

Joerg Eisendick

Dr. med. dent.

## **Untersuchung Zellzyklus-assoziierter Biomarker in oralen Leukoplakien**

Geboren am 26.12.1972 in Mannheim

Reifeprüfung am 19.05.1992 in Schwetzingen

Studiengang der Fachrichtung Zahnmedizin vom SS 1996 bis WS 2001

Physikum am 06.10.1998 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Staatsexamen am 19.12.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Mund-Zahn-Kieferheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Mühling

Die Anwendung molekularbiologischer Methoden findet zunehmend Anwendung in der Diagnostik und histopathologischen Beurteilung biopsierter Gewebe. Molekulare Biomarker sollen neben der makromorphologischen Klassifikation die Möglichkeit schaffen, einzelne Stadien prämaligener Läsionen genauer zu klassifizieren, um das individuelle Risiko einer malignen Transformation besser abschätzen zu können.

Im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung wurden 39 Leukoplakien des Mundraumes nach makromorphologischer Klassifikation in einzelne Dysplasiegrade immunhistochemisch nach dem Prinzip der Avidin-Biotin-Komplex-Färbung analysiert. Es galt Hinweise zu erarbeiten, inwieweit das Kernporen-Protein hnRNP B1 bzw. einige der insgesamt 12 verwendeten Zellzyklus-assozierten Proteine als mögliche Biomarker in Frage kommen könnten. Aufgabe war es, die jeweils nachgewiesenen Proteine in den einzelnen Dysplasiegraden semiquantitativ zu bestimmen. Der genauen Verteilung der einzelnen Marker sollte ebenfalls Aufmerksamkeit gewidmet werden, um einzelne Grade zu vergleichen und mögliche Tendenzen zu ermitteln.

Bei der Untersuchung aller 12 verwendeten Marker konnte in einigen Fällen eine annähernde Korrelation zwischen steigendem Dysplasiegrad und zu- oder abnehmender Expression festgestellt werden. So wiesen MIB, p53, BCL2 und Cyclin D1 eine tendenzielle

Expressionszunahme auf. Aufgrund der geringen Fallzahlen kann diese Aussage allerdings nicht als gesichert angesehen werden. Ebenso weiter ungeklärt ist die Frage, ob etwa, wie im konkreten Fall von p53, die gesteigerte Zellaktivität innerhalb der Dysplasien auf Mutationen beruht oder ob es sich in den höherdysplastischen Graden um eine erhöhte Expression des Wildtyp-Proteins handelt, welches jedoch durch Komplexierung funktionell gehemmt ist.

Ob in einigen Fällen die vorliegende Nichtexpression etwa auf Expressionsverlust auf mRNA-Ebene oder auf Allel-Verlust zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht ermittelt werden. Hierzu bedarf es weiterführender Untersuchungen wie PCR-Verfahren bzw. LOH („loss of heterozygosity“)-Analysen.

Bei einem Teil der untersuchten Marker war aufgrund zu großer Abweichungen innerhalb der Dysplasiegrade bzw. durch mangelnden, immunhistochemischen Nachweis (so z.B. bei CdK4) keine Aussage möglich.

Die Analyse des Kernporen-Proteins hnRNP B1 ergab keinerlei zufriedenstellende Ergebnisse. Färbungen unterschiedlicher, gesunder Gewebe der Uvula und des Dünndarms, leukoplakisch veränderter Mundschleimhaut und eines Bronchial-Carcinoms ließen keinerlei Unterschiede hinsichtlich ihres Expressionsgrades erkennen. In allen Präparaten fanden sich generalisiert unspezifische Kern- bzw. Plasmafärbungen von Plattenepithel-, Entzündungszellen und Drüsenepithelien. Auch mehrfach durchgeführte Färbungen konnten dieses Ergebnis nur bestätigen. Allein die Tatsache, daß ein eindeutiger Positiv-Nachweis von hnRNP B1 in gesundem Uvula-Gewebe vorlag, läßt dieses Protein weder als geeigneten Marker früher Ereignisse noch als Tumormarker erscheinen.

Durch Auswertung einzelner Marker war eine genaue Abgrenzung zwischen hochdysplastischen Leukoplakien des Grades 2 bzw. 3 und einem oft fließenden Übergang in ein Carcinoma in situ nicht möglich. Einen interessanten Ansatz bot allerdings die vergleichende Untersuchung verschiedener Markerkombinationen. Besonders vielversprechend erschien die kombinierte Betrachtung der Marker p53, p27<sup>KIP1</sup> sowie Cyclin D1, wonach eine Unterscheidung der Dysplasiegrade auf molekularer Ebene erstmals möglich erschien. Demnach könnte der Anstieg der Cyclin D1-Überexpression und der p53-Überexpression, sowie der Expressionsverlust des p27<sup>KIP1</sup>-Gens als erster möglicher Parameter einer Abgrenzung betrachtet werden. Für eine zuverlässige Etablierung dieses semiquantitativen Verlaufsparmeters bedarf es weitergehender, gleichartiger

immunhistochemischer Untersuchungen größerer Kollektive unter Verwendung standardisierter, quantitativer Nachweisverfahren.

Bei der vergleichenden Untersuchung dysplastischer Epithelien von Leukoplakie-Patienten und Patienten mit Primärtumoren ergaben sich keine nennenswerte Unterschiede, so daß die verwendeten Marker für beide Gruppen als valide angesehen werden können.