf die Proteinexpression. Buerger et al. berichteten über eine erhöhte EGFR-Expression bei heterozygoten Mammakarzinomen mit einem kürzeren CA-Repeat (<17) im Intron 1als bei Tumoren mit einem langen CA-Repeat (Buerger *et al.*, 2000).

Die Expression wird vermutlich schon auf der Transkriptionsebene reguliert. Hierzu wurde folgendes Model etabliert: Die Struktur um den CA-SSR I ist auffallend biegsam. Je länger der CA-SSR I desto biegsamer. Dadurch werden die Enhancer 1 und 2 räumlich nah aneinander gebracht. Diese könnten dann mit einem Repressor-Protein miteinander verbunden werden und somit eine Sekundärstruktur z.B. eine Schleifenbildung erzwingen. Ein längeres CA-SSR I begünstigt die Biegung und die Bindung des Repressor-Proteins und dadurch die Hemmung der Transkription (Gebhardt *et al.*, 2000). Durch einen möglichen Verlust eines Allels oder eine Amplifikation kommt es zum Ungleichgewicht der Allele, auch „*allelic imbalance*" genannt.

Es wurde nachgewiesen, dass bei Patienten mit einer erhöhten Expression des EGFR häufiger eine Amplifikation des CA SSR I vorliegt (18,7%) als eine Amplifikation des gesamten Gens (12,5%) (Kersting *et al.*, 2004). Als Beispiel gilt das

Mammakarzinom, wo das CA-SSR I ein häufiger Ort der Mutationen ist (Tidow *et al.*, 2003). Aus einer Population von 103 Patientinnen mit Mammakarzinom weisen 90% mindestens ein kürzeres Allel auf (Buerger *et al.*, 2000). Bei Kopf- und Halstumoren mit mindestens einem Allel mit 16 CA-Repeats wurde gezeigt, dass je länger das zweite Allel ist, desto niedriger ist die EGFR-Expression Dementsprechend höher ist diese bei kürzeren Allelen.

2 Material und Methoden

2.1 Liste der Geräte, Materialien und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Geräteliste	**Hersteller**
Lichtmikroskop	Wilowert S Helmut Hund GmbH,Wetzlar
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Applied Biosystems 3100 PCR Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
Klebefolie, optisch klar	SARSTEDT, Nümbrecht
Biofuge *pico*	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Mikro 20	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
VWR Galaxy Mini Zentrifuge	VWR, Darmstadt
Vortex Genie 2	Scientifis Industries, New York, USA
Wasserbad GFL-1012	GFL, Großburgwedel
ND-1000 Spectophotometer	NanoDrop, Washington, USA
Eppendorf PCR-Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
research Pipetten (0,1-2,5 µl / 0,5-10 µl / 2-20 µl / 20-200 µl / 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg
MicroAmp™ optical 96-Well plate reaction plate	Applied Biosystems, Darmstadt
Optisch klare Klebefolie	SARSTEDT, Nümbrecht
Multiply™ µStrip Pro 8er Kette	SARSTEDT, Nümbrecht
Thin-Wall Tube 0,2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
MicroAmp™ 8-cap strip	Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.3 Kits und fertige Lösungen

Kit / fertige Lösung	Hersteller
QIAamp DNA Micro Kit (50)	Qiagen, Hilden
NucleoSEQ	Macherey-Nagel, Düren
qPCR Mastermix	Eurogentec, Köln
GenomiPhi DNA Amplification Kit	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
AGOWA® mag Maxi DNA Isolation Kit	AGOWA, Berlin
6 x loading dye solution	Fermentas, St. Leon-Roth
10 x PCR Gold Buffer	Applied Biosystems, Darmstadt
$MgCl_2$	Applied Biosystems, Darmstadt
AmpliTaq Gold™	Applied Biosystems, Darmstadt
ROX 500	Applied Biosystems, Darmstadt
ATL-Puffer (aus QIAamp DNA Micro Kit)	Qiagen, Hilden

2.1.4 Chemikalien

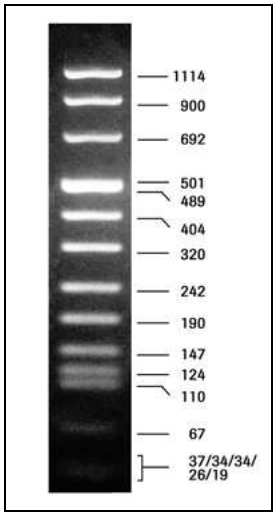
Chemikalien	Hersteller
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Isopropanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Diesenhofen
SDS	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Diesenhofen
NaOH	Merck, Darmstadt
NaAC	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Qiagen, Hilden
ROX 500	Applied Biosystems, Weiterstadt
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Weiterstadt
SeaKem® LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
MetaPhor® Agarose	FMC Bioproducts, Philadelphia USA
GelStar	Lonza, Weil am Rhein
Carrier RNA	Qiagen, Hilden

2.1.5 Standardpuffer / Standardlösungen

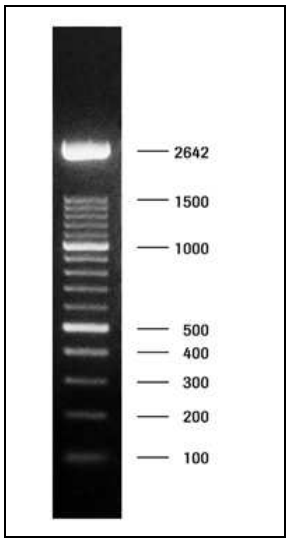
Puffer / Lösung	Zusammensetzung
0,5 M EDTA pH 8	93 g EDTA 11 g NaOH ad 500 ml Reinstwasser
Lysepuffer (für DNA-Zell-Lyse)	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA 0,1 % SDS
TE-Puffer	10mM Tris/HCl 1 mM EDTA
10 x TBE-Puffer	216 g Tris 110 g Borsäure 80 ml 0,5 M EDTA pH 8 ad 2000 ml Reinstwasser
6x Loading Dye Buffer	60% Glycerol 0,5 M EDTA 1M Tris 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylene Cyanol

2.1.6 Molekulargewichtsstandards

Marker	Hersteller
DNA Molecular Weight Marker VIII (37 – 1114 bp)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA Molecular weight marker XIV (100 – 2642 bp)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim



VIII



XIV

Abbildung 4: Molekulargewichtsstandards VIII und XIV (Bilder übernommen von ROCHE Diagnostics GmbH)

2.1.7 Verwendete Software

Gene Scan (Mikrosatelliten-PCR)

SDS 1.3 (real-time PCR)

2.1.8 Verwendete Oligonukleotide

Bez.	Sequenz (5` - 3`)	Hersteller
BB 1	FAM-GTTTGAAGAATTTGAGCCAACC	OPERON
BB 2	TTCTGTCTGCACACTTGGCAC	OPERON
QEGFR_CA+15k	6-FAM-CAGCCCTCTGTTGGGTCACCTTCC-BHQ1a	OPERON
Q_EGFR_f	TCTGCATTCCTGCCGAGTTC	OPERON
Q_EGFR_r	GCAGTCTCCACTCCATGCTCA	OPERON
QPCR_SOD_F	GGAGAAGCTGACGGCTGC	OPERON
QPCR_SOD_R	CCTTATTGAAACCAAGCCAACC	OPERON
SOD	VIC-CAACCTGAGCCTTGGACACCAACAGA-TAMRA	Applied Biosystems
QChr10F	CAGAGATGCGGTGTTCAGGAC	OPERON
QChr10R	CTGGCCTCATCCTTGGTATCG	OPERON
QChr10Fam	6-FAM-AGGCACTTTGCAAGGAGAACCACCA-BHQ1a	OPERON

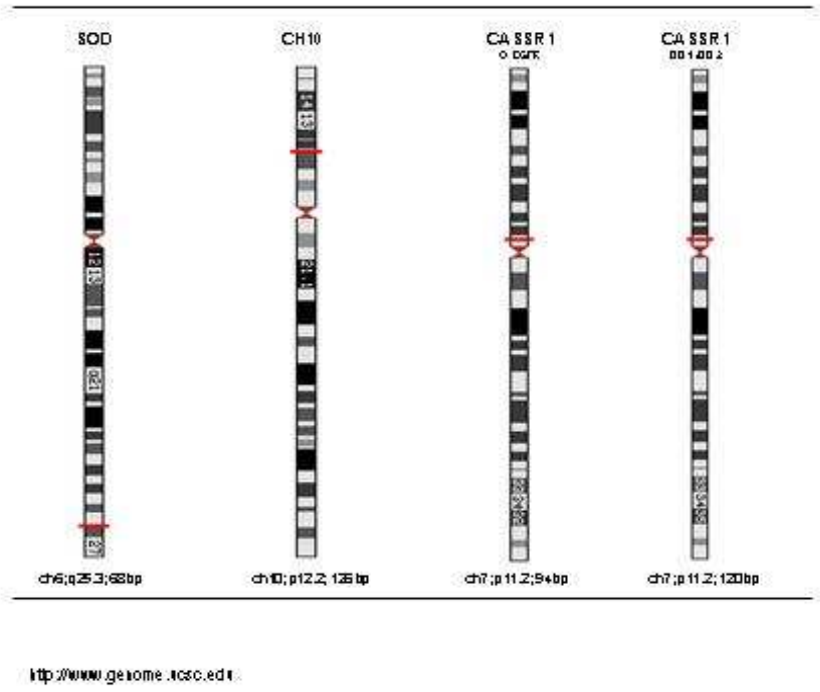


Abbildung 5: Darstellung der zu amplifizierten Regionen nach Primern. Bild übernommen von:http://www.genome.ucsc.edu

2.2 Material

2.2.1 Patienten mit oraler Leukoplakie

Aus dem Archiv des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) in Münster stammen 403 Präparate der Mundschleimhaut mit der Diagnose einer oralen Leukoplakie. Diesen 403 Patienten wurden im Rahmen von oralchirurgischen Eingriffen Mundschleimhautproben entnommen. Die Entnahmen erfolgten in den Jahren 1988 – 2001. Die Aufarbeitung und Beurteilung der Proben wurde von den zu den Zeiten jeweils verantwortlichen Mitarbeitern des Uniklinikums Münster durchgeführt. Diese Proben wurden bezüglich der Allellängen des CA-SSR I in der Leukoplakie analysiert und wurden anschließend mit der Verteilung in der Normalpopulation verglichen. Als Ausgangsmaterial dienten formalin-fixierte paraffin-eingebettete Gewebeblöcke.

2.2.2 Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom

Ein Kollektiv von 12 Patienten, 8 Männern und 4 Frauen mit einer Leukoplakie und einer gesicherten Entwicklung eines Mundschleimhautkarzinoms. Das Durchschnittsalter der Patienten lag zu dem Zeitpunkt der Erstdiagnose bei 58 Jahren. Bei allen Patienten wurde zuerst eine Leukoplakie diagnostiziert und im Verlauf die Entwicklung eines Karzinoms festgestellt. Die Tumore wurden stets chirurgisch entfernt, eine Entwicklung eines Rezidivs bzw. eines Sekundärtumors konnte aber nicht immer verhindert werden. Dementsprechend stammen unsere Proben aus den unterschiedlichen Stadien der Karzinomentwicklung von der Leukoplakie bis zu einigen Rezidivtumoren. Entnommen wurden die Proben im Zeitraum 1988 – 2001. Diese Gewebeproben stammen ebenfalls aus dem Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Die histologisch-pathologische Beurteilung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Riethdorf durchgeführt, die Einteilung ist in Tabelle 8 aufgelistet und etspricht der neuesten WHO-Klassifikation wie in 1.1.7 beschrieben. Als Ausgangsmaterial wurden Objektträger mit eosin-gefärbten entparaffinierten Schnitten verwendet.

Tabelle 8: Histopathologische Einteilung der Karzinomentwicklung

N	Normalgewebe
PEH	Plattenepitheliale Hyperplasie
OIN 1	Orale intraepitheliale Neoplasie
OIN 2	Orale intraepitheliale Neoplasie
OIN 3	Orale intraepitheliale Neoplasie
CA	Karzinom

Die für diese Proben gewählte histo-pathologische Stadieneinteilung wurde dann der allgemeinen Dysplasiegradeinteilung zugeordnet.

Dysplasiegradeinteilung

PEH	Plattenepithel-Hyperplasie
OIN1 leichte Dysplasie	basale Hyperplasie, normale Schichtung, in oberen Schichten geringe Zellpolymorphie
OIN2 mittlere Dysplasie	Übergreifen der Basalzellen auf die mittlere Schicht, deutliche Zell- und Kernpolymorphie, vermehrt Mitosen (auch atypische)
OIN3 (+*carcinoma in situ*) schwere Dysplasie	aufgehobene Epithelschichtung, ausgeprägte Zell- und Kernpolymorphie, typische/atypische Mitosen im Gesamtepithel
CA Karzinom	vollständige Aufhebung der Schichtung, invasive Proliferation der Zellen – Durchdringung der Basalmembran

2.3 Methoden

2.3.1 Entparaffinieren

Aus dem paraffin-eingebetteten Gewebe wurden 5 – 10 Schnitte je nach Größe in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube gegeben, mit 1000 µl Xylol gut gemischt und ü.N. bei 37 ℃ inkubiert. Die Tubes wurden dann für 10 Min. bei 22 000 *g* zetrifugiert und der Überstand verworfen. Nachfolgend wurden 1000 µl Abs. Ethanol zugegeben und kurz per vortexen gemischt. Hiernach wurde bei 22 000 *g* für 5 Min. zentrifungiert und der Überstand verworfen. Die Zugabe von Abs. Ethanol und die anschließende Schritte wurden wiederholt. Die Tubes wurden dann in einem Vakuumkonzentrator (Speedvac) trocken zentrifugiert.

2.3.2 Mikrodissektion

Die Mikrodissektion wurde bei dem Material der Patientengruppe 3.1.2 angewendet. Die entparafinierten Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop mittels eines Skalpells bzw. einer Nadel von dem Objektträger entnommen. Für das Normalgewebe wurden z.T. Epithelzellen und z.T. auch Stroma- bzw. Drüsengewebe (falls in Präparaten vorhanden) gewonnen.

2.3.3 DNA-Isolierung

2.3.3.1 DNA-Isolierung mit dem QIAmp DNA Micro Kit (QIAGEN)

Die QIAamp MinElute Colums (Säulen) aus dem Kit wurden im Kühlschrank bei 2- 8 ℃ gelagert. Die Proteinase K und die restlichen Bestandteile des Kits wurden bei Raumtemperatur gelagert, wobei eine Erwärmung über 25 ℃ verhindert wurde. Die Vorbereitung der Puffer und der Carrier RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Das Gewebe wurde je nach Menge in 20 – 50 µl ATL-Puffer (aus QIAamp DNA Micro Kit), wahlweise in 50 µl selbst hergestelltem Lysepuffer aufgenommen. Dazu wurden anschließend 10 µl Proteinase K zugegeben, die Proben wurden kurz anzentrifugiert und ü.N. bei 56 ℃ inkubiert. Zu den Proben, die nach der Inkubationszeit noch nicht vollständig gelöst waren, d.h. wo in den Tubes noch Pellet zu sehen war, wurden

weitere 10 – 30 µl Proteinase K sowie 20 – 50 µl ATL-Puffer zugegeben. Die Proben wurden gut durchmischt und für weitere 5 – 24 Stunden bei 56℃ inkubiert.

Im Anschluss an die Lyse wurden zu allen Proben 50 µl AL-Puffer und 1 µl Carrier RNA hingegeben und per vortexen für 15 Sek. gut durchmischt. Dann erfolgte Zugabe von 50 µl Abs. Ethanol und Vortexen für 15 Sek. Die Proben wurden für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und kurz anzentrifugiert. Als nächstes wurde das gesamte Lysat aus den Tubes in die QIAmp MinElute Column überführt und bei 7000 *g* für 1 Min. zentrifugiert. Falls das gesamte Lysat noch nicht die Säule passiert hat, wurde erneut bei > 13 000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen. Anschließend wurde in 2 Schritten mit 500 µl AW1- bzw. AW2-Waschpuffer gewaschen und jeweils bei 7000 *g* für 1 Min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich wurden die Cups noch bei 22 000 *g* für 3 Min. zentrifugiert um die Silika-Membran vollständig zu trocknen und der Cup dann verworfen. Die Säule wurde in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Tube gestellt. Auf die Mitte der Säule wurden danach 20 – 30 µl vorgewärmten (50 – 60 ℃) mit Reinstwasser 1:1 vorverdünnten AE-Puffer pipettiert. Die Säulen wurden bei Raumtemperatur für mindestens 5 Min. inkubiert und bei 22 000 *g* für 1 Min zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben bei -20 ℃ gelagert.

2.3.3.2 DNA-Isolierung nach einem alternativen Protokoll

Die Gewebeproben wurden mit ATL- bzw. selbst hergestelltem Lysepuffer, wie in 2.3.3.1 beschrieben, lysiert. Anschließend wurde 1/10 Vol. 3M NaAC (Natriumacetat) zugegeben und die Lösung mit Carrier RNA (5 mg/ µl) versetzt. Die Menge der Carrier RNA richtete sich nach dem Volumen der isopropanolhaltigen Lösung, 20 µg Carrier RNA für 1 ml Lösung. Nachfolgend wurde 1,5 Vol. Isopropanol zugegeben. Durch das Isopropanol sinkt die Dielektrizitätskonstante der Lösung (nach Coulombschem Gesetz), was die Ionenbindungen zwischen der DNA und des Salzes (NaAC) begünstigt. Somit werden die Hydrathüllen um die DNA gestört, was der DNA-Fällung dient. Danach wurden die Proben bei 13 000 *g* und 4 ℃ für mindestens 30 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Dann die Proben wieder bei 13 000 *g* für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.

Anschließend wurden die Proben in 25 µl 0,1 x TE-Puffer aufgenommen und ü.N. bei Raumtemperatur gelöst.

2.3.3.3 DNA-Isolierung mit dem AGOWA® mag Maxi DNA Isolation Kit

Diese Methode ermöglicht DNA-Isolierung aus Vollblut oder anderem Zellmaterial. Es werden superparamagnetische Partikel für die Auftrennung genutzt.

Das entparaffinierte getrocknete Gewebe wurde erst in 150 µl ATL-Puffer und 25 µl Proteinase K (beide Fa. Qiagen) lysiert und anschließend bei 56 ℃ inkubiert. Wenn nötig wurden weitere 10 µl Proteinase K zugegeben (und wieder inkubiert). Proben wurden danach zentrifugiert und der Überstand entfernt (und für weitere Zwecke aufbewahrt). Als nächstes wurde mit 1 Vol. 100% EtOH gewaschen. Hiernach wurde die *AGOWA mag Particles Suspension BML* zu den Proben zugegeben und 2 Min. bei Raumtemperatur gemischt. Die Partikel und die Suspension wurden dann in einem Gestell mittels magnetischer Platte getrennt und der Überwurf abgeworfen. Die Proben wurden dann von dem Magnet entfernt und zu jeder Probe wurde 500 µl *BLM1*-Puffer zugegeben. Diese wurden dann 10 Min. bei Raumtemperatur gemischt. Die Suspension mit Hilfe des Magneten wurde wieder aufgetrennt und der Überwurf abgeworfen. Die Schritte für BLM1-Puffer wurden dann 2mal für *BLM2*-Puffer wiederholt. Die Partikel wurden anschließend an der Luft getrocknet und dann zu jeder Probe 100 µl *BLM-ellution buffer* zugegeben. Die Proben wurden dann für 3 Min. bei 50 ℃ inkubiert und erneut mittels des Mag neten aufgetrennt. Der Überwurf wurde schließlich in eine neue Platte pipettiert.

2.3.4 Whole Genome Amplification (WGA)

Nach der DNA-Isolierung wurde eine WGA zur Amplifikation der genomischen DNA durchgeführt.

Diese Methode nutzt die bakteriophagische *Phi*29 DNA-Polymerase um ein- oder doppelsträngige DNA zu vervielfältigen. Die Reaktion ist isothermal und läuft über Nacht (ca. 16 Std.) bei 30 ℃ (Dean *et al.*, 2001). Als Produkt der Reaktion wird hochmolekulare doppelsträngige DNA größer 10 kb gewonnen. Das Ausgangsmaterial kann entweder gereinigte DNA (Mengen auch kleiner 1 ng) oder

nicht gereinigte Zelllysate sein. In dieser Arbeit wurde das GenomiPhi DNA Amplification Kit® (GE Healthcare) benutzt.

Für die WGA wurde 1 µl der Probe und 9 µl *sample buffer* vermischt und bei 95 ℃ 2 Min. lang denaturiert. Anschließend wurde die Mischung sofort auf Eis gestellt. 9 µl *reaction buffer* wurden mit 1 µl *emzyme mix* gemischt und der denaturierten Menge zugefügt. Danach erfolgte die Inkubation bei 30 ℃ für 16 Stunden (über Nacht). Das Enzym wurde durch Erhitzen auf 65 ℃ inaktiviert und die Menge anschließend auf 4 ℃ abgekühlt.

2.3.5 Aufreinigung von DNA mit NucleoSEQ Kit®

Die Aufreinigung der WGA-Produkte erfogte mit den in diesem Kit beinhalteten Säulen, die mit Sephadex G50® (*exclusion matrix*) in trockener Form gefüllt sind.

Die Säulen wurden erst bei 3500 *g* für 30 Sek. zentrifugiert. Anschließend wurden 600 µl von Reinstwasser zugegeben und die Mischung für mind. 30 Min. inkubiert (Alternativ lief die Inkubation ü.N. im Kühlschrank). Nach der Inkubation wurden die Säulen bei 3500 x *g* für 2 Min. zentrifungiert. Es folgte wiederholte Zugabe von 350 µl Reinstwasser und Zentrifugation bei bei 3500 *g* für 2 Min. Die zentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und Säulen in ein neues 1,5 ml *eppendorf tube* gestellt.

Das WGA-Produkt wurde dann auf die Mitte der Säule pippetiert und bei 3500 *g* für 4 Min. zentrifugiert. Das Material anschließend bei -20 ℃ eingefroren.

2.3.6 UV/VIS-Spektrometrie

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem NanoDrop Spectrophotometer (Peqlab). DNA zeigt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Proteine, die häufig als Verunrenigungen in der DNA vorkommen, haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm (E_{260}/E_{280}) kann als Maß für die Reihheit der Präparation angesehen werden. Ein Verhältnis von 1,8-2,0 weist auf eine proteinfreie Nucleinsäurelösung. Die Extinktion E_λ (Absorption des Materials für Licht der Wellenlänge λ) ist gegeben durch das Lambert-Beersches Gesetz:

$$E_\lambda = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

I ist die Intensität des transmittierten Lichtes

I_0 ist die Intensität des einfallenden Lichtes

c ist die Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit

d ist die Weglänge des Lichtes im Material

ε_λ ist der natürliche molare Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ. (Dieser ist eine für die absorbierende Substanz spezifische Größe. Eine gemessene Absorption von 1 bei 260 nm, bei einer Küvettenschichtdicke von 1 entspricht etwa eine Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA.)

2.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*) wurde erstmalig von Mullis und Faloona 1987 beschrieben. Die PCR stellt eine Methode zur Amplifikation von DNA-Abschnitten dar. Eine wichtige Voraussetzung ist, dass die Sequenz, oder mindestens das 3'- und das 5'-Ende des DNA-Abschnittes bekannt sind. Hierfür werden komplementäre Oligonukleotide, so genannte Primer synthetisiert. Für die Amplifikation des Fragmentes zwischen den Primern wird eine hitzestabile DNA-Polymerase verwendet. Das Verfahren läuft in mehreren Zyklen mit je 3 Phasen.

Die DNA wird zu Beginn des Prozesses durch Erhitzen in Einzelstränge getrennt (Denaturierungsphase). Anschließend folgt die spezifische Anlagerung der im Überschuss vorliegenden Primern als Starthilfe. Für diese Annealingphase ist eine optimale Hybridisierungstemperatur maßgebend. Diese ergibt sich aus der Länge und der Sequenz-Zusammensetzung der Primern. Zu niedrige Temperatur verursacht unspezifische Hybridisierungen der Primern, zu hohe Temperatur führt zu keiner Hybridisierung. In der folgenden Elongationsphase synthetisiert die hitzestabile DNA-Polymerase den Abschnitt zwischen den Primern, in dem sie das 3'-Ende des Primern verlängert. Der derart gebildete Doppelstrang wird durch erneute Erhöhung der Temperatur wieder getrennt, wodurch ein neuer Zyklus

anfängt. Durch mehrere Zyklen wird eine exponentielle Amplifizierung des DNA-Abschnittes erreicht. So wird bei n Zyklen eine theoretische Kopienzahl von 2^n erreicht. Das Produkt dieser exponentielen Bildung wird durch verschiedene Faktoren begrenzt (Morrison & Gannon, 1994). Die wichtigsten sind das als Nebenprodukt entstehende Pyrophosphat (PPi) und der Funktionsverlust der durch die Temperaturen beschädigten DNA-Polymerase.

2.3.7.1 Mikrosatelliten-PCR zur Bestimmung der CA-SSR I Länge

Zum Nachweis der Länge des CA-SSR I Repeats im Intron 1 des EGFR Gens wurde eine PCR mit folgendem Reaktionsansatz (10 µl) durchgeführt.

Reagenzien	**Konzentration der Stammlösung**	**Vol. (µl) / Ansatz**
PCR Gold Buffer	10x	1
$MgCl_2$	25 mM	0,8
dNTP	2,5 mM	0,8
Primer BB1	10 µM	0,1
Primer BB2	10 µM	0,1
AmpliTaq Gold	5 U/µl	0,1
TMAC	2 mM	0,5
Template-DNA	5 ng/µl	2
H_2O	ad 10 µl	4,6

Als DNA-Polymerase wurde die so genannte Taq-Polymerase verwendet, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt. Als Positivkontrolle diente DNA aus einer Mammakarzinom–Zelllinie (MDA-MB-468). Als Negativkontrolle wurde eine Leerprobe ohne DNA eingesetzt.

Das Temperaturprofil der PCR war für alle Reaktionen gleich:

Programm	Temperatur [℃]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10 Min	1
Denaturierung	95	30 Sec	35
Annealing	56	30 Sec	
Elongation	72	30 Sec	
Finale Elongation	72	7 Min	1
	20	∞	

Die Auswertung erfolgte mit der GeneScan®-Software. Bei den grundlegend heterozygoten Patienten wurde eine Überprüfung auf allelische Imbalanz (AI) durchgeführt, in dem die *peak areas* der beiden Allele des Normalgewebes (N) und des Karzinoms (CA) bzw. der Vorstufen (PEH, OIN 1-3) verglichen wurden:

$$Ratio = \frac{T_1 * N_2}{T_2 * N_1}$$

Wobei T_1 bzw. T_2 die Fläche unter dem *Peak* des kürzeren bzw. des längeren Allels des Karzinoms oder der Vorstufe ist. N_1 bzw. N_2 ist die Fläche unter dem *Peak* des kürzeren bzw. des längeren Allels des Normalgewebes desselben Patienten (Buerger *et al.*, 2000).

Eine AI ist statistisch signifikant, wenn die Ratio < 0,79 bzw. > 1,27 beträgt (Buerger *et al.*, 2000), für BB1 und BB2 Primer im ITB am UKE validiert.

2.3.7.2 Quantitative Real-time PCR

Die quantitative real-time PCR ist eine Methode für die Quantifizierung von Nukleinsäuren, bei der der Verlauf der Reaktion kontinuierlich gemessen wird. Die Quantifizierung ist über Fluoreszenz-Messungen während des PCR-Zyklus möglich, da die Fluoreszenz proportional mit der Menge des PCR-Produktes zunimmt.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen einer SYBR® Green I- und einer Sonden-basierten Methode. SYBR® Green I ist ein DNA-interkalierrender Farbstoff, bei dessen Einlagerung die Fluoreszenz ansteigt. Bei der Sonden-basierten Methode wird der Fluoreszenz-(oder Förster) Resonanz –Energie-Transfer (FRET) genutzt (Cardullo *et al.*, 1988). Die Sonde (TaqMan®-Sonde) ist ein Oligonukleotid an dessem 5'-Ende ein fluoreszierender Reporter-Farbstoff (Donor-Fluorochrom) und an dem 3'-Ende ein Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) platziert ist. Die Sonde hybridisiert während der Annealing- und Elongationsphase an die DNA. Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich eine 5' – 3' – Exonuklease-Aktivität besitzt, während der Synthese des komplementären Stranges die Sonde an ihrem 5'-Ende erreicht, wird diese hydrolysiert und es kommt zur räumlichen Trennung von Reporter und Quencher(Lyamichev *et al.*, 1993). Die Fluoreszenz des Reporters, die in Abhängigkeit von der Akkumulation des PCR-Produktes ansteigt, kann gemessen werden.

Weil die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase doppelstrang-spezifisch ist, bleiben die nicht gebundenen Sonden intakt und es wird keine Reporter-Fluoreszenz von diesen gemessen(Holland *et al.*, 1991). Die Sequenzspezifität wird auch dadurch erhöht, dass die nicht 100% bindende Sonden noch vor der Aktivierung der Exonuklease entfernt werden. Diese Methode ist zwar kostenintensiver, als die SYBR® Green I Methode, hat aber den Vorteil einer hohen Spezifität des Assays.

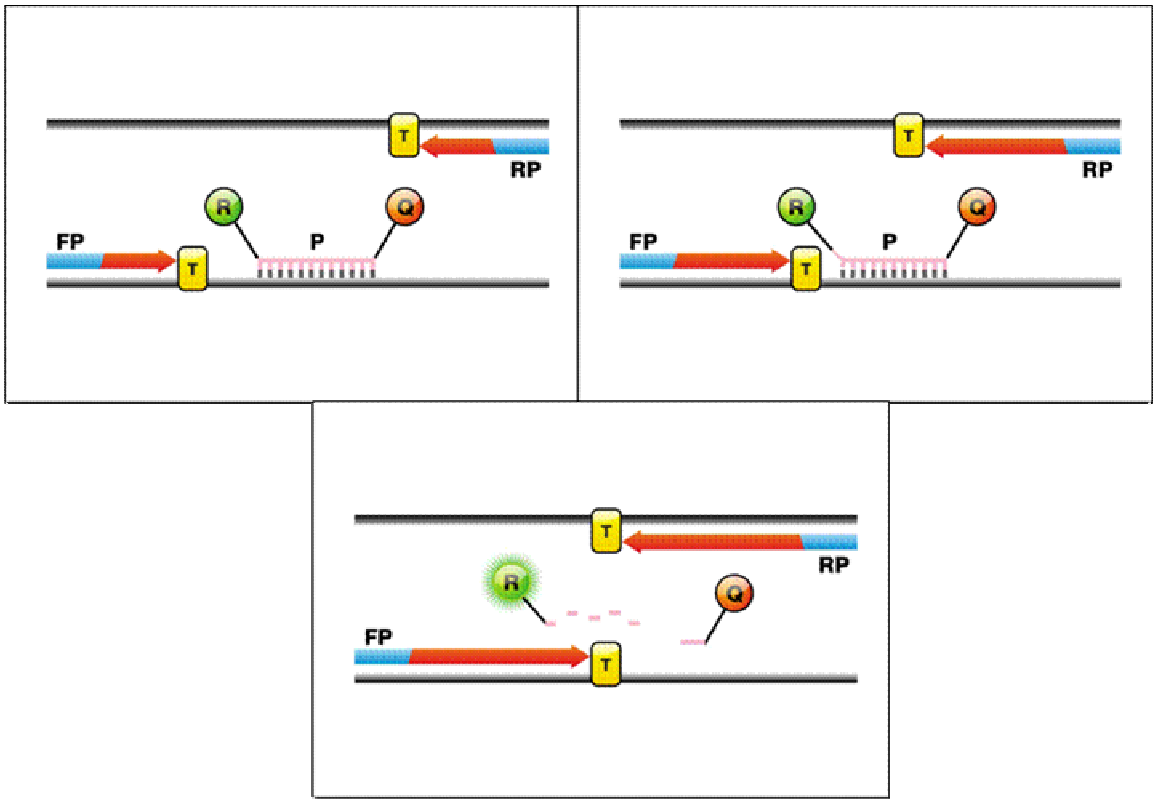


Abbildung 6: Schematische Darstellung der TaqMan® real-time PCR: Die Sonde (mit R als Reporter und Q als Quencher) bindet an den Matrizenstrang zwischen den beiden Primern (FP, RP) und wird während der Elongationsphase von der Taq-Polymerase verdrängt. Durch die 5' – 3' – Exonuklease – Aktivität kommt es zur Spaltung der Sonde und der Reporter (R) fluoresziert. Das Signal des Reporters wird in Echtzeit gemessen.

In dieser Arbeit wurde die quantitative real-time PCR

1. für die absolute Quantifizierung der DNA nach der DNA-Isolierung (keine photometrische Messung möglich, da Carrier-RNA während der Isolierung zugesetzt wurde),

2. für die relative Quantifizierung im Bezug auf einen *Houskeeping-Gen* (auf Chromosom 10) angewendet.

Für die absolute Quantifizierung der DNA wurde eine Region aus dem Gen der Superoxiddismutase 2 (SOD) auf dem Chromosom 6 gewählt (ch6; q25.3; Länge 68 bp; siehe auch Abbildung 5).

Reaktionsansatz für Assay mit 12,5 µl Volumen:

Reagenzien	**Konzentration. der Stammlösung**	**Vol. pro Ansatz**
2X U-Mix		6,25
Primer QPCR_SOD_F		0,3
Primer QPCR_SOD_R		0,3
SOD-Sonde		1,0
Template-DNA		2,5
H_2O	Ad 12,5 µl	2,1

Als Negativkontrolle wurde eine Leerprobe ohne DNA eingesetzt.

Für die relative Quantifizierung wurde eine quantitative real-time PCR von CA-SSR I und eines *Housekeeping*-Gens (126 bp lange Region auf Chromosom 10; siehe Abbildung 5) durchgeführt.

Reaktionsansatz für CA-SSR I mit15 µl:

Reagenzien	**Vol. pro Ansatz**
2X U-Mix	7,5
Primer Q_EGFR_f	0,4
Primer Q_EGFR_r	0,4
Sonde QEGFR_CA+15k	1,2
Template-DNA	2,0
H_2O	3,5

Reaktionsansatz für Housekeeping-Gen mit15 µl:

Reagenzien	**Vol. pro Ansatz**
2X U-Mix	7,5
Primer QChr10F	0,4
Primer QChr10R	0,4
Sonde QChr10FAM	1,2
Template-DNA	2,0
H_2O	3,5

Bei der real-time PCR verwendeten 96-Well-Platten (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate) wurden nach dem Pipettieren mit einer optisch klaren Klebefolie (ABI Prism) verschlossen und im Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System analysiert. Das Gerät besteht aus einem Thermocycler, in dem zeitgleich 96 Reaktionen stattfinden können, sowie einer optischen Einrichtung mit einer CCD-Kamera.

Das Temperaturprofil war für alle Reaktionen gleich:

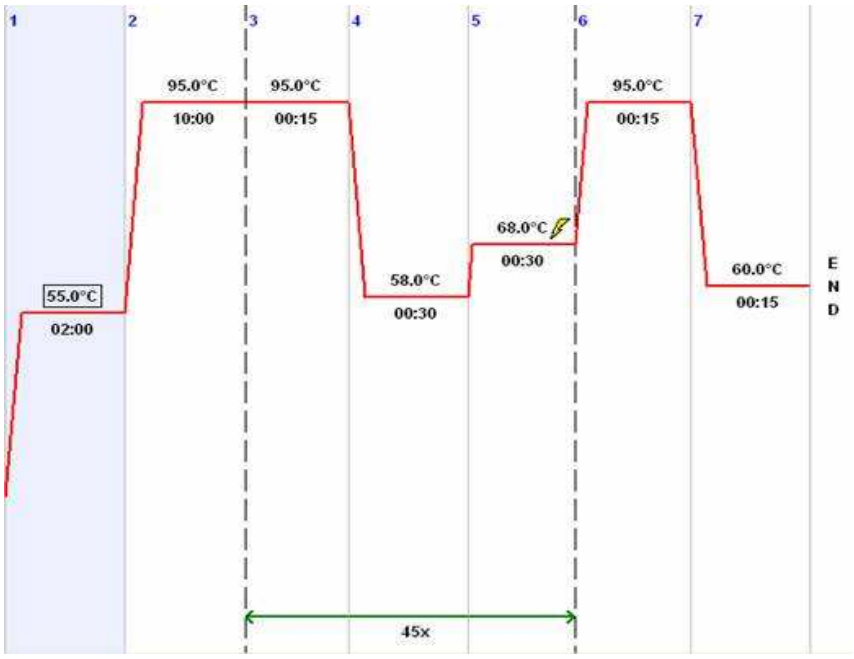


Abbildung 7: ScreenShot des vorgegebenen Temperaturprofils für real-time PCR. Die Temperaturbedinungen müssen unter der Schmelztemperatur (T_m) der Sonde liegen, damit diese hybridisiert bleibt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SDS 1.3.

Für die Quantifizierung wird die Kinetik der Reaktion genutzt. Es werden keine absoluten Produktmengen gemessen, sondern die exponentielle Zunahme der Reporter-Fluoreszenz (ΔR). Der Anstieg der Fluoreszenz-Emission ist proportional zu der Menge des PCR-Produktes, wobei sich das Produkt wiederum zu der eingesetzten Konzentration proportional verhält(Heid *et al.*, 1996). Es wird zuerst ein Schwellenwert der Reporter-Fluoreszenz in der exponentiellen Phase der PCR festgelegt, die so genannte *Treshold*-Linie. Diese entspricht einer bestimmten Produktmenge, die wiederum mit einer bestimmten Anzahl der Zyklen, dem so genannten *Treshold Cycle* (C_T-Wert, siehe Abbildung 8) korreliert. Je niedriger der C_T-Wert ist, desto weniger Zyklen sind nötig um die bestimmte Produktmenge zu erreichen bzw. desto mehr DNA wurde in die Reaktion eingesetzt.

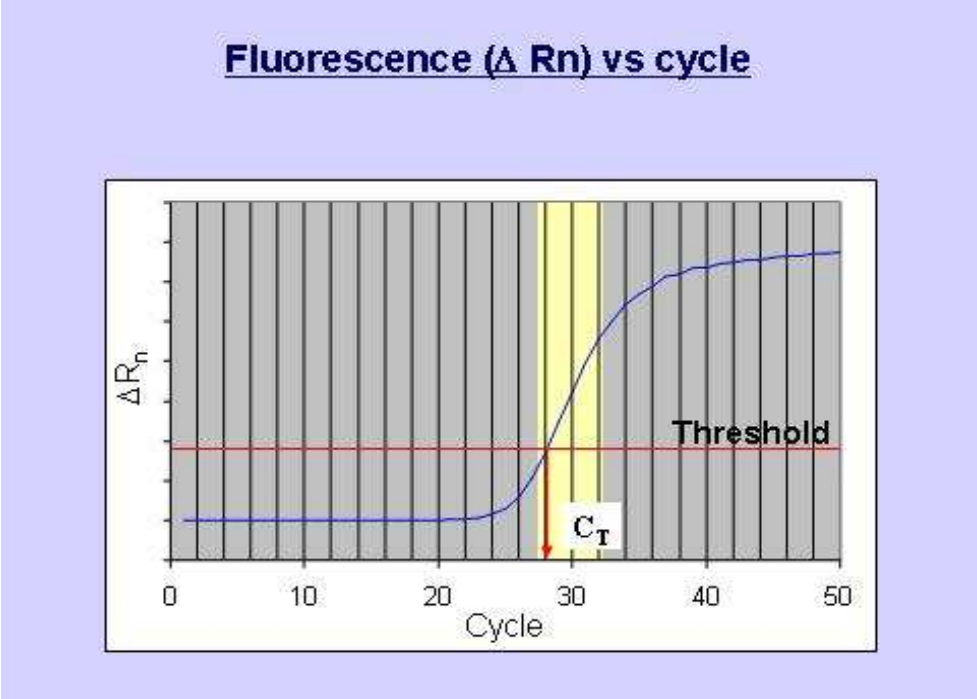


Abbildung 8: Festlegung des Tresholds und des C_T-Wertes: In der exponentiellen Phase der Reaktion wird eine zu der x-Achse parallele *Treshold*-Linie eingestellt. Der sich dadurch ergebende Schnittpunkt mit den PCR-Kurven wird senkrecht zur x-Achse verlängert. Der Schnittpunkt mit der x-Achse entspricht dann dem C_T-Wert einer PCR-Reaktion.[1]

Die C_T-Werte wurden mittels einer Funktion des Programms in einen Textfile übertragen und mit Microsoft Excel weiter bearbeitet. Alle Proben wurden mindestens in Doppelbestimmungen analysiert. Aus diesen Doppelbestimmungen wurde für jede Probe ein Mittelwert ($\bar{x}$) bestimmt.

(1) $$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} X_i$$

x_i sind die Messwerte

n ist die Anzahl der Messwerte

[1] Die Abbildung wurde mit freundlicher Zustimmung von Dirk Kemming (Mitarbeiter der AG von Prof. Brandt) übernommen.

Die C_T-Messwerte der Proben können mittels einer Standardkurve in absolute quantitaive Ergebnisse umgerechnet werden. Hierzu wird DNA mit einer Sequenz des Amplikons und bekannter Anfangskonzentration verwendet. Verschiedene Verdünungsstufen werden in getrennten Reaktionen amplifiziert und die resultierenden C_T-Werte gegen den Logarithmus zur Basis 2 der Anfangskonzentrationen aufgetragen. Somit erhält man eine Standardkurve, die in einer semilogarithmischen Darstellung eine Gerade ergibt.

Anhand der Funktion der Standardkurve können die Konzentrationen der Template-DNA errechnet werden:

(2) $$c[DNA] = 2^{\frac{C_T - b}{a}}$$

a ist die Steigung

b ist der Achsenabschnitt

Als Standardkurve wurde genomische Leukozyten-DNA in Konzentrationen von ca. 5 ng/µl in 6 Verdünungsstufen jeweils 1:2 bis ca. 0,078 ng/µl eingesetzt.

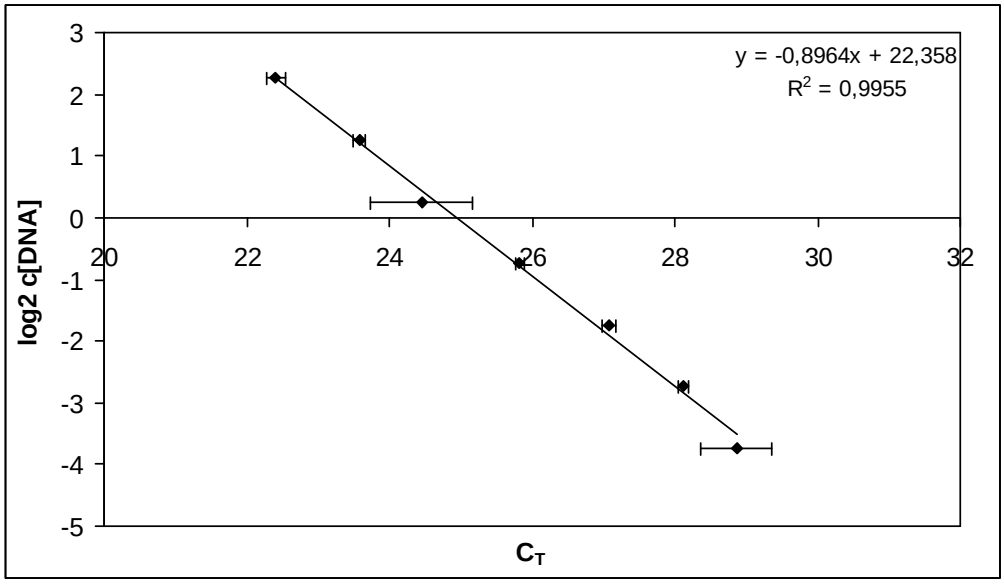


Abbildung 9: Standardkurve quantitativer real-time PCR: C_T-Mittelwerte in semilogarithmischer Darstellung. Die Fehlerbalken geben die Standartabweichungen für die C_T-Werte an. Die Gleichung der Funktion dient für die Berechnung der Konzentrationen der Template-DNA.

Für die real-time PCR mit einem *Housekeeping*-Gen als Referenz wurde zuerst eine absolute Quantifizierung der Template-DNA und des *Housekeeping*-Gens anhand deren Standardkurven durchgeführt. Das *Housekeeping*-Gens ist durch seine Eigenschaft wenig in malignen Mundschleimhautzellen von Abberationen betroffen zu sein gekennzeichnet (aus *Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer*).

Der Gendosis (bzw. Konzentration) des *Housekeeping*-Gens wird der Wert 1 zugeteilt und die Gendosis der Template-DNA wird mit dieser verglichen (Ratio):

(3) $$ratio = \frac{c_{DNA}[Template-DNA]}{c_{DNA}[Housekeeping-Gen]} = \frac{c_{DNA}[Template-DNA]}{1}$$

Sowohl für die Werte der absoluten Qunatifizierung, als auch für die Ratio wurde die Standardabweichung (s_x) und der Variationskoeffizient (*CV*) berechnet:

(4) $$s_x = \sqrt{\frac{1}{N-1}\sum_{i=1}^{N}(x_i - \bar{x})^2}$$

N ist der Stichprobenumfang

x_i ist die Merkmalsausprägung am *i*-ten Element der Stichprobe

$\bar{x}$ ist der arithmetische Mittelwert

(5) $$CV = \frac{s_x}{\bar{x}} * 100 \text{ (in \%)}$$

(6) $$CV_{ratio} = \sqrt{CV^2_{Template-DNA} + CV^2_{Housekeeping-Gen}}$$

(7) $$s_x = \frac{CV_{ratio}}{\left(\bar{x}_{Template-DNA} / \bar{x}_{Housekeeping-Gen}\right)}$$

2.3.8 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung verschieden langen DNA-Molekülen. Die DNA ist negativ geladen und wandert dementsprechend im elektrischen Feld zur positiven Anode, dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit von der Fragmentgröße abhängig (lange Fragmente laufen langsamer).

Die Agarosegelelektophorese wurde in horizontalen Gelkammern durchgeführt. Für ein Gel wurde 0,75% - 2% Agarose mit 1x TBE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlung mit GelStar® versetzt (4 µl auf 60 ml Gel), wodurch die DNA später fluoresziert. Das Gel wurde in die Kammer mit einem passenden Kamm gegossen. Nachdem ein festes Gel entstanden ist, wurde der Kamm entfernt. Die Kammer wurde dann mit 1x TBE-Puffer gefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war.

Die Proben (5-6 µl) wurden im Verhältnis 6:1 mit einem *Loading Dye Buffer* versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Für die Abschätzung der Bandengrößen im Gel wurden zusätzlich Marker mit definierten Fragmentgrößen (siehe Abbildung 4) mit aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte unter Raumtemperatur bei einer Spannung von 80 – 100V. Die Dauer richtete sich nach der Agarosekonzentration. Das Gel wurde unter UV Licht analysiert und mit einer Kamera fotografiert.

2.3.9 Kapillarelektrophoretische Aufteilung von PCR-Produkten

Die (Kapillar-)Elektrophorese dient der Trennung von Ionen aufgrund ihrer verschiedenen elektrophoretischen Mobilitäten. Die jeweiligen Moleküle haben unterschiedliche Verhältnisse an Masse und Ladung. In einem elektrischen Feld bewegen sich Moleküle mit kleiner Masse und größerer Ladung schneller. Bei der Auftrennung laufen die längeren DNA-Fragmente also langsamer, als die kürzeren. Die Kapillarelektrophorese hat eine hohe Sensitivität, eine Bestimmung bis auf 1 bp Länge ist möglich.

Die Produkte der konventionellen PCR wurden erst denaturiert und dann mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Für die Denaturierung wurde jede Probe mit 80 µl

(8µl auf 1µl Probe) Reinstwasser verdünnt. Zu je 1 µl der vorverdünnten Probe wurden 20 µl *HiDi Formamid* und 0,1 µl *ROX 500* zugegeben. Anschließend wurden die Proben 3 Min. lang bei 95 ℃ in einem Eppendorf -Mystercycler denaturiert und sofort auf Eiswasser gestellt.

Die Kapillarelektrophorese erfolgte im Analyser in der WWU – Münster (Applied Biosystems 3100 Genetic Analyser). Die Detektion erfolgte mittels Laser-Anregung und einer CCD-Kamera. Die Rohrdaten wurden in der Data Collection Software automatisch gespeichert und voranalysiert.

3 Ergebnisse

Die orale Leukoplakie stellt die häufigste Präkanzerose des Mundschleimhautkarzinoms dar. Eine frühzeitige Erkennung möglicher genetischer Abberationen ist für die Prognose und Therapie der Patienten von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Länge des im Intron 1 des EGFR-Gens liegenden CA-SSR I (Anzahl der CA-Repeats) bestimmt. Die Untersuchung wurde an 403 Patienten mit oralen Leukoplakien und an 12 Patienten mit anschließender Karzinomentwicklung der Mundhöhle unternommen. Zusätzlich wurden die 12 Patienten mit Karzinomen auf genetische Abberationen im Bereich des CA-SSR I untersucht.

Die Zellreihe MDA-MB-468 mit einer bekannten Anzahl der CA-Repeats von 17 (Gebhardt *et al.*, 1999) wurde als Positivkontrolle und Vorlage für die Umrechnung der Allellängen (in bp) in die Anzahl der CA-Repeats verwendet.

3.1 CA-SSR I – Polymorphismus in oralen Leukoplakien

Beim Kollektiv von 403 Patienten wurden die Allellängen des CA-SSR I untersucht. In 5 Fällen war eine Leukoplakie mit teilweise fortgeschrittener Dysplasie nachgewiesen. In diesen Fällen wurde das umgebende Normalgewebe untersucht, da wir die genetische Untersuchung an einem histologisch normalen Gewebe durchführen wollten. Aus dem Gewebe wurde die DNA isoliert und die Allellängen mittels einer konventionellen PCR detektiert und mit der *Gene-Scan*-Software analysiert.

Von den 403 Patienten waren für die CA-SSR I-Sequenz 100 (24,81%) homozygot und 239 (59,31%) heterozygot. Bei 64 (15,88%) Patienten waren die Proben nicht auswertbar.

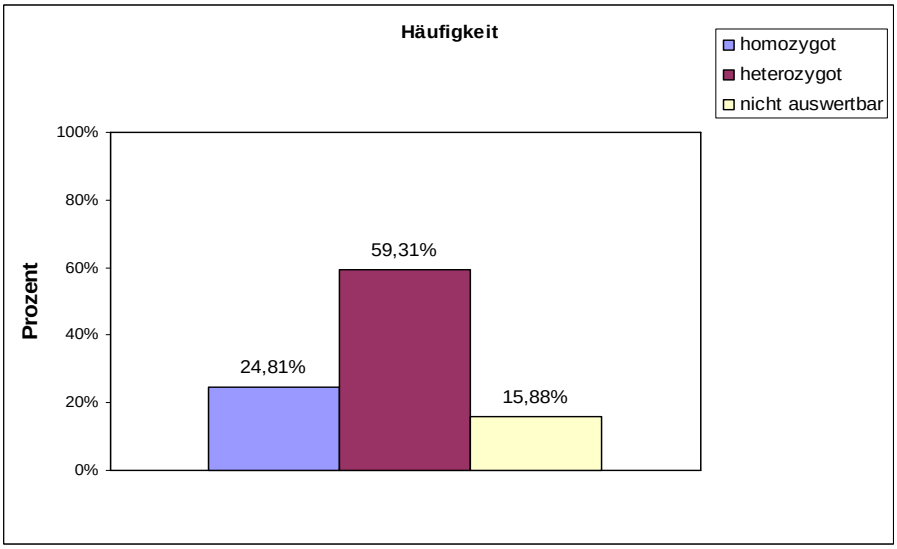


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung homozygoter und heterozygoter Genotypen des CA-SSR I des EGFR-Gens bei 403 Patienten mit oraler Leukoplakie.

Insgesamt wurden 26 verschiedene Genotypen beobachtet. Die CA-Repeat Anzahl erstreckt sich zwischen 13 und 22. Die häufigsten Allelkombinationen sind 16/20 (22,12 %), 16/18 (21,53 %) und 16/16 (20,35 %). Das eindeutig häufigste kurze Allel ist 16 CA-Repeats (74,93%). Das am meisten vorkommende lange Allel ist 20 CA-Repeats mit 31,27 %. Die Abbildung 11 und die Tabelle 9 präsentieren die vollständigen Ergebnisse.

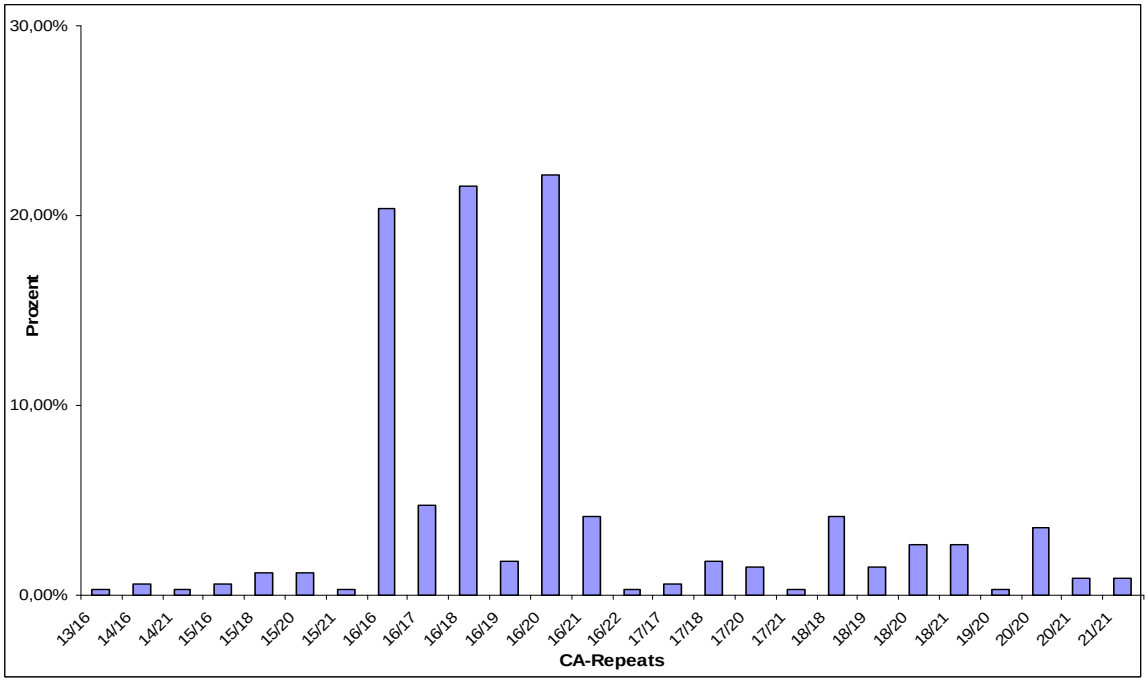


Abbildung 11: Allelverteilung der oralen Leukoplakien. Prozentual dargestellt.

Tabelle 9: Verteilung der Allelkombinationen (nach der Länge des CA-Repeats) des CA-SSR I im EGFR-Gen bei Patienten mit oraler Leukoplakie.

Allelverteilung		
CA-Repeat	**absolut**	**prozentual**
13/16	1	0,29%
14/16	2	0,59%
14/21	1	0,29%
15/16	2	0,59%
15/18	4	1,18%
15/20	4	1,18%
15/21	1	0,29%
16/16	**69**	**20,35%**
16/17	16	4,72%
16/18	**73**	**21,53%**
16/19	6	1,77%
16/20	**75**	**22,12%**
16/21	14	4,13%
16/22	1	0,29%
17/17	2	0,59%
17/18	6	1,77%
17/20	5	1,47%
17/21	1	0,29%
18/18	14	4,13%
18/19	5	1,47%
18/20	9	2,65%
18/21	9	2,65%
19/20	1	0,29%
20/20	12	3,54%
20/21	3	0,88%
21/21	3	0,88%
	339	100

3.1.1 Zusammenhang zwischen der CA-SSR I Länge und der Lokalisation der Leukoplakie

Wie in 1.1.5 beschrieben, gibt es in der Mundhöhle einerseits Regionen, die bevorzugt von der Leukoplakie betroffen sind, andererseits sind so genannte „*high-risk*“-Zonen eher für eine maligne Entartung prädisponiert. In 218 Fällen der untersuchten Gruppe war die Lokalisation der Leukoplakie bekannt. In der Abbildung 12 sind die vier häufigsten Lokalisationen Wange, Zungenrand, Gaumen und Mundboden dargestellt. Der Zungenrand und der Mundboden gehören gleichzeitig zu den o.g. „*high-risk*“-Zonen. Die zugehörigen häufigsten Allelkombinationen sind:

Lokalisation	Allelkombination	Häufigkeit
Gaumen	16/20	36,40%
Mundboden	16/20	33,40%
Wange	16/20	29,70%
Zungenrand	16/16	31,80%

Die Allellänge tendiert zu kürzeren Allelen (<19) in allen vier Lokalisationen. Die Zungenrand-Leukoplakien zeigten eine Tendenz zu kürzeren Allelen sogar für die Grenzwerte 17 und 18. (Singnifikanz wurde nicht geprüft).

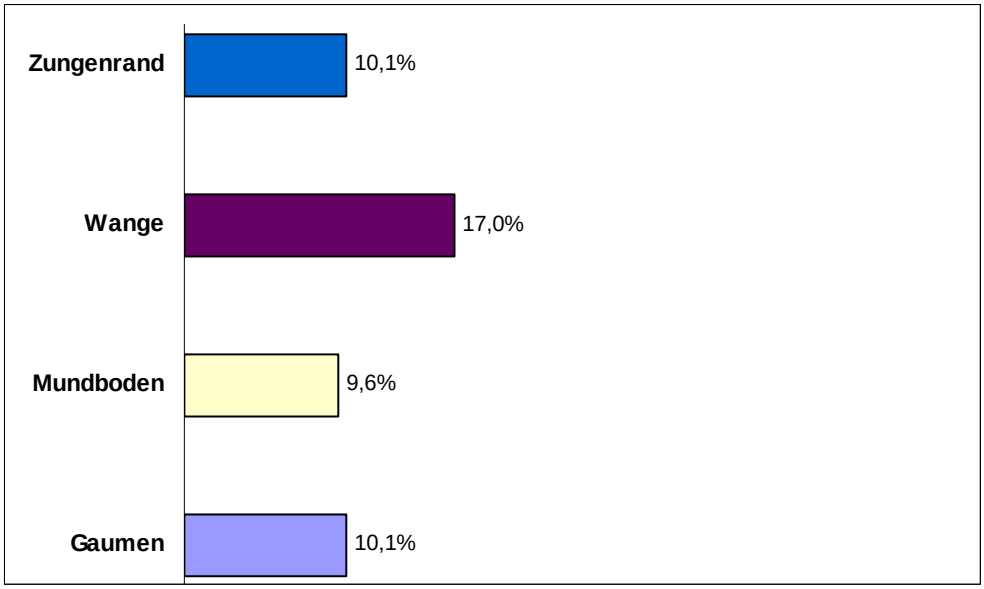


Abbildung 12: Die häufigsten Lokalisationen der oralen Leukoplakien

3.1.2 CA-SSR I – Polymorphismus im Normalkolektiv der Population

Um die Genotypisierung des o.g. Patientenkollektivs mit der Normalpopulation zu vergleichen, wurde in dieser Arbeit eine frühere Studie derselben Arbeitsgruppe herangezogen. *Brandt et al* (Brandt *et al.*, 2004). untersuchten die Länge des CA-SSR I bei Brustkrebspatientinnen und einer nicht betroffenen Kontrollgruppe. Das Studienkollektiv bildeten deutschsprachige Frauen aus zwei Studienregionen in Süddeutschland. Die Kontrollgruppe (*n*=1063) kann auch in dieser Arbeit als

Kontrollgruppe der Normalpopulation auch in dieser Arbeit dienen, da folgende Kriterien erfüllt sind:

1. DNA-Isolierung mittels eines DNA-Kits der Firma Qiagen
2. PCR-Amplifikation mit denselben Primern und derselben Polymerase
3. Zelllinie MDA-MB-468 als Kontrolle für die Fragmentlängen der PCR-Analyse
4. Kapillarelektophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente auf dem ABI PRISM 3100 bzw. 3700 Analyser.

Die Gruppe umfasst 1063 Kontrollen. Die Allelverteilung erstreckt sich zwischen 13 - 21 CA-Repeats. Das kürzere Allel betrachtet, sind 16 CA-Repeats am häufigsten (66,6%). Unter den längeren Allelen sind 20 CA-Repeats am stärksten vertreten (34,5%). Die drei häufigsten Allelkombinationen sind 16/16 CA-Repeats (19,4%), 16/20 CA-Repeats (18,9%) und 16/18 CA-Repeats (15,8%).

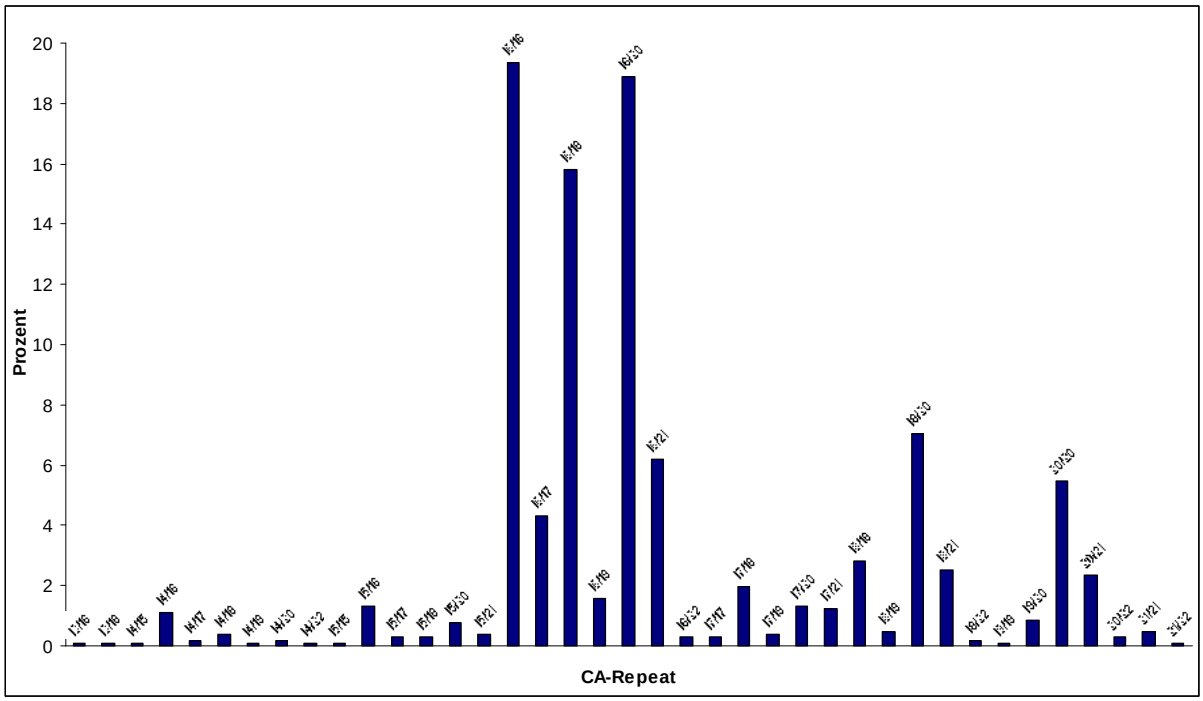


Abbildung 13: Prozentuale Häufigkeitsverteilung der Genotype in der Normalpopulation. Daten aus Brandt et al. 2004(Brandt *et al.*, 2004).

3.1.3 Vergleich der Genotypen des Patientenkollektivs mit der Normalpopulation

Die Anzahl der CA-Repeats reicht sowohl in dem Patientenkollektiv als auch in der Normalpopulation von 13 bis 21. Die drei häufigsten Allelkombinationen sind mit 16/16, 16/18 und 16/20 in beiden Kollektiven gleich. Wie in der Studie von *Brandt et al.* wurden auch in dieser Arbeit die CA-Repeats 17, 18 und 19 als Grenzwerte zwischen kurzen und langen Allelen gesetzt und der χ^2-Test (Chi-Quadrat-Test) angewendet. Ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Leukoplakie besteht für Personen mit mindestens einem Allel ≥ 19 (Odds Ratio 0,75; p-Wert < 0,05), angenommen die Referenzgruppe umfasst Personen mit zwei Allelen < 19 CA-Repeats. Ein erhöhtes Risiko für eine Leukoplakie gab es dagegen nicht bei Patienten mit mindestens einem Allel ≥ 17 bzw. ≥ 18 CA-Repeats, siehe auch Tabelle 10.

Tabelle 10: Odds Ratios (OR) und p-Werte für Patienten mit mindestens einem Allel ≥ 17, ≥ 18 bzw. ≥ 19 CA-Repeats.

CA-Repeat	OR	p-Wert
17	1.02	n.s.
18	1.00	n.s.
19	0.75	0.027

Nach demselben Prinzip wurden dann Patienten mit mindestens einem kürzeren Allel ≤ 17, ≤ 18 bzw. ≤ 19 CA-Repeats und Personen des Normalkollektivs mit zwei längeren Allelen verglichen. Die Odds Ratios waren 1.49, 1.79 bzw. 1.69, die p-Werte alle grenzwertig (siehe Tabelle 11), somit durchaus als signifikant zu betrachten. Am deutlichsten zeigt sich ein erhöhtes Risiko für eine Leukoplakie bei kürzeren Allelen an Patienten, die mindestens ein Allel ≤ 18 CA-Repeats besitzen.

Tabelle 11: Odds Ratios (OR) und p-Werte für Patienten mit mindestens einem Allel ≤ 17, ≤ 18 bzw. ≤ 19 CA-Repeats.

CA-Repeat	OR	p-Wert
17	1,49	0.063
18	1,79	0.058
19	1,69	0.062

3.2 Methodenvergleich für DNA-Isolierung

Die Gewebematerialien der 12 Patienten, die aus einer bestehenden Leukoplakie ein Mundschleimhautkarzinom entwickelt haben, standen als Eosin-gefärbte entparaffinierte Schnitte auf Obejktträgern zur Verfügung. Einzelne Bereiche der Präparate wurden histo-pathologisch beurteilt und per Mikrodissektion abgetragen. Dies erwies sich als schwierige Methode, da die Präparate kleine Flächen aufwiesen, zum Teil betrugen diese nur 0,5 cm^2 und beinhalteten mindestens 2 Karzinomvorstufen. Zum besseren Verständnis dient die Abbildung 14.

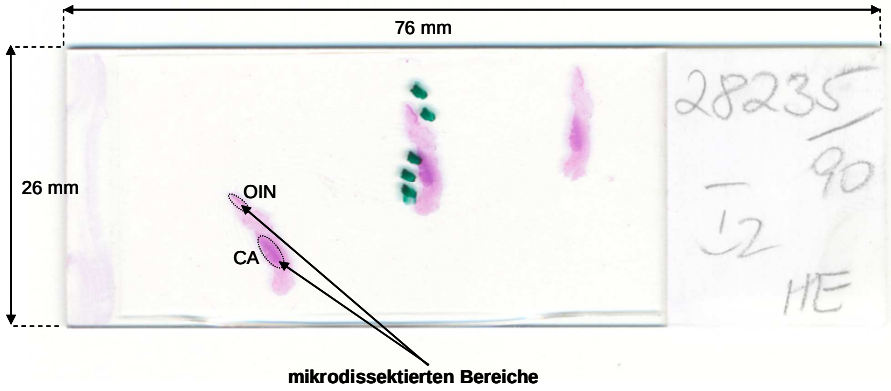


Abbildung 14: Objektträger mit 3 Schnitten eines Gewebestückes. Die mikrodissektierten Bereiche sind als CA (Karzinom) und OIN (orale intraepitheliale Neoplasie) bezeichnet.

Aufgrund der geringen Gewebemengen und somit wenigen Zellkerne in den Proben, war es notwendig, eine geeigente Methode für die DNA-Isolierung zu etablieren.

Hierfür wurde aus gleichen Gewebemengen von 3 Proben mit 2 verschiedenen Puffern die DNA isoliert, wie in 2.3.3.1 beschrieben. Die real-time PCR hat folgende Ergebnisse geliefert:

Probe	Puffer	Konz. (ng/µl)
46478/88 N	Eigener Lysepuffer	**-**
46478/88 N	ATL	**0,064**
26154/00 N	Eigener Lysepuffer	**-**
26154/00 N	ATL	**0,50**
35206/01 N	Eigener Lysepuffer	**-**
35206/01 N	ATL	**-**

Aufgrund der noch sehr niedrigen DNA-Mengen wurde anschließend das QIAamp DNA Micro Kit mit einem alternativen Protokoll für die DNA-Isolierung (2.3.3.2) verglichen und mit real-time PCR die DNA-Konzentrationen gemessen:

Probe	DNA-Isolierung	Konz. (ng/µl)
22793/02 N	Alternatives Protokoll	**0,0002**
22793/02 N	QIAmp DNA Micro Kit	**0,172**
22793/02 OIN	Alternatives Protokoll	**0,0172**
22793/02 OIN	QIAmp DNA Micro Kit	**0,321**

Durch die alternativen Methoden konnten keine größeren Mengen an DNA isoliert werden, so dass die ursprüngliche Methode weiterhin angewendet wurde. Nach der Konzentrationsbestimmung mittels real-time PCR wurde bei allen Proben eine Whole Genome Amplification (WGA) durchgeführt, um die gesamte genomische DNA zu vervielfältigen, und mittels des NucleoSEQ Kits® aufgereinigt. Danach konnten die Konzentrationen am NanoDrop Spectrophotometer bestimmt werden. Anschließend wurde eine konventionelle PCR für die Anzahl der CA-Repeats wie in 2.3.7.1 beschrieben durchgeführt.

3.3 CA-SSR I – Polymorphismus in oralen Plattenepithelkarzinomen

Für die Bestimmung der Allellängen wurde die DNA aus den oralen Plattenepithelkarzinomen und deren Vorstufen mittels einer Mikrosatelliten-PCR analysiert. Gleichzeitig wurde von allen Patienten das tumorumgebende Normalgewebe untersucht. Bei ausgewählten Proben wurde im Anschluss eine quantitative real-time PCR zur Detektion allelischer Imbalanzen durchgeführt.

Die Bestimmung der CA-SSR I Länge ergab stark heterogene Ergebnisse, sogar innerhalb der Proben eines Patienten. In der Tabelle 12 sind die Ergebnisse nach den Patienten (1 – 12) aufgelistet. Die Anzahl der CA-Repeats erstreckt sich zwischen 12 und 28. Sechs der 12 Patienten sind ausschließlich homozygot, 3 heterozygot. Drei Patienten weisen in den unterschiedlichen Stadien und Tumoren sowohl Homo- als auch Heterozygotie auf. Das häufigste Allel beträgt 16 CA-Repeats (72%). Auffällig sind die polymorphen Genotypen innerhalb eines Individuums in den Stadien eines Tumors bzw. der Unterschied zwischen dem ersten Tumor und einem späteren Rezidiv. Eine Erklärung wird im Kapitel 4.2 diskutiert.

Tabelle 12: Verteilung der Allelkombinationen des CA-SSR I des EGFR-Gens (nach der Länge der CA-Repeats) bei 12 Patienten mit Leukoplakie und anschließendem Mundschleimhautkarzinom.

Patient	Probe Nr.	Stadium	Klinische Diagnose	Anzahl der CA-Repeats	
1	32	OIN1	Tumor nach Leukoplakie	16	-
	50	PEH	zweiter Tumor	15	16
	51	PEH	zweiter Tumor	16	-
	49	N	zweiter Tumor	28	-
2	46	OIN3	Leukoplakie vor dem 1. Tumor	16	-
	69	N	1. Tumor	16	-
	44	OIN3	Leukoplakie 1 Jahr vor 2. Tumor	16	-
	45	N	Leukoplakie 1 Jahr vor 2. Tumor	16	-
	21	OIN3	Leukoplakie 4 Wo. vor 2. Tumor	16	-
	64	OIN3	Leukoplakie 4 Wo. vor 2. Tumor	16	-
	23	N	Leukoplakie 4 Wo. vor 2. Tumor	(115 bp)	-
	65	N	Leukoplakie 4 Wo. vor 2. Tumor	18	-

Patient	Probe Nr.	Stadium	Klinische Diagnose	Anzahl der CA-Repeats	
3	41	OIN1	Leukoplakie vor dem Tumor	16	-
	11	OIN1	Leukoplakie vor dem Tumor	16	-
	60	OIN1	Leukoplakie vor dem Tumor	16	-
	42	N	Leukoplakie vor dem Tumor	16	-
	58	Ca	Tumor nach Leukoplakie	16	-
	24	OIN1	Tumor nach Leukoplakie	27	-
	31	N	Tumor nach Leukoplakie	16	-
4	35	Ca	Metastase nach Tumor	16	18
	68	Ca	Metastase nach Tumor	16	18
	37	N	Metastase nach Tumor	16	18
5	17	PEH	Leukoplakie vor Tumor	18	22
	62	OIN1	Leukoplakie vor Tumor	18	-
	63	N	Leukoplakie vor Tumor	(115 bp)	-
	39	N	Leukoplakie vor Tumor	16	21
	3	N	2. Tumor nach Leukoplakie	16	-
6	43	OIN1	Leukoplakie vor Tumor	18	-
	57	OIN1	Tumor nach Leukoplakie	16	-
7	26	OIN1	Tumor nach Leukoplakie	21	-
8	19	OIN1	Leukoplakie vor Tumor	16	18
9	55	OIN1	Leukoplakie vor Tumor	18	20
	56	N	Leukoplakie vor Tumor	16	21
	20	OIN1	Tumor nach Leukoplakie	16	21
	53	OIN3	Tumor nach Leukoplakie	20	-
	54	N	Tumor nach Leukoplakie	16	21
	27	N	Tumor nach Leukoplakie	16	-
10	38	OIN1	Leukoplakie vor Tumor	16	-
11	4	Ca	Leukoplakie vor Tumor	16	-
12	13	PEH	Leukoplakie vor Tumor	16	18
	61	PEH	Leukoplakie vor Tumor	16	18
	14	N	Leukoplakie vor Tumor	16	18

3.3.1 Allelische Imbalanzen (AI)

Eine allelische Imbalanz wurde bei den Patienten **Nr.4** und **Nr. 12** nachgewiesen.

Beim Patienten **Nr. 4** handelte sich um Proben aus einer Mundschleimhautmetastase eines bestehenden Mundschleimhautkarzinoms. Die Mikrosatelliten-PCR hat folgende Ratios für die AI geliefert:

Patient	Probe	Diagnose	Ratio CA / N
4	35	Ca	0,51
	68	Ca	0,92
	37	N	

Bei der Karzinom(Ca)-Probe Nr. 35 zeigt sich eine AI (Ratio < 0,79) des CA-SSR I. Die CA-Probe Nr. 68 stellt keine AI dar (Ratio > 0,79 und < 1,27).

Eine Plattenepithelhyperplasie (PEH) zeigt sich in der Leukoplakie vor der Entwicklung eines Karzinoms beim Patienten **Nr. 12**. Ergebnisse der Mikrosatelliten-PCR sind:

Patient	Probe-Nr.	Diagnose	Ratio PEH / N
12	13	PEH	0,49
	61	PEH	8,06
	14	N	

Die Ratios beiden PEH-Proben weisen auf eine AI in der Leukoplakie hin (Ratio < 0,79 bzw. > 1,27).

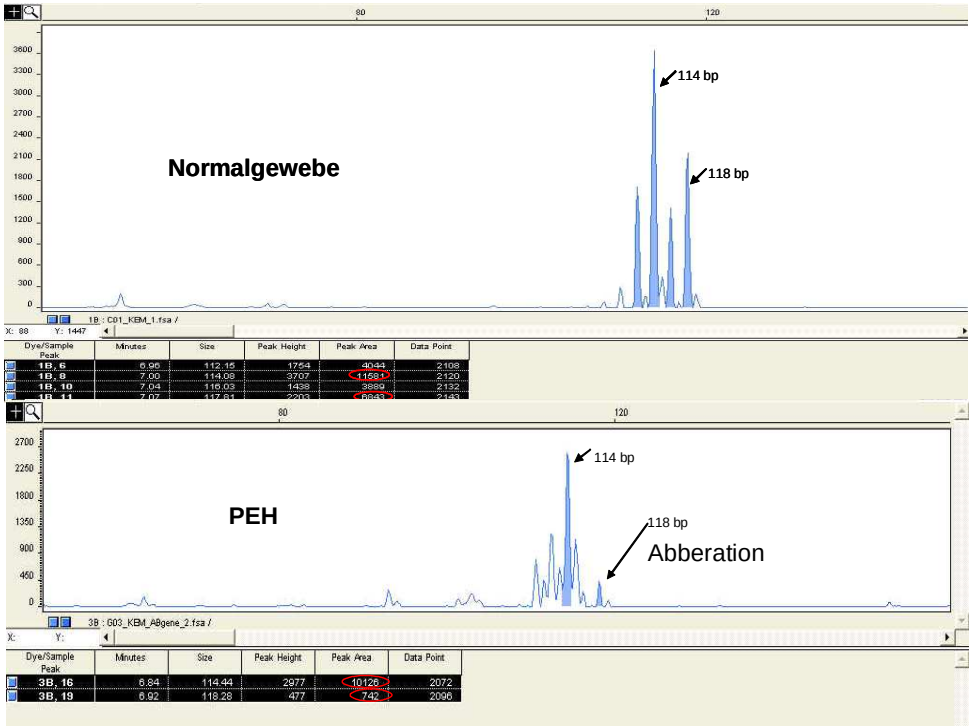


Abbildung 15: Elektropherogram zweier Proben des Patienten Nr. 12. Oben das Normalgewebe mit Allellängen 114 und 118. Unten die PEH mit Allellängen 114 und 118. Das längere Fragment weist in der PEH eine geringere Häufigkeit auf, was auf eine genetische Abberation im EGFR-Gen schließen lässt.

Bei den restlichen 10 Patienten wurde nach der Mikrosatelliten-PCR eine quantitative real-time PCR mit einem *Housekeeping*-Gen als Referenz durchgeführt um die Gendosis des CA-SSR I zu bestimmen (siehe 2.3.7.2).

Die Proben Nr. 41, 19 und 27 der Patienten **Nr. 3, 8** bzw. **9** konnten ausgewertet werden. Die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR sind in Tabelle 13 zusammengefasst und in Abbildung 16 graphisch dargestellt.

Tabelle 13: Die Ratios der Gendosen des CA-SSR I (c[egfr]) bzw. des *Housekeeping*-Gens CH10 (c[ch10]) und deren Standardabweichungen (SD, *standard deviation*).

Probe	c[egfr]	c[ch10]	Ratio	SD
41	0,0017	0,0013	1,33	$1,88*10^{-5}$
27	0,0001	0,0023	0,047	$4,03*10^{-5}$
19	0,0014	0,01	0,14	$1,23*10^{-4}$

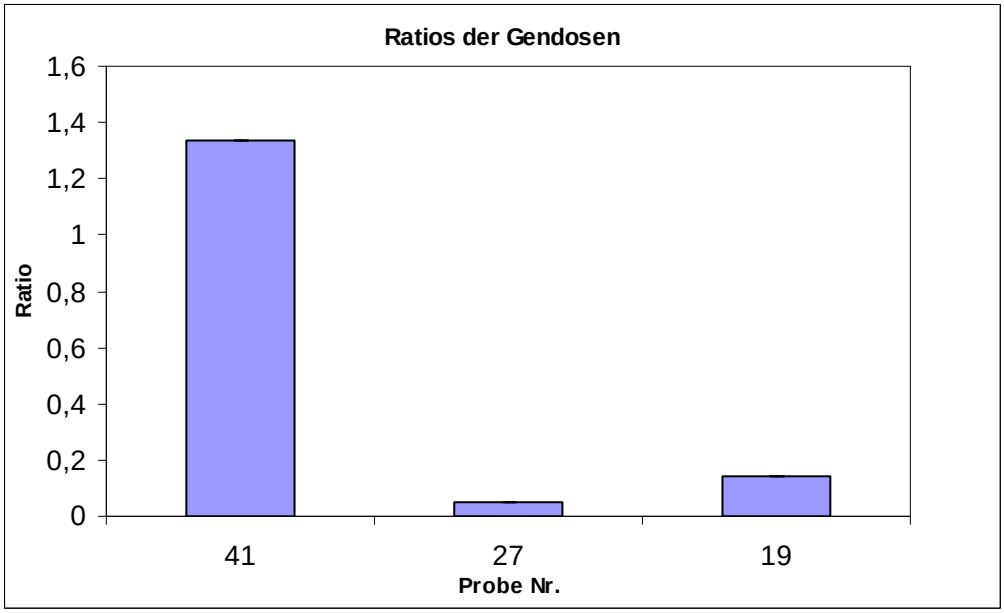


Abbildung 16: Ratios der Gendosen für die Proben Nr. 41, 29 und 19. Die Werte der Standardabweichungen sind zu niedrig, um die in der Graphik sichtbar darzustellen.

Bei allen drei Proben wurden die Ratios der Konzentrationen von EGFR und dem *Housekeeping*-Gen bestimmt und dazu die Standardabweichungen und der p-Wert.

Bei der Probe 41 handelt es sich um eine schwache intraepitheliale Neoplasie (OIN1) in einer Leukoplakie vor dem Tumor. Der Genotyp ist 16/16 CA-Repeats. Die Ratio liegt bei 1,33, der p-Wert < 0,001. Dies weist signifikant auf eine Amplifikation schon in einer leichten Dysplasie hin.

Die Probe Nr. 27 stammt von dem Patienten Nr. 9 und wurde als Normalgewebe differenziert, allerdings aus einem Tumorpräparat des Patienten. Der Genotyp war

16/16 CA-Repeats. Die Ratio beträgt 0,047 und der p-Wert liegt bei < 0,05. Damit ist bei dieser Probe von einer Deletion auszugehen, die in einem histologischem Normalgewebe zu finden ist.

Die Probe Nr. 19 (Patient Nr. 8), eine leichte orale intraepitheliale Neoplasie (OIN1) hat eine Allelkombilation 16/18 CA-Repeats. Die Ratio beträgt 0,14. Der p-Wert liegt bei < 0,001. Es handelt sich hier um eine Deletion in einer Leukoplakie.

4 Diskussion

Die Leukoplakie gilt allgemein als der wichtigste Prädiktorfaktor des oralen Mundschleimhautkarzinoms. Nicht ungewöhnlich sind histologische Dysplasien in den präkanzerosen Stadien. In einer Studie mit 3256 Patienten (in den USA) mit einer oralen Leukoplakie wurde eine milde bis moderate Dysplasie in 12.2% und eine schwere Dysplasie bzw. Carcinoma in situ in 4.5% der Fälle gefunden (Waldron & Shafer, 1975). Eine ungarische Studie mit 500 Patienten zeigte eine epitheliale Dysplasie in 24% der oralen Leukoplakien (Banoczy & Csiba, 1976). In der Leukoplakiegruppe der vorliegenden Arbeit wurde in 1,5 % der Leukoplakien eine schwere Dysplasie gefunden.

Nicht nur histologisch finden sich in der Leukoplakie Anomalien, die zur Malignität beitragen können. Die Expression des EGFR kann erhöht sein (Beenken *et al.*, 1994). Eine Studie zeigte genetische Abberationen des EGFR an Patienten auch mit nicht-dysplastischen Leukoplakie (Werkmeister *et al.*, 1999). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die EGFR-Rate mit dem steigenden Dysplasiegrad in den oralen Leukoplakien zunimmt (Srinivasan & Jewell, 2001).

Eine besondere Rolle spielt die polymorphe Sequenz (CA-SSR I) des Intron 1 im EGFR-Gen. Das Model der Funktion des CA-SSR I ist in 1.3.3 beschrieben. In Mammakarzinomen wurde der Polymorphismus und allelische Imbalanz des CA-SSR I bereits nachgewiesen (Brandt *et al.*, 2004; Tidow *et al.*, 2003). Bei Patienten mit rektalen Karzinomen, die einen Rezidiv entwickelt hatten, beobachtete man ein schnelleres Auftreten eines Rezidives bei einem kürzeren CA-Repeat (unter 20 CA) (Zhang *et al.*, 2005).

Aufgrund der oben aufgeführten wissenschaftlichen Erkentnissen wurde in der vorliegenden Arbeit die Länge des CA-SSR I in oralen Leukoplakien und Vorstufen des Mundschleimhautkarzinoms bestimmt. Zusätzlich wurde im Karzinomkollektiv das CA-SSR I des EGFR-Gens mittels quantitativen real-time PCR auf allelische Imbalanzen untersucht.

4.1 CA-SSR I-Polymorphismus in oralen Leukoplakien

Wir untersuchten die Länge des CA-SSR I in 339 oralen Leukoplakien mittels einer konventionellen PCR. Die Ergebnisse wurden mit den Daten der Normalpopulation verglichen. Anders als in den oralen Karzinomen gibt es nach dem aktuellen Stand der Literatur keine Studien, in denen das CA-SSR I in den potentiell prämalignen oralen Leukoplakien untersucht wurde. Lediglich wurde eine Polysomie des Chromosoms 7 (Voravud *et al.*, 1993) (auf dem das EGFR liegt) nachgewiesen und die Proteinexpression des EGFR untersucht. Von Interesse war, ob das CA-SSR I schon in der Leukoplakie eine für erhöhte Expression des EGFR und damit mögliche Malignität günstige Länge aufweist.

Die Ergebnisse bestätigen den Polymorphismus des CA-SSR I. Die Genotypen erstrecken sich zwischen 13 und 22 CA-Repeats. Im Vergleich mit der Normalpopulation (Brandt et al., 2004)(Brandt *et al.*, 2004) zeigte sich keine abweichende Häufigkeit der Allelkombinationen. Die drei häufigsten sind 16/16, 16/18 und 16/20 in beiden Gruppen. Es wurde ein durchaus als signifikant zu betrachtendes Risiko für eine Leukoplakie bei Patienten mit mindestens einem kürzeren Allel (≤ 17, ≤ 18, ≤ 19 CA-Repeats) nachgewiesen (p-Wert 0.058-0.063). Es ist bekannt, dass kürzere CA-Repeats mit einer erhöhten Aktivität der Transkription des EGFR-Gens einhergehen(Gebhardt *et al.*, 1999). Auch wurden bereits eine Überexpression sowie genetische Abberationen des EGFR in der Leukoplakie beschrieben (Srinivasan & Jewell, 2001; Werkmeister *et al.*, 1999).

Der im Rahmen dieser Arbeit bestätigte Trend zu kürzeren Allelen legt die Hypothese nahe, dass bereits bei der oralen Leukoplakie eine erhöhte Transkription des EGFR-Gens vorliegt. Aufgrund des kleinen Kollektivs von 339 Patienten sollte diese hypothetische Aussage durch weitergehende Untersuchungen untermauert werden.

Bei 218 Patienten (64%) war die genaue Lokalisation der Läsionen bekannt. Zu 17 % fanden sich die Leukoplakien in der Mundschleimhaut der Wangen. Jeweils 10,1 % der Läsionen bildeten sich am Zungenrand oder am Gaumen, und zu 9,6 % waren die Stellen auf dem Mundboden lokalisiert. Zungenrand und Mundboden gehören zu den „*high-risk*“ Zonen für orale Mundschleimhautkarzinome, und in allen 4

Lokalisationen sah man eine Tendenz zu kürzeren Allelen (< 19). Leider fehlen genauere Daten zu Geschlecht, Alter und Risikofaktoren der Patienten.

4.2 CA-SSR I – Polymorphismus in oralen Plattenepithelkarzinomen und deren Vorstufen

In einer Studie von Etienne-Grimaldi *et al* (Etienne-Grimaldi *et al.*, 2005). wurden 112 Patienten mit Kopf- und Halstumoren untersucht. Davon waren die meisten (64) oropharyngeal lokalisiert, oral nur 8 Karzinome. 86,6% der Patienten waren Kaukasier. Der CA-Repeat lag zwischen 15 und 22 sowohl im Tumorgewebe als auch im Normalgewebe (entnommen aus der Mundhöhle von 91 Patienten). Das häufigste Allel in Tumoren betrug sowohl in Tumoren als auch im Normalgewebe 16 CA-Repeats (46,9% bzw. 47,1%). Die häufigste Allelkombination (26%) war 16/16 CA-Repeats. Amador *et al*. untersuchten das CA-SSR I in 12 Zelllinien der Kopf- und Halstumore und bestimmten die Expression des EGFR (mRNA und Protein). Zellen mit einer niedrigen CA-Repeat-Anzahl wiesen eine erhöhte Expression des Proteins und eine höhere Transkriptionsrate auf. Die Möglichkeit einer erhöhten Proteinexpression aufgrund einer EGFR-Gen Amplifikation wurde mittels FISH-Analyse ausgeschlossen. Zusätzlich wurde die Anzahl der CA-Repeats in der tumoralen DNA von 30 Patienten mit DNA in peripheren Blutzellen der Patienten verglichen. Die Anzahl der CA-Repeats war identisch in Tumoren und Blutzellen. Es konnte also keine somatische Mutation der CA-SSR I Region im Rahmen der Tumorgenese nachgewiesen werden (Amador *et al.*, 2004).

Verglichen mit den oben genannten Studien bestätigt die vorliegende Arbeit die Häufigkeit von 16 CA-Repeats im CA-SSR I sowie in der Neoplasie als auch im Normalgewebe.

Es finden sich unterschiedliche Genotypen innerhalb eines Patienten, ferner innerhalb eines Tumors und innerhalb der gleichen histo-pathologischen Diagnose. Eine Instabilität der Allele während der Tumorgenese ist anzunehmen. Eine so genannte „field cancerisation“ ein für die Plattenepithelkarzinome bekanntes Phänomen. Somit können mehrere Klone innerhalb eines makro- und mikroskopisch

als homogen wirkenden Tumors vorkommen. Hiermit wären die unterschiedlichen Genotypen innerhalb des zweiten Tumors beim Patienten Nr. 1, im Karzinom des Patineten Nr.3 und im Tumor des Patienten Nr.9 zu erklären. Sogar in einer Leukoplakie Patienten Nr.5, Nr. 9 und im umgebenden Normalgewebe einer Leukoplakie (vor einem Tumorrezidiv) beim Patienten Nr. 2 findet sich ein solches Phänomen.

Eine weitere Erklärung für die Instabilität ist, dass in verschiedenen Stadien der Kanzerogenese ein anderer Genotyp-Klon im Vordergrund steht. Dasselbe gilt dann für die neu entstandenen Läsionen nach einer vollständigen chirurgischen Entfernung. Somit sehen wir eine andere Allelänge des CA-SSR I in einem Primärtumor und in einem Rezidiv, bzw. in der Leukoplakie und nachfolgendem Karzinom (s. Tabelle 12).

4.3 Genetische Aberration des CA-SSR I in frühen Stadien der oralen Kanzerogenese

Amplifikationen in Onkogenen wie EGFR sind bekannte Mechanismen in der Entstehung und Progression maligner Tumore. Werkmeister *et al*. (Werkmeister *et al.*, 2000) untersuchten Mundschleimhautkarzinome von 110 Patienten und tumor-umgebendes histologisch gesundes Gewebe eines Kollektivs von 84 Patienten. Bei 22 Patienten (20,2%) wurde eine Amplifikation des EGFR-Gens festgestellt, bei 15 Patienten eine Deletion. Bei der Untersuchung der histologisch normalen Mukosa wurde in 14,2% der Patienten eine Amplifikation, in 9,5% eine Deletion gefunden. Allerdings gab es keine signifikant relevanten Unterschiede für die Tumorprogression bei Patienten mit Amplifikationen in der gesunden Mukosa und der mit einer durchschnittlichen Genkopienzahl zwischen 0,4 – 1,6 (keine Aberrationen).

Einige Studien zeigten, dass Amplifikationen des EGFR-Gens auch isoliert in der Region vorkommen, wo Intron 1 mit der regulatorischen Sequenzen liegt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese mit der Expression des EGFR in Mammakarzinomen assoziiert sind (Kersting *et al.*, 2004). Solche Amplifikationen konnten sogar in dem die Tumore umgebenden, histologisch normalen Gewebe gefunden werden (Tidow *et al.*, 2003). Eine interethnische Studie der Mammakarzinome von Buerger *et al*. (2004) zeigte eine Korrelation zwischen der

Länge des CA-SSR I und der Häufigkeit der Amplifikationen dieser Sequenz. Japanische Patientinnen hatten in der Regel längere CA-SSR I als deutsche Patientinnen (67 % > 18 CA-Repeats) und gleichzeitig eine signifikant niedrigere EGFR-Expression. Allelische Imbalanzen (AI) kamen in der Studie häufiger bei den japanischen Frauen vor (55 % vs. 34 %). Des Weiteren wiesen diese signifikant häufiger Amplifikationen des CA-SSR I auf (Buerger *et al.*, 2004).

Anhand der oben aufgeführten Beobachtungen haben wir die Patienten mit Mundschleimhautkarzinomen auf allelische Imbalanzen (AI) des CA-SSR I untersucht.

In 2 Patienten (16,7 %) wurde eine nicht näher definierte AI nachgewiesen: Beim ersten Patienten im metastasierten Mundschleimhautgewebe eines oralen Primärtumors, beim zweiten Patienten war allerdings die AI schon in der epithelialen Hyperplasie nachzuweisen. Wie das Follow-Up dieses Patienten zeigte, ist auf dem Boden dieser Leukoplakie ein Karzinom entstanden.

In der quantitativen real-time PCR Analyse wurde bei 3 Patienten (25 %) eine genetische Abberation des CA-SSR I nachgeweisen: eine signifikante Amplifikation in der leichten Dysplasie (OIN 1) eine Deletionen ebenfalls in einer OIN 1 und eine Deletion in einem dem Tumor anliegendem, histologisch als normal klassifiziertem Gewebe.

Zusammengefasst wurden in dieser Arbeit 4 Patienten (33,4%) mit einer sehr frühen genetischen Abberation gefunden. Weder die Hyperplasie noch die OIN 1 in Leukoplakien sind Indikationen zur chirurgischen Intervention oder anderen Therapien. Unsere Beobachtungen korrelieren mit denen von Werkmeister *et al*. aufgeführten Daten und zeigen eine ähnliche Tendenz in der Tumorgenese der oralen Karzinome wie für die Entstehung des Mammakarzinoms.

Aufgrund des sehr kleinen Kollektivs von 12 Patienten besteht auf diesem Gebiet weiterer Forschungsbedarf mit größeren Patientenkollektiven um statistisch sichere Aussagen treffen zu können.

4.4 Materialqualität und Gewebsheterogenität

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeschnitte der oralen Karzinome zeigten eine hohe Heterogenität. Wie in der Abbildung 14 gezeigt, wurden auf einer kleinen Fläche Normalgewebe mehrere Dysplasiegrade und Karzinomgewebe diagnostiziert. Dies erschwerte die Präzision der manuellen Mikrodissektion. Zusätzlich konnte die DNA durch Verarbeitung (Paraffin, Färbung) und Alter des Gewebes (bis zu 16 Jahren) beschädigt geworden sein, was zu Strangbrüchen und dadurch zu kleineren DNA-Fragmenten für die Analyse führen konnte. Diese Bedingungen haben dazu beigetragen, dass einige der Proben nicht auswertbar waren: von 403 Patienten mit oralen Leukoplakien konnten wir 64 (15,88%) der paraffin-eingebetteten Proben nicht auswerten. Das Gewebematerial für die Untersuchung der Karzinome war von minderer Qualität, so dass hier von ursprünglich 92 Proben nur 44 erfolgreich analysiert werden konnten.

4.5 Feldkanzerisierung

Das Prinzip der „*field cancerization*“ wurde das erste Mal von Slaughter 1953 (Slaughter *et al.*, 1953) für das Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches beschrieben. Hiernach ist die orale Mukosa gegenüber kanzerogenen Substanzen sehr anfällig. Aufgrund multipler genetischer Anomalien besitzt sie ein hohes Risiko für präkanzerose Läsionen. Orale Karzinome entstehen dadurch auf dem Boden multifokaler Areale mit Präkanzerosen. Auch das umgebende Gewebe ist durch toxische Substanzen wie Tabak und Alkohol häufig abnorm und genetisch verändert. Zum Beispiel findet sich eine erhöhte Expression der EGFR-mRNA nicht nur in den oralen Plattenepithelkarzinomen, sondern auch in dem angrenzenden, histologisch als „normal“ diagnostizierten Gewebe (Grandis & Tweardy, 1993). Diese ausgedehnte Veränderung der oralen Mukosa kann zusätzlich auch die häufigen Rezidive nach chirurgischer Exzission erklären.

IN der vorliegenden Arbeit wurde beim Patienten Nr. 9 eine Deletion des CA-SSR I (Probe Nr. 27) im Normalgewebe nachgewiesen, somit eine genetische Abberation im Normalgewebe gefunden, was für das Phänomen der *„field cancerization“* spricht.

4.6 EGFR-Inhibitoren als Therapie und mögliche Chemoprävention

Wie in 1.1.8 beschrieben, ist eine komplette chirurgische Resektion und ggf. anschließende lokale Bestrahlung die Standardtherapie der oralen Tumore bzw. der mittel- und schwerdysplastischen Leukoplakie.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass eine histologisch nicht-dysplastische Leukoplakie genetische Abberationen des CA-SSR I im EGFR-Gen aufweisen kann, so dass eine gezielte und rechtzeitig angewendete Therapie in Betracht gezogen werden sollte. Die EGFR-spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) sind ein vielversprechender Ansatz für die medikamentöse Therapieentwicklung in den HNSCC. Einer der wichtigen Vorteile der TKI im Vergleich zu anderen EGFR-Inhibitoren ist die einfache orale Einnahme der Medikamente.

Erste Ergebnisse des Therapieansatzes mittels EGFR-Inhibitoren zeigt die Studie von Bonner et al. Es wurden zwei Patientengruppen mit Kopf- und Halstumoren untersucht. Eine Gruppe wurde nur mit Radiotherapie und die andere mit Radiotherapie in Kombination mit Cetuximab (monoklonaler Antikörper gegen den Ligandenteil des EGFR) behandelt. Die Überlebenszeit betrug im Durchschnitt 49,0 Monate in der Gruppe mit Kombinationstherapie und 29,3 Monate bei den Patienten, die nur Radiotherapie erhalten haben. Radiotherapie kombiniert mit Cetuximab konnte die tumorprogressionsfreie Überlebenszeit der Patienten signifikant verlängern. Die Inzidenz der Nebenwirkungen inklusive der Mukositis unterschied sich in den beiden Patientengruppen nicht signifikant (Bonner *et al.*, 2006).

In einer Studie von Amador et al. wurde ein eindrucksvoller Zusammenhang zwischen der Anzahl der CA-Repeats im Intron 1 des EGFR-Gens und dem Ansprechen auf Erlotinib (spezifischer EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor) beschrieben. 12 Zellinien des HNSCC wurden mit verschieden Konzentrationen des Erlotinibs behandelt. Vier der fünf Zellinien (80%) mit der Summe der CA-Repeats beider Allele > 35 waren resistent. Dagegen waren sieben der acht Zellinien mit einer Summe der CA-Repeats von ≤ 35 empfindlich gegenüber Erlotinib. Auch das relative Wachstum der Zellen war in Linien mit hohen CA-Repeat-Anzahl deutlich höher: 75 +/- 32% gegenüber 38 +/- 21%(Amador *et al.*, 2004). Die länge des CA-SSR I und damit die

Proteinexpression steht im direkten Zusammenhang mit dem Ansprechen auf die Inhibitoren. Für den Einsatz der Therapie ist eine Genotypisierung des EGFRs von Bedeutung und kann zu einer präziseren Auswahl der Patienten für eine EGFR-gezielte Therapie dienen.

Für eine Einteilung in Hoch- und Niedrigrisikogruppen kann eine nicht invasive Biopsie der Leukoplakie bei der Erstdiagnose und daran anschließende genetische Untersuchung des EGFR-Gens dienen. Die Hochrisikogruppe könnte dann mittels der EGFR-Inhibitoren behandelt werden.

5 Zusammenfassung

Die orale Leukoplakie zählt zu den häufigsten Präkanzerosen des oralen Plattenepithelkarzinoms. Das Mundschleimhautkarzinom selber gilt als aggressiver Tumor mit einer schlechten Prognose und einer hohen Rezidivrate.

Das epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) weist in vielen malignen Tumoren eine Überexpression auf. Auch in den oralen Leukoplakien wurde eine Überexpression mit steigendem Dysplasiegrad beobachtet. Zudem sind genetische Abberationen des EGFR in nicht-dysplastischen Leukoplakien beschrieben worden.

Die Genstruktur beinhaltet im Intron 1 einen polymorphen SSR (simple sequence repeat), der aus 14-21 CA-Dinukleotiden besteht. Es wurde *in vitro* nachgewiesen, dass die Aktivität der Transkription des EGFR-Gens durch kürzere CA-Repeats begünstigt wird. Eine längere Struktur des CA-Repeats vermindert die Transkription.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des CA-SSR I im Intron 1 des EGFR-Gens in einem Kollektiv oraler Leukoplakien (339 Patienten) und einem Kollektiv oraler Plattenepithelkarzinome (12 Patienten). Die Bestimmung der Länge des CA-SSR I erfolgte mittels einer Mikrosatelliten-PCR. Für die Untersuchung der allelischen Imbalanzen in der Gruppe mit Plattenepithelkarzinomen wurde anschließend eine real-time-PCR angesetzt.

Zusammenfassend konnten folgenden Daten für das erste Kollektiv (orale Luekoplakie) erhoben werden:

1. Die Länge des CA-SSR I in oralen Leukoplakien erstreckt sich zwischen 13 und 22 CA-Repeats. Die drei häufigsten Allelkombinationen sind 16/16, 16/18 und 16/20 CA-Repeats. Die häufigsten Genotypen sind somit nicht von der Verteilung in der Normalpopulation abweichend.
2. Die vier häufigsten Lokalisation Wange, Gaumen, Mundboden und Zungenrand weisen allen einen Trend zu kürzeren Allelen (<19 CA-Repeats) auf, letzteres sogar für die Grenzwerte 17 und 18 CA-Repeats. Der Zungenrand und der Mundboden gehören gleichzeitig zu den „high-risk“-Zonen für eine maligne Entwicklung.

Die Analyse des zweiten Kollektivs von 12 Patienten mit oralen Plattenepithekarzinomen ergab ein stark heterogenes Bild. Das häufigste Allel des Kollektivs hat 16 CA-Repeats (72%) unabhängig vom Stadium oder Diagnose. Das Ergebnis bestätigt die bereits für Hals- und Kopftumore beschriebene Häufigkeitsverteilung(Etienne-Grimaldi *et al.*, 2005). Die Allellängen variierten innerhalb eines Präparates, sogar im histo-pathologisch gleichen Stadium. Dieses Phänomen ist durch die Feldkanzerizierung (*„field cancerization“*) zu erklären. Zudem ergab sich die Hypothese, dass in verschiedenen Stadien bzw. in unterschiedlichen Tumoren eines Patienten ein anderer Klon des Genotyps im Vordergrund der Tumorgenese steht.

Bei 4 Patienten (33,4%) wurden genetische Abberationen des CA-SSR I im frühen Stadium nachgewiesen. Besonders auffallend war eine nachgewiesene Deletion im die Leukoplakie umgebenden Normalgewebe. Unsere Ergenbisse korrelieren mit den bereits veröffentlichten Daten zu oralen Karzinomen (Werkmeister *et al.*, 2000).

Die Allelverteilung des CA-SSR I in den oralen Leukoplakien unterscheidet sich nicht von der in der Normalpopulation. Es ist jedoch ein Trend zu kürzeren Allelen zu verzeichnen. In den frühen Vorstufen eines oralen Karzinoms konnten allelische Imbalanzen nachgewiesen werden. Nach dem heutigen klinischen Standard stellen weder die epitheliale Hyperplasie noch die leichte orale Dysplasie eine Indikation zu einer therapeutischen Intervention dar. Eine Malignomentwicklung kommt zwar nur selten vor, ist dann jedoch mit einer sehr schlechten Prognose (5-Jahres-Überlebensrate 40-60%) assoziiert. Es sollte mindestens eine chirurgische Exzision aller Leukoplakien angestrebt werden. Eine anschließende Untersuchung des EGFR-Gens und eine Einteilung in Hoch- und Niedrigrisikogruppen für eine gezielte Gentherapie sollte diskutiert werden. Es ist jedoch zuerst notwendig repräsentative Studien mit größeren Kollektiven durchzuführen, um statistisch sichere Aussagen treffen zu können.

6 Literaturverzeichnis

Leitlinien der AWMF online, Interdisziplinäre Kurzgefaßte Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und ihrer Arbeitsgemeinschaften, der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Karzinome des oberen Aerodigestivtrakts, 2000. http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/ll-na/032-031.htm.

Alroy, I.Yarden, Y. (1997). The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* **410,** 83-6.

Amador, M. L., Oppenheimer, D., Perea, S., Maitra, A., Cusatis, G., Iacobuzio-Donahue, C., *et al.* (2004). An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res* **64,** 9139-43.

Awaya, H., Takeshima, Y., Furonaka, O., Kohno, N. &Inai, K. (2005). Gene amplification and protein expression of EGFR and HER2 by chromogenic in situ hybridisation and immunohistochemistry in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *J Clin Pathol* **58,** 1076-80.

Axell, T. (1987). Occurrence of leukoplakia and some other oral white lesions among 20,333 adult Swedish people. *Community Dent Oral Epidemiol* **15,** 46-51.

Axell, T., Holmstrup P, Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M (1984). International seminar on oral leukoplakia and associated lesions related to tobacco habits. *Comunity Dent Oral Epidemiol* **12,** 145-154.

Banoczy, J. (1977). Follow-up studies in oral leukoplakia. *J Maxillofac Surg* **5,** 69-75.

Banoczy, J.Csiba, A. (1976). Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **42,** 766-74.

Beenken, S. W., Huang, P., Sellers, M., Peters, G., Listinsky, C., Stockard, C.*, et al.* (1994). Retinoid modulation of biomarkers in oral leukoplakia/dysplasia. *J Cell Biochem Suppl* **19,** 270-7.

Boffetta, P., Mashberg, A., Winkelmann, R. &Garfinkel, L. (1992). Carcinogenic effect of tobacco smoking and alcohol drinking on anatomic sites of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* **52,** 530-3.

Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B.*, et al.* (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **354,** 567-78.

Bouquot, J. E.Gorlin, R. J. (1986). Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **61,** 373-81.

Bouquot, J. E., Weiland, L. H. &Kurland, L. T. (1988). Leukoplakia and carcinoma in situ synchronously associated with invasive oral/oropharyngeal carcinoma in Rochester, Minn., 1935-1984. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **65,** 199-207.

Brandt, B., Vogt, U., Schlotter, C. M., Jackisch, C., Werkmeister, R., Thomas, M.*, et al.* (1995). Prognostic relevance of aberrations in the erbB oncogenes from breast, ovarian, oral and lung cancers: double-differential polymerase chain reaction (ddPCR) for clinical diagnosis. *Gene* **159,** 35-42.

Brandt, B., Hermann, S., Straif, K., Tidow, N., Buerger, H. &Chang-Claude, J. (2004). Modification of breast cancer risk in young women by a polymorphic sequence in the egfr gene. *Cancer Res* **64,** 7-12.

Brandt, B., Meyer-Staeckling, S., Schmidt, H., Agelopoulos, K. &Buerger, H. (2006). Mechanisms of egfr gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response. *Clin Cancer Res* **12,** 7252-60.

Buerger, H., Gebhardt, F., Schmidt, H., Beckmann, A., Hutmacher, K., Simon, R.*, et al.* (2000). Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic

sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression. *Cancer Res* **60,** 854-7.

Buerger, H., Packeisen, J., Boecker, A., Tidow, N., Kersting, C., Bielawski, K.*, et al.* (2004). Allelic length of a CA dinucleotide repeat in the egfr gene correlates with the frequency of amplifications of this sequence--first results of an inter-ethnic breast cancer study. *J Pathol* **203,** 545-50.

Burkhardt, A.Seifert, G. (1977). [Morphological classification of oral leukoplakia (author's transl)]. *Dtsch Med Wochenschr* **102,** 223-9.

Cadena, D. L.Gill, G. N. (1992). Receptor tyrosine kinases. *FASEB J* **6,** 2332-7.

Cardullo, R. A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P. C. &Wolf, D. E. (1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85,** 8790-4.

Carpenter, G. (1987). Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* **56,** 881-914.

Carpenter, G. (1999). Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol* **146,** 697-702.

Chaffanet, M., Chauvin, C., Laine, M., Berger, F., Chedin, M., Rost, N.*, et al.* (1992). EGF receptor amplification and expression in human brain tumours. *Eur J Cancer* **28,** 11-7.

Chen, Z., Zhang, X., Li, M., Wang, Z., Wieand, H. S., Grandis, J. R.*, et al.* (2004). Simultaneously targeting epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and cyclooxygenase-2, an efficient approach to inhibition of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* **10,** 5930-9.

Chiesa, F., Tradati, N., Sala, L., Costa, L., Podrecca, S., Boracchi, P.*, et al.* (1990). Follow-up of oral leukoplakia after carbon dioxide laser surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **116,** 177-80.

Cowan, C. G., Gregg, T. A., Napier, S. S., McKenna, S. M. &Kee, F. (2001). Potentially malignant oral lesions in northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral Dis* **7,** 18-24.

Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L. &Lasken, R. S. (2001). Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* **11,** 1095-9.

Dimova, I., Zaharieva, B., Raitcheva, S., Dimitrov, R., Doganov, N. &Toncheva, D. (2006). Tissue microarray analysis of EGFR and erbB2 copy number changes in ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer* **16,** 145-51.

Dunsche, A., Kreusch, Th., Sauer, M. (1992). Die Leukoplakie der Mundschleimhaut - Eine retrospektive Studie an 161 Patienten. *Dtsch Zahnärztl Z* **47,** 869-870.

Einhorn, J.Wersall, J. (1967). Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of the oral mucosa. *Cancer* **20,** 2189-93.

Epstein, J. B., Wong, F. L., Millner, A. &Le, N. D. (1994). Topical bleomycin treatment of oral leukoplakia: a randomized double-blind clinical trial. *Head Neck* **16,** 539-44.

Etienne-Grimaldi, M. C., Pereira, S., Magne, N., Formento, J. L., Francoual, M., Fontana, X.*, et al.* (2005). Analysis of the dinucleotide repeat polymorphism in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in head and neck cancer patients. *Ann Oncol* **16,** 934-41.

Frame, J. W. (1985). Removal of oral soft tissue pathology with the CO2 laser. *J Oral Maxillofac Surg* **43,** 850-5.

Gale N, P. B., Sidransky D, Westra WH, Califano J (2005). Epithelial precursor lesions. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours., pp. 140-143. IARC, Lyon.

Gebhardt, F., Burger, H. &Brandt, B. (2000). Modulation of EGFR gene transcription by secondary structures, a polymorphic repetitive sequence and mutations--a link between genetics and epigenetics. *Histol Histopathol* **15,** 929-36.

Gebhardt, F., Zanker, K. S. &Brandt, B. (1999). Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* **274,** 13176-80.

Grandis, J. R.Tweardy, D. J. (1993). Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* **53,** 3579-84.

Gullick, W. J., Marsden, J. J., Whittle, N., Ward, B., Bobrow, L. &Waterfield, M. D. (1986). Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas. *Cancer Res* **46,** 285-92.

Gundlach, K. (1992). Wie viele Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle sind aus Leukoplakien entstanden? *Dtsch Z Mund-Kiefer-Gesichts-Chir* **16,** 109-111.

Gupta, P. C., Murti, P. R. &Bhonsle, R. B. (1996). Epidemiology of cancer by tobacco products and the significance of TSNA. *Crit Rev Toxicol* **26,** 183-98.

Haley, J., Whittle, N., Bennet, P., Kinchington, D., Ullrich, A. &Waterfield, M. (1987). The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res* **1,** 375-96.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. &Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6,** 986-94.

Ho, C. M., Lam, K. H., Wei, W. I., Lau, S. K. &Lam, L. K. (1992). Occult lymph node metastasis in small oral tongue cancers. *Head Neck* **14,** 359-63.

Hogewind, W. F.van der Waal, I. (1988). Prevalence study of oral leukoplakia in a selected population of 1000 patients from The Netherlands. *Community Dent Oral Epidemiol* **16,** 302-5.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. &Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88,** 7276-80.

Hollstein, M. C., Smits, A. M., Galiana, C., Yamasaki, H., Bos, J. L., Mandard, A.*, et al.* (1988). Amplification of epidermal growth factor receptor gene but no evidence of ras mutations in primary human esophageal cancers. *Cancer Res* **48,** 5119-23.

Hong, W. K., Endicott, J., Itri, L. M., Doos, W., Batsakis, J. G., Bell, R.*, et al.* (1986). 13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia. *N Engl J Med* **315,** 1501-5.

Hornstein, O. P., Grassel, R., Schirner, E. &Schell, H. (1979). [Oral candidiasis in leukoplakia and carcinoma of the oral cavity (author's transl)]. *Dtsch Med Wochenschr* **104,** 1033-6.

Hudson, L. G., Thompson, K. L., Xu, J. &Gill, G. N. (1990). Identification and characterization of a regulated promoter element in the epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87,** 7536-40.

Ishii, S., Xu, Y. H., Stratton, R. H., Roe, B. A., Merlino, G. T. &Pastan, I. (1985). Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82,** 4920-4.

Jaber, M. A., Porter, S. R., Gilthorpe, M. S., Bedi, R. &Scully, C. (1999). Risk factors for oral epithelial dysplasia--the role of smoking and alcohol. *Oral Oncol* **35,** 151-6.

Kageyama, R., Merlino, G. T. &Pastan, I. (1988). Epidermal growth factor (EGF) receptor gene transcription. Requirement for Sp1 and an EGF receptor-specific factor. *J Biol Chem* **263,** 6329-36.

Kersting, C., Tidow, N., Schmidt, H., Liedtke, C., Neumann, J., Boecker, W.*, et al.* (2004). Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. *Lab Invest* **84,** 582-7.

Klijn, J. G., Look, M. P., Portengen, H., Alexieva-Figusch, J., van Putten, W. L. &Foekens, J. A. (1994). The prognostic value of epidermal growth factor

receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res Treat* **29,** 73-83.

Kramer, I. R. (1969). Precancerous conditions of the oral mucosa. A computer-aided study. *Ann R Coll Surg Engl* **45,** 340-56.

Kramer, I. R., Lucas, R. B., Pindborg, J. J. &Sobin, L. H. (1978). Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **46,** 518-39.

Lind, P. O. (1987). Malignant transformation in oral leukoplakia. *Scand J Dent Res* **95,** 449-55.

Lippman, S. M., Batsakis, J. G., Toth, B. B., Weber, R. S., Lee, J. J., Martin, J. W.*, et al.* (1993). Comparison of low-dose isotretinoin with beta carotene to prevent oral carcinogenesis. *N Engl J Med* **328,** 15-20.

Lippman, S. M., Sudbo, J. &Hong, W. K. (2005). Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development. *J Clin Oncol* **23,** 346-56.

Liu, W., Innocenti, F., Wu, M. H., Desai, A. A., Dolan, M. E., Cook, E. H., Jr.*, et al.* (2005). A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res* **65,** 46-53.

Lotan, R., Xu, X. C., Lippman, S. M., Ro, J. Y., Lee, J. S., Lee, J. J.*, et al.* (1995). Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N Engl J Med* **332,** 1405-10.

Lyamichev, V., Brow, M. A. &Dahlberg, J. E. (1993). Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* **260,** 778-83.

Maekawa, T., Imamoto, F., Merlino, G. T., Pastan, I. &Ishii, S. (1989). Cooperative function of two separate enhancers of the human epidermal growth factor receptor proto-oncogene. *J Biol Chem* **264,** 5488-94.

Mashberg, A.Meyers, H. (1976). Anatomical site and size of 222 early asymptomatic oral squamous cell carcinomas: a continuing prospective study of oral cancer. II. *Cancer* **37,** 2149-57.

Mathew, A. L., Pai, K. M., Sholapurkar, A. A. &Vengal, M. (2008). The prevalence of oral mucosal lesions in patients visiting a dental school in Southern India. *Indian J Dent Res* **19,** 99-103.

Mehta, F. S., Gupta, P. C., Daftary, D. K., Pindborg, J. J. &Choksi, S. K. (1972). An epidemiologic study of oral cancer and precancerous conditions among 101,761 villagers in Maharashtra, India. *Int J Cancer* **10,** 134-41.

Mittermayer, C. (1993). *Oralpathologie: Erkrankungen der Mundregion; Lehrbuch für Zahnmedizin, Mund- und Kieferheilkunde.* . Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; New York.

Moreno-Lopez, L. A., Esparza-Gomez, G. C., Gonzalez-Navarro, A., Cerero-Lapiedra, R., Gonzalez-Hernandez, M. J. &Dominguez-Rojas, V. (2000). Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* **36,** 170-4.

Morrison, C.Gannon, F. (1994). The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta* **1219,** 493-8.

Piattelli, A., Fioroni, M., Santinelli, A. &Rubini, C. (1999). bcl-2 expression and apoptotic bodies in 13-cis-retinoic acid (isotretinoin)-topically treated oral leukoplakia: a pilot study. *Oral Oncol* **35,** 314-20.

Pindborg, J., Reichart PA, Smith CJ, Waal I van der. Collaboration with LH Sobin and pathologists in 9 Countries. In: World Health Organisation (eds.) (1997). *International Histological Classification of Tumors. Second Edition: Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa.* .

Pindborg, J. J. (1980). Oral cancer and Precancer. *Bristol: Wright*.

Pindborg, J. J., Jolst, O., Renstrup, G. &Roed-Petersen, B. (1968). Studies in oral leukoplakia: a preliminary report on the period pervalence of malignant

transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients. *J Am Dent Assoc* **76,** 767-71.

Pomerantz, R. G.Grandis, J. R. (2004). The epidermal growth factor receptor signaling network in head and neck carcinogenesis and implications for targeted therapy. *Semin Oncol* **31,** 734-43.

Reibel, J. (2000). Diagnosis of oral cancer. *Dtsch Zahnärztl Z* **55,** 307-312.

Reichart, P. (2000). Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dent Oral Epidemiol.* **2000 Oct,** 390-8.

Reichart, P. A.Kohn, H. (1996). Prevalence of oral leukoplakia in 1000 Berliners. *Oral Dis* **2,** 291-4.

Rikimaru, K., Tadokoro, K., Yamamoto, T., Enomoto, S. &Tsuchida, N. (1992). Gene amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* **14,** 8-13.

Ro, J., North, S. M., Gallick, G. E., Hortobagyi, G. N., Gutterman, J. U. &Blick, M. (1988). Amplified and overexpressed epidermal growth factor receptor gene in uncultured primary human breast carcinoma. *Cancer Res* **48,** 161-4.

Roed-Petersen (1971). Cancer development in oral leukoplakia: Follow up of 331 Patients. *J Dent Res* **50,** 711.

Sankaranarayanan, R., Mathew, B., Varghese, C., Sudhakaran, P. R., Menon, V., Jayadeep, A.*, et al.* (1997). Chemoprevention of oral leukoplakia with vitamin A and beta carotene: an assessment. *Oral Oncol* **33,** 231-6.

Saranath, D., Panchal, R. G., Nair, R., Mehta, A. R., Sanghavi, V. D. &Deo, M. G. (1992). Amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor gene in human oropharyngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* **28B,** 139-43.

Scheifele, C.Reichart, P. A. (1998). [Oral leukoplakia in manifest squamous epithelial carcinoma. A clinical prospective study of 101 patients]. *Mund Kiefer Gesichtschir* **2,** 326-30.

Schepman, K., der Meij, E., Smeele, L. &der Waal, I. (1999). Concomitant leukoplakia in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* **5,** 206-9.

Schepman, K. P., van der Meij, E. H., Smeele, L. E. &van der Waal, I. (1998). Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol* **34,** 270-5.

Schoelch, M. L., Sekandari, N., Regezi, J. A. &Silverman, S., Jr. (1999). Laser management of oral leukoplakias: a follow-up study of 70 patients. *Laryngoscope* **109,** 949-53.

Shah, J. P., Candela, F. C. &Poddar, A. K. (1990). The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer* **66,** 109-13.

Shin, D. M., Ro, J. Y., Hong, W. K. &Hittelman, W. N. (1994). Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* **54,** 3153-9.

Shintani, S., Matsuo, K., Crohin, C. C., McBride, J., Tsuji, T., Donoff, R. B.*, et al.* (1999). Intragenic mutation analysis of the human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in malignant human oral keratinocytes. *Cancer Res* **59,** 4142-7.

Silverman, S., Jr. (1968). Observations on the clinical characteristics and natural history of oral leukoplakia. *J Am Dent Assoc* **76,** 772-7.

Silverman, S., Jr. (2001). Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc* **132 Suppl,** 7S-11S.

Silverman, S., Jr., Gorsky, M. &Lozada, F. (1984). Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* **53,** 563-8.

Slaughter, D. P., Southwick, H. W. &Smejkal, W. (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* **6,** 963-8.

Squier, C. A., Cox, P. &Hall, B. K. (1986). Enhanced penetration of nitrosonornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J Oral Pathol* **15,** 276-9.

Srinivasan, M.Jewell, S. D. (2001). Evaluation of TGF-alpha and EGFR expression in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis by quantitative immunohistochemistry. *Oncology* **61,** 284-92.

Stich, H. F., Hornby, A. P., Mathew, B., Sankaranarayanan, R. &Nair, M. K. (1988). Response of oral leukoplakias to the administration of vitamin A. *Cancer Lett* **40,** 93-101.

Sudbo, J., Lippman, S. M., Lee, J. J., Mao, L., Kildal, W., Sudbo, A.*, et al.* (2004). The influence of resection and aneuploidy on mortality in oral leukoplakia. *N Engl J Med* **350,** 1405-13.

Sudbo, J., Ristimaki, A., Sondresen, J. E., Kildal, W., Boysen, M., Koppang, H. S.*, et al.* (2003). Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in high-risk premalignant oral lesions. *Oral Oncol* **39,** 497-505.

Tidow, N., Boecker, A., Schmidt, H., Agelopoulos, K., Boecker, W., Buerger, H.*, et al.* (2003). Distinct amplification of an untranslated regulatory sequence in the egfr gene contributes to early steps in breast cancer development. *Cancer Res* **63,** 1172-8.

Torrance, C. J., Jackson, P. E., Montgomery, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Wissner, A.*, et al.* (2000). Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia. *Nat Med* **6,** 1024-8.

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W.*, et al.* (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and

aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309,** 418-25.

van der Waal, I., Schepman, K. P., van der Meij, E. H. &Smeele, L. E. (1997). Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol* **33,** 291-301.

Voravud, N., Shin, D. M., Ro, J. Y., Lee, J. S., Hong, W. K. &Hittelman, W. N. (1993). Increased polysomies of chromosomes 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis. *Cancer Res* **53,** 2874-83.

Waldron, C. A.Shafer, W. G. (1975). Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer* **36,** 1386-92.

Warnakulasuriya, S., Speight, P. &Epstein, J. (1998). Diagnosing oral cancer: can toluidine blue mouthwash help? *FDI World* **7,** 22-6.

Werkmeister, R., Brandt, B. &Joos, U. (1999). Aberrations of erbB-1 and erbB-2 oncogenes in non-dysplastic leukoplakias of the oral cavity. *Br J Oral Maxillofac Surg* **37,** 477-80.

Werkmeister, R., Brandt, B. &Joos, U. (2000). Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol* **36,** 100-5.

Wolf Ulrich Batzler, D. K. G. M., Dr. Stefan Hentschel, G. H., Dr. Peter Kaatsch,, PD Dr. Alexander Katalinic (Redaktion GEKID), Joachim Kieschke MPH, D. K. K. M., Dr. Martin Meyer, R. S., Christa Stegmaier &Dr. Joachim Bertz, D. J. H., Dr. Ute Wolf (Redaktion RKI) (6. überarbeitete Auflage, 2008). Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. *In* "Gesundheitsberichtserstattung des Bundes" (B. Robert Koch Institut, Ed.). Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Lübeck.

Yamamoto, T., Kamata, N., Kawano, H., Shimizu, S., Kuroki, T., Toyoshima, K.*, et al.* (1986). High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Cancer Res* **46,** 414-6.

Zhang, W., Park, D. J., Lu, B., Yang, D. Y., Gordon, M., Groshen, S.*, et al.* (2005). Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Clin Cancer Res* **11,** 600-5.

7 Danksagung

Großen Dank an **Prof.rer.nat. B. Brandt**, der mir diese Aufgabe überlies und mir auch stets geduldig zu Rat stand.

Ein riesiger Dank an **Dr. Dirk Kemming**. Er half mir die Laborarbeit zu bewältigen und sein Wissen und Unmengen an Zeit und Kraft in mich investiert.

An dieser Stelle danke ich auch dem Archiv des **Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie** der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) in Münster für die Überlassung des Gewebematerials für diese Arbeit.

Mein Dankeschön geht auch an **Dr. Riethdorf** für die histo-pathologische Beurteilung der Präparate.

Ich bedanke mich bei **Dr. Sönke Meyer-Staeckling**, **Natalia Bednarz**, **Antje Andreas** und **Malgorzata Stoupiec** für Eure Hilfe während allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit. Ohne Euch wäre es nicht möglich gewesen. DANKE!

Mein Dank geht auch an alle andere **Mitarbeiter** des Instituts für eine gute Atmosphäre und Zusammenarbeit.

An dieser Stelle auch ein Dank an meine **Eltern**, die mich durch das ganze Studium begleitet, finanziell und emotional unterstützt und gefördert haben.

An alle meine Freunde, die an mich stets geglaubt haben und bei mir geblieben sind. Vor allem Dank an **Karolina** und **Antje**.

Mein besonderer Dank vom ganzen Herzen geht an **Marco**. Für den Mut, die Hoffnung, die Unterstützung und die Ablenkung.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Alena Vlachová
wohnhaft in:	Semperstraße 33, 22303 Hamburg
geboren am:	08.06.1983
in	Prag, Tschechien
Staatsangehörigkeit:	tschechisch

Beruflicher Werdegang

seit 10/2009	Assistenzärztin in der internistischen Klinik, St. Adolf-Stift Krankenhaus Reinbek, Reinbek

Hochschulstudium

14/07/2009	Erhalt der Approbation als Ärztin
24/06/2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2008 – 01/2009	Praktisches Jahr
10/2005 – 03/2010	Dissertation im Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Eppendorf unter Anleitung von Prof. B. Brandt zum Thema: „Untersuchung des CA-SSR I im Intron 1 des egfr-Gens in oralen Leukoplakien und oralen Plattenepithelkarzinomen“
10/2004	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2002 – 06/2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg Eppendorf
05/2002	Erhalt eines Jahresstipendiums Deutsch-Tschechischen-Gesellschaft Hamburg für ein Studienjahr an der Universität Hamburg

Schulausbildung

1996 – 2002	Gymnasium „Na Prazacce“ Prag, Tschechien (tschechische und deutsche allgemeine Hochschulreife)

Hamburg, den 07. April 2010

Ort, Datum — Alena Vlachová

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 07. April 2010

_____

Alena Vlachová