

Aus dem

Department für Pathologie und Neuropathologie Tübingen

Allgemeine und Molekulare Pathologie

und Pathologische Anatomie

**Die differenzierte squamöse intraepitheliale Neoplasie (dSIN)
im Mundraum und Oropharynx Morphologische und
immunhistochemische Merkmale
zur Abgrenzung von anderen dysplastischen
Epithelveränderungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Morsch, Melanie Desire Beatrix

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. Vogel

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. M. Zimmerer

Tag der Disputation: 10.04.2026

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Histologie des Epithels im Mundraum und Oropharynx	2
1.1.1 Verhorntes mehrschichtiges Plattenepithel	3
1.1.2 Unverhorntes mehrschichtiges Plattenepithel	6
1.2 Dysplasien und präkanzeröse Läsionen der Epithelien im Mundraum und Oropharynx	9
1.2.1 Einteilung nach WHO	9
1.2.2 Dysplasieeinteilung nach Ljubljana	18
1.2.3 Dysplasieeinteilung nach Arsenic und Kurrer.....	18
1.3 Plattenepithelkarzinome im Mundraum und Oropharynx	21
1.3.1 <i>TP53</i> Mutation und Expression von p53	24
1.3.2 HPV-assoziierte dysplastische Veränderungen	25
1.4 Definition und histologische Merkmale der differenzierten squamösen intraepithelialen Neoplasie	27
1.5 Fragestellung und Zielsetzung.....	33
2 Material und Methoden	34
2.1 Patientenrecherche.....	34
2.2 Auswahl der studienrelevanten Gewebeareale	37
2.3 Herstellung der Tissue MicroArrays (TMAs).....	38
2.4 Schneiden der TMAs	42

2.5	Standardfärbung – Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	43
2.6	Immunhistochemische Färbungen (IHC).....	45
2.7	Aufnahme und Auswertungsmethodik der TMAs	49
3	Ergebnisse	53
3.1	Morphologische Einteilung.....	55
3.1.1	Differenzierte squamöse intraepitheliale Neoplasie	57
3.1.2	Pleomorphe Dysplasie.....	59
3.1.3	Verruköse Dysplasie.....	60
3.1.4	Gemischte Dysplasie	62
3.1.5	Basaloide Dysplasie	63
3.1.6	Gemischt - verruköse Dysplasie.....	66
3.2	Expression der immunhistochemischen Marker bei den verschiedenen Dysplasieformen	68
3.2.1	p53.....	69
3.2.2	p16.....	74
3.2.3	CK13.....	76
3.2.4	CK17	79
3.2.5	MIB-1	82
3.3	Effektivität der TMAs mit einem 1 mm, 2 mm und 5 mm Stanzdurchmesser	85
4	Diskussion.....	88
4.1	Morphologische Einteilung der Dysplasie.....	88
4.2	Anwendung immunhistochemischer Marker für die Einteilung der Dysplasie.....	92
4.3	Aussagekraft der Markerprofile.....	97

4.4	Kombination der morphologischen und immunhistochemischen Merkmale zur Einteilung der Dysplasie.....	98
4.5	Effektivität der TMAs.....	102
5	Zusammenfassung	105
6	Quellenverzeichnis	108
7	Erklärung zum Eigenanteil.....	117
8	Danksagung.....	118

Abkürzungsverzeichnis

BZA - Basazellatypie

CA - Karzinom

CIN - cervikale intraepitheliale Neoplasie

CIS - Carcinoma in situ (engl. für nicht invasives Karzinom)

CK - Cytokeratin

DAB - Diaminobenzidin

DNA - Desoxyribonukleinsäure

dSIN - differenzierte squamöse intraepitheliale Neoplasie

dVIN - differenzierte vulväre intraepitheliale Neoplasie

HE - Hämatoxylin-Eosin

HPV - Humaner Papillomavirus

HPVOED - humane Papillomaviren assoziierte orale Epitheldysplasie

HRP - Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)

IHC - Immunhistochemie

Lnc-RNA - long non-coding RNA (engl. für lange nicht-kodierende Ribonukleinsäure)

OED - orale Epitheldysplasie

OPMD - oral potentially malignant disorder (engl. für orale potenziell maligne Veränderung)

OSCC - oral squamous cell carcinoma (engl. für orales Plattenepithelkarzinom)

PAS - Perjodsäure-Schiff

PLECA - Plattenepithelkarzinom

pRB - Retinoblastom-Protein

PVL - proliferative verruköse Leukoplakie

SCC - squamous cell carcinoma (engl. für Plattenepithelkarzinom)

SIN - squamöse intraepitheliale Neoplasie

STS - Schnitttransfersystem

TMA - Tissue Microarray

uVIN - usual type vulvar intraepithelial neoplasia (engl. für gewöhnliche vulväre intraepitheliale Neoplasie)

VC - verruköses Karzinom

VIN - vulväre intraepitheliale Neoplasie

WHO - World Health Organisation (engl. für Weltgesundheitsorganisation)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Mehrschichtig verhorntes Plattenepithel mit Bindegewebe der Lippe und des harten Gaumens	6
Abb. 2 Mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel beispielhaft an Lippe und Zungenoberfläche	8
Abb. 3 Histologische Beispiele milder oraler Epitheldysplasie und moderater oraler Epitheldysplasie	15
Abb. 4 Histologisches Beispiel einer schweren oralen Epitheldysplasie	15
Abb. 5 Beispiel einer proliferativen verrukösen Leukoplakie	17
Abb. 6 Beispiele für OED nach Arsenic und Kurrer (2013).....	20
Abb. 7 Subtypen des oralen Plattenepithelkarzinoms	23
Abb. 8 Beispiele für Formen des niedrigmalignen Plattenepithelkarzinoms.....	23
Abb. 9 Differenzierte intraepitheliale Neoplasie (dSIN) beispielhaft an gingivalem Plattenepithel.....	31
Abb. 10 Beispiel einer dSIN mit invasivem Karzinom am Zungenrand	31
Abb. 11 Pleomorphe Dysplasie: Übergang von physiologischem Epithel in neoplastisches Epithel.....	32
Abb. 12 Formblatt für Platzhalter.....	35
Abb. 13 Herstellung der paraffinierten Agar-Akzeptorblöcke für die TMAs	39
Abb. 14 Material und Verlauf der Bestückung der TMAs.....	41
Abb. 15 Beispiel der HE-Färbung an regelhaftem mehrschichtigem unverhorntem Plattenepithel vom Zungenrand	44
Abb. 16 Exemplarische p53-IHC-Färbung	46
Abb. 17 Exemplarische p16-IHC-Färbung	46

Abbildungsverzeichnis

Abb. 18 Exemplarische MIB-1-IHC-Färbung.....	47
Abb. 19 Exemplarische CK17-IHC-Färbung	47
Abb. 20 Exemplarische CK13-IHC-Färbung	48
Abb. 21 Verteilung der Diagnosen der 224 Patientenprofile.....	54
Abb. 22 Beispielhafte morphologische Einteilung der Dysplasieformen.....	57
Abb. 23 Beispiel einer verrukösen dSIN in HE, p53, Ck13 und CK17	58
Abb. 24 Beispiel einer pleomorphen Dysplasie neben einer dSIN	60
Abb. 25 Verruköse Dysplasie beispielhaft am Plattenepithel der GIngiva.....	61
Abb. 26 Beispiel einer verruköse Dysplasie mit Basalzellatypie (BZA) gegenüber einer einfachen verrukösen Dysplasie	62
Abb. 27 Beispiele der gemischten Dysplasie mit verschiedenen morphologischen Merkmalen.....	63
Abb. 28 Beispiele einer basaloiden Dysplasie/SIN anhand unterschiedlicher Gewebeproben aus dem Oropharynx	65
Abb. 29 Basaloides invasives Plattenepithelkarzinom mit einer gemischten Dysplasie im angrenzenden Oberflächenepithel.....	66
Abb. 30 Beispiel einer gemischt-verrukösen Dysplasie	67
Abb. 31 Zusammenstellung der HE-Färbung und der IHC-Färbungen anhand einer Gewebeprobe	69
Abb. 32 Anteil von p53 Ausfall und p53 Überexpression von 121 p53 reaktiven Dysplasieformen.....	71
Abb. 33 Doppelmutation von p53	71
Abb. 34 Exemplarische p53 Überexpression mit Übergang in einen p53 wild type in Zusammenschau mit p16, CK13, CK17 und MIB-1 IHC	72
Abb. 35 Beispiel einer pleomorphen Dysplasie in HE-Färbung, p16 und p53 IHC	73
Abb. 36 Beispiel einer verrukösen dSIN	74
Abb. 37 Sonderfall einer kräftigen nukleären p16 Expression und einer p53 Überexpression derselben Gewebeprobe.....	75
Abb. 38 HPV-assoziierte, basaloide Dysplasie in p16 IHC.....	76

Tabellenverzeichnis

Abb. 39 Verlauf CK13 Expression zu Ausfall im Übergang von regelhaftem Epithel zu einer dSIN.....	78
Abb. 40 CK13 normgerechte Expression in regelhaftem Plattenepithel neben atypischem Expressionsmuster in einer dSIN	79
Abb. 41 Beispielhafte CK 17 Expression am Übergang von dysplastischem Plattenepithel einer dSIN in regelhaftes Epithel.....	81
Abb. 42 Ausfall der CK17 in HPV-assoziiertes, p16 positiver, Dysplasie.....	81
Abb. 43 Ergebnisse MIB-1 Expression nach Diagnosen	82
Abb. 44 MIB-1 Expression am Beispiel einer verrukösen Dysplasie	83
Abb. 45 Beispielhafte MIB-1 Expression in einem verrukösen Karzinom.....	84
Abb. 46 Paraffinschnitt des TMA 1mm-01 in HE-Färbung.....	86
Abb. 47 Paraffinschnitt des TMA 2mm-04 in HE-Färbung.....	87
Abb. 48 Paraffinschnitt des TMA 5mm-03 in HE-Färbung.....	87
Abb. 49 Klassifikation der squamösen intraepithelialen Neoplasie und Algorithmus zur Einteilung und Therapie nach Novack et al. (2023b)	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 "Diagnosekriterien für epitheliale Dysplasien" nach WHO 2017	13
Tabelle 2 Modifikationen der Diagnosekriterien für die orale Epitheldysplasie nach WHO 2023	13
Tabelle 3 „Gradeinteilung für die epitheliale Dysplasie nach WHO 2017“	14
Tabelle 4 Merkmale der OED nach Arsenic und Kurrer (2013)	20
Tabelle 5 Zusammenfassung der histologischen Merkmale einer dSIN.....	27
Tabelle 6 Kriterien und Auswertungskürzel der ersten Nachbegutachtung in HE zur Diagnosesicherung nach WHO-Kriterien, 2017.	35
Tabelle 7 Durchführung der HE-Färbung.....	43
Tabelle 8 Auswertungskürzel der immunhistochemischen Färbungen	51
Tabelle 9 Einteilung der Dysplasie nach Immunprofilen nach Morsch	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 10 Anzahl der ausgewerteten Patientenfälle und Verteilung der Diagnosen nach Lokalisation	53
Tabelle 11 Ergebnisse der CK13 Expression nach Diagnose	77
Tabelle 12 Ergebnisse der CK17 nach Diagnosen	80
Tabelle 13 Ergebnisse Auswertung MIB-1 nach Diagnosen	84
Tabelle 14 Korrelation der WHO-Klassifikation der OED (2023) mit den morphologischen und immunhistochemischen Diagnosen der OED nach Morsch	101

1 Einleitung

Plattenepithelkarzinome im Mundraum und Oropharynx sind weltweit die sechsthäufigsten Tumore (Warnakulasuriya, 2009). Im Mundraum machen sie über 90 % der malignen Tumore aus (Sloan et al., 2017). Eine sorgfältige klinische Diagnostik ist essenziell, da Vorstufen des Karzinoms durch visuelle Kontrolle und Palpation der Mundschleimhaut erkannt werden. Frühzeitige Erkennung dieser potenziell malignen oralen Veränderungen (OPMD) sowie bestehender aggressiver Plattenepithelkarzinome ist notwendig, da der Zeitpunkt der Erstdiagnose den Therapieverlauf und die Prognose bestimmt (Brandizzi et al., 2008). Die klinische Diagnose und die Therapie richten sich nach der aktuellen S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“ der Deutschen Krebsgesellschaft (Deutsche Krebsgesellschaft, 2021). Zur Sicherung der Diagnose ist eine histopathologische Untersuchung einer Biopsie aus verdächtigem Gewebe unabdingbar (Mashberg and Samit, 1995), denn nur diese ermöglicht es eine z.B. aufgrund einer Infektion, einer Überbeanspruchung oder einer allergischen Reaktion reaktiv veränderte Schleimhaut von einer neoplastischen Schleimhaut zu unterscheiden (Fitzpatrick et al., 2019). Da die histopathologische Untersuchung durchaus einer gewissen Inter- und sogar Intraobserver-Variabilität unterliegt (Reibel et al., 2017, Warnakulasuriya et al., 2008), ist für eine korrekte Diagnosestellung eine möglichst klare, gut anwendbare und damit gut reproduzierbare Einteilung insbesondere hinsichtlich der präkanzerösen Läsionen notwendig, die aktuell nicht verfügbar ist (Odell et al., 2021).

Die histopathologischen Typen der oralen Plattenepithelkarzinome sind durch die WHO gut beschrieben. Solange jedoch orale epitheliale Dysplasien (OED) wie z.B. die proliferative verruköse Leukoplakie auf einer klinisch-pathologischen Definition beruhen, ist eine sichere Diagnosestellung insbesondere bei frühen Formen oftmals unmöglich. Ferner ist laut WHO die Graduierung der OED umstritten und weltweit uneinheitlich (Muller and Tilakaratne, 2022). In den

Einleitung
bestehenden Einteilungen der OED (WHO, Ljubljana) ist die low-grade Dysplasie/squamöse intraepitheliale Neoplasie I (SIN I) mit einem geringen Entartungsrisiko verknüpft (Cho and Song, 2018, Reibel et al., 2017). Finden sich architektonische Epithelveränderungen neben zellulären Atypien, kann laut WHO die SIN hochgestuft werden, auch wenn die Veränderungen nur im unteren Drittel des Epithels vorhanden sind (Muller and Tilakaratne, 2022, Muller et al., 2023). Am Plattenepithel der Vulva wird durch die WHO der morphologisch und ätiologisch definierten Subtyp einer differenzierten vulvären intraepithelialen Neoplasie (dVIN) beschrieben (Young, 2014, WHO, 2020, Ayala and Fatehi, 2023), welche mit einem erhöhten Risiko der Proliferation in ein Plattenepithelkarzinom korreliert (Reyes and Cooper, 2014, Ackermann et al., 2018, Jin and Liang, 2019, Dasgupta et al., 2018). Eine eigene Bezeichnung für diese Art der Dysplasie ist in der aktuellen WHO-Einteilung der OEDs trotz der ähnlichen morphologischen Merkmale der hochgestuften SIN nicht vorgesehen (Brouns et al., 2023).

1.1 Histologie des Epithels im Mundraum und Oropharynx

Die Schleimhaut im Mundraum und Oropharynx ist ähnlich zur Haut eine Schutzbarriere vor mechanischen, chemischen und mikrobiellen Reizen. Sie trägt ein hochgradig differenziertes, mehrschichtiges Plattenepithel, das vorwiegend unverhornt, aber je nach Lokalisation und mechanischer Beanspruchung auch verhornt auftreten kann (Winning and Townsend, 2000). Die aus unverhorntem Plattenepithel bestehende Schleimhaut am weichen Gaumen, der Zungenunterseite, dem Mundboden, den Alveolarfortsätzen, dem Oropharynx, dem Mundvorhof mit Planum buccale und Lippeninnenseite ist ständig befeuchtet (Lüllmann-Rauch and Asan, 2024a). Die mastikatorische Mundschleimhaut besteht aus verhorntem Plattenepithel, da die Beanspruchung an dem harten Gaumen und der Gingiva durch das Zerkleinern der Nahrung höher ist. Ebenfalls verhornt liegt die spezialisierte Mundschleimhaut vor, die mit speziellen Strukturen, den Papillen, u.a. zuständig für die

Einleitung
Geschmackswahrnehmung, nur auf dem Zungenrücken auftritt (Winning and Townsend, 2000).

Allgemein bestehen mehrschichtige Plattenepithelien aus mehreren Zelllagen (>10), die in vier Schichten unterteilt werden können und dem Reifungsfortschritt der Plattenepithelzellen. Von der Basalmembran ausgehend sind folgende Schichten aufsteigend zur Oberfläche unterteilbar: Stratum basale, Stratum parabasale oder Stratum spinosum, Stratum intermedium (unverhorntes Epithel) oder Stratum granulosum (verhorntes Epithel), Stratum superficiale (unverhornt) oder Stratum corneum (verhornt) (Lüllmann-Rauch and Asan, 2024a).

1.1.1 Verhorntes mehrschichtiges Plattenepithel

Um den Anforderungen an die hohe mechanische Belastung zu entsprechen, ist das verhornte mehrschichtige Plattenepithel durch Hemidesmosomen mit der Basalmembran fest verankert (Lüllmann-Rauch and Asan, 2024b). Die Basalmembran lässt sich in drei Kompartimente einteilen: Lamina lucida, Lamina densa reich an Kollagen Typ IV und Lamina fibroretikularis mit dichten retikulären Kollagenfibrillen Typ III und Mikrofibrillen (Lüllmann-Rauch and Asan, 2024b). Weitere wichtige Bestandteile der Membran wie Adhäsionsmoleküle (z. B. Integrine), Glykoproteine (Laminin und Fibronectin), Nidogen und Proteoglykane (wie Perlecan und Syndecan) werden von den Epithelzellen und Bindegewebszellen exprimiert, um die starke Barrierefunktion der Basalmembran zum Schutz des mukösen und submukösen Gewebes zu gewährleisten (Ulfig, 2019). Die darunterliegende Lamina propria enthält einige Fibrozyten, Blutgefäße, Nerven und Drüsen und versorgt das avaskuläre Epithel mit Nährstoffen (Junqueira and Carneiro, 2005).

Das Stratum basale sitzt direkt auf der Basalmembran und besteht aus einer Lage säulenförmiger oder kubischer Keratinozyten mit kleinen, kräftig gefärbten Zelleibern. Diese Zellen stellen Progenitorzellen (Stammzellen) dar und sind fähig, sich zu teilen, um zum einen die proliferativen Eigenschaften und die DNA des Epithels durch die Produktion von Stammzellen zu erhalten

Einleitung (Stammzellkompartiment) und zum anderen die Anzahl der Zellen zu erhöhen, die nach anschließenden weiteren Mitosen (Proliferationskompartiment) letztlich ausdifferenzieren (Differenzierungskompartiment) (Squier and Kremer, 2001). Im Stratum basale ist die Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns verschoben als Hinweis auf die Unreife der Zellen und ihre Fähigkeit zur Mitose. Diese Stammzellen exprimieren bereits Proteine wie Cytokeratin 5 und 14 (CK5, CK14), die als Intermediärfilamente zum epithelialen Zytoskelett gehören (Winning and Townsend, 2000).

Das Stratum spinosum besteht aus mehreren Zellschichten größerer, polygonaler Keratinozyten, die mehr Keratinfilamente enthalten. Je nach Lokalisation in der Mundhöhle werden unterschiedliche Zytokeratine exprimiert, um die spezifischen Anforderungen an das jeweilige Zytoskelett zu erfüllen. Im gingivalen Epithel sowie dem des harten Gaumens sind Keratine CK1, CK2 und CK10 präsent. Im Saume epithel der Zähne werden CK8, CK13, CK16, CK18 und CK19 exprimiert (Dale et al., 1990, Mackenzie et al., 1991, Collin et al., 1992). Die Keratinozyten sind untereinander mit vielen Desmosomen verbunden, welche histologisch als stachelartige Interzellularbrücken sichtbar sind und dieser Zellschicht ihren Namen geben (Moll et al., 2016).

Die folgende relativ schmale Epithelschicht wird durch den hohen Gehalt an basischer Keratohyalin granula in den Keratinozyten - als Körnchen in der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung histologisch sichtbar - als Stratum granulosum bezeichnet (Lüllmann-Rauch and Asan, 2024a). Als Funktion der Granula wird der Erhalt der Barrierefunktion der darüberliegenden Zellschicht durch Verschmelzung mit der Keratinozytenmembran und Freigeben ihres Inhaltes (Proteine wie Profilaggrin und Loricrin) in den Interzellularraum beschrieben (Winning and Townsend, 2000, Candi et al., 2005, Brown and McLean, 2012). Der Übergang zur obersten Zellschicht, dem Stratum corneum, ist fließend. Die Zellen flachen nach oben ab, die Keratinfilamente verdichten sich, nur noch einzelne Desmosomen und keine Zellorganellen sind mehr vorhanden. Sind noch pyknotische Zellkerne in den flachen Zellen nachweisbar, spricht man von einer

Einleitung
Parakeratose, sind keine mehr vorhanden von einer Orthokeratose (Lesch et al., 1989). Auf der Epitheloberfläche liegende Zellen schilfern ab (Lüllmann-Rauch and Asan, 2024a). Abb. 1 zeigt regelhaftes mehrschichtig verhorntes Plattenepithel am Beispiel der Lippe (A, B) und am harten Gaumen (C, D).

Ausgehend von der Basalmembran verblasst das Zytoplasma in der HE-Färbung zunehmend im Verlauf des Epithels, da sich das in den Plattenepithelzellen vermehrt gespeicherte Glykogen nicht mittels Standardfärbung anfärben lässt. In der PAS-Färbung ist das Bild gegenteilig, da im Stratum basale kein Glykogen vorhanden ist und erst in den folgenden Schichten die Konzentration von Glykogen zunimmt. So lässt sich mit der PAS-Färbung durch den ansteigenden Glykogengehalt die regelhafte Differenzierung der Plattenepithelzellen beweisen (Lüllmann-Rauch and Asan, 2024a). Ein Fehlen dieser Glykogenzunahme lässt auf eine fehlerhafte Differenzierung und zumeist auf eine Dysplasie schließen (Gale and Zidar, 2009).

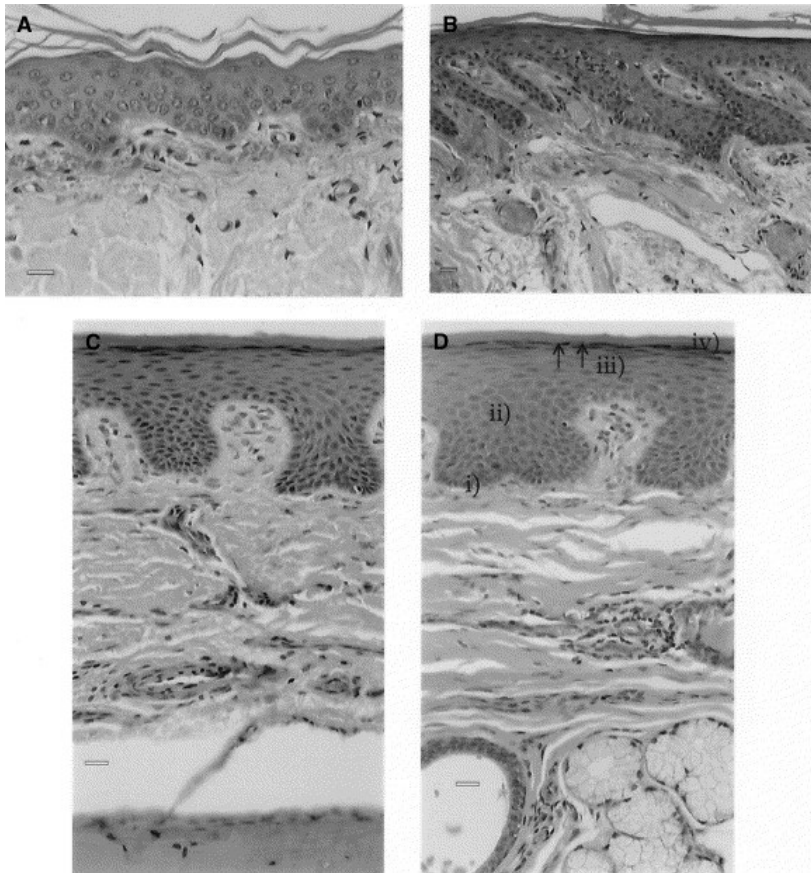


Abb. 1 Mehrschichtig verhorntes Plattenepithel mit Bindegewebe der Lippe und des harten Gaumens (Skalierung = 20 μm). **A** Haut von der Lippe; dünne Epidermis und breite unterliegende Dermis. **B** Lippenrot; lange Bindegewebspapillen mit zahlreichen, oberflächlichen Kapillaren, die die klinisch sichtbare Rotfärbung bedingen. **C** Harter Gaumen; dickeres Epithel und ausgedehntere bindegewebige Papillen und dichtes Bindegewebe mit festem Band zum Periost. **D** Harter Gaumen von postero-lateral, Ansatzstelle der Lamina propria an fibröse Submukosa mit Speicheldrüsen und Fett (nicht sichtbar): **(i)** Stratum basale; **(ii)** Stratum spinosum; **(iii)** Stratum granulosum; **(iv)** Stratum corneum. Adaptiert nach „Oral mucosal embryology and histology“, Figure 3 (Winning and Townsend, 2000).

1.1.2 Unverhorntes mehrschichtiges Plattenepithel

Das unverhornte Plattenepithel ist seinen Anforderungen entsprechend - wie z.B. beim Sprechen oder bei Bewegungen beim Kauen - elastischer und flexibler über die Lamina propria an die Submukosa gebunden als das verhornte Plattenepithel. Durch die starke Basalmembran schützt es die unter ihr liegenden Gewebsanteile vor dem Austrocknen und dem Eindringen potenziell schädlicher Agenzien aus der Umgebung (Squier and Kremer, 2001). Der Aufbau des Stratum basale ähnelt dennoch dem des verhornten Plattenepithels der mastikatorischen Schleimhaut (Lüllmann-Rauch and Asan, 2024a). Zusätzlich zu

Einleitung
den Basalkeratinen CK5 und CK14 exprimieren die Basalzellen des unverhornten Plattenepithels allerdings auch CK19 (Su et al., 1996). Das Stratum spinosum unterscheidet sich ebenso kaum von dem des verhornten Plattenepithels. Die Zellen werden ebenfalls größer, verändern ihre Form zu polygonalen Zelleibern, bilden aber etwas weniger Desmosomen, jedoch vermehrt Keratinfilamente, und exprimieren vorwiegend CK4 und CK13 (Tomakidi et al., 1998).

Anschließend folgen das Stratum intermedium und das Stratum superficiale, in dem die Zellen abflachen und der Anteil an Keratinfilamenten nochmals deutlich zunimmt. Allerdings sind die Keratinfilamente nicht wie im verhornten Epithel zu Filamentbündeln aggregiert, da keine Keratohyalingranula vorhanden ist. Im Stratum superficiale verdicken sich die Zellmembranen und die Zellen behalten ihre Zellkerne und Zellorganellen. Im Gegensatz zu den Keratinozyten des verhornten Plattenepithels mit ihren starken desmosomalen Zellverbindungen und Bündeln von Keratinfilamenten sind die Keratinozyten im unverhornten Plattenepithel schwächer miteinander verbunden, haben nur kurze interzelluläre Lipid-Lamellen und machen das Epithel damit permeabler (Squier and Kremer, 2001). Die Charakteristika des regelhaften mehrschichtig unverhornten Plattenepithels sind in Abb. 2 beispielhaft anhand der Lippenschleimhaut (2 A) und der Zungenoberfläche (2 B) dargestellt.

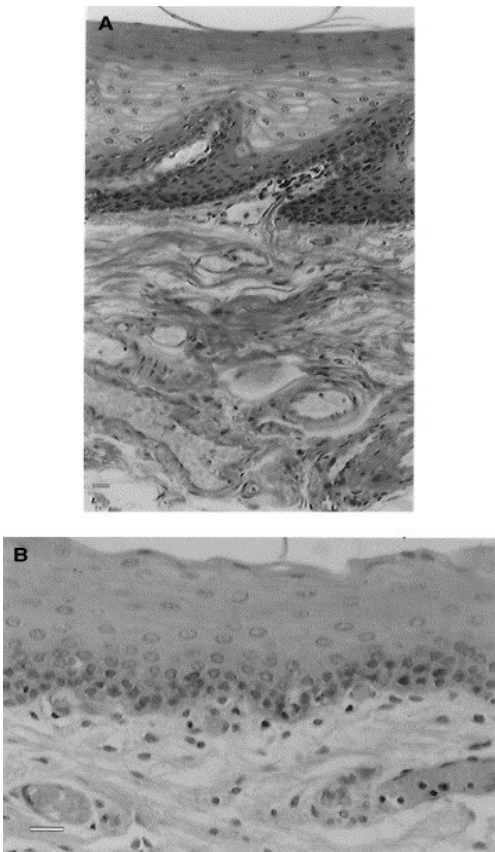


Abb. 2 Mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel beispielhaft an Lippe und Zungenoberfläche (Skalierung = 20µm). **A** Lippenschleimhaut in Verbindung mit Submukosa, Fett und Speicheldrüsen (nicht sichtbar). **B** Ventrale Zungenoberfläche Epithel und Bindegewebe. Adaptiert nach „Oral mucosal embryology and histology“, Figure 4 (Winning and Townsend, 2000).

1.2 Dysplasien und präkanzeröse Läsionen der Epithelien im Mundraum und Oropharynx

Die Mundhöhle erstreckt sich vom feuchten Lippenrot bis zum Übergang von hartem zu weichem Gaumen bzw. zu den Papillae vallatae auf der Oberseite der Zunge. Der Oropharynx wird vom weichen Gaumen, Zungengrund und der Oberseite des Zungenbeins (Vallecula epiglottica) begrenzt (Mahul B. Amin, 2016). Wichtig ist diese Unterscheidung hinsichtlich des Stagings der malignen Tumoren nach der WHO Klassifikation der Kopf- und Halstumoren (Bishop et al., 2023).

Folgende pathologische Veränderungen der Mundschleimhaut und der oropharyngealen Schleimhaut sind bekannt: Entwicklungsbedingte Anomalien, infektiös bedingte Veränderungen, entzündlich oder immunologisch bedingte nicht-infektiöse Veränderungen, benigne epitheliale Tumoren und Prozesse, andere nicht-neoplastische Anomalien, potenziell maligne und dysplastische Veränderungen/präkanzeröse Läsionen, orale Plattenzellkarzinome, oropharyngeale Plattenepithelkarzinome, Speicheldrüsentumoren und Speicheldrüsenanomalien, Bindegewebstumoren und Bindegewebsveränderungen sowie andere Tumoren, wie beispielsweise Melanome (Cardesa, 2017, Gnepp and Bishop, 2020, Neville et al., 2023, Reibel et al., 2017).

Für die vorliegende Arbeit sind dysplastische Epithelveränderungen, präkanzeröse Veränderungen in Mundraum und Oropharynx sowie orale und oropharyngeale Plattenepithelkarzinome relevant. Andere pathologische Veränderungen werden in diesem Rahmen nicht erläutert.

1.2.1 Einteilung nach WHO

Die WHO-Klassifikation der Kopf- und Halstumoren ist eine weltweit gängige und relevante Einteilung (Muller and Tilakaratne, 2022). Die aktuelle 5. Edition aus 2023 unterscheidet Tumoren des Mundraums und des Oropharynx, wobei sich

Einleitung

diese Unterscheidung nur auf die Plattenepithelkarzinome und hamartomatösen Polypen bezieht. Die übrigen pathologischen Veränderungen und OPMDs werden in der WHO Klassifikation gemeinsam im Kapitel über den Mundraum besprochen (Bishop et al., 2023).

1.2.1.1 Orale potenziell maligne Veränderungen (OPMD)

Potenziell maligne Veränderungen der Mundschleimhaut und – wenn auch nicht explizit im OPMD-Begriff erfasst - auch der oropharyngealen Schleimhaut sind zumeist klinisch sichtbare Schleimhautveränderungen, die ein unterschiedliches kanzeröses Entartungsrisiko aufweisen. Folgende OPMDs werden in der WHO-Klassifikation der Kopf-/Halstumoren von 2017 unterschieden: Orale epitheliale Dysplasie (OED), mit humanen Papillomaviren (HPV)-assoziierte Dysplasie, lichenoiden Läsionen, Leukoplakie, Erythroplakie, Erythroleukoplakie, orale submuköse Fibrose, Dyskeratosis congenita, Keratose durch rauchfreien Tabak, palatinale Läsion durch reverse smoking, chronische Candidose, Lichen planus, diskoider Lupus erythematoses, Syphilis-induzierte Glottitis, aktinische Keratose (Lippe), proliferative verruköse Leukoplakie und nicht-neoplastische Läsionen (Reibel et al., 2017).

Generell sind Männer häufiger betroffen als Frauen (Muller et al., 2023). Die Leukoplakie ist weltweit mit 2-3 % der OPMDs am häufigsten vertreten (Petti, 2003). Die Erythroplakie ist eher eine seltene Veränderung, die nur 0,02-0,83 % der OPMDs ausmachen (Reichart and Philipsen, 2005). Andere oben genannte OPMDs können häufiger vertreten sein, weisen aber ein geringeres Entartungsrisiko auf und werden daher weniger dokumentiert. Die OPMDs haben eine unterschiedliche und meist unbekanntes Ätiologie, wobei die Leukoplakie oft durch Tabak- und/oder Alkoholkonsum (Napier and Speight, 2008) und die orale submuköse Fibrose durch den Konsum der Betelnuss entstehen (Tilakaratne et al., 2006). Die Veränderungen können sich in der gesamten Mundhöhle manifestieren; allerdings findet man die Erythroplakie am ehesten am weichen Gaumen, am Mundboden und/oder der Wangeninnenseite (Reichart and Philipsen, 2005). OPMDs, die an lateralen/ventralen Zungen und Mundboden

Einleitung

auftreten, sind eher mit einem erhöhten Entartungsrisiko verbunden (Muller et al., 2023).

Die Leukoplakie ist klinisch definiert als weiße Plaque, die homogen oder inhomogen mit nodulären, verrukösen oder roten Anteilen (Erythroleukoplakie) auftreten kann. Die Erythroplakie zeigt sich klinisch in Form von roten Schleimhautarealen. Die OPMDs können mit oder ohne Dysplasien auftreten. Da OPMDs mit Dysplasien aber ein deutlich höheres malignes Entartungsrisiko aufweisen, ist die Dysplasie einer der wichtigsten prognostischen Faktoren (Reibel et al., 2017). Weitere wichtige prognostische Faktoren sind klinische Parameter wie die Lokalisation der Läsion, die Größe, die Symmetrie und die Homogenität oder Inhomogenität hinsichtlich Farbe und Oberfläche (Napier and Speight, 2008). Die Leukoplakie, die Erythroplakie und die Erythroleukoplakie stellen die risikoreichsten OPMDs dar (Reibel et al., 2017).

1.2.1.2 Orale epitheliale Dysplasie (OED) / Squamöse intraepitheliale Neoplasie (SIN)

Die OED ist durch Veränderungen im Aufbau und der Zellstruktur des Epithelgewebes definiert und wird meist durch genetische Veränderungen verursacht (Pitiyage et al., 2009). Laut WHO wird die orale Epitheldysplasie in drei Schweregrade abhängig von ihrer Ausdehnung in den Epitheldritteln eingeteilt (Reibel et al., 2017). Die Kriterien für zelluläre Atypien und architektonische Atypien sind in Tabelle 1 aus der WHO-Klassifikation von 2017 (Reibel et al., 2017) und die überarbeiteten Kriterien von 2022 in Tabelle 2 (Muller and Tilakaratne, 2022) aufgeführt. Eine leichte Dysplasie lässt sich definieren durch eine auf das basale Drittel beschränkte zytologische Atypien oder architektonische Atypien, eine mittelschwere Dysplasie durch eine Ausdehnung der Atypien bis auf das mittlere Drittel und eine schwere Dysplasie durch eine Ausdehnung der Atypien bis in das obere Drittel definieren (Reibel et al., 2017). In der 5. Edition der WHO-Klassifikation der Kopf-Hals-Tumoren von 2023 wird allerdings darauf hingewiesen, dass auch auf das basale Epitheldrittel beschränkte zytologische Atypien eine schwere Dysplasie darstellen können

Einleitung

(Muller et al., 2023). Abb. 3 A zeigt regelhaftes Plattenepithel im Vergleich zu einer milden Dysplasie (3 B) und einer moderaten Dysplasie (3 C). Als schwerste Dysplasie gilt das Carcinoma in situ (CIS), welches alle Drittel des Epithels betrifft (Abb. 4).

Kritisch zu sehen ist, dass die Einstufung der Dysplasie schlecht reproduzierbar und somit die prognostische Aussage sehr variabel ist. Einige Studien zeigen einen guten prognostischen Wert, andere hingegen schlechte Ergebnisse. Eine Überprüfung der Ergebnisse durch eine weitere Pathologin oder einen weiteren Pathologen oder durch mehrere Pathologen und Pathologinnen kann die diagnostische Zuverlässigkeit erhöhen (Reibel et al., 2017, Muller et al., 2023). Aufgrund dieser hohen Interobserver-Variabilität bei der dreiteiligen Dysplasieeinteilung wird von einigen Autoren eine zweiteilige Einteilung (Binäres-System) favorisiert (Reibel et al., 2017), welche bereits bei den Läsionen des Larynx Anwendung findet (Gale et al., 2017). Dieses System ist jedoch für orale Epitheldysplasien, insbesondere im Hinblick auf das maligne Transformationsrisiko, noch nicht validiert (Muller et al., 2023). Tabelle 3 stellt eine Gegenüberstellung des binären Systems und der Gradeinteilung der WHO dar (Reibel et al., 2017).

Obwohl das Vorhandensein einer Dysplasie mit der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen korreliert, entwickeln sich die meisten oralen Epitheldysplasien nie zu Karzinomen (Reibel et al., 2017). Eine Meta-Analyse von Läsionen mit OED ergab eine Transformationsrate in ein Karzinom von 12 % (Mehanna et al., 2009). Generell gilt: Je weiter die Dysplasie fortgeschritten ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Plattenepithelkarzinom entwickelt. Die 15-Jahres-Malignitätsrate bei leichter, mittlerer und schwerer Dysplasie (nach dem traditionellen Drei-Grad-System) beträgt etwa 6 %, 18 % bzw. 39 %. Eine Dysplasie stellt einen Hinweis auf ein Langzeitrisiko zur malignen Entartung dar (Reibel et al., 2017). Laut Reibel et al. bedingt die geringe Reproduzierbarkeit der derzeitigen Diagnosekriterien die in einigen Studien

Einleitung

festgestellte sehr unterschiedliche Korrelation zwischen Dysplasie und Karzinomentstehung (Reibel et al., 2017).

Tabelle 1 “Diagnosekriterien für epitheliale Dysplasien“ nach WHO 2017 (Original aus WHO Classification of Head and Neck Tumors: Tumors of the Oral Cavity and Mobile Tongue. Seite 113, Table 4.03 (Reibel et al., 2017) ins Deutsche übersetzt.

Architektonische Merkmale	Zytologische Merkmale
Irreguläre Epithelschichtung	Abnorme Variationen der Kerngröße
Verlust der Basalzellpolarität	Abnorme Variationen der Kernform
Tropfenförmige Reteleisten	Abnorme Variation der Zellgröße
Erhöhte Anzahl mitotischer Zellen	Abnorme Variation der Zellform
Abnormale Anzahl mitotischer Zellen in superfiziellen Schichten	Erhöhte Kern-Zytoplasma-Relation
Vorzeitige Keratinisierung in einzelnen Zellen	Atypische Mitosefiguren
Keratinperlen in Reteleisten	Erhöhte Anzahl und Größe von Nucleoli
Verlust des Zusammenhalts der Epithelzellen	Hyperchromasie

Tabelle 2 Modifikationen der Diagnosekriterien für die orale Epitheldysplasie nach WHO 2023“ adaptiert nach (Muller and Tilakaratne, 2022)

Architektonische Merkmale	Zytologische Merkmale
Irreguläre epitheliale Schichtung	Abnorme Variation der Kerngröße
Verlust der Basalzellpolarität	Abnorme Variation der Kernform
Tropfenförmige Reteleisten	Abnorme Variation der Zellgröße
Erhöhte Anzahl von Mitosefiguren (verschoben zu zytologischen Merkmalen)	Abnorme Variation der Zellform
Abnorm oberflächliche mitotische Figuren (jetzt: Mitosen hoch im Epithel)	Erhöhte Kern-Zytoplasma-Relation

Architektonische Merkmale	Zytologische Merkmale
Vorzeitige Keratinisierung einzelner Zellen (jetzt: Generalisierte vorzeitige Keratinisierung)	Atypische Mitosefiguren
Keratinperlen innerhalb der Reteleisten	Erhöhte Anzahl und Größe der Nukleoli
Verlust der epithelialen Zellkohäsion	Hyperchromasie
Verändertes Keratinmuster für orale Unterregionen	Einzelzell-Keratinisierung
Verruköse oder papilläre Architektur	Apoptotische Mitosen
Ausbreitung der Veränderungen entlang kleiner Drüsengänge	Vergrößerte Zellkerne
Scharf begrenzte Ränder zu Veränderungen	
Mehrere unterschiedliche Dysplasiemuster	
Multifokale oder diskontinuierliche Läsionen	
Erweiterte proliferative Zone	
Basalzell-Cluster/-Nester	

Tabelle 3 „Gradeinteilung für die epitheliale Dysplasie nach WHO 2017“ (Original aus WHO Classification of Head and Neck Tumours, Seite 113, Table 4.04; 2017)(Reibel et al., 2017).

WHO Dysplasie Grad	Binäres System
Milde Dysplasie	Low-grade Dysplasie
Moderate Dysplasie	High-grade Dysplasie
Schwere Dysplasie	

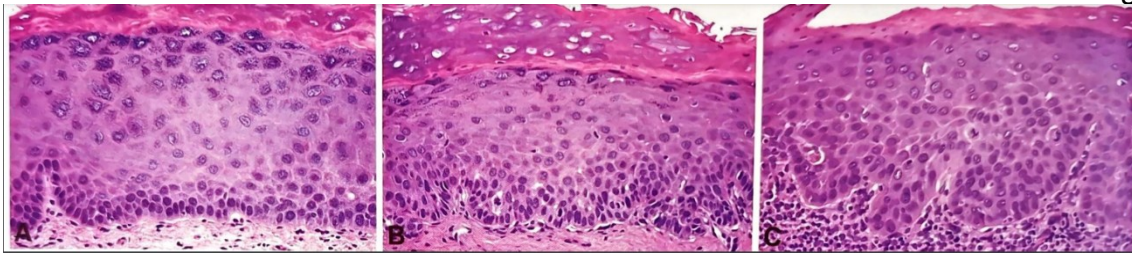


Abb. 3 Histologische Beispiele milder oraler Epitheldysplasie und moderater oraler Epitheldysplasie
A Hyperkeratose mit normaler Architektur und Zytologie. **B** Milde Dysplasie: Fehlen von Basalzellpolarität, abnorme Variationen in Kerngrößen und -formen, Hyperchromasie, erhöhte Anzahl von Mitosen. Die Veränderungen sind begrenzt auf das basale Drittel des Epithels. **C** Moderate Dysplasie: tränenförmige Reteleisten, mäßig abnorme Variationen in Kerngrößen und -formen, Hyperchromasie, erhöhte Kern-Zytoplasma-Relation, atypische Mitosen im basalen/parabasalen Bereich. Die Veränderungen erstrecken sich bis zum mittleren Epitheldrittel. Adaptiert nach WHO Classification of Head and Neck Tumours, Seite 114, Figure 4.05; 2017 (Reibel et al., 2017).

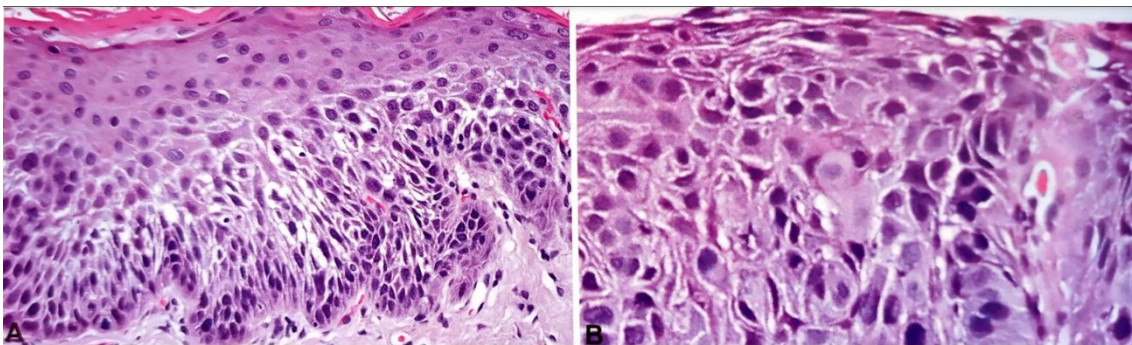


Abb. 4 Histologisches Beispiel einer schweren oralen Epitheldysplasie
A Verlust des Zusammenhaltes der Epithelzellen, Verlust der Epithelzellpolarität, abnorme Variationen der Kerngrößen und -formen, deutliche abnorme Variationen der Zellformen. Die Veränderungen erstrecken sich bis zum oberen Epitheldrittel. **B** Verlust der Basalzellpolarität, Verlust der Epitheldifferenzierung und des Zellzusammenhaltes. Erhöhte Anzahl an Mitosen, erhöhte abnorme Variationen der Kern- und Zellmerkmale über die gesamte Epithelhöhe, wodurch die schwere Dysplasie (Carcinoma in situ) charakterisiert wird. Adaptiert nach WHO Classification of Head and Neck Tumours, Seite 114, Fig. 4.06; 2017 (Reibel et al., 2017).

1.2.1.3 Proliferative verruköse Leukoplakie (PVL)

Nach der WHO gilt die PVL als eine aggressive Form der OPMDs, da sie multifokal und progressiv wächst (Warnakulasuriya et al., 2007). Die PVL weist eine hohe Rezidiv- und Transformationsrate auf, wonach etwa 70 % zu invasiven Karzinomen werden (Abadie et al., 2015). Gillenwater et al. beschreiben die PVL als eine klinisch-pathologische Diagnose, welche mehrere Stadien aufweist, die jedoch nicht zwingend in einer festen Reihenfolge auftreten müssen (Gillenwater et al., 2014):

Stadium 1: Einzelne flache weiße (hyperkeratinisierte) Plaques werden/sind sichtbar.

Stadium 2: Diese Plaques wachsen diffus in die Breite und multifokal.

Stadium 3: Weitere langsame horizontale Ausbreitung und exophytisches/verruköses Wachstum mit rötlichen Arealen.

Stadium 4: Transformation in ein verruköses Karzinom oder Plattenepithelkarzinom.

Für eine gesicherte Diagnose und die Einschätzung einer malignen Transformation ist die Korrelation der klinischen Stadien mit der histologischen Untersuchung essenziell. Histologisch sind bei einer PVL Hyperkeratosen dargestellt mit und ohne Dysplasie und ein bandförmiges, lymphohistiozytäres Infiltrat unterhalb der Basalmembran erkennbar. Abb. 5 zeigt Beispiele einer PVL dar. Erkennbar sind die ausgeprägte Hyperkeratose und das imposante lymphozytäre Infiltrat unterhalb der Basalmembran. Dadurch kann in frühen Stadien der PVL eine Verwechslung mit Lichen planus auftreten. Sobald allerdings eine Dysplasie vorliegt, ist ein Lichen planus ausgeschlossen (Gillenwater et al., 2014). In Abb. 5B ist eine PVL im fortgeschrittenen Stadium, erkennbar an der verrukösen Architektur mit ausgeprägter verruköser Hyperplasie und Hyperkeratose.

Im Vergleich zu anderen OPMDs findet sich bei der PVL häufiger eine Inaktivierung der Gene *p14ARF* und *CDKN2A*, wobei das letztgenannte für das Tumorsupressorprotein p16 kodiert (Kresty et al., 2008).

Die Ätiologie der PVL ist bis heute ungeklärt und weder mit Risikofaktoren der anderen OPMDs noch mit viralen Infektionen assoziiert (Townsend et al., 2024).

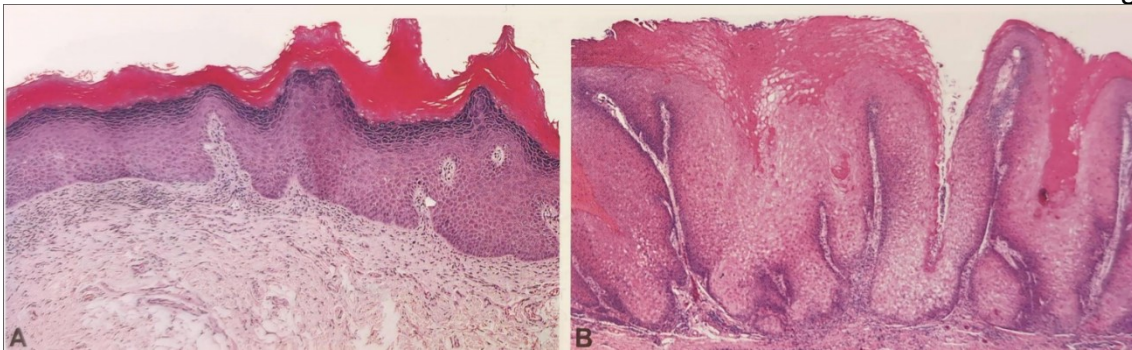


Abb. 5 Beispiel einer proliferativen verrukösen Leukoplakie A Warzenförmige, epitheliale Hyperkeratose mit fokalen Bereichen von lichenoider Mukositis in einem im Frühstadium festgestellten Fall. B Progression eines fortgeschrittenen Falles zu einer atypischen verrukösen Hyperplasie. Original aus WHO Classification of Head and Neck Tumours, Seite 115, Fig. 4.07; 2017 (Reibel et al., 2017).

1.2.1.4 HPV-assoziierte orale epitheliale Dysplasie (HPVOED)

In der 5. Edition des von der WHO herausgegebenen Buches über Kopf-Hals-Tumoren wurde die HPV-assoziierte Dysplasie als eigenständige Entität der OPMDs aufgenommen. Diese tritt deutlich häufiger bei Männern als bei Frauen (6:1), am häufigsten in den 60er Lebensjahren und an Zungenrand, Zungenspitze und Mundboden auf. Weniger häufig sind Wangenschleimhaut, Gaumen, Lippenschleimhaut und Gingiva betroffen. Während die Ätiologie der HPVOED durch die Infektion mit high-risk HPV-Subtypen (meist HPV 16) feststeht, ist hingegen die Pathogenese aktuell noch unklar (Bishop et al., 2023), dürfte jedoch der Pathogenese der cervicalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) entsprechen.

Histopathologisch unterscheiden sich die Merkmale der HPVOED von denen der konventionellen OED. Folgende morphologische Diagnosekriterien werden für die HPVOED beschrieben: Epitheliale Zellen mit basaloider Morphologie und hohem Kernanteil zum Plasma, in den oberen Zellschichten Koilozyten; Zellen in Karyorrhexis: Zellen mit grobem Chromatin, Zellen, die der Mitose ähneln, mit perizellulären Halo-Zone; apoptotischen Zellen mit eosinophilem Zytoplasma; eine stark eosinophile Keratinschicht mit oder ohne Kernresten (Hyperortho- und/oder Hyperparakeratose) auf dem Epithel (Bishop et al., 2023). Laut WHO wird empfohlen, HPV-assoziierte Dysplasien vorerst analog zur konventionellen OED zu klassifizieren, da noch keine spezifischen Grading-Kriterien für die

Einleitung
HPVOED definiert wurden (Bishop et al., 2023). Obwohl die HPVOED eine starke und diffuse p16-Immunexpression zeigt, wird zur Bestätigung eine DNA- oder RNA-in-situ-Hybridisierung für High-Risk-HPV empfohlen, da p16 bislang nicht als Surrogatmarker für HPV validiert ist (Muller and Tilakaratne, 2022). In 5-15 % der Fälle entsteht aus einer HPVOED ein Plattenepithelkarzinom (PLECA) (Hendawi et al., 2020).

1.2.2 Dysplasieeinteilung nach Ljubljana

Die Ljubljana-Klassifikation der squamösen intraepithelialen Läsionen ist ursprünglich für die Graduierung der epithelialen Präkanzerosen des Larynx eingeführt worden. Da diese binäre Einteilung eine gute klinische Anwendbarkeit besitzt und sich durch eine eingängige Nomenklatur auszeichnet, wird sie mittlerweile auch für Vorläuferläsionen der Mundhöhle angewandt (Driemel et al., 2006). Als Kriterien werden die Zellschichten nach Präsenz von Hyperplasie und Atypie untersucht (Gale et al., 2016).

Die einfache squamöse Hyperplasie beschreibt eine benigne Vergrößerung der Stachelzellschicht. Eine abnorme basale/parabasale Hyperplasie bezeichnet eine benigne Basalzell- bzw. Parabasalzellhyperplasie entsprechend einer milden Dysplasie bzw. SIN I. Als atypische Hyperplasie wird eine Hyperplasie mit Zellatypien benannt, welche vergleichbar mit der moderaten bis schweren Dysplasie bzw. der SIN II-III als Risikoepithel gewertet wird. Bereits als maligne gilt das Carcinoma in situ (entspricht dem Carcinoma in situ des WHO-Vorschlags oder auch der Kategorie SIN III) (Hellquist et al., 1999). Die letztgenannten zwei Läsionen sollten wegen stark malignem Verdacht engmaschig beobachtet werden und stellen eine Indikation zur kompletten Resektion dar (Driemel et al., 2006).

1.2.3 Dysplasieeinteilung nach Arsenic und Kurrer

Die Autoren Arsenic und Kurrer stellen im Jahr 2013 eine Klassifikation der oralen und oropharyngealen Dysplasie vor, wobei sie 5 Kategorien nach morphologischen Kriterien definieren. ihre Klassifikation mit den

Einleitung

morphologischen Merkmalen ist in Tabelle 4 Merkmale der OED nach Arsenic und Kurrer (2013) dargestellt. Bei der basaloiden und bei der pleomorphen Dysplasieform ist die gesamte Epithelbreite von den dysplastischen Veränderungen (full-thickness) erfasst, bei der mixed (gemischten), der differenzierten und der verrukösen Dysplasieform nur die basalnahen Epithelanteile (non-full-thickness). Diese Unterscheidung zwischen non-full-thickness und full-thickness beruht auf der Annahme, dass die bisher z.B. für die CIN postulierte Progression einer epithelialen Dysplasie, ausgehend vom Stratum basale zum Stratum superficiale, bis auf wenige Ausnahmen (zumeist Doppelinfection von low-risk und high-risk HPV-Subtypen) nicht existiert (Arsenic and Kurrer, 2013, Pinto and Crum, 2000). In Abb. 6 sind repräsentative Beispiele der Dysplasieformen in der HE-Färbung nach Arsenic und Kurrer dargestellt. Laut Arsenic und Kurrer bildet das bestehende System nach WHO in zu limitierter Form das breite Spektrum der präkanzerösen Läsionen im oberen Aerodigestivtrakt ab, da dort im Vergleich zum Genitale neben HPV noch mehr Ätiologien wie z.B. Tabakkonsum, entzündliche Entwicklungen (Lichen), Alkohol, Kautabak, etc. in Frage kommen. Diese lassen sich nicht gut in das, analog zum Graduierungssystem der Cervix angewandte, eindimensionale Graduierungssystem eingliedern (Arsenic and Kurrer, 2013).

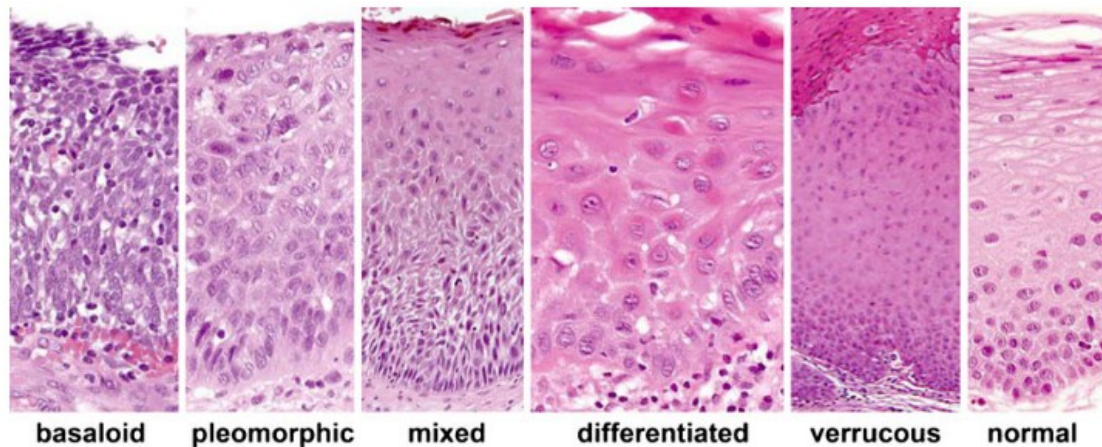


Abb. 6 Beispiele für OED nach Arsenic und Kurrer (2013) (Arsenic and Kurrer, 2013).

Tabelle 4 Merkmale der OED nach Arsenic und Kurrer (2013) „Features of squamous cell carcinoma precursor lesions“ adaptiert aus „Differentiated dysplasia is a frequent precursor or associated lesion in invasive squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx“; Tabelle 2, page 612; Arsenic, L., Kurrer, M.O.; 2013.(Arsenic and Kurrer, 2013)

Table 2 Features of squamous cell carcinoma precursor lesions

	Superficial maturation	Compartment/epithelial layer			
		Basal	Suprabasal	Superficial	Keratinization
Basaloid	None	Densely packed basaloid cells in all layers, with their long axis perpendicular to the epithelial surface, scant cytoplasm, hyperchromatic ovoid to elongated nuclei, coarse chromatin, no or indistinct nucleoli			None or minimal
Pleomorphic	Minimal	Pleomorphic cells, variation in internuclear spacing (i.e., variable cytoplasm), nuclear orientation (i.e., polarity), size, shape, and membrane thickness, chromatin coarseness, nucleolar size, shape, distribution, and number. Atypical mitoses could often be found but were not required			Typically none or minimal
Mixed	Distinct	Similar to "pleomorphic," <i>discernable at low power magnification</i>	Variable, either similar to pleomorphic, "differentiated," "verrucous," or regular squamous mucosa	Variable, either similar to differentiated, verrucous, or regular mucosa	Often present
Differentiated	Yes	<i>Distinct clustering of often small basal cells, with small nuclei, either hyperchromatic or with open chromatin with small but distinct nucleoli, variable nuclear atypia</i>	Large cells, abundant eosinophilic cytoplasm, distinct desmosomes, distinctly large nuclei with open chromatin with distinct large nucleoli, <i>nuclear atypia with variable binucleation, variation in nuclear shape, membrane thickness, chromatin structure, nucleolar size, shape, distribution, and number.</i> Atypical mitosis and dyskeratosis could be found but were not required	Often minimal changes of verrucous	Variable
Verrucous	Yes	No or minimal atypia	At most minimal changes of differentiated	Striking expansion of cells with moderate to abundant pale eosinophilic cytoplasm and nuclei with irregular thin membrane with membrane folding	Often present and striking

1.3 Plattenepithelkarzinome im Mundraum und Oropharynx

Die oralen PLECA sind die sechsthäufigsten Tumoren weltweit und repräsentieren 90 % der Malignome im Mundraum und Oropharynx (Glass, 2024). Laut WHO treten etwa 50 % der PLECA an Zunge, Mundboden und Gingiva auf. Die Lokalisation wird allerdings durch Risikofaktoren beeinflusst. Als Risikofaktoren zählen in absteigender Reihenfolge: Rauchen, abhängig von der Menge, wobei das Risiko nach dem Aufhören wieder sinkt; Alkoholkonsum, der in Verbindung mit Nikotinabusus mehr als ein doppeltes Risiko ausmacht; rauchfreier Tabak, beispielsweise die kaubare Betelnuss oder anderer Tabak, der das Risiko durch die Zusatzstoffe erhöht; HPV insbesondere Typ 16, Sonnenexposition, besonders auf den Sonnenterrassen wie Lippe, Stirn, Wangen. Eine schlechte Mundhygiene wird auch mit dem oralen Plattenepithelkarzinom (oralen squamous cell carcinoma/OSCC) in Verbindung gebracht, gilt jedoch nicht als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung eines OSCC (Sloan et al., 2017). 2023 wurden das verruköse Karzinom und das Carcinoma cuniculatum in die WHO-Klassifikation der Tumoren im Mundraum aufgenommen, da 50-70 % der verrukösen Karzinome und die meisten Carcinomata cuniculata im Kopf-Hals-Bereich in der Mundhöhle diagnostiziert wurden (Muller and Tilakaratne, 2022).

Die Karzinome treten weltweit häufiger bei Männern (5,5/100.000) als bei Frauen (2,5/100.000) und insbesondere in der Altersgruppe von 50-70 Jahren auf (Sloan et al., 2017).

Das klinische Erscheinungsbild der PLECA ist aufgrund der verschiedenen Schweregrade nicht einheitlich. Sie können als nicht abstreichbare, weißliche, erythematöse, weiß-rötlich gemischte, ulzerierende oder verkrustete Hautveränderungen sichtbar sein. Die betroffenen Areale sind meist verhärtet. Die Läsionen können asymptomatisch oder symptomatisch sein. Mögliche Symptome sind je nach Stadium Unwohlsein, Schmerzen und eingeschränkte Beweglichkeit, beispielsweise der Zunge (Sloan et al., 2017).

Hinsichtlich der Ätiologie und Pathogenese der OSCC wird auf das nachfolgende Kapitel 1.3.1 und 1.3.2 verwiesen.

Histologisch können folgende beispielhaft dargestellte, Varianten des Plattenepithelkarzinoms unterschieden werden: Verruköses Plattenepithelkarzinome, papilläres Plattenepithelkarzinom, Spindelzellkarzinom, Carcinoma cuniculatum, basaloides Plattenepithelkarzinom, akantholytisches Plattenepithelkarzinom, adenosquamöses Karzinom, lymphoepitheliales Karzinom (Sloan et al., 2017). Abb. 7 zeigt vier dieser Varianten (Schwarz-Furlan, 2013). Außerdem werden die Karzinome histologisch je nach Ausreifung, d.h. der Keratinisierung, der mitotischen Aktivität, des zellulären und nukleären Pleomorphismus, des Invasionsmusters und der Wirtsreaktion in 3 Schweregrade unterteilt: Gut differenzierte G1, mäßig differenzierte G2, schlecht differenzierte G3 PLECA. Je höher die Differenzierung eines PLECA ist, desto niedriger maligne wird es eingestuft. (Sloan et al., 2017). Abb. 8 zeigt diese niedrigmalignen Formen des PLECA (Schwarz-Furlan, 2013). Immunhistologische Färbungen (z.B. AE1/AE3, CK5/6, p63, p40) können hilfreich sein, schlecht differenzierte neoplastische Zellen als Karzinome zu identifizieren (insbesondere beim Spindelzellkarzinom und kleinen Speicheldrüsenkarzinome) (Müller et al., 2019). In Plattenepithelkarzinomen ist die immunhistochemische CK13 Färbung in Verbindung mit CK5, CK7, CK8, CK18 und CK19 etabliert (Wils et al., 2020). Beim Vorliegen eines PLECA ist ein Ausfall oder allenfalls eine schwache Expression von CK13 festzustellen. Wils et al. geben im Hinblick auf dysplastische Veränderungen am vulvären Plattenepithel an, dass ein Ausfall von CK13 im Zusammenhang mit einer dysplastischen Epithelveränderung ein höheres malignes Entartungsrisiko birgt (Wils et al., 2020).

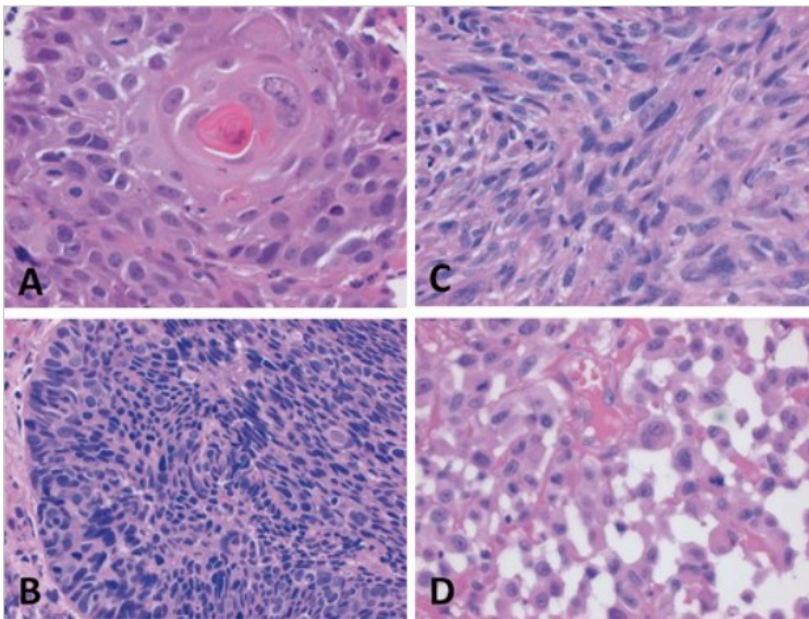


Abb. 7 Subtypen des oralen Plattenepithelkarzinoms A Konventionelles, verhornendes Plattenepithelkarzinom. B Basaloides Plattenepithelkarzinom. C Spindelzellkarzinom. D Akantholytisches Plattenepithelkarzinom. (Vergr. 400x) (Schwarz-Furlan, 2013).

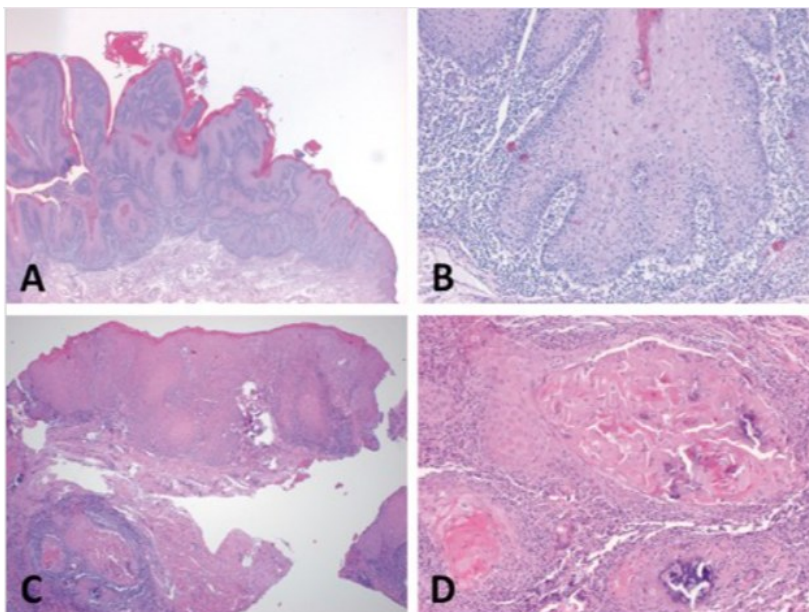


Abb. 8 Beispiele für Formen des niedrigmalignen Plattenepithelkarzinoms A Verruköses Karzinom (Ackermann Tumor) - Übersicht 12x B Verruköses Karzinom (sog. Ackerman-Tumor) – Detail (100x). C und D Carcinoma cuniculatum (25x/100x Ätiologie und Pathogenese dysplastischer Veränderungen und Karzinome des Mundraumes und des Oropharynx (Schwarz-Furlan, 2013).

1.3.1 *TP53* Mutation und Expression von p53

Das *TP53*-Gen ist das am häufigsten mutierte Gen bei menschlichen Tumorerkrankungen. Es liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p13.1) und codiert den Tumorsuppressor p53. Das 393 Aminosäuren lange Protein p53 ist ein Transkriptionsfaktor. Es reguliert unter anderem die Apoptose, DNA-Reparaturmechanismen, DNA-Transkriptionsmechanismen und die Genomaktivität. Zudem spielt es eine tragende Rolle bei der Regulation des Zellstoffwechsels, der Ferroptose, der Mikroumgebung des Tumors, der Autophagie und weiteren Signalwegen, welche zur Tumorunterdrückung beitragen (Levine, 2020). Eine Mutation im *TP53*-Gen stellt eine Prädisposition für eine Tumorerkrankung dar. Im Gegensatz zu der sonst bei fehlerhafter Zelldifferenzierung einsetzenden Apoptose sind die Tumorzellen, welche eine *TP53*-Mutation aufweisen, weiterhin mitotisch aktiv und breiten sich weiter aus (Immortalisierung der Tumorzellen). Diese onkogene Eigenschaft kann zudem beispielsweise die Invasivität eines Karzinoms positiv beeinflussen und die Chemo- sowie Strahlenresistenz von Tumoren erhöhen (Lane, 1992). Etwa 50 % der Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich weisen eine Mutation von *TP53* auf (Poeta et al., 2007).

Der Signalweg von p53 hängt eng mit jenem des Proteins MDM2 zusammen. Wird MDM2 durch ein stress-induziertes Signal gehemmt, verdoppelt sich die Konzentration von p53 und die Transkription einer Reihe von Genen startet unverzüglich. Damit werden die durch Reize entstandenen Schäden entweder repariert oder die Apoptose wird eingeleitet (Levine, 2020). Je nach Art des Reizes kann MDM2 stark, mäßig oder schlecht an p53 gebunden werden; diese Verbindung bestimmt die p53 induzierte Reaktion und Einleitung zahlreicher weiterer Signalwege. Das Zusammenspiel mehrerer Reize löst diese Antwort aus (Hu et al., 2012).

Obwohl in über 67 % der Fälle eine Expression von p53 in Plattenepithelkarzinomen (squamous cell carcinomas/SCCs) detektiert werden

Einleitung

kann, besteht laut Ara et al. kein zwingender Zusammenhang zu einer *TP53* Gen-Mutation (Ara et al., 2014). Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine posttranskriptionale Inaktivierung von p53 beispielsweise durch Viren oder Bakterien stattfinden muss (Scheffner et al., 1990, Wei et al., 2010, Werness et al., 1990, Scarth et al., 2021). Singh, R.D. et al. kommen zu dem Schluss, dass eine Analyse des *TP53*-Mutationsstatus in Tumorgewebe im frühen Stadium ein wichtiger prognostischer Faktor sein kann (Singh et al., 2016). Laut Odell et al. führen *TP53*-Mutationen zu frühen Veränderungen in dysplastischen Läsionen (Odell et al., 2021).

1.3.2 HPV-assoziierte dysplastische Veränderungen

HPV können beim Menschen zu persistierenden Infektionen führen. Die rund 200 HPV-Typen werden in 5 Gattungen (Genera) eingeteilt. Man unterscheidet α , β , γ , μ , ν HPV. α -HPV und β -HPV sind dabei am meisten erforscht, da sie den größten Teil der onkogenen HPV darstellen (Bernard et al., 2010). Im Kopf-Hals-Bereich sind es α -HPV, die das größte onkogene Potenzial innehaben. Es werden high-risk (HR) und low-risk (LR) HPV-Typen unterschieden. HR-HPV-Typen sind etwa HPV 16 und HPV 18, wobei HPV 16 hauptsächlich im Oropharynx, am Zungengrund und an den Tonsillenkrypten zu malignen Läsionen führt (Chaturvedi et al., 2013). Zu LR-HPV zählen HPV 6 und HPV 11, da sie benigne Läsionen verursachen (Tomaić, 2016).

α -HPV dringt durch Mikroläsionen in die Mukosa ein und wandert zu seinem Hauptziel - den Keratinozyten. Da die Viren keine eigene Reproduktionsmaschinerie besitzen, sind die Basalzellen und Parabasalzellen mit hoher Differenzierungskapazität die Hauptwirtszellen der Viren, wodurch sich das basaloide Muster in HPV-assoziierten Dysplasien erklärt (Ganti et al., 2015, Doorbar et al., 2012). Die Virus-RNA wird in das Wirtsgenom integriert und die Onkoproteine exprimiert. Besonders wichtig für die Replikation sind die Proteine E6 und E7, da sie eine zelluläre Unsterblichkeit induzieren (E6) und die Zellteilung unkontrollierbar (E7) vorantreiben. Damit fördern besonders diese

Einleitung
beiden Onkoproteine das Tumorstadium (Androphy et al., 1987, Smotkin and Wettstein, 1986). Die Proteine sind nur gemeinsam funktionell aktiv für die Tumorentwicklung (Riley et al., 2003).

Damit die mutierten Zellen der p53-induzierten Apoptose entgehen können, kann E6 mit dem Tumorsuppressor p53 interagieren (Honda et al., 1997). E6 nimmt den Platz der MDM2-Ligase ein, die sonst die Aktivität von p53 reguliert. Damit wird MDM2 komplett inaktiv in der Signalkaskade und p53 wird inaktiv oder abgebaut (Hengstermann et al., 2001, Pim et al., 1994). So kann E6 in die p53-Transaktivierung eingreifen und die Aktivität sogar ohne Proteasomen unterdrücken (Thomas and Chiang, 2005). E6 kann weitere Schutzmechanismen des Körpers umgehen, indem es den Apoptoseregulator BAK unterdrückt und die Expression des Apoptose-hemmenden Proteins Survivin stimuliert (Borbély Á et al., 2006, Krajewski et al., 1996).

Das Onkoprotein E7 ist durch seine posttranskriptionelle Regulation mithilfe des Proteasoms und der Phosphorylierung in der Lage, mit vielen Substraten Wechselwirkungen einzugehen. Damit greift E7 in den Zellzyklus ein und führt zu einer Steigerung der Proliferation, einer Destabilisierung von Transkriptionskomplexen, einer Umgestaltung des Chromatins sowie einer Degradierung des als Tumorsuppressor wirkenden Retinoblastom-Proteins (pRB) (Tomaić, 2016).

Prädilektionsstellen für HPV-assoziierte Dysplasien im Mund-Rachen-Raum sind Epithelien mit folgenden Merkmalen: Eine Fragmentierung der Epithelbarriere durch infiltrierende Lymphozyten; eine basaloide Differenzierung des Plattenepithels, wobei basaloide Zellen eine HPV-Infektion erleichtern; eine Immunprivilegierung, die die Beseitigung des Virus verhindert; eine geringere Polarisierung des Epithels ohne oberflächliche Ausreifung. Diese Faktoren erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer anhaltenden Infektion (Tomaić, 2016).

1.4 Definition und histologische Merkmale der differenzierten squamösen intraepithelialen Neoplasie

Die dSIN beschreibt ein abnormales Plattenepithel, welches im Bereich des Stratum basale und parabasale atypische Epithelzellen aufweist, welche in den höheren Epithelschichten ausreifen (Wasserman et al., 2016). Die dSIN wird in den gängigen Graduierungssystemen (z.B. WHO) im Kopf-Hals-Bereich nicht als eigene Entität genannt. Erst in der 3. Edition der WHO-Klassifikation (2005) wurde die Veränderung einer dSIN beschrieben, jedoch wird sie bis zur aktuellen 5. WHO-Klassifikation von 2023 nicht als solche bezeichnet (Odell et al., 2021, Muller and Tilakaratne, 2022). Daher besteht die differenzierte Form der Dysplasie als dysplastische Veränderung, aber nicht als eigene Klassifizierungseinheit (Li et al., 2021). In der WHO wird eine Art differenzierte Dysplasieform von Muller et al. wie folgt beschrieben:

“Cytological atypia confined to the basal third may be sufficient for a diagnosis of severe dysplasia, depending on individual features present, particularly bulbous rete processes, budding and disorganization of basal cells, and marked pleomorphism“ (Muller et al., 2023).

Die histologischen Merkmale der dSIN sind wie von Arsenic & Kurrer, 2013, Odell et al., 2021, Reibel et al., 2017 und Paliga, 2014 beschrieben anerkannt und in Tabelle 5 zusammengefasst (Paliga and Mai, 2014, Arsenic and Kurrer, 2013, Odell et al., 2021, Reibel et al., 2017). Abb. 9 zeigt ein Beispiel einer dSIN an gingivalem, retromolarem Plattenepithel mit den beschriebenen morphologischen Merkmalen. Abb. 10 stellt eine dSIN neben einem PLECA dar.

Tabelle 5 Zusammenfassung der histologischen Merkmale einer dSIN

Merkmals	Beschreibung
Hyperkeratose	Häufig vorhandene Hyperkeratose mit Ortho- oder Parakeratose.

Merkmal	Beschreibung
Zelluläre Differenzierung	Sehr gute squamöse Zelldifferenzierung mit erhaltener oder fehlender Keratinisierung oberhalb der Parabasalzellschicht; abnorme Proliferation und Hyperplasie.
Kernmerkmale in der basalen und parabasalen Zellschicht	Vergrößerte, hyperchromatische Zellkerne; variable Anzahl an Zellkernen; erhöhtes Kern-Zytoplasma-Verhältnis; prominente Nukleoli.
Minimale zytologische Atypien in den Oberflächenschichten	Zytologische Atypien meist stärker in den unteren Epithelschichten, Oberflächenzellen können leichte Anomalien zeigen, wie vergrößerte Zellgröße und unregelmäßige Zellgrenzen.
Verlust der normalen architektonischen Anordnung	Desorganisation der normalen Architektur, eine gewisse epitheliale Stratifikation bleibt jedoch erhalten, architektonische Verzerrung mit unregelmäßiger Zellanordnung, „Cobblestone-Appearance“ (Paliga, 2014).
Fehlen des HPV-zytopathischen Effekts	Kein HPV-nachweisbarer zytopathischer Effekt: keine Koilocyten mit Hyperchromasie und unregelmäßigen Kernmembranen

Merkmal	Beschreibung
Akanthose	Häufiges Auftreten einer Akanthose, welche auf die Zunahme der Epithelzellen aufgrund der Hyperplasie der basalen und parabasalen Zellen hinweist.
Mitotische Aktivität	Erhöhte Mitosefiguren, besonders in den basalen und parabasalen Schichten, weniger in den oberflächlicheren Schichten.
Basalzellschicht-Anomalien	Basalzellen mit hyperchromatischen oder offenen Kernen; zahlreiche kleine Nukleoli; erhöhte mitotische Aktivität; Bildung von Zellnestern von 3-5 Zellen möglich.
Kein signifikantes entzündliches Infiltrat	dSIN zeigt in der Regel kein signifikantes entzündliches Infiltrat im Stroma im Gegensatz zu anderen Dysplasieformen
Reteleisten	Elongierte und anastomosierte Reteleisten

Die gleichen Merkmale wurden auch für die dVIN von Reutter 2016, von Van den Eiden 2013 und von Jin 2019 ausführlich beschrieben. Dort wurde die dVIN bereits als mittel- bis schwerwiegende Dysplasie eingestuft (Reyes and Cooper, 2014), obwohl sie sich meist nur auf die basalen und parabasalen Schichten beschränkt. Das Entartungsrisiko der dVIN ist im Gegensatz zu den HPV- oder entzündlich bedingten VIN I bis VIN II erhöht (Jin and Liang, 2019).

Einleitung

dVIN hat eine HPV-unabhängige Pathogenese (Thompson et al., 2022). Jin und Liang beschreiben, dass in 80 % der dVINs eine *TP53*-Mutation vorliegt (Jin and Liang, 2019). Daher ist p53 ein guter Marker, um die Diagnose einer dVIN zu unterstützen, wenn es in der basalen Zellschicht überexprimiert wird. Ein Ausfall von p53 kann auch ein Hinweis auf eine Mutation im *TP53*-Gen sein, jedoch kann dieser auch in benignen Epithelveränderungen wie Lichen sclerosus, Lichen simplex chronicus oder im normalen Epithel auftreten (Thompson et al., 2022). Parra-Herran et al. wiesen 2022 anhand der dVI nach, dass bei einer Überexpression von p53 eine Mutation von *TP53* vorliegt (Parra-Herran et al., 2022). Singh, Leen et al. stellten ebenfalls an der dVIN fest, dass ein Ausfall von p53 ebenfalls eine Mutation von *TP53* nahelegt (Singh et al., 2015) Zum gleichen Ergebnis kamen auch Dasgupta et al. (Dasgupta et al., 2018) Um eine dSIN von diesen benignen Veränderungen abzugrenzen, ist es somit wichtig, das Ergebnis der p53-Immunhistologie mit der HE-Morphologie zu korrelieren. Bei zweifelhafter Beurteilung der Expression von p53 erscheint auch eine molekularpathologische Mutationsanalyse von *TP53* nötig. Als weiterer möglicher Marker könnte hier CK17 in Frage kommen, welcher eine spezifische Reaktivität bei dVIN (93 %, oft vollschichtig oder suprabasal) zeigt und sich deutlich von der HPV-abhängigen usual VIN (uVIN; keine Expression von CK17) unterscheidet. Lichen sklerosus und Lichen simplex chronicus zeigen ebenfalls eine Expression von CK17, jedoch nur in der oberen Epithelhälfte (Jin and Liang, 2019). Ob diese Expression von CK17 auch auf die dSIN zutrifft, muss noch geklärt werden.

Die pleomorphe Dysplasie könnte eine Weiterentwicklung der dSIN mit Übergreifen der dysplastischen Zellen von der Basal- und Parabasalzellschicht auf die oberen Epithelschichten darstellen. Sie erstreckt sich histologisch somit über das gesamte Epithel (alle Epitheldrittel); die übrigen Merkmale sind gleich denen der dSIN. Abb. 11 zeigt regelhaftes Plattenepithel neben einer pleomorphen Epitheldysplasie am Beispiel von Plattenepithel vom Zungenrand

Einleitung
 aus der vorliegenden Studie. Daran ist erkennbar, dass die Merkmale dieser
 Dysplasie denen der dSIN aus Abb. 9 ähneln.

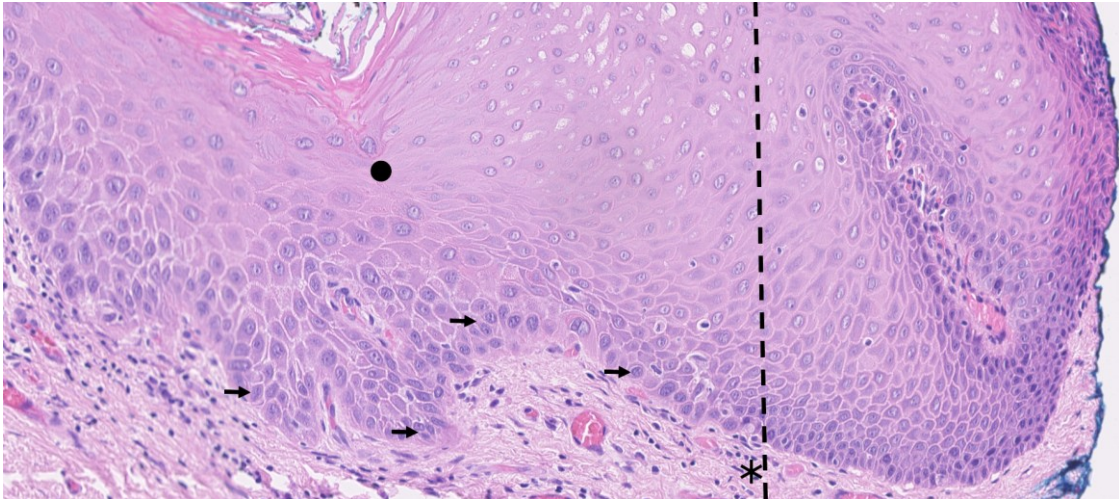


Abb. 9 Differenzierte intraepitheliale Neoplasie (dSIN) beispielhaft an gingivalem Plattenepithel aus dem TMA 5mm-03Ü Core 5-3, HE, 20-fache Vergrößerung. Übergang von physiologischem Plattenepithel in die dSIN (*); rechts: Plattenepithel mit regelhafter Epithelschichtung mit kleinen Basalzellen und Basalzellkernen. Links: dSIN mit atypischen Basalzellen in Nestern oder einzeln liegend (→) mit großen, atypisch geformten Zellkernen, im oberen Epitheldrittel (•) regelhafte Ausreifung mit Parakeratose; kein lymphozytäres Infiltrat unter der Basalmembran.

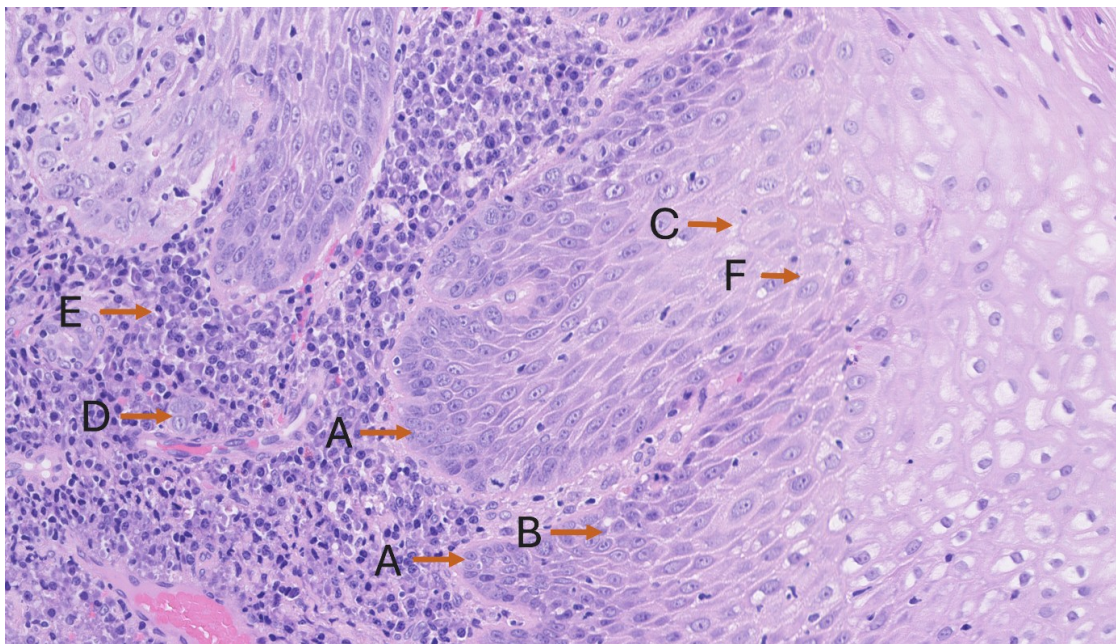


Abb. 10 Beispiel einer dSIN mit invasivem Karzinom am Zungenrand **A** Atypische Basalzellen mit variabler Anzahl an Zellkernen, viel Zytoplasma und prominenten Nucleoli. **B** Desorganisation und architektonische Verzerrung des Epithels. **C** Ödem und Akanthose. **D** Invasion von hochdifferenzierten,

Einleitung

squamösen Turmozellen ins subepitheliale Stroma. E Lymphozytäres Infiltrat bei Tumorinvasion und Epitheldysplasie. F Desmosomen. Aus dem TMA 5mm-03Ü Core 1-1, HE, 20-fache Vergrößerung.

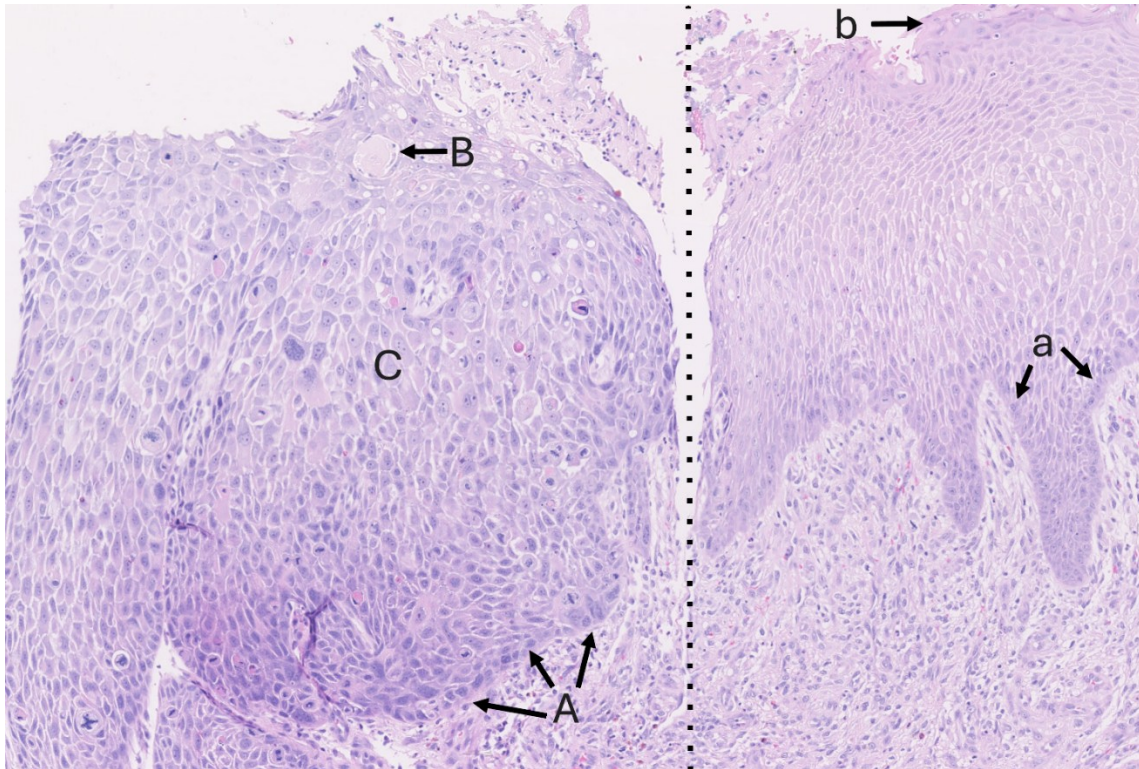


Abb. 11 Pleomorphe Dysplasie: Übergang von physiologischem Epithel in neoplastisches Epithel Zungenrand: a Palisadenartige Anordnung der kleinen Basalzellen. b Ortho-/Parakeratose. A Atypische vergrößerte Basalzellen mit großen Zellkernen, atypischer Kern-Plasma-Relation, Desorganisation, große parabasale Zellen mit viel eosinophilem Zytoplasma, „cobblestone-appearance“. B Hornperlen/Dyskeratose innerhalb des Stratum granulosum. C Polymorphe Zellen in allen Epithelschichten. Aus dem TMA 5mm-26 Core 7-1, HE, 5-fache Vergrößerung.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob analog zur Vulva histologisch eine differenzierte squamöse intraepitheliale Neoplasie (dSIN) von anderen Formen der squamösen intraepithelialen Neoplasie (SIN) abzugrenzen ist. Dafür sollen morphologische Merkmale einer möglichen dSIN ermittelt werden, welche die dSIN eindeutig von anderen dysplastischen Veränderungen des Epithels im Mundraum und Oropharynx abgrenzen.

Neben den morphologischen Kriterien sollen immunhistochemische Marker (p16, MIB1, p53, CK13, CK17) untersucht werden, welche z.T. bei der Vulva zur Charakterisierung der dSIN eingesetzt werden können und damit die Reproduzierbarkeit der Diagnose erhöhen.

Ziel der Arbeit ist es zu beweisen, dass die dSIN eine eigene Entität der präkanzerösen Läsionen im Mundraum und Oropharynx vergleichbar zur dVIN darstellt und durch einen immunhistochemisch zu bestimmenden Marker eindeutig und damit ohne Inter- und Intraobserver-Variabilität diagnostiziert werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenrecherche

Aus der Patientendatei des Informationssystems PAS.NET (Nexus AG, Krankenhausinformationssysteme, Medizin Software, Villingen-Schwenningen, Deutschland) des Institutes für Pathologie wurden mit Hilfe der Suchbegriffe „„SIN“ OR "squamöse intraepitheliale neoplasie" OR "squamous intraepithelial neoplasia" AND NOT "cervix" AND NOT "vulva"“ im Zeitraum 1998 bis 2018 Fälle mit einer SIN oder dSIN herausgesucht. Bei der Entnahme der zugehörigen Paraffinblöcke und Schnitte aus dem Block- und Schnittarchiv des Institutes für Pathologie wurden als Platzhalter kleine Zettel (FB-HIS-029, Abb. 12) eingelegt, welche die Fallnummer, die Blocknummer, die Studienverantwortlichen, den Studiennamen und das Datum enthielten. Die 1050 routinemäßig befundeten Fälle wurden digital aus dem PAS.NET in eine Excel-Tabelle (Excel 365, Microsoft, Redmont, Washington, USA) exportiert und nach Materialart und -herkunft sortiert. Zur Vollständigkeit wurden alle im PAS.NET vorhandenen Befunde der jeweiligen Patientinnen und Patienten anhand der routinemäßig erstellten kritischen Berichte geprüft und ggf. in der Excel-Liste ergänzt, wenn die Materialart und -herkunft in Kombination mit dem Befund in die Studie passte. Dadurch wurde die Auswahl der Befunde bis zum Jahr 2020 erweitert. Die Befunde vor dem Jahr 2003 wurden aus der Studie herausgenommen, da sie teilweise nicht oder nicht ausreichend digitalisiert waren. Die Objektträger der verbliebenen 986 Fälle wurden dem Schnittarchiv des Institutes für Pathologie entnommen und mithilfe eines Durchlichtmikroskops (Axioskop 40, Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland) hinsichtlich des Vorliegens einer Epitheldysplasie nachbegutachtet (Tabelle 6). Nach histologischer Durchsicht dieser 986 Fälle wurden 559 Fälle von 227 Patientinnen und Patienten ausgewählt (Nachnamen A-K und einzelne Fälle der Nachnamen L-Z) und nach der Materialherkunft aufgeteilt. Diese überwiegend willkürliche Patientenauswahl wurde zur Fallbegrenzung der Studie getroffen. Das Material stammt von 91

Material und Methoden
 Patientinnen und 136 Patienten, der Altersdurchschnitt liegt bei 67 Jahren (19-92). Proben vom Alveolarkamm, Alveolarfortsatz, Planum buccale, Caruncula lingualis, Zungenoberseite, Zungenspitze, Zungenrand, Mundschleimhaut oder Mundboden wurden der Mundhöhle, Proben vom weichen Gaumen, Zungenrund, Tonsillen, Uvula und vorderem Gaumenbogen dem Oropharynx zugeordnet. Für die Studie waren nur Befunde wie SIN I/milde Dysplasie, SIN II/moderate Dysplasie, SIN III/CIS/schwere Dysplasie, Plattenepithelkarzinome G1-G3 und dSIN aus den oben genannten Bereichen relevant. Metastasen wurden nicht berücksichtigt. Ebenfalls nicht gesondert bewertet wurde eine mögliche Progression bei Verlaufsbiopsien.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen genehmigt (Projektnummer 542/2018B02).

A	A
Namen / Studie / Material / Abt.	Namen / Studie / Material / Abt.
M. Morsch; PD Dr. U. Vogel	M. Morsch; PD Dr. U. Vogel
dSIN	dSIN
☒ 82265	☒ 82265
Nummern der Blöcke/Schnitte:	Nummern der Blöcke/Schnitte:
Datum:	Datum:

Abb. 12 Formblatt für Platzhalter FB-HIS-029 aus dem Institut für Pathologie Tübingen

Tabelle 6 Kriterien und Auswertungskürzel der ersten Nachbegutachtung in HE zur Diagnosesicherung nach WHO-Kriterien, 2017. Die Kürzel der Auswertung sind in der Tabelle beschrieben. Einige Kürzel wurden aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation im Epithel mehrfach vergeben.

Basale Zellschicht	Suprabasale Zellschicht	Superfizielle Zellschicht	Entzündung	Reteleisten
Ausrichtung der Zellen:	Mitosen (p = ja, n = nein)	Hyperparakeratose (p = ja, n = nein)	Lichenoid I	Verlängert I

Basale Zellschicht	Suprabasale Zellschicht	Superfizielle Zellschicht	Entzündung	Reteleisten
Orthogonal o, Horizontal h, Quer q				
Größe der Zellkerne: Normal n Kleiner – Größer + Viel größer ++	Spongiose (p = ja, n = nein)	Hyperorthokeratose (p = ja, n = nein)	Nicht-lichenoid nl	Verbreitert b
Form der Zellkerne: Länglich l Oval o Rund r	Interzellulärbrücken (p = ja, n = nein)		Gemischt g	Anastomosiert a
Zytoplasma Normal n Eosinophil e Keins k	Zellatypien (p = ja, n = nein)			
Nucleoli (p = ja, n = nein)	Dyskeratosen (p = ja, n = nein)			
Cobblestone Appearance (p = ja, n = nein)				

2.2 Auswahl der studienrelevanten Gewebeareale

Nunmehr wurden die mit HE oder IHC (p16, p53, MIB1) gefärbten Schnitte der verbliebenen 559 Fälle nochmals mikroskopiert, um diejenigen Areale auf dem Schnitt zu identifizieren und mit einem Filzstift zu markieren, welche in die Tissue Microarrays (TMAs) eingestellt werden sollten.

In einigen Fällen waren die Paraffinblöcke zerfallen oder die Gewebeprobe zu dünn, um weitere Schnitte davon anfertigen zu können. Diese Fälle wurden aus der Studie genommen. Es wurden insgesamt 1722 Gewebestanzylinder von 227 Patientinnen und Patienten aus 559 Fällen den Paraffinblöcken entnommen. Davon stammten insgesamt 1294 Gewebestanzylinder aus der Mundhöhle, 428 Gewebestanzylinder aus dem Oropharynx.

2.3 Herstellung der Tissue MicroArrays (TMAs)

Die Methode der TMAs dient der kosten- und arbeitssparenden Untersuchung von bis zu 2501 Gewebeproben durch die Anordnung von kleinen Gewebestanzzyklern (Durchmesser: 0,3–5 mm) in einem kartesischen Koordinatensystem in einem Standardparaffinblock (34,9 x 21,8 x 4 mm). Durch die Anordnung von vielen kleinen Gewebszylindern können mehrere Gewebeproben einer Patientin oder eines Patienten auf einem Objektträger direkt nebeneinander untersucht (parallele Analyse) und damit das Material effizienter beurteilt werden. Mit Hilfe der TMAs lässt sich auch der benötigte Durchmesser einer Gewebeprobe für eine sichere Diagnostik ermitteln. In dieser Studie wurden TMAs mit einem Durchmesser der Gewebszylinder von 1 mm, 2 mm und 5 mm untersucht.

Werden TMAs benötigt, die mit einer mittleren Anzahl an Proben (30-100) bestückt werden sollen und eine präzise Anordnung benötigen, sollten vorgefertigte Akzeptorparaffinblöcke mit vorgebohrten oder vorgestanzten Aufnahmelöchern genutzt werden. Als Akzeptorblöcke eignen sich insbesondere kleine kubische paraffinierte Agarblöcke (Vogel, 2014). Diese Anforderungen stellten die in dieser Studie angefertigten TMAs mit 1 mm und 2 mm durchmessenden Gewebecores. Als Grundlage wurden Agar-Platten aus zweiprozentigem Agar-Agar gegossen. Diese wurden über eine aufsteigende Alkohol-Verdünnungsreihe von Wasser befreit und anschließend über einen Xylol-Zwischenschritt paraffiniert (Song, 2005). Das dargestellte Verfahren hat den Vorteil, dass beim späteren Aufschmelzen des Paraffins ein formstabiler Block bestehen bleibt und die Gewebecores sich nicht zufällig versetzen oder kippen. Nach dem Paraffinieren wurden die Blöcke zur Aufnahme der Gewebecores mit Stanzlöchern in den vorgegebenen Größen von 1 mm und 2 mm – sog. Blindes - händisch mithilfe eines im Bohrständer fixierten Multifunktionsfeinbohrers in Kombination mit einem Micro Compound Tisch (alle Teile der Fa. Proxxon GmbH, Föhren, Germany) versehen (Vogel and Bueltmann, 2006). Die mit 5 mm durchmessenden Gewebszylinder bestückten

Material und Methoden
 TMAs benötigen diese Vorarbeit nicht, da die 5 mm breiten Gewebszylinder stabil auf einem doppelseitigen Klebeband der Firma Tesa (2,75 mm x 38 mm) standen (Wilkins, 2003). Auf die Schnittfläche der Agar-Paraffin-Blöcke wurde ebenfalls doppelseitiges Klebeband aufgebracht. Zur Stabilisierung des Klebebandes wurde auf die verbliebene Klebeseite eine Röntgenfolie als Träger befestigt (back-bone-Methode nach Chen (Abb. 13)) (Chen and Zhou, 2005).

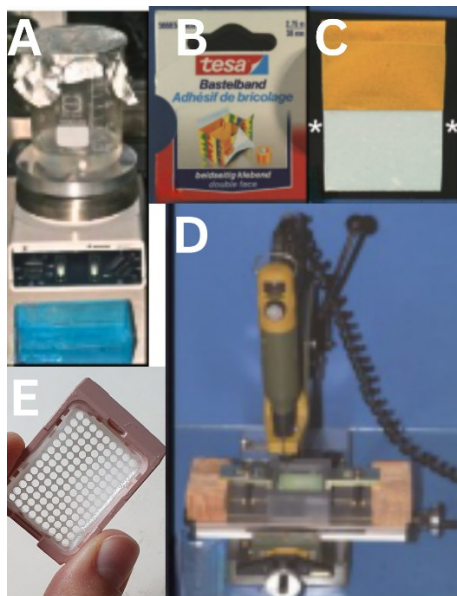


Abb. 13 Herstellung der paraffinierten Agar-Akzeptorblöcke für die TMAs **A** Konventionelle Herstellung eines Agar-Gels aus Agar-Agar-Pulver und Wasser auf einer Magnetheizplatte mit einem Rührmagneten **B** Doppelseitiges Klebeband der Firma Tesa **C** Doppelseitiges Klebeband auf Röntgenfilm (*) **D** Proxxon Multifunktionsbohrer im Bohrstand **E** Paraffinierter Agar-Akzeptorblock mit 2 mm Blindes. Adaptiert aus „Overview on Techniques to Construct Tissue Arrays with Special Emphasis on Tissue Microarrays“ A Fig. 9; B, C Fig. 7; D Fig. 8 (Vogel, 2014)

Die in der HE-Nachbegutachtung auf den Objektträgern markierten Stellen wurden auf die Donorblöcke übertragen und wahlweise mit einer 1 mm, 2 mm oder 5 mm-Hautbiopsiestanze (Abb. 14 A) (KAI Industries Group, Japan) aus dem Donorblock herausgestanzt. Die 1 mm und 2 mm durchmessenden Gewebszylinder wurden nun in die vorgefertigten Blindes - leere Cores auf dem Array - der Akzeptorblöcke eingeführt. Die 5 mm durchmessenden Gewebszylinder wurden frei auf das doppelseitige Klebeband gestellt. Die Lokalisation der Gewebeproben wurde in zunächst in mehreren Tabellen in Microsoft Excel 365 erfasst. Ein sogenannter Markercore diente zur Festlegung

Material und Methoden
der Position 1-1 in den jeweiligen TMAs, wobei bei den 1 mm und 2 mm TMAs ein Markercore in die Position 1-1 gesetzt wurde, bei den 5 mm TMAs zwei Markercores neben die Position 1-1 und 1-2. Als Gewebe für die Markercores wurden eine Melanommetastase und Leberparenchym verwendet. Die 5 mm TMAs wurden jeweils mit max. 7x4 Cores, die 2 mm TMAs mit max. 14x9 Cores und der 1 mm TMA mit 371 Cores bestückt. Zusätzlich zur Position der Gewebeproben in den TMAs wurden die Fallnummer, die Materialherkunft und die routinemäßige sowie die bei der Nachbegutachtung erhobene Diagnose in den Excel-Tabellen dokumentiert.

Die Akzeptorblöcke wurden zum Schmelzen in gereinigte Edelstahlmodeln der Größe 34,87 mm x 21,78 mm gebracht. Nach dem Aufschmelzen auf einer Wärmplatte (Slee MPS/W, SLEE medical GmbH, Nieder-Olm) bei 65°C für 10 Minuten wurden die Stahlmodeln mit 80°C heißem, flüssigem Paraffin (Ausgießstation, Slee MPS/P, SLEE medical GmbH, Nieder-Olm) aufgefüllt. Danach wurde die Stahlmodel kurzfristig auf eine Kälteplatte (-12°C) (Slee MPS/C, SLEE medical GmbH, Nieder-Olm) gestellt, wobei mit Hilfe einer beheizbaren Pinzette der TMA bzw. der Röntgenfilm fest auf den Boden der Stahlmodel gedrückt wurde. Dadurch sollte eine plane Auflage der TMAs bzw. des Röntgenfilmes erreicht werden. Nach der Verfestigung des bodennahen Paraffins wurde eine im Kassettendrucker (Leica IPC, Printer for Tissue Cassettes, SN 1346, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim) beschriftete Gitterkassette aus Plastik zur Identifizierung der TMAs auf die Stahlmodel gelegt. Die Stahlmodel wurde zunächst bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend über Nacht in einen 4°C kalten Kühlschrank gelegt (Liebherr Premium, Liebherr-International-AG, Bulle, Schweiz). Dieses Verfahren der langsamen Abkühlung vermindert die Kristallbildung und Spannungen im Paraffin, die zum Splintern der Blöcke und damit zur erschwerten Auswertung führen könnten (Vogel, 2014).

Insgesamt wurde ein TMA mit 1mm, vier TMAs mit 2 mm und siebenunddreißig TMAs mit 5 mm durchmessenden Stanzzyklindern hergestellt. Die 5 mm TMAs

Material und Methoden wurden in sechzehn Übersichtsblöcke und einundzwanzig Mehrprobenblöcke geteilt. Erstere dienen der Übersicht mit jeweils einer Gewebeprobe pro Fall. Die anderen wurden, wenn vorhanden, mit weiteren Gewebeproben des gleichen Falls bestückt.

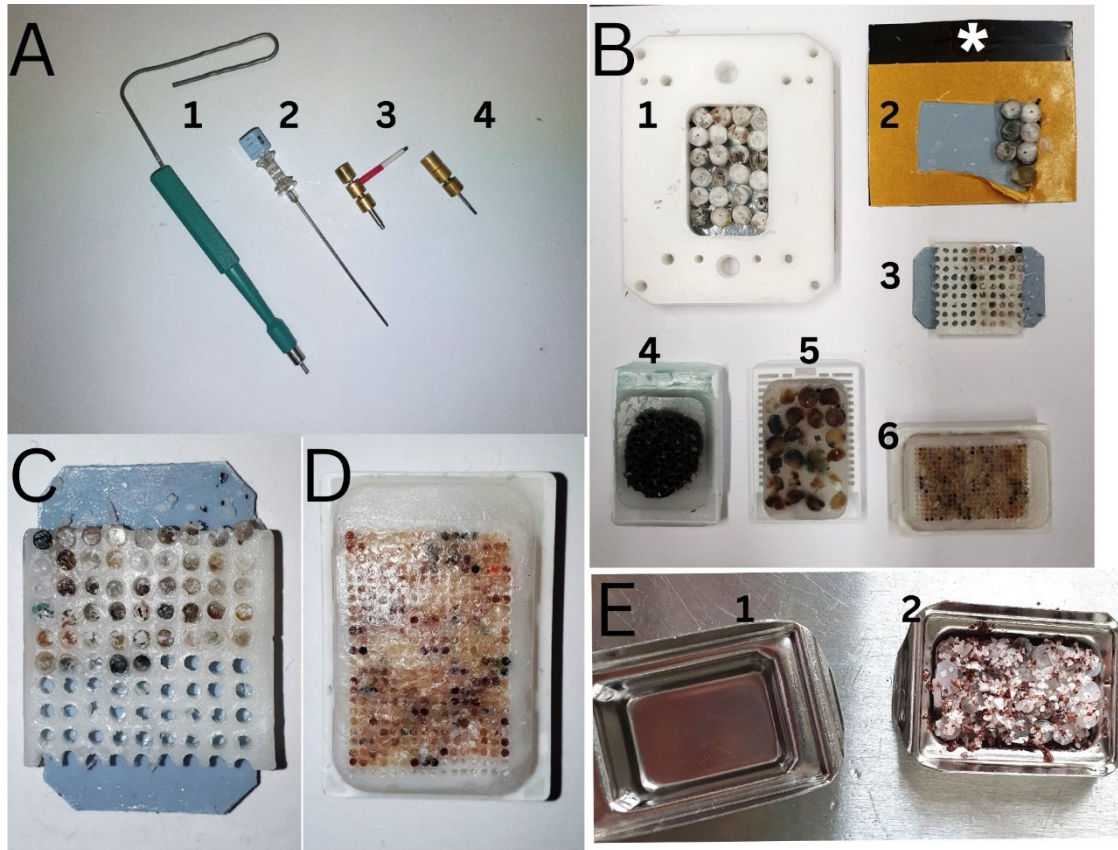


Abb. 14 Material und Verlauf der Bestückung der TMAs **A** (1) 5 mm durchmessende Hautbiopsiestanze; (2) 1 mm durchmessende Gewebestanze; (3/4) 2 mm durchmessende Gewebestangen **B** (1) 24 (4x6) 5 mm durchmessende Gewebecores mit Ausgießrahmen (Kunststoff) auf doppelseitigem Klebeband; (2) Bestückung des auf einer Röntgenfolie (*) befestigten doppelseitigen Klebebandes (Sandwichträger) mit 5 mm durchmessenden Gewebecores; (3) Bestückung des Akzeptorblockes mit 2 mm durchmessenden Gewebecores auf Sandwichträger; (4) Gewebeparaffinblock Markergewebe Melanometastase; (5) TMA mit 5 mm durchmessenden Gewebecores auf beschrifteter Plastikkassette; (6) Vorgebohrter Akzeptorblock mit bereits zahlreichen eingestellten 1 mm durchmessenden Gewebecores. **C** Nahaufnahme 2 mm Akzeptorblock. **D** Nahaufnahme 1 mm Akzeptorblock vor dem Aufschmelzen; **E** (1) Stahlmodell zum Gießen eines Paraffinblockes (2) 5 mm Gewebecores auf Sandwichträger mit zerkleinertem paraffiniertem Lebergewebe zum vereinfachten Abgrenzen der in den TMA eingestellten Cores.

2.4 Schneiden der TMAs

Die TMAs wurden nach dem vollständigen Aushärten bei Kühlschranktemperatur aus den Modeln genommen, die Trägerschicht aus Klebeband und Röntgenfolie entfernt und auf eine Kühlplatte (Tissue Cool Plate COP20, Reichert-Jung Optische Werke AG, Österreich) mit -10°C gebracht. Das weitere Herabkühlen des Paraffins dient der besseren und vor allem längeren Schnittfähigkeit am Mikrotom. Der zu schneidende TMA wurde in den CoolCut-Aufsatz des Rotationsmikrotoms (Microm, Mikrotom HM 355 S) eingespannt und zur Begradigung der Anschnittfläche zuerst mit 10-15 μm Schnittvorschub gerade geschnitten. Nach dem Anschneiden wurden die für die Färbungen benötigten Dünnschnitte abhängig von der Blockqualität (Rissbildung oder nicht) mit einer Dicke von 2,5-3,5 μm erstellt. Die dauerhafte Kühlung durch das CoolCut-System verlängerte die optimale Bearbeitungsdauer des Paraffins. Die Dünnschnitte flossen über ein wasserbenetztes Schnitttransfersystem (STS) in ein mit Eiswürfeln gekühltes und mit destilliertem Wasser gefülltes Auffangbecken. Auf der Oberfläche dieses Wasserbades schwimmend konnten die Dünnschnitte auf adhäsive Objektträger (Tomo TOM-1190, Matsunami Glass IND. LTD., Japan) aufgezogen werden. Zum glatten Aufziehen und Strecken der Dünnschnitte wurden diese durch Eintauchen der Objektträger in ein auf 51°C vorgeheiztes, mit destilliertem Wasser gefülltes Wasserbad (pfm AG Typ WB 1000) auf dessen Oberfläche aufgebracht und nach wenigen Sekunden, in denen sich das Paraffin des Schnittes erwärmen und sich der Schnitt ausdehnen konnte, sogleich wieder blasenfrei und möglichst rissfrei auf den Objektträger aufgezogen. Je Block wurden etwa 25 Schnitte angefertigt, um die bestmöglichen Schnitte mit den geringsten Artefakten für Färbungen und Diagnostik zu verwenden. Nach 20 Minuten Trocknungszeit in senkrechter Position wurden die Objektträger händisch mit der TMA-Nummer und einer Schnittnummer versehen, um eine Zuordnung zu ermöglichen.

2.5 Standardfärbung – Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Zur Nachbegutachtung der routinemäßig erstellten Schnittpräparate und zur Markierung der für die TMA-Erstellung relevanten Areale wurde weitestgehend die HE-Färbung verwendet. Ferner wurde eines der neu erstellten Schnittpräparate der TMAs nach dem im Rezepturhandbuch des hämatologischen Labors der Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie hinterlegten Protokolls (RPH-PNP-14349-1 RPH-HÄM-006) wie in Tabelle 7 beschrieben mit HE von den Mitarbeitenden des Labors gefärbt. Am Beispiel des mehrschichtig unverhornten Plattenepithels am Zungenrand ist die HE-Färbung in Abb. 15 dargestellt. Das vom Eosin rot gefärbte Zytoplasma und die vom Hämatoxylin blau gefärbten Zellkerne sind typisch für die HE-Färbung.

Tabelle 7 Durchführung der HE-Färbung laut Qualitätsmanagement (QM)-Dokument RPH-PNP-14349-1 RPH-HÄM-006 des Institutes für Pathologie Tübingen

HE		
Wiederholungen	Chemikalie	Inkubationszeit
1	Xylol	15 Min.
2	100 % Alkohol	1 Min.
2	96 % Alkohol	1 Min.
2	70 % Alkohol	1 Min.
1	Aqua dest.	spülen
1	Mayers – Hämatoxylin	4 Min.
1	Leitungswasser	10 Min.
1	Aqua dest.	spülen
1	Eosin	2 Min.
1	70 % Alkohol	wenige Sekunden
1	96 % Alkohol	wenige Sekunden
2	100 % Alkohol	1 Min.
4	Xylol	1 Min.
Eindecken		

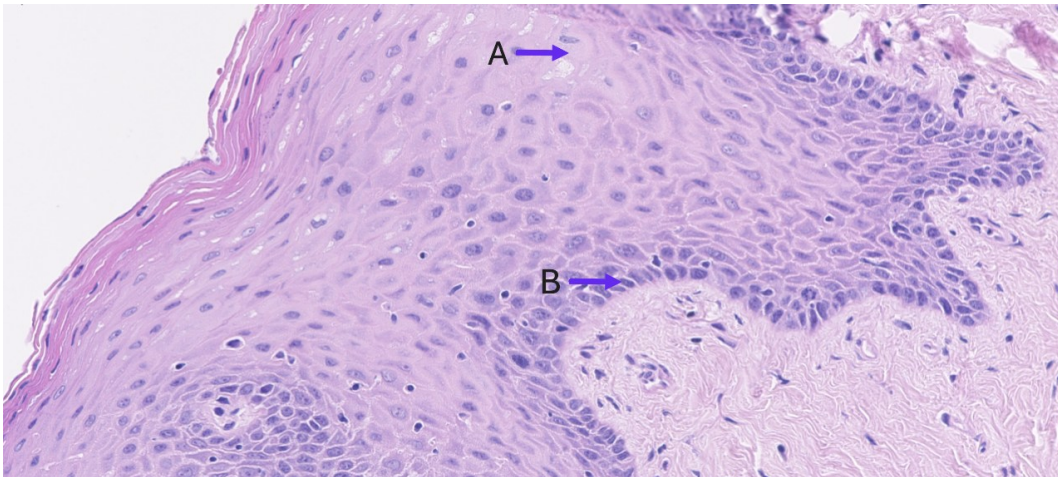


Abb. 15 Beispiel der HE-Färbung an regelhaftem mehrschichtig unverhornten Plattenepithel vom Zungenrand aus dem TMA 2mm-01 Core 3-7, HE, 20-fache Vergrößerung: A Rotes Zytoplasma (Eosin). B Blaue Zellkerne (Hämatoxylin). Palisadenförmige Anordnung der Zellen.

2.6 Immunhistochemische Färbungen (IHC)

IHC dienen der Darstellung einer genau definierten, zumeist aus Protein bestehenden Zielstruktur mithilfe eines Antikörpers. Damit können sie zur Charakterisierung von Tumoren und damit in der pathohistologischen Diagnostik eingesetzt werden.

Nach Binden des Primärantikörpers an das Antigen wird ein Sekundärantikörper verwendet, der an den Primärantikörper bindet und das immunhistochemische Signal durch eine erhöhte Anzahl an Bindungsstellen für ein Detektionssystem verstärkt. In dieser Studie wurden die Detektionssysteme OptiView HRP Multimer (Roche Holding AG, Basel, Schweiz) für p16, p53, CK17, MIB-1 und iView SA-HRP (Roche Holding AG, Basel, Schweiz) für CK13 eingesetzt, um den Sekundärantikörper mit mehreren Enzymen zu konjugieren und die Signalstärke durch weitere offene Bindungsstellen zu erhöhen. Das so geschaffene Polymer mit seinen Enzymen kann nun das Chromogen Diaminobenzidin (OptiView DAB DetectionKit, Roche Holding AG, Basel, Schweiz, für p16, p53, CK17, MIB-1 und iVIEW DAB DetectionKit, Roche Holding AG, Basel, Schweiz für CK13) zu einem kräftigen, beständigen, unlöslichen, braunen Niederschlag umsetzen, der unter dem Mikroskop sichtbar wird. Um die zugrundeliegenden Gewebestrukturen ebenfalls kontrastreich darzustellen, wird im Anschluss an eine immunhistochemische Färbung eine HE-Gegenfärbung durchgeführt.

Die IHC-Färbungen wurden nach den geltenden Protokollen Nr. 8 für p16, p53, CK 17 und MIB-1 und Nr. 485 für CK13 nach dem Qualitätsmanagement des Institutes für Pathologie Tübingen im Ventana BenchMark ULTRA Färbvollautomaten (Roche Holding AG, Basel, Schweiz) angefertigt. Es wurde jeweils ein Objektträger gefärbt.

Beispiele der IHC-Färbungen mit unterschiedlichen Expressionsmustern aus der vorliegenden Studie sind in Abb. 16 (p53), Abb. 17 (p16), Abb. 18 (MIB-1), Abb. 19 (CK17) und Abb. 20 (CK13) dargestellt.

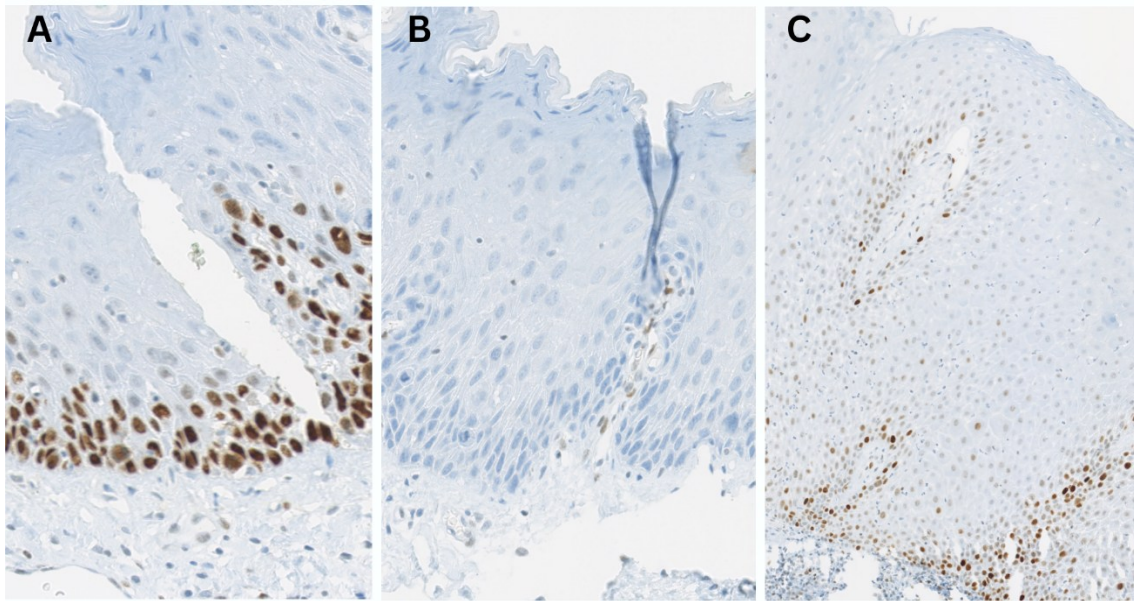


Abb. 16 Exemplarische p53-IHC-Färbung **A** Mundhöhle. Weder Zytoplasma noch Zellkerne zeigen eine braune Färbung im Sinne eines Ausfalls der p53. Aus dem TMA 5mm-35ü Core 1-1, p53, 20-fache Vergrößerung. **B** Mundhöhle. Deutliche braune Färbung der Zellkerne im Sinne einer Überexpression p53 in basalen und parabasalen Epithelschichten. Aus dem TMA 5mm-35ü Core 1-1, p53, 20-fache Vergrößerung. **C** Alveolarfortsatz. Vereinzelt stark ausgeprägte braune Färbung der Zellkerne, überwiegend schwache bis keine braune Färbung im Sinne eines p53 wild-type(wt). Aus dem TMA 5mm-35ü Core 2-1, p53, 10-fache Vergrößerung.

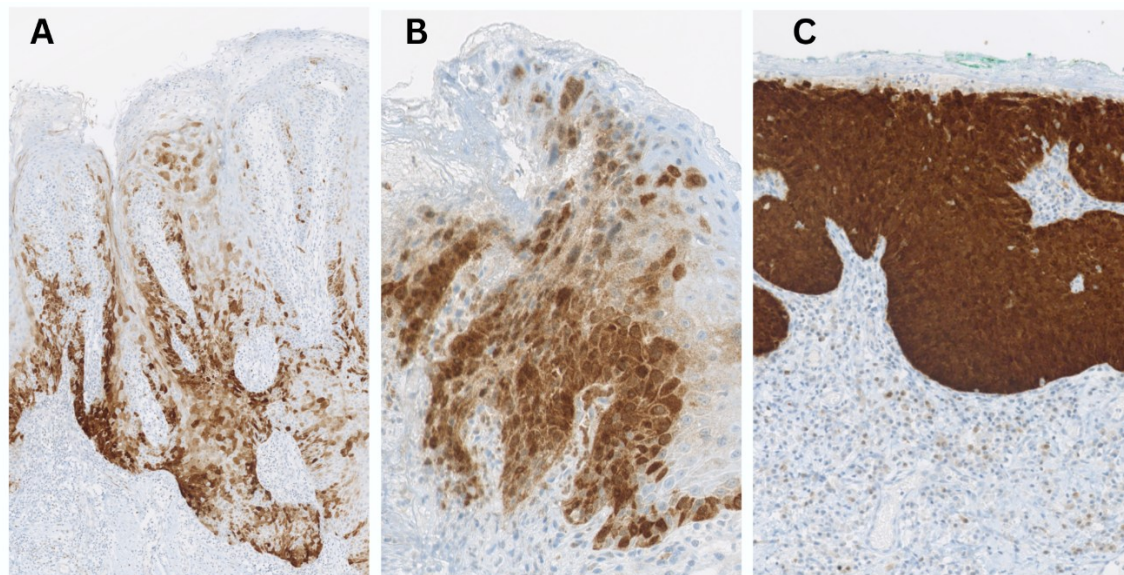


Abb. 17 Exemplarische p16-IHC-Färbung **A** Planum buccale. Expression von p16 im unteren Epitheldrittel entsprechend einer HPV-assoziierten Epitheldysplasie (SIN I) aus dem TMA 5mm-07ü Core 4-2, p16, 5-fache Vergrößerung **B** Weicher Gaumen. Expression von p16 bis ins mittlere Epitheldrittel entsprechend einer HPV-assoziierten Epitheldysplasie (SIN II) aus dem TMA 5mm-07ü Core 2-2, p16, 20-fache

Material und Methoden

Vergrößerung **C** Zunge. Expression von p16 über alle Epitheldrittel entsprechend einer HPV-assoziierten Epitheldysplasie (SIN III/CIS) aus TMA 5mm-07ü 2-3, p16, 10-fache Vergrößerung.

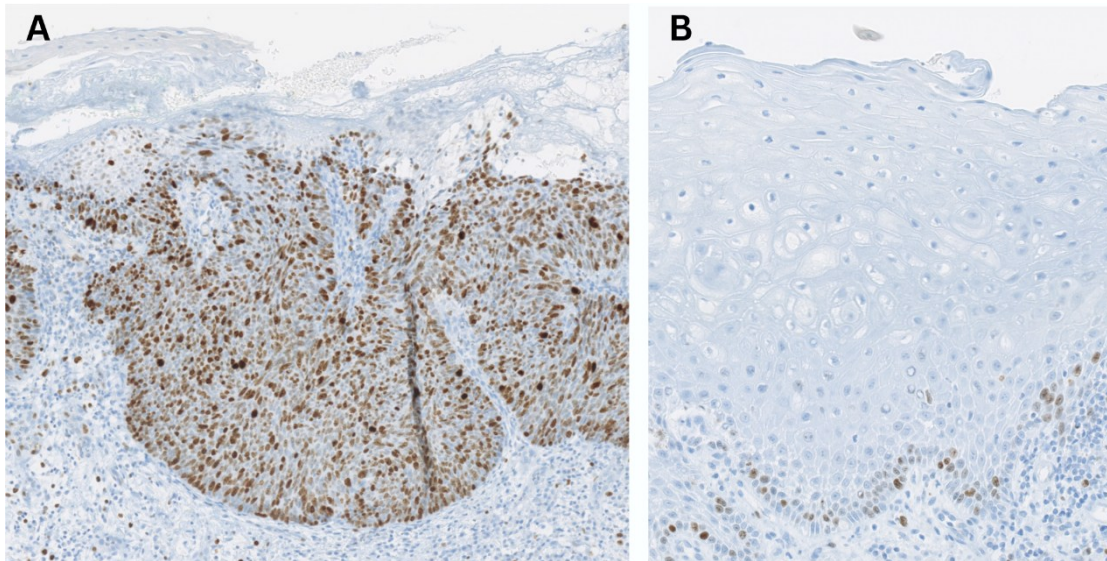


Abb. 18 Exemplarische MIB-1-IHC-Färbung **A** Zunge. Starke atypische Expression über die gesamte Epithelhöhe. Aus dem TMA 5mm-07ü Core 2-3, MIB-1, 10-fache Vergrößerung **B** Weicher Gaumen. Regelmäßige vereinzelte Expression beschränkt auf die basale Zellschicht. Aus dem TMA 5mm-07ü Core 2-2, MIB-1, 20-fache Vergrößerung

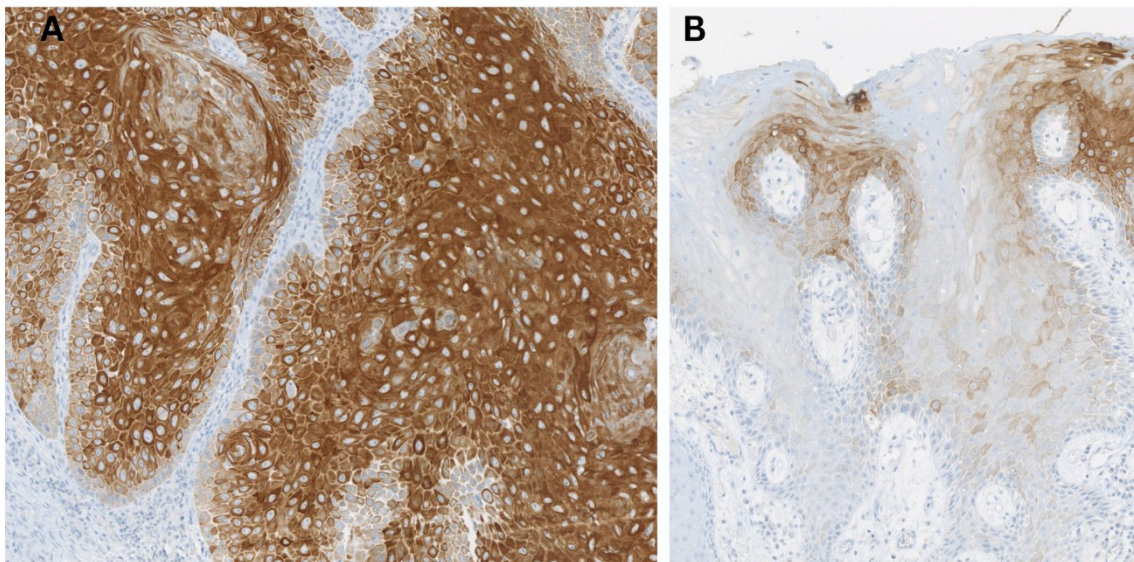


Abb. 19 Exemplarische CK17-IHC-Färbung **A** Alveolarfortsatz. Starke Expression über die gesamte Epithelhöhe entsprechend einer atypischen CK17-Expression. Aus dem TMA 5mm-35ü Core 2-1, CK17, 20-fache Vergrößerung. **B** Gingiva. Geringe, aber nachweisbare Expression von CK17 in den oberen Epitheldritteln entsprechend einer atypischen CK17-IHC-Färbung. Aus dem TMA 5mm-35ü Core 3-1, CK17, 10-fache Vergrößerung.

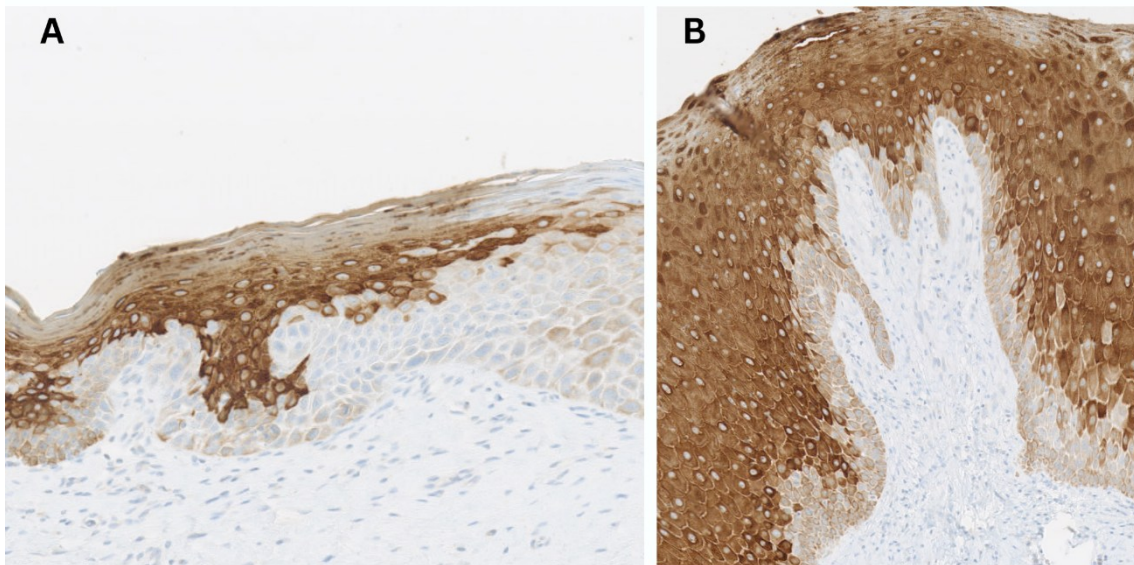


Abb. 20 Exemplarische CK13-IHC-Färbung **A** Planum buccale. Mäßige bis keine Expression im Sinne einer atypischen CK13-IHC-Färbung. Aus dem TMA5mm-35ü 4-3, CK13, 10-fache Vergrößerung. **B** Alveolarfortsatz. Starke Expression mit Ausparung der basalen und parabasalen Epithelschicht im Sinne einer regelhaften CK13-Expression. Aus dem TMA 5mm-35ü 2-1, CK13, 10x.

2.7 Aufnahme und Auswertungsmethodik der TMAs

Nach dem Färben wurden die Präparate mit Glasdeckgläsern (No. 1,5, 24x60mm, Firma Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) und einem Harz eingedeckt. Die gefärbten Objektträger wurden mithilfe des Nano Zoomer Digital Pathology 2.0 HT (Hamamatsu Photonics K.K., Japan) nach dem Antrocknen des Harzes eingescannt und in entsprechenden Ordnern digitalisiert als ndpi-Dateien abgespeichert. Damit konnten die gefärbten Objektträger mit jedem Viewer-Programm angesehen werden, der ndpi-Dateien nutzen konnte. In dieser Studie wurden die Programme CaseViewer (3DHistec Ltd., Budapest, Ungarn) und NPD.view 2.0 (Hamamatsu Photonics K.K., Japan) benutzt.

Die TMAs wurden in zwei Runden in Zusammenarbeit mit PD Dr. Ulrich Vogel zur Sicherung der Diagnosen ausgewertet. Zuerst wurden alle erstellten TMAs parallel in allen Färbungen betrachtet und eine Diagnose basierend auf den Befunden (nach den in Kapitel 1.2 und 1.4 genannten Kriterien) gestellt. Dysplasien wurden unabhängig von ggf. auftretenden invasiven Karzinomen betrachtet. Als primärer Marker wurde p53 herangezogen, eine Semiquantifizierung der Färbung fand erst in der folgenden Runde der Auswertung statt. Die Diagnosen wurden mit den Diagnosen aus dem PASNET verglichen, die in der gleichen Excel-Tabelle während der Patientenrecherche dokumentiert wurden.

In der zweiten Runde wurden die TMAs hinsichtlich der Expression der untersuchten Proteine semiquantitativ ausgewertet und die Expression in der Excel-Tabelle mit Kürzeln (Tabelle 8) dokumentiert. Die mittels der Kürzel dokumentierte Expression der Proteine wurde zur Erstellung von Immunprofilen herangezogen, wobei die Proteine in einer eindeutigen Reihenfolge angeordnet wurden (p53 – p16 – CK13 – CK17 – MIB1). Die sich dabei herauskristallisierenden Immunprofile wurden, wie Tabelle 9 zeigt, einer Diagnose zugeordnet. Dabei wurden alle Proben einer Patientin oder eines

Material und Methoden
Patienten zu einem Profil zusammengefasst, wobei jeweils die stärkste Expression eines Proteins gewertet wurde. Lagen in verschiedenen Proben der gleichen Patientin oder des gleichen Patienten verschiedene Immunprofile und damit verschiedene Ätiologien/Pathogenesen vor, wurden dementsprechend mehrere Profile dokumentiert. Diese Auswertungsmethode diente der Übersichtlichkeit und der Bestätigung der Färbemuster der verschiedenen Proteine.

Tabelle 8 Auswertungskürzel der immunhistochemischen Färbungen

P53		CK13		CK17		P16		MIB1	
p	Überexpression	n	Keine Expression	n	Keine Expression/ Normalbefund	p	Kräftig, bandartig	1	Basal
wt	Wild type	pn	Schwache Expression	pn	Schwache Expression	pn	schütter	2	Parabasal
n	Ausfall	p	Expression mit hellem basalem Band	p	Starke Expression mit schwacher Basalzellschicht	n	negativ	3	Suprabasal
		pp	Expression bis an die Basalmembran	pp	Starke Expression bis an die Basalmembran				
		ppp	Normalbefund: Bandartige starke Expression mit Ausnahme des Stratum basale						

Tabelle 9 Einteilung der Dysplasie nach Immunprofilen nach Morsch

Immunprofile	p53 p/n, p16 n/pn, MIB1 1-2, CK13 pn/pp, CK17 p/n	p53 p/n, p16 n/pn, MIB1 3; CK13 pp, CK17 pp	p53 wt, p16 n/pn, MIB1 1, 1-2, CK13 p-, CK17 p	p53 wt, p16 n/pn, MIB1 1-3, CK13 p+, CK17 p	P53 wt, p16 p, MIB1 1-3, CK13 p, CK17pp
Morphologie HE	gute Ausreifung, Basalzellschicht: Kernpolymorphie, Zellpolymorphie, Hyperchromasie, veränderte Zellpolarität, große Zellen, „Chaos“	Kernpolymorphie bis in superfizielle Epithelschicht, große Zellkerne, „Chaos“ wie in dSIN	verruköse Oberfläche - zackentartige Parakeratose, - ballenartiger Vorschub des Epithels ins Gewebe - viel eosinophiles, „lachsfarbendes“ Zytoplasma in Stratum spinosum, entweder große, eosinophile „Spinalzellen“ bis an die Basalmembran oder Basalzellatypie im Sinne Zellpolymorphie und Unordnung bis an die Basalmembran	Mischung aus verrukös, dSIN, pleomorph	basaloide Zellen vermehrt bis im unteren (SIN I), mittleren (SIN II) oder oberen Drittel des Epithels (SIN III/CIS), kleine Zellen mit wenig eosinophilem Zytoplasma, Kollozyten, keine Kernpolymorphie, keine Hyperchromasie
P53	Überexpression oder Ausfall	Überexpression oder Ausfall	wild type, beschränkt auf Basal- und Parabasalschicht	wild type, beschränkt auf Basal- und Parabasalschicht	wild type, dennoch vereinzelte Anfärbung der Basalzellen bis in die oberen Schichten, je nach Höhe der Läsion
P16	keine oder schwächere Expression	keine oder schwächere Expression	keine oder schwächere Expression	keine oder schwächere Expression	kräftige, bandartige Expression, je nach Höhe der Läsion bis in unteres, mittleres und oberes Drittel des Epithels ausgeprägt
MIB	1-2: Basalzellschicht überwiegend auch gefärbt	min. 2-3	1/1-2	1-3	Expression entsprechend der Höhe der Dysplasie
CK13	p53+ → sehr schwach bis Ausfall mit Flecken starker Expression, p53- → schwach bis Ausfall oder starke Expression Oropharynx: p53+ → stark bis zur Basalmembran	überwiegend starke Färbung bis zur Basalmembran	basal schwach gefärbt, zur superfiziellen Schicht weicher Übergang in stärkere Färbung	basal schwach gefärbt, zur superfiziellen Schicht weicher Übergang in stärkere Färbung	schwache Färbung, wie Basalzellschicht im Normalbefund, aber abhängig von der Höhe der Dysplasie
CK17	p53+ → starke Expression bis an Basalmembran, p53- → alle Expressionsmuster möglich	überwiegend starke bandartige Färbung bis zur Basalmembran	starke Färbung, Basalzellschicht schwach gefärbt	starke Färbung, Basalzellschicht schwach gefärbt	bandartig, partiell inhomogene Färbung, entsprechend der Höhe der Läsion
Diagnose	dSIN	pleomorph	Verrukös	Gemischt	SIN I-III

3 Ergebnisse

Insgesamt konnten 1722 Gewebeproben von 227 Patientinnen und Patienten ausgewertet werden. Die Gewebestanzten von 12 Patientinnen und Patienten enthielten kein Epithelgewebe mehr oder es war keine vollständige Auswertung aller IHC möglich. Diese Patientinnen und Patienten wurden somit vollständig aus der Auswertung genommen. 9 von 215 verbleibenden Patientinnen und Patienten zeigten zwei Dysplasieformen. Es konnten 224 Fälle/Profile von 215 Patientinnen und Patienten diagnostiziert werden, wobei in 155 Fällen Proben aus der Mundhöhle und in 69 Fällen aus dem Oropharynx stammen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 10 und Abb. 21 dargestellt. Insbesondere Abb. 21 zeigt den hohen Anteil der Diagnose dSIN in der vorliegenden Studie.

Tabelle 10 Anzahl der ausgewerteten Patientenfälle und Verteilung der Diagnosen nach Lokalisation

Diagnose	Gesamt n=224	Mundhöhle n=155	Oropharynx n=69
dSIN (inkl. verruköser dSIN)	91	64 (41 %)	27 (39 %)
Pleomorph	30	17 (11 %)	13 (19 %)
SIN (p16+)	13	3 (2 %)	10 (14 %)
Gemischt	32	24 (15 %)	8 (12 %)
Verrukös	18	18 (12 %)	0
Gemischt- verrukös	14	14 (9 %)	0
D0 (keine Dysplasie)	26	15 (10 %)	11 (16 %)

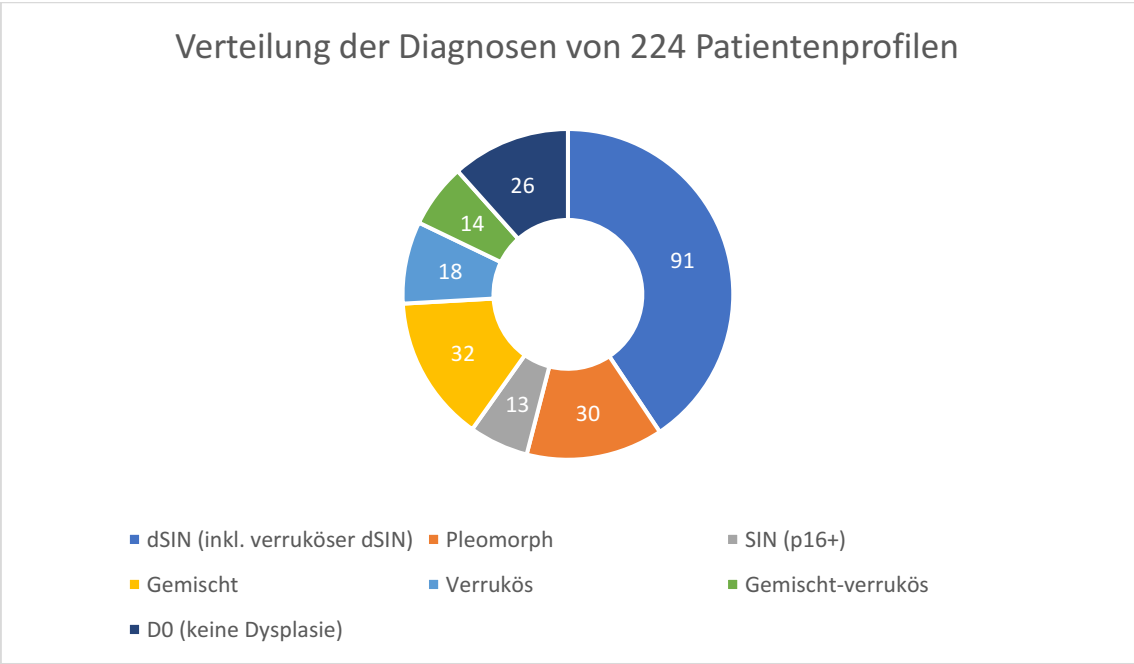
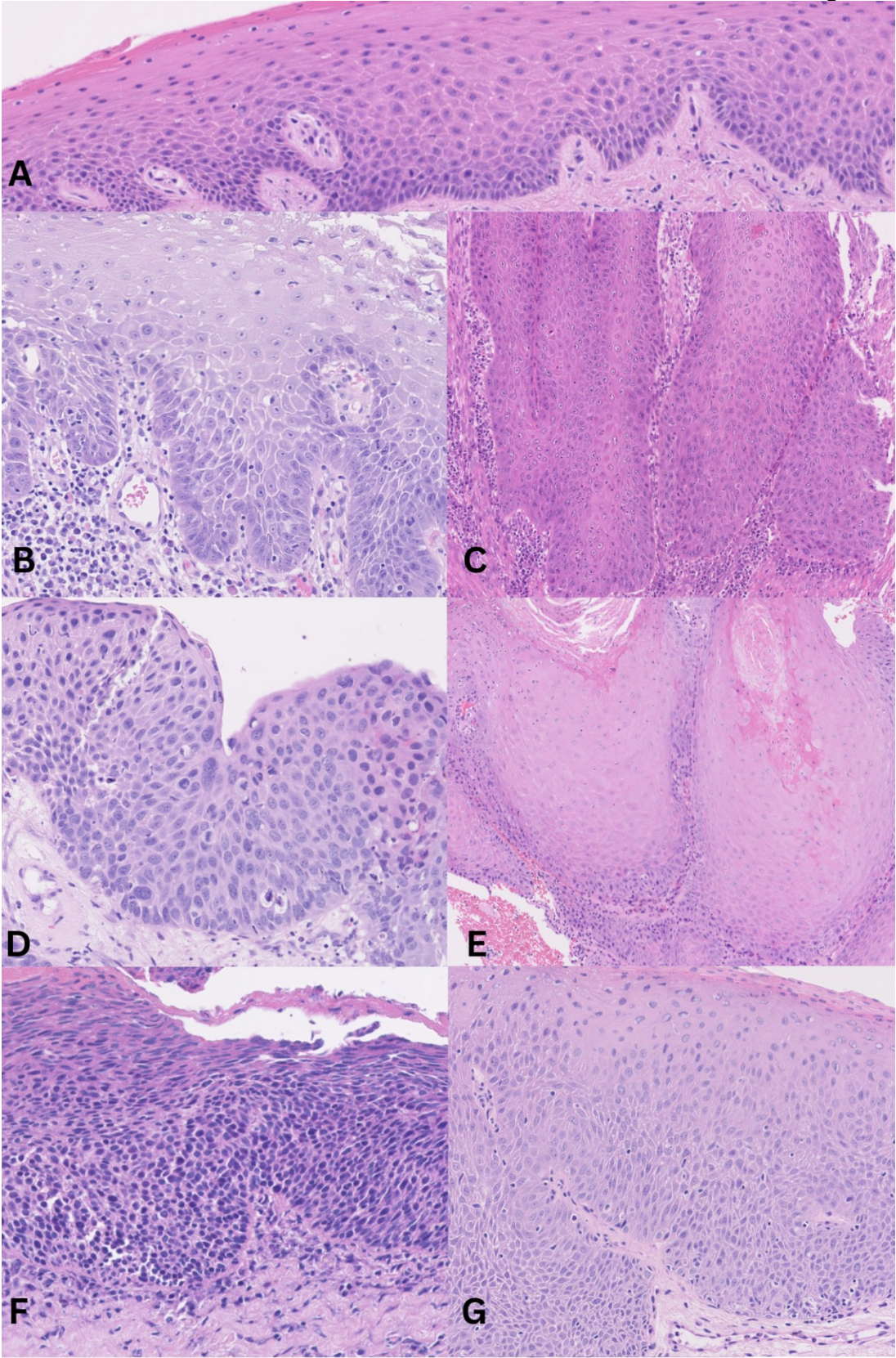


Abb. 21 Verteilung der Diagnosen der 224 Patientenprofile

3.1 Morphologische Einteilung

Teil der Studie war es bei der ersten Auswertung die Gewebeprobe nach den von Arsenic und Kurrer vorgeschlagenen morphologisch definierten Entitäten: „dSIN“, „pleomorph“, „verrukos“, „mixed“ und „basaloid“ (Tabelle 4) zu diagnostizieren (Arsenic and Kurrer, 2013). In der vorliegenden Studie zeigte sich jedoch noch eine weitere Entität, die nicht von Arsenic und Kurrer beschrieben und intern eingeführt wird: „Gemischt-verrukos“. Sie wurde aufgrund der Schwierigkeit einer genauen Zuordnung von einigen dysplastischen Veränderungen zu den bestehenden Entitäten hinzugefügt, da sie sowohl ein verruköses Wachstum zeigt als auch eine ausgeprägte Zellpolymorphie in der basalen und parabasalen Zellschicht. Die in der vorliegenden Studie verschiedenen beschriebenen Entitäten sind in Tabelle 9 mit ihren morphologischen Aspekten zusammengefasst. Abb. 22 zeigt histologische Beispiele der morphologisch definierten Dysplasieformen in der HE-Färbung.



Ergebnisse

Abb. 22 Beispielhafte morphologische Einteilung der Dysplasieformen
A Mundboden. Regelhaftes mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel mit intakter Basalmembran, palisadenartig angeordneten Basalzellen, regelhafter Schichtung bis zur Epitheloberfläche. Aus dem TMA 5mm-15 Core 4-4, HE, 10-fache Vergrößerung. **B Oropharynx. dSIN:** Große polymorphe Basalzellen mit Kernpolymorphie, Desorganisation, basal Zellnester aus drei Zellen, große parabasale Zellen mit viel eosinophilem Zytoplasma, erhöhte Mitosefiguren, Akanthose, erhaltene squamöse Differenzierung. Aus dem TMA 5mm-17 Core 1-1, HE, 20-fache Vergrößerung. **C Mundhöhle. Gemischt-verruköse Dysplasie:** Atypische, vergrößerte Basalzellen ähnlich denen des Stratum spinosum, plumpe, verlängerte Reteleisten, viel eosinophiles Zytoplasma, verruköses, ballenartig vorschiebendes Wachstum. Aus dem TMA 5mm-02 Core 3-4, HE, 10-fache Vergrößerung. **D Mundhöhle. Pleomorph:** Große polymorphe Zellen in allen Epithelschichten, Zell- und Kernpolymorphie, Desorganisation bis an die Oberfläche. Aus dem TMA 5mm-03 Core 1-1, HE, 20-fache Vergrößerung. **E Mundhöhle. Verruköse Dysplasie:** Verbreitete und verlängerte Reteleisten, ballenartiger Vorschub in das umliegende Gewebe, vergrößerte Basalzellen, große Zellen im Stratum spinosum mit viel eosinophilem Zytoplasma, Hyperplasie, regelhafte Ausreifung mit Hyperparakeratose. Aus dem TMA 5mm-15 Core 7-2 HE 10-fache Vergrößerung. **F Oropharynx. Basaloide Dysplasie (SIN III):** Basaloide Zellen bis an die Epitheloberfläche, große Zellkerne, kaum Zytoplasma. Aus dem TMA 2mm-01 Core 9-4, HE, 20-fache Vergrößerung. **G Mundhöhle. Gemischte Dysplasie:** Plumpe Reteleisten, basal ausgeprägte Zell- und Kernpolymorphie, Desorganisation in basaler und suprabasaler Zellschicht, viel eosinophiles Zytoplasma im Stratum spinosum, Parakeratose. Aus dem TMA 5mm-06 Core 3-1, HE, 20-fache Vergrößerung.

3.1.1 Differenzierte squamöse intraepitheliale Neoplasie

Die Einteilung der dSIN nach histomorphologischen Merkmalen gelang zumeist gut. Die dysplastischen Veränderungen in der basalen und parabasalen Zellschicht wie ausgeprägte zytologische Atypien und Kernpolymorphie im Sinne großer Basalzellen mit hyperchromatischen oder offenen Kernen und vergrößerten Parabasalzellen mit viel Zytoplasma, Desorganisation der Architektur mit Zellnestern aus 3-5 Zellen und erhöhte Mitosefiguren waren zumeist klar erkennbar. Ebenso konnten in den oberflächlichen Zellschichten eine gute squamöse Differenzierung mit erhaltener Keratinisierung oder Hyperkeratose festgestellt werden. Es traten geringe Zellatypien im Sinne vergrößerter Zellen mit viel Zytoplasma auf. Das dysplastische Epithel zeigte häufig eine Akanthose und elongierte und anastomosierende Reteleisten. Im Verlauf der Studie traten trotz der bereits eindeutig definierten histologischen Merkmale manchmal Befunde auf, welche nicht sicher einer dSIN zugeordnet werden konnten. Daher erschien die p53-IHC zur Bestätigung der ersten Diagnose wichtig. Beispielsweise zeigte sich bei einem verrukösen Erscheinungsbild oder einer gemischten Dysplasie eine Überexpression oder fehlende Expression von p53, welche nicht zu erwarten war (Abb. 23). Ebenso erfüllten andere Fälle die Charakteristika einer dSIN, zeigten aber keine p53-Expression.

Ergebnisse

Die histologischen Merkmale der von Arsenic und Kurrer postulierten Entitäten konnten in der vorliegenden Studie weitestgehend angewandt werden. In Abb. 22B ist ersichtlich, dass gut differenzierte Zellen vorlagen und einen gewissen Grad an normaler Reifung aufwiesen. Die Zelltypen erstrecken sich besonders auf die basalen und parabasalen Epithelschichten. Das von Paliga et al. 2014 für beschriebene, unregelmäßige „Kopfsteinpflaster“ war erkennbar.

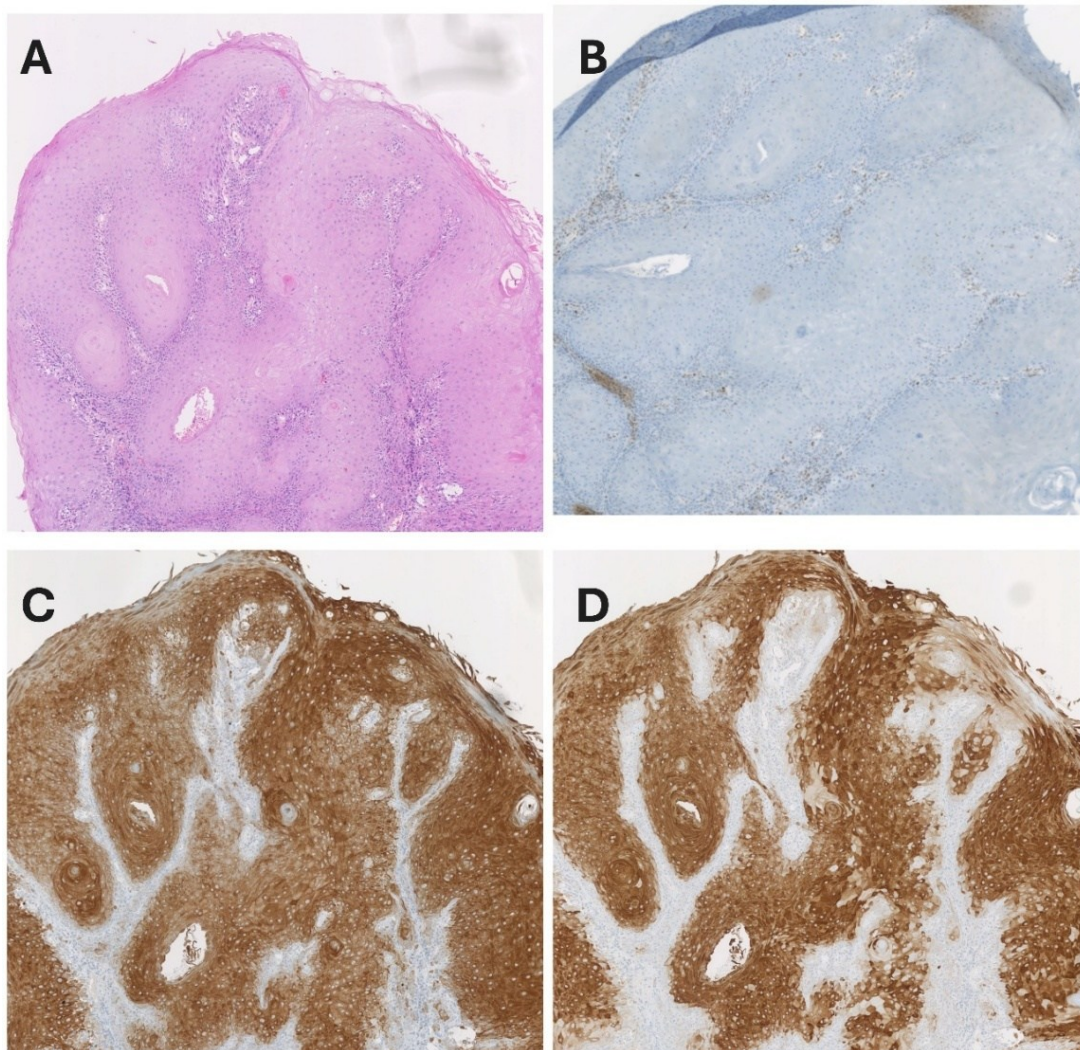


Abb. 23 Beispiel einer verrukösen dSIN in HE, p53, Ck13 und CK17 anhand einer Probe aus der Mundhöhle. Gingiva. **A** Morphologische Merkmale in der HE-Färbung: verruköses Erscheinungsbild mit Hornperlen, ausgeprägte, bullöse Reteleisten, Hyperkeratose, große basale und parabasale Zellen, viel eosinophiles Zytoplasma, Kopfsteinpflaster-artige suprabasale Zellen. **B p53**: Ausfall der p53-IHC. **C CK17**: Kräftige Expression über das gesamte Epithel. **D CK13**: atypische, starke Expression bis zur Basalmembran über das gesamte Epithel („pp“). Aus dem TMA 5mm-28 Core 5-4, alle 5-fache Vergrößerung.

3.1.2 Pleomorphe Dysplasie

Die beschriebenen morphologischen Merkmale (Tabelle 4) für die pleomorphe Dysplasie wie eine ausgeprägte Kern- und Zellpolymorphie über alle Epitheldrittel mit gegebenenfalls minimaler Ausreifung und minimaler Keratinisierung konnten in dieser Studie zur Diagnostik angewandt werden. Das Ausmaß der architektonischen sowie der zellulären Atypien erstreckte sich zumeist über alle Epitheldrittel. Der Versuch, die dSIN als Vorstufe zu einer pleomorphen Dysplasie anzusehen, gelang immerhin in einzelnen Fällen, in denen eine dSIN neben einer pleomorphen Dysplasie auftrat (Abb. 24). Im direkten Vergleich wiesen die dysplastischen basalen und parabasalen Zellen der dSIN eine gewisse Ähnlichkeit mit den pleomorphen Zellen der pleomorphen Dysplasie auf. Im Bereich der pleomorphen Dysplasie zeigte sich ein ausgeprägtes periläsionäres Infiltrat, welches im Bereich der dSIN schwächer ausgeprägt war. Eine Abgrenzung der pleomorphen Dysplasie zu einem invasiven Karzinom stellte sich in diesen Fällen aufgrund der ausgeprägten Dysplasie teilweise als schwierig heraus.

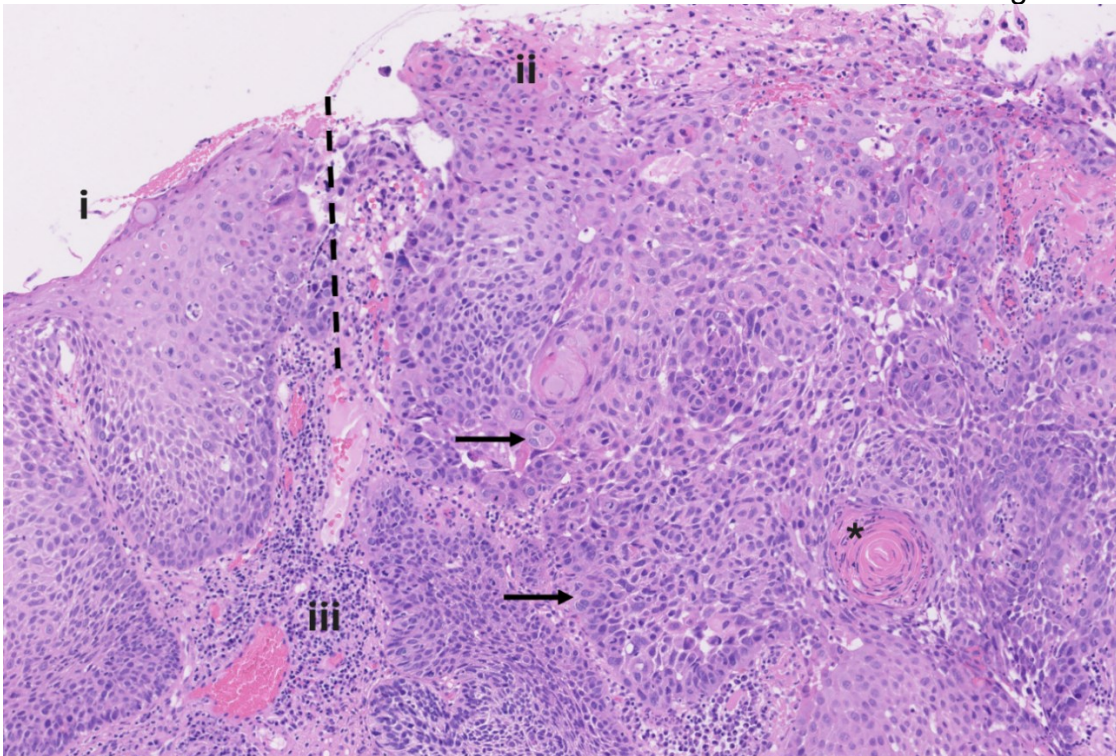


Abb. 24 Beispiel einer pleomorphen Dysplasie neben einer dSIN anhand einer Probe aus dem Oropharynx. Übergang durch die gestrichelte Trennlinie gekennzeichnet. **(i) dSIN:** basal Verlust der Zellpolarität, atypische vergrößerte Zellen, basale und parabasale Zell- und Kernpolymorphie, suprabasal großer, hyperchromatische Zellen, nach oben hin erhaltene Differenzierung mit leichter Orthokeratose. **(ii) Pleomorphe Dysplasie** über das gesamte Epithel mit Hornperle (*). Verlust der basalen Zellpolarität, basale Zellnester (→), Desorganisation des gesamten Epithels, Zell- und Kernpolymorphie im gesamten Epithel. **(iii)** Periläsionäres, lymphozytäres Infiltrat. Aus dem TMA 5mm-15 Core 6-4, HE, 20-fache Vergrößerung

3.1.3 Verruköse Dysplasie

Anhand der in der Literatur beschriebenen vermeintlich eindeutigen Morphologie, d.h. des Alleinstellungsmerkmals des architektonischen Musters im Sinne einer ausgeprägten Hyperplasie mit großen Zellen und viel eosinophilem Zytoplasma, einer zackentartigen Parakeratose und verlängerten und verbreiterten Reteleisten sowie dem ballenartigen Vorschubs des Epithels ins Gewebe soll die verruköse Dysplasie eindeutig zu identifizieren sein und keiner anderen oralen Erkrankung ähneln (Odell et al., 2021). Abb. 25 zeigt eine verruköse Dysplasie mit den klassischen histomorphologischen Merkmalen. In der vorliegenden Studie konnte die verruköse Dysplasie jedoch oftmals nicht so einfach diagnostiziert werden. Neben einer verrukösen Architektur des Epithels fand sich eine ausgeprägte Zellpolymorphie, die so nicht mit einer verrukösen Epitheldysplasie vereinbar

Ergebnisse waren. Es konnten zwei Formen der verrukösen Dysplasie identifiziert werden, die nur im Bereich des Stratum basale Unterschiede aufwiesen: Entweder zeigten die Basalzellen eine Atypie oder die Basalzellen fehlten, wodurch Stachelzellen direkt an die Basalmembran grenzten (Abb. 26, linkes Bild). Eine verruköse Dysplasie mit Basalzellatypie (BZA) lag häufiger vor als eine verruköse Dysplasie ohne Atypie (Abb. 26, rechtes Bild). Jedoch konnte der Übergang des einen in den anderen Subtyp auch oft in der gleichen Gewebeprobe beobachtet werden. Ein für diese Entität typischer immunhistochemisch fassbarer Marker erschien wünschenswert. Ein solcher ist jedoch aktuell nicht bekannt.

Sieben Fälle zeigten trotz typischer Morphologie einer verrukösen Dysplasie später einen Ausfall oder eine Überexpression von p53 und wurden somit als dSIN diagnostiziert.

Ebenso schwierig ist die Abgrenzung der verrukösen Dysplasie zu einer gemischten Dysplasie nach Arsenic und Kurrer. Einen immunhistochemischen Marker für eine gemischte Dysplasie gibt es bislang ebenfalls nicht.

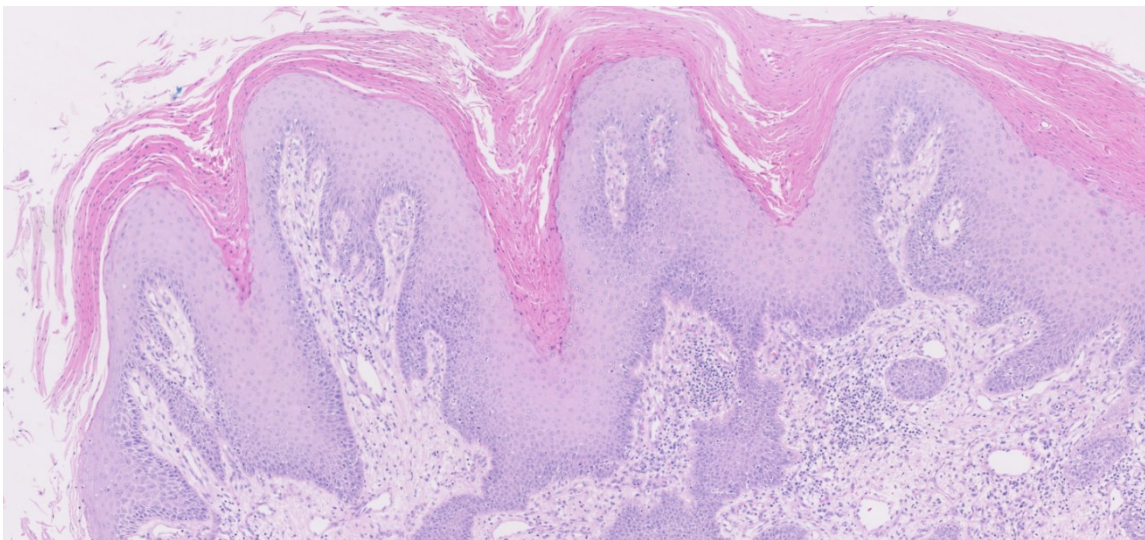


Abb. 25 Verruköse Dysplasie beispielhaft am Plattenepithel der Gingiva Verruköse Wachstumsform mit plumpen und ausgeprägten Reteleisten, große suprabasale Zellen, viel eosinophiles Zytoplasma, Akanthose, ausgeprägte zackenartige Hyperparakeratose. Aus dem TMA 5mm-05 Core 7-1, HE, 5-fache Vergrößerung.

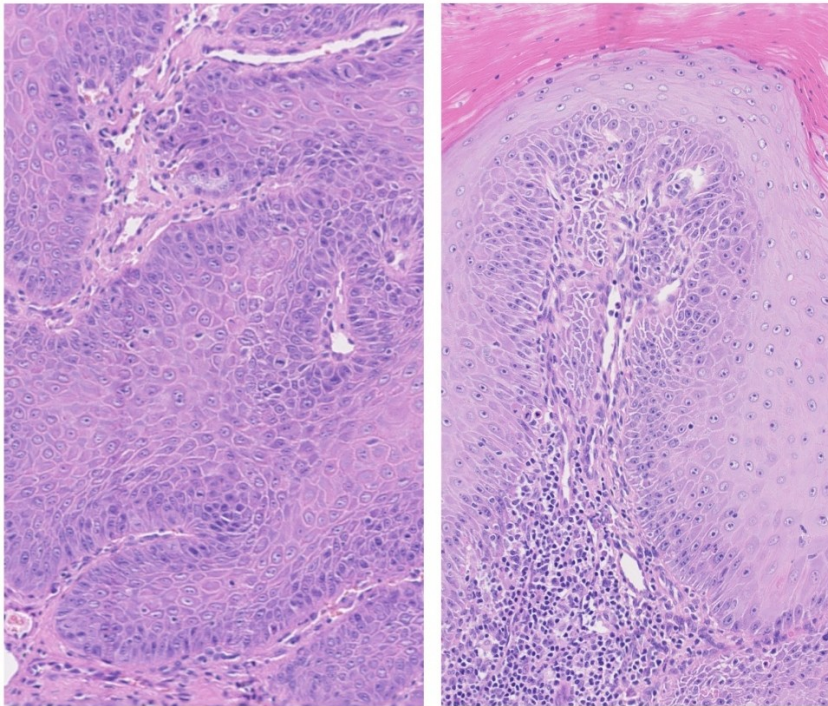


Abb. 26 Beispiel einer verrukösen Dysplasie mit Basalzellatypie (BZA) gegenüber einer einfachen verrukösen Dysplasie Links, Wange: Verruköse Dysplasie mit Akanthose; bis an die Basalmembran, atypische, vergrößerte basale Zellen mit großen Kernen wie Spindelzellen (BZA), Verlust der Zellpolarität, suprabasal hyperchromatische Zellen. Aus dem TMA 5mm-21 Core 4-2, HE, 20-fache Vergrößerung. **Rechts, Unterlippe:** Verruköse Dysplasie mit palisadenförmig angeordneten, vergrößerten Basalzellen. Suprabasale Akanthose und Hyperplasie, regelhafte Ausreifung, ausgeprägte Hyperparakeratose. Aus TMA5mm-30 1-2, HE, 20-fache Vergrößerung.

3.1.4 Gemischte Dysplasie

Als gemischte Dysplasie bezeichnen Arsenic und Kurrer eine nicht das gesamte Epithel betreffende Dysplasie entsprechend einer moderaten SIN laut WHO-Klassifikation mit und ohne Keratinisierung. Die von ihnen festgelegten Merkmale konnten von uns angewandt werden und eine variable Morphologie kann bestätigt werden. Abb. 27 zeigt Beispiele einer gemischten Dysplasie mit verschiedenen morphologischen Merkmalen. Somit werden Fälle, die keiner basaloiden, verrukösen, differenzierten oder pleomorphen Dysplasie zugeordnet werden konnten, als gemischte Dysplasie bezeichnet, welche somit wohl einen Sammeltopf (waste basket) für jene Dysplasien darstellt.

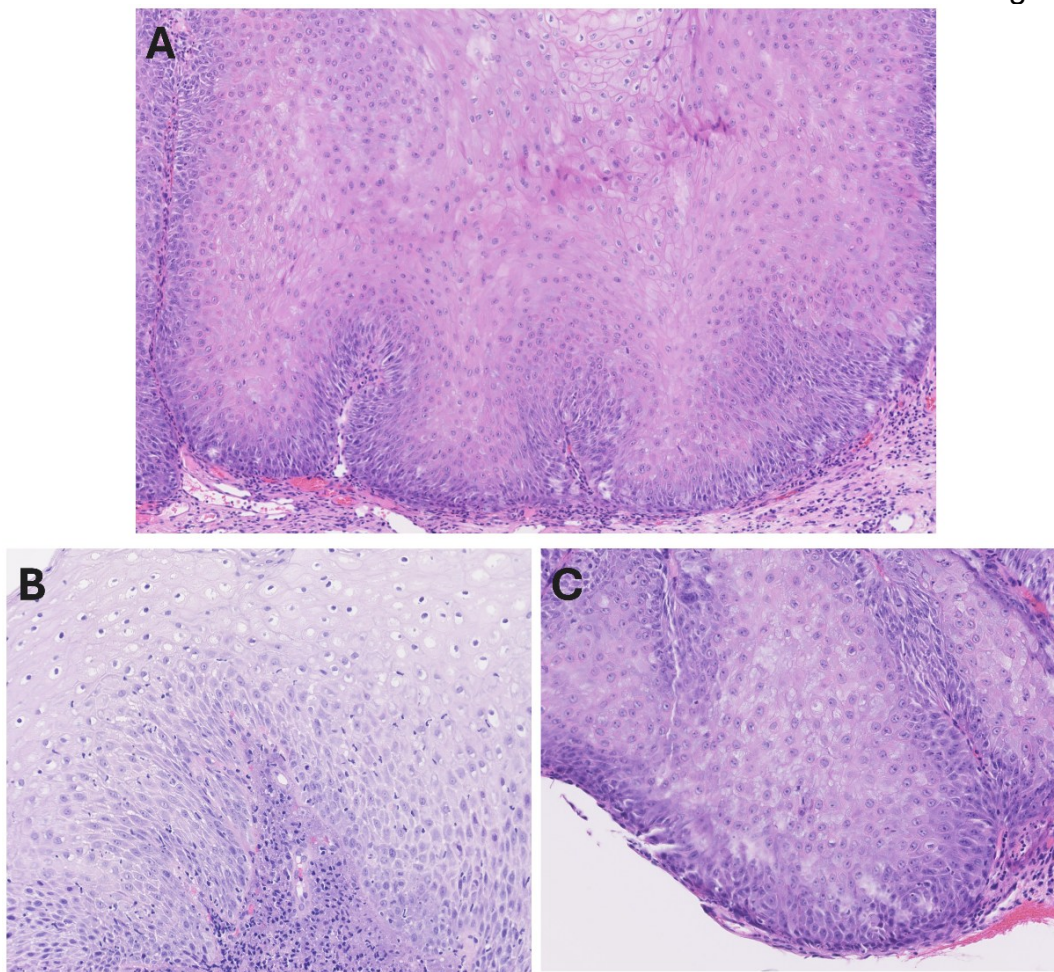


Abb. 27 Beispiele der gemischten Dysplasie mit verschiedenen morphologischen Merkmalen
A Planum buccale. Basal und parabasal kleine Zellen, Verlust der Zellpolarität, breite, ballenartige Reteleisten, suprabasal große Zellen mit viel eosinophilem Zytoplasma, Akanthose im oberen Epitheldrittel, Hyperplasie, verruköses Erscheinungsbild. **B Oropharynx.** Basal und parabasal Zell- und Kernpolymorphie, suprabasal große Zellen mit viel eosinophilem Zytoplasma ähnlich den morphologischen Merkmalen der dSIN, Parakeratose, periläsionäres lymphozytäres Infiltrat. **C Planum buccale.** Basal und parabasal kleine Zellen, runde Zelleiber, suprabasal große, runde Zellkerne, ballenartiger Vorschub. A und C aus dem TMA5mm-07 Core 4-1, HE, 10-fache Vergrößerung B TMA5mm-03 Core 7-3, HE, 20-fache Vergrößerung.

3.1.5 Basaloide Dysplasie

Die morphologischen Kriterien für eine basaloide Dysplasie sind, wie in Kapitel 1.2.1.4 beschrieben, sorgfältig dokumentiert und die Bezeichnung „basaloid“ ist die Basalzellen beschreibend sehr präzise. Die basaloide Dysplasie ist aufgrund ihrer HPV-Assoziation, welche immunhistochemisch mit dem HPV-Surrogat-Marker p16 korreliert werden kann, leicht zu diagnostizieren. Abb. 28 zeigt Beispiele der basaloiden Dysplasie und ein Beispiel eines basaloiden

Ergebnisse
Plattenepithelkarzinoms anhand von Gewebeproben aus dem Oropharynx in der HE-Färbung. Die morphologischen Merkmale wie basaloide Zellen und Koilozyten sind klar erkennbar. Jedoch zeigten sich acht Fälle mit basaloider Morphologie und einer diffusen oder fehlenden Expression von p16, welche nach Auswertung der anderen IHC als gemischte Dysplasie oder bei p53-Expression als dSIN diagnostiziert wurden. Des Weiteren ließ sich in vier Fällen ein basaloides Erscheinungsbild feststellen und eine Expression von p16 gleichzeitig mit einer Expression bzw. eines Ausfalls der p53. Ein molekularpathologischer HPV-Nachweis sollte in diesen Fällen zur Sicherheit durchgeführt werden. Als Sonderfall fanden wir ein basaloides Karzinom ohne p16-Nachweis in der IHC-Färbung, dafür aber mit einer gemischten Dysplasie im Oberflächenepithel (Abb. 29). In diesem Fall sollte ebenfalls eine molekularpathologische Diagnostik erweitert werden, um die Pathogenese dieses Karzinoms herauszufinden.

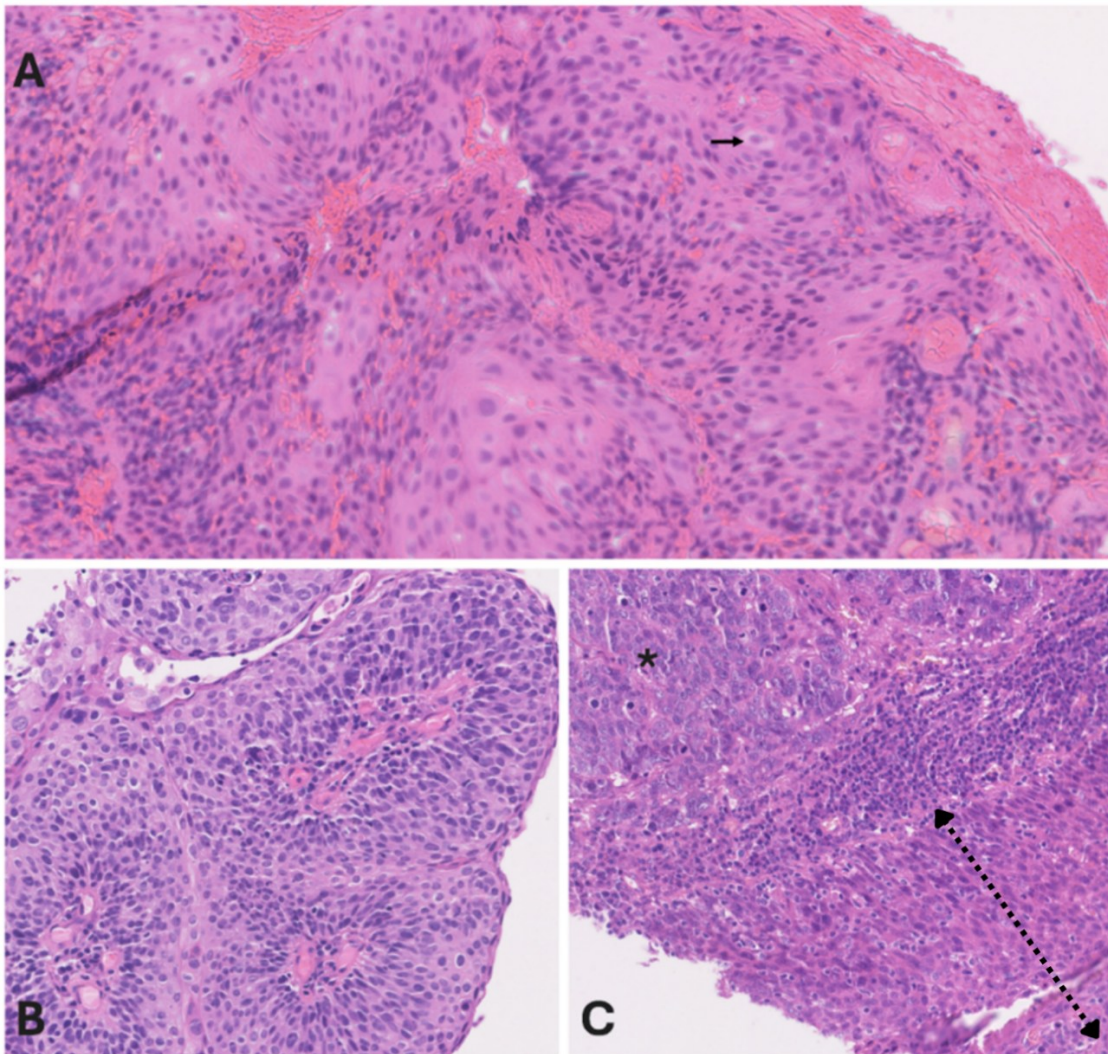


Abb. 28 Beispiele einer basaloiden Dysplasie/SIN anhand unterschiedlicher Gewebeproben aus dem Oropharynx HE, 20-fache Vergrößerung. **A SIN III:** Dicht gepackte basaloide Zellen in allen Epithelschichten, besonders dicht basal und parabasal. Typische Koilozyten (→), Parakeratose. Aus dem TMA 5mm-34 Core 5-3 **B SIN III:** Hyperchromatische ovale bis längliche Zellkerne, wenig Zytoplasma, basaloide Zellen bis zur Epitheloberfläche, Zellpolymorphie im oberen Epitheldrittel. Aus dem TMA 5mm-32 Core 4-1 **C SIN III mit invasivem Karzinom:** basaloide Dysplasie auf gesamter Epithelhöhe im Oberflächenepithel (gestrichelter Pfeil). Invasives basaloides Karzinom (*). Aus dem TMA 5mm-35 Core 4-2.

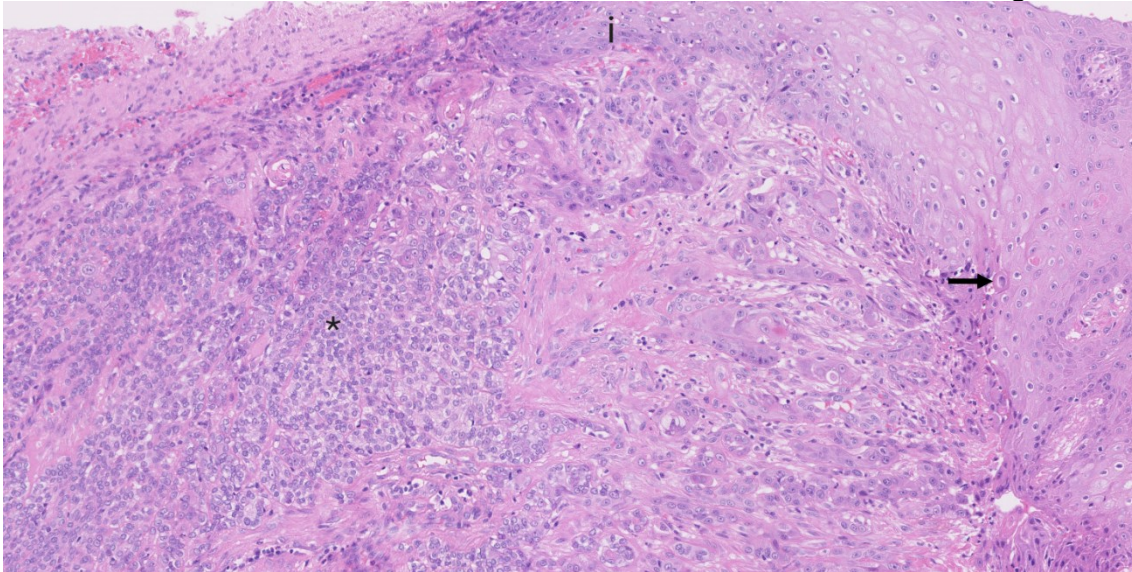


Abb. 29 Basaloides invasives Plattenepithelkarzinom mit einer gemischten Dysplasie im angrenzenden Oberflächenepithel Oropharynx (*) basaloides Karzinom mit dicht gedrängten, basaloiden Zellen, runde hyperchromatische Zellkerne, **(i) Oberflächenepithel:** polymorphe basale und parabasale Zellschicht. Suprabasal große Zellen mit viel eosinophilem Zytoplasma. Dyskeratose (→). Teils erhaltene Ausreifung in den oberflächlichen Epithelschichten. Aus dem TMA 5mm-30 Core 3-1, HE, 20-fache Vergrößerung.

3.1.6 Gemischt - verruköse Dysplasie

Bei der Auswertung konnten einige Fälle nicht eindeutig als verruköse oder gemischte Dysplasie diagnostiziert werden, weshalb dieser weitere Subtyp der gemischten-verrukösen Dysplasie eingeführt wurde. Die Einführung dieses Subtyps erschien in 14 von 224 notwendig. Abb. 30 stellt beispielhaft eine gemischt-verruköse Dysplasie dar und veranschaulicht die Überschneidung der morphologischen Merkmale einer verrukösen Dysplasie (erhaltene squamöse Ausreifung, große Zellen und viel eosinophiles Zytoplasma oberhalb der parabasalen Zellschicht, ausgeprägte Parakeratose, ballenartiger Vorschub ins Gewebe) und einer gemischten Dysplasie (Zell- und Kernpolymorphie in der basalen und parabasalen Zellschicht entsprechend den morphologischen Merkmalen einer differenzierte Dysplasie). Auffallend ist auch das dichte periläsionäre lymphozytäre Infiltrat. Die deutliche Ausprägung der Merkmale beider Dysplasieformen machte es schwer, diese Dysplasie einer der beschriebenen Entitäten zuzuordnen.

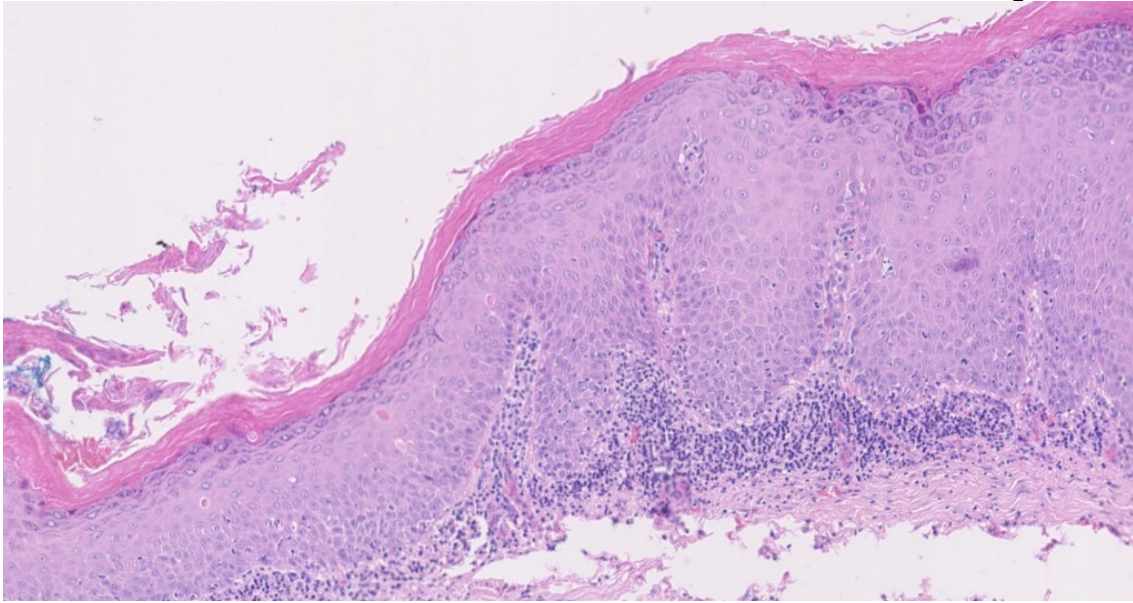


Abb. 30 Beispiel einer gemischt-verrukösen Dysplasie Mundhöhle. Eindeutig verruköses Wachstum mit breiten und langen Reteleisten, aber übermäßige polymorphe Basal- und Parabasalzellschicht, suprabasal große Zellen mit viel eosinophilem Zytoplasma, vereinzelt Dyskeratosen, weitestgehend erhaltene Differenzierung, Hyperplasie, Akanthose, Hyperkeratose, periläsionäres lymphozytäres Infiltrat. Aus dem TMA 5mm-23 Core 4-1, HE, 10-fache Vergrößerung.

3.2 Expression der immunhistochemischen Marker bei den verschiedenen Dysplasieformen

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, gelingt mittels HE-Morphologie der histologischen Veränderungen bisweilen nicht immer eine sichere Diagnosestellung, weshalb zusätzliche – insbesondere immunhistochemische – Färbungen angeschlossen werden müssen. Anhand der Färbemuster wurde ein individuelles Markerprofil pro Patientin und Patienten nach diesem Muster (p53-p16-CK13-CK17-MIB1) erstellt. Die Markerprofile mit den Diagnosen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Abb. 31 zeigt eine Zusammenstellung eines mittels HE und IHC gefärbten TMAs derselben Gewebeprobe aus der Mundhöhle. Nach der ersten Durchsicht schien die pleomorphe Dysplasie vergleichbar mit der dSIN mit einer *TP53*-Mutation einherzugehen, wobei die pleomorphe Dysplasie möglicherweise sogar aus der dSIN hervorgehen könnte. Die basaloiden Dysplasien waren mit HPV assoziiert und p16-positiv. Sie wurden entsprechend einer SIN I-III eingeteilt.

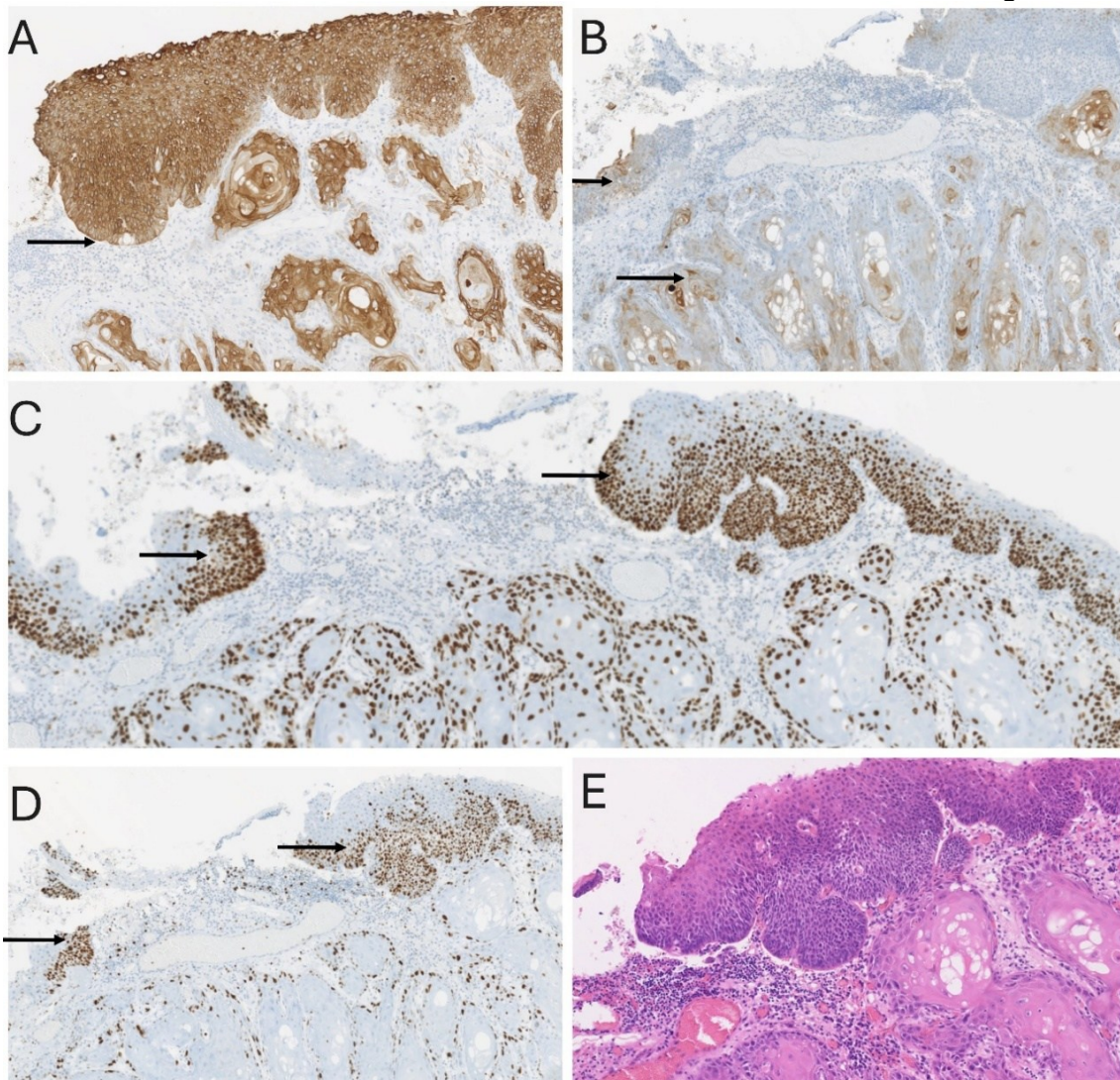


Abb. 31 Zusammenstellung der HE-Färbung und der IHC-Färbungen anhand einer Gewebeprobe Aus dem TMA5mm-35ü Core 3-1. **Gingiva.** dSIN mit Übergang in ein invasives CA **A CK13:** Starke, atypische Expression im dysplastischen Oberflächenepithel bis an die Basalmembran (→) sowie im invasiven Karzinomanteil, 10-fache Vergrößerung. **B CK17:** Schwach positive Expression (→) im dysplastischen Oberflächenepithel sowie im invasiven CA. 5-fache Vergrößerung. **C p53:** Starke Expression bzw. Überexpression basal und parabasal im dysplastischen Oberflächenepithel (→) sowie im invasiven CA. 5-fache Vergrößerung. **D MIB-1:** Zellulär starke Expression in basaler und parabasaler Epithelschicht (→), mäßige zelluläre Expression im Karzinomanteil. 5-fache Vergrößerung. **E HE:** Dysplastisches Oberflächenepithel mit basaler und parabasaler Zell- und Kernpolymorphie, Hyperchromasie. Übergang in invasives CA. 10-fache Vergrößerung.

3.2.1 p53

Als Hauptkriterium der dSIN wurde in dieser Arbeit ein Ausfall oder eine Überexpression von p53 genutzt unter der Hypothese, dass analog zur Vulva und der Cervix hier eine Mutation in *TP53* vorliegt. Bereits bei der ersten Durchsicht

Ergebnisse stellte sich heraus, dass eine Auswertung der p53-Färbung in manchen Fällen auch für die erfahrene Pathologin oder den erfahrenen Pathologen nicht immer leicht war. Insbesondere in Fällen, in denen p53 erst in parabasalen Epithelschichten überexprimiert wird, erschien eine molekularpathologische Untersuchung zur Bestätigung einer Mutation sinnvoll bzw. notwendig. Abb. 34 zeigt exemplarisch eine p53 Überexpression bei einer dSIN im direkten Vergleich zu einer p53-wild-type-Expression anhand derselben Gewebeprobe. Zudem sind die HE-Färbung sowie die p16, CK13, CK17 und MIB-1 derselben Probe zum Vergleich dargestellt. Der Übergang von regelhaftem zu dysplastischem Epithel ist mithilfe der IHC-Färbungen klar ersichtlich.

Im Gegensatz zur dSIN, welche nur in basal und parabasal gelegenen Epithelschichten eine Überexpression oder eine fehlende Expression aufweist, zeigen einige Fälle dieses Färbemuster der p53 vom Stratum basale bis in die oberflächlichen Epithelschichten (Abb. 35). In Zusammenschau mit den morphologischen Kriterien wurde ein pleomorpher Subtyp nach Arsenic und Kurrer (2013) angenommen. Dies könnte ein Hinweis für eine Weiterentwicklung der dSIN zu einer pleomorphen Dysplasie, wie in Abb. 24 dargestellt, sein.

Insgesamt konnte bei 54 % (121 von 224) der diagnostizierten Fälle ein Ausfall (57/121) oder eine Überexpression (58/121) von p53 erkannt werden (Abb. 32). Davon konnten 5 Fälle nicht sicher als Ausfall oder Überexpression gewertet werden. In einem Fall schien eine Doppelmutation vorzuliegen (Abb. 33). Ebenfalls beinhaltet ist die verruköse dSIN, die aufgrund ihrer Morphologie eher einer verrukösen Dysplasie ähnelt, aber einen Ausfall oder eine Überexpression von p53 aufzeigt. Abb. 36 zeigt eine verruköse dSIN in der HE mit einer Überexpression in der p53 IHC.

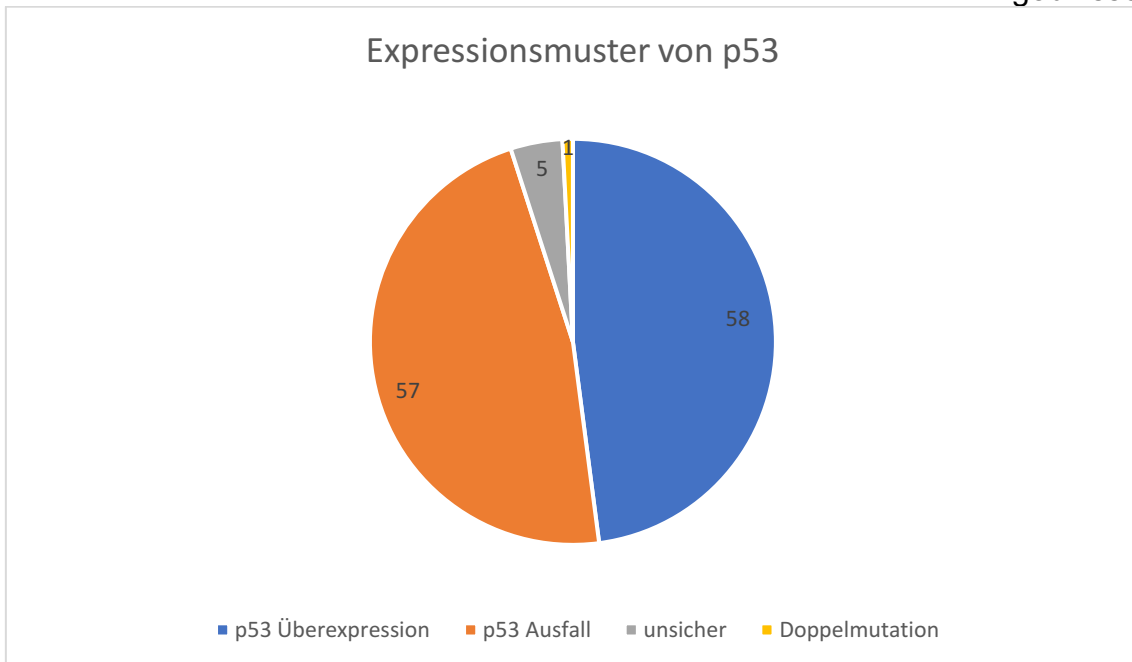


Abb. 32 Anteil von p53 Ausfall und p53 Überexpression von 121 p53 reaktiven Dysplasieformen

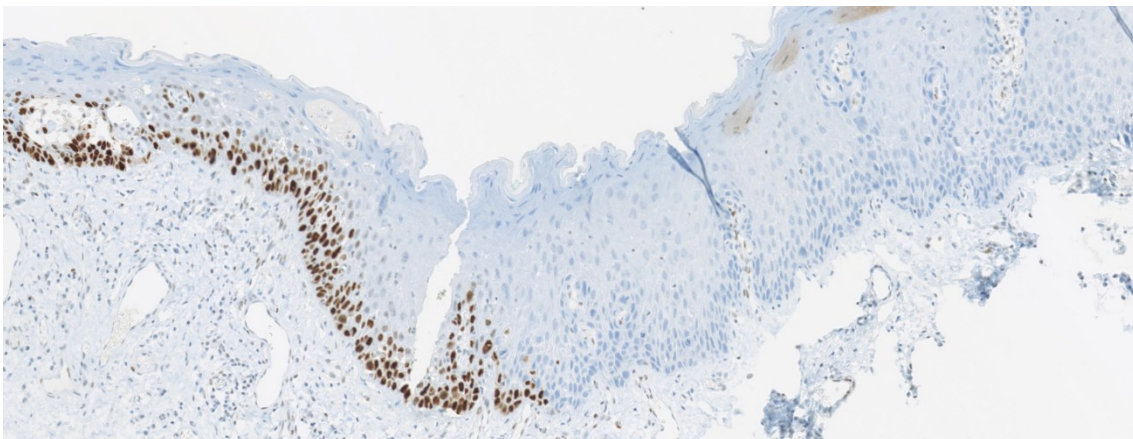


Abb. 33 Doppelmutation von p53 Mundhöhle. Links: Überexpression von p53 im basalen und suprabasalen Kompartiment. **Rechts: Ausfall** von p53 auf gesamter Höhe des Epithels. Aus dem TMA 5mm-35ü Core 1-1, p53, 10-fache Vergrößerung.

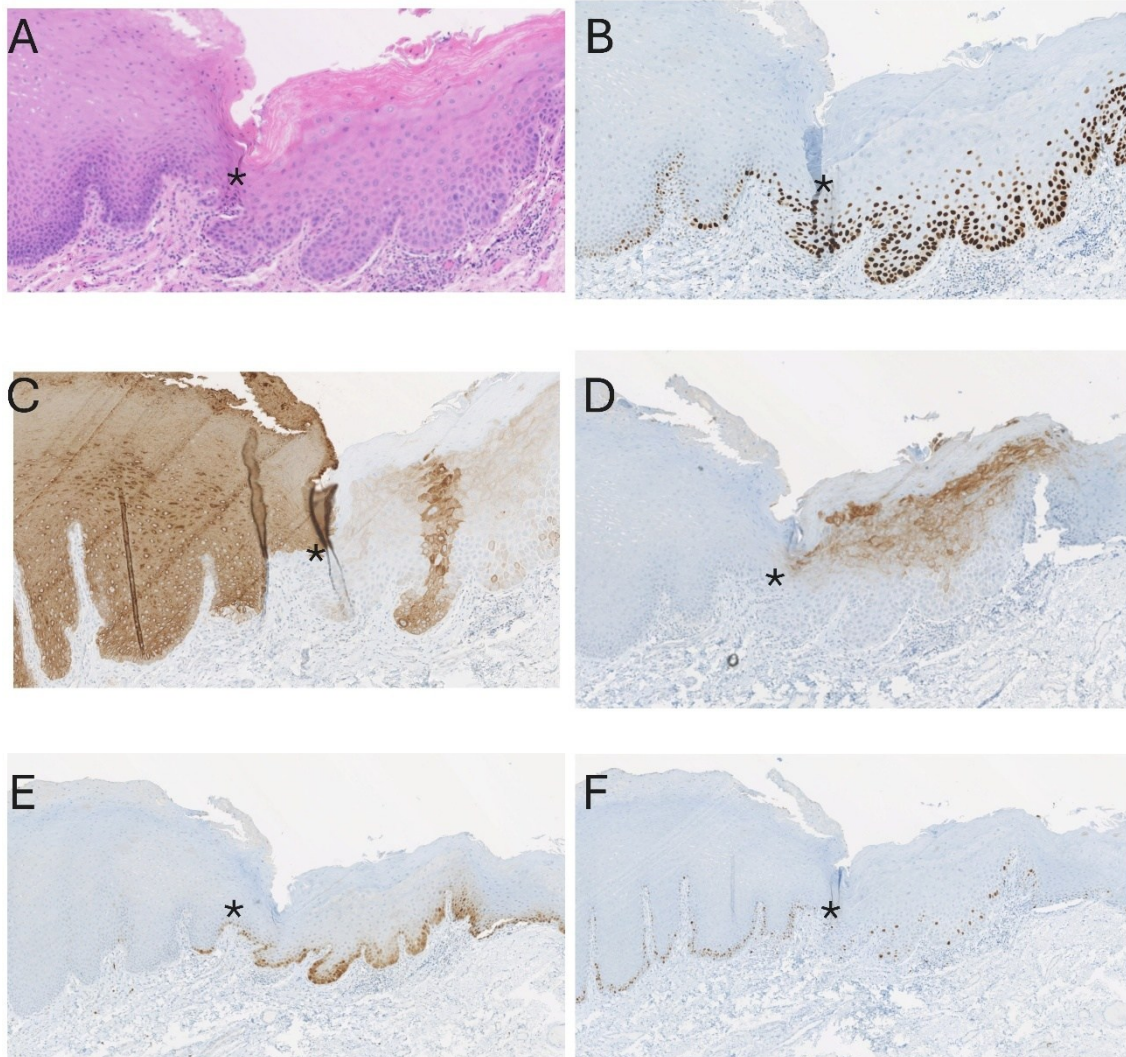


Abb. 34 Exemplarische p53 Überexpression mit Übergang in einen p53 wild type in Zusammenschau mit p16, CK13, CK17 und MIB-1 IHC Gingiva. A HE: Regelmäßiges Plattenepithel mit Übergang (*) zu dSIN 10-fache Vergrößerung. **B p53:** Linke Seite regelhafte wild type Expression zum Übergang (*) in eine basale und parabasale Überexpression. 10-fache Vergrößerung. **C CK13:** Linke Seite regelhafte, starke Expression mit schwach ausgeprägter Färbung in der basalen Zellschicht. Übergang (*) zur rechten Seite mit nahezu fehlender, atypischer Expression. 10-fache Vergrößerung. **D CK17:** Linke Seite regelhaft keine Expression. Übergang (*) in eine schütterere Expression in den oberen Epithelschichten. 5-fache Vergrößerung. **E p16:** Linke Seite: Regelhaft keine Expression mit Übergang (*) zu basalständiger, bandartiger Expression. 5-fache Vergrößerung. **F Mib-1:** Linke Seite: Zelluläre Expression im basalen und vereinzelt parabasaler Epithelschicht. Übergang (*) zu vereinzelter Expression in der basalen, parabasalen und suprabasalen Epithelschicht. 5-fache Vergrößerung. Aus dem TMA 5mm-05 Core 3-2.

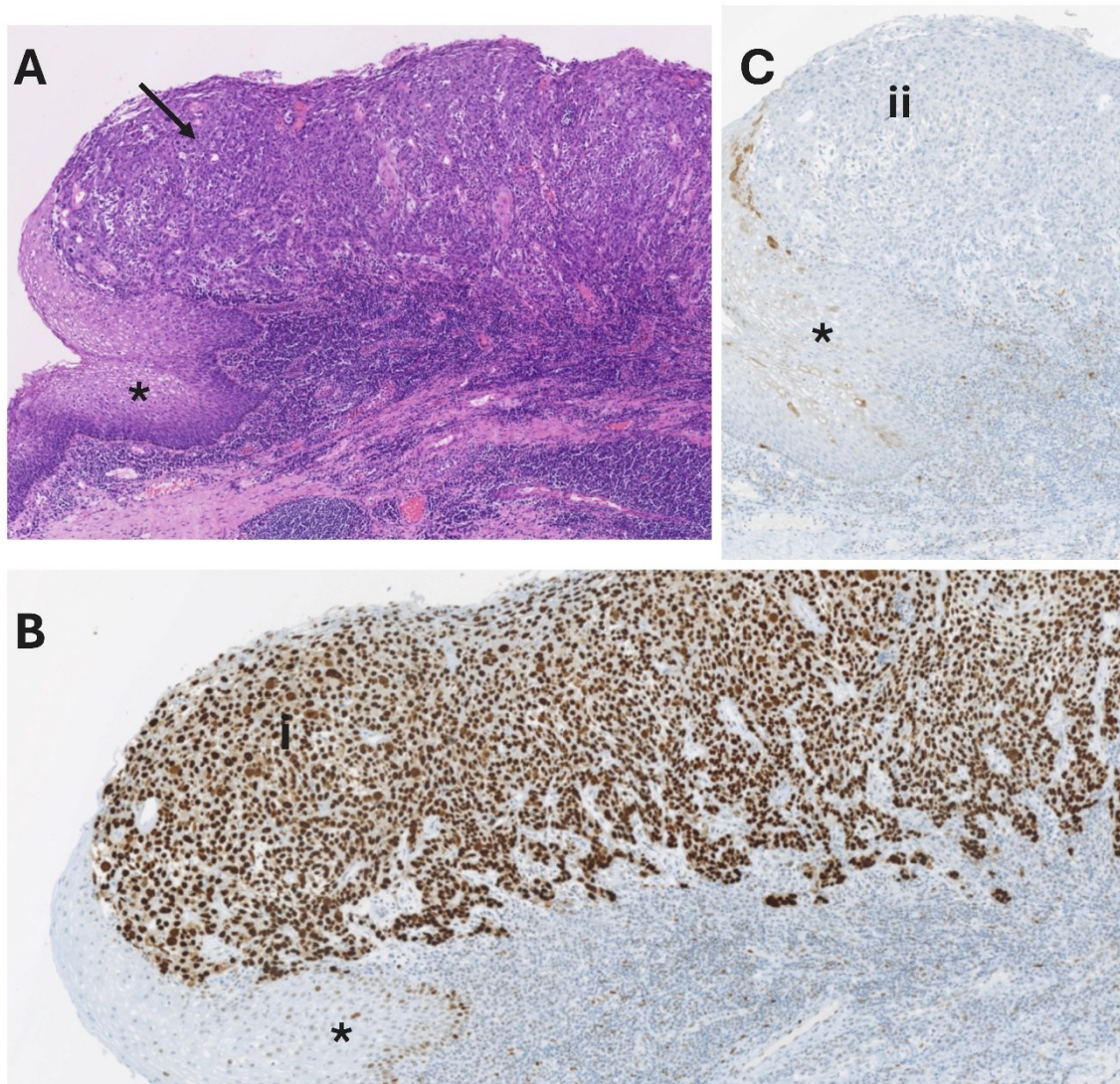


Abb. 35 Beispiel einer pleomorphen Dysplasie in HE-Färbung, p16 und p53 IHC Oropharynx. A-C Übergang von regelhaftem Epithel (*) in pleomorphe Dysplasie **A HE:** Zelluläre und architektonische Atypien über alle Epitheldrittel, Zellpolymorphie, Hyperplasie. **B p53 Überexpression (i)** starke Färbung über das gesamte Epithel. **C p16 negativ** im dysplastischen Epithel (ii). Aus dem TMA 5mm-07 Core 3-4, alle 5-fache Vergrößerung.

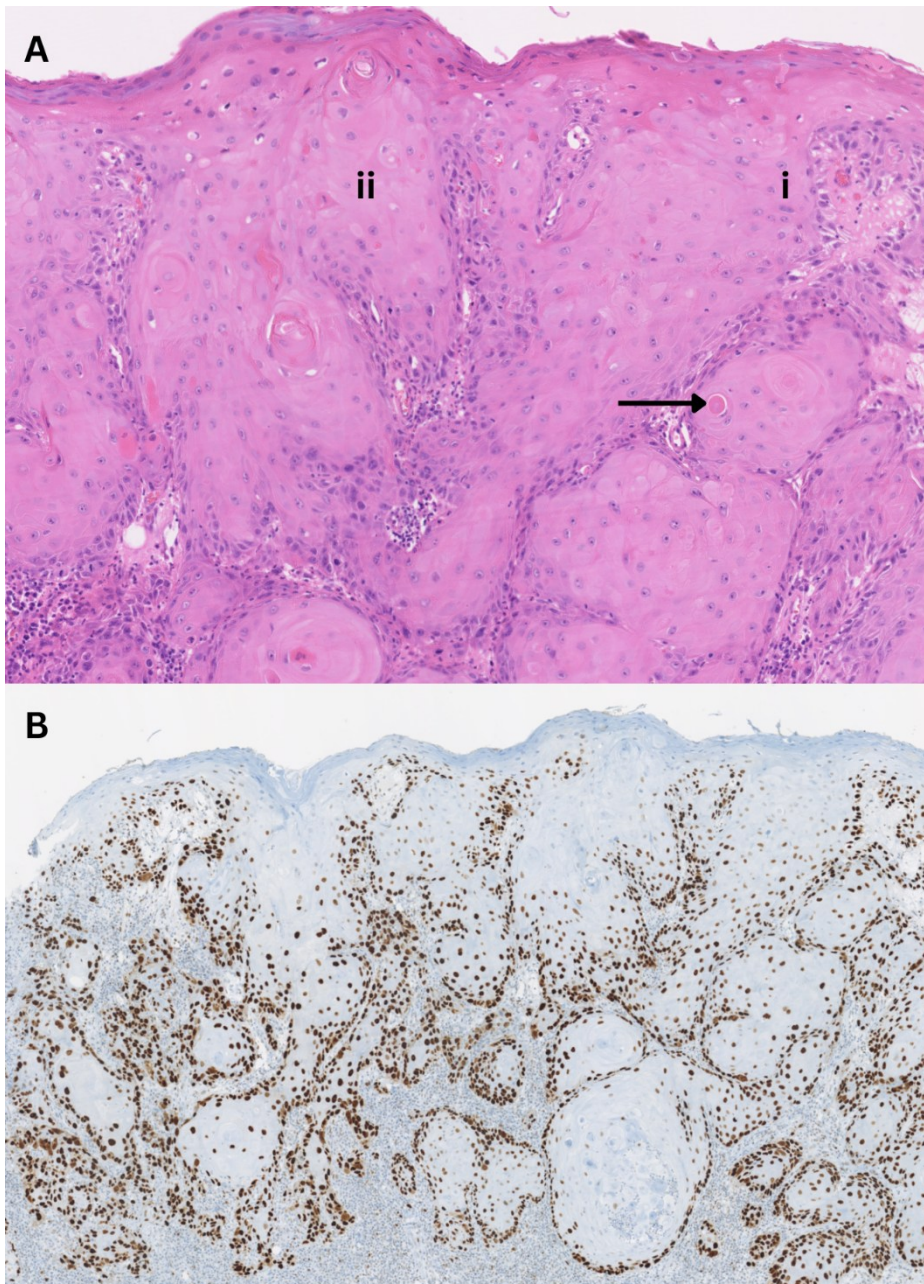


Abb. 36 Beispiel einer verrukösen dSIN A HE: Große, atypische basale und parabasale Zellen mit viel eosinophilem Zytoplasma (i), erhaltene Differenzierung, verruköses, ballenartiges Wachstum, Acanthose (ii), Hornperlen innerhalb des Epithels (→), 10-fache Vergrößerung. **B p53:** Überexpression in basaler und parabasaler Zellschicht. 5-fache Vergrößerung. Aus dem TMA 5mm-33 Core 4-2.

3.2.2 p16

In dieser Studie wurde p16 als Surrogatmarker für eine HPV-bedingte Dysplasie verwendet. Ferner wurde im Gegensatz zur WHO, die alle dysplastischen Epithelveränderungen als SIN I-III einteilt, die Einteilung nach SIN I-III nur für die

Ergebnisse HPV-assoziierte Dysplasie angewandt. In der gynäkologischen Pathologie werden HPV-assoziierte Dysplasien (z. B. CIN, VIN, VAIN) ebenfalls häufig als „klassisch“ oder „konventionell“ bezeichnet. Diese Begriffe beziehen sich auf das charakteristische, HPV-induzierte zytologische Bild: basaloide Zellen, Koilozyten, Reifungsstörung mit Hyperchromasie und erhöhter mitotischer Aktivität im mittleren Drittel des Epithels. Insgesamt ist in 14 % (10 von 69) der Fälle im Oropharynx und in 2 % (3 von 155) der Fälle in der Mundhöhle eine positive p16 Färbung deutlich feststellbar (Abb. 38). Auffallend war, dass alle 10 Fälle im Oropharynx eine SIN III darstellen. In der Mundhöhle war die p16 Färbung manchmal nicht eindeutig auf eine HPV-Ätiologie zurückzuführen. So zeigte ein Fall eine kräftige nukleäre Expression von p16 bei einer Überexpression von p53 basal und parabasal (Abb. 37), eine eindeutige Bestimmung der Ätiologie war somit nicht möglich. Ein molekularpathologischer HPV-Nachweis oder ein Nachweis einer *TP53*-Mutation ist zur Klärung und korrekten Einteilung vonnöten.

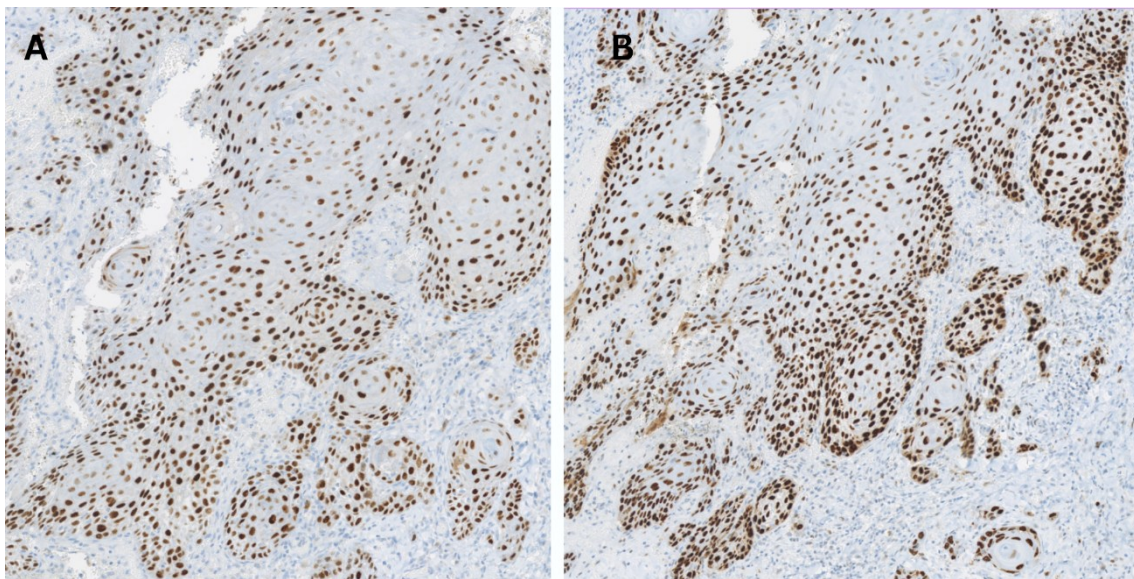


Abb. 37 Sonderfall einer kräftigen nukleären p16 Expression und einer p53 Überexpression derselben Gewebeprobe Mundhöhle. **A p16:** Atypische, starke nukleäre Expression in allen Schichten. **B p53:** Überexpression basal und parabasal entsprechend einer dSIN. TMA 5mm-32 Core 6-3, 10-fache Vergrößerung.

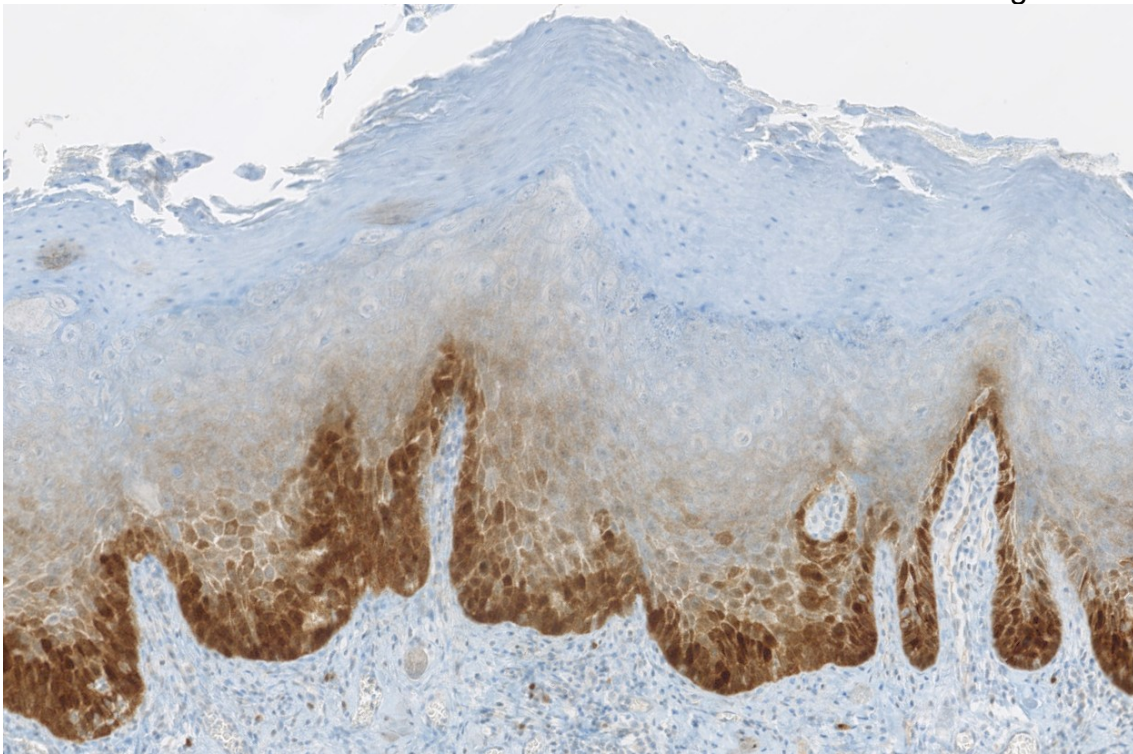


Abb. 38 HPV-assoziierte, basaloide Dysplasie in p16 IHC Mundhöhle. Kräftige Expression basal bis parabasal typisch für eine SIN I-SIN II. Aus dem TMA 5mm-22 Core 2-1, p16, 10-fache Vergrößerung.

3.2.3 CK13

Wie in Kapitel 1.1.2 erwähnt, wird CK13 hauptsächlich im Stratum spinosum exprimiert. Damit zeigte sich immunhistochemisch beim Normalbefund ein schwach gefärbtes basales Band mit einer deutlichen Expression in den oberen Epitheldritteln.

Die in Tabelle 8 beschriebenen Auswertungskürzel für die Expression von CK13 erwiesen sich im Lauf der Auswertung als zu detailliert und wurden deshalb zusammengefasst. So stellte sich heraus, dass der Normbefund „ppp“ (bandartige sehr starke Expression mit Ausnahme des Stratum basale) mit dem Befundkürzel „p“ (bandartige Expression mit Ausnahme des Stratum basale) gleichgesetzt werden konnte. Auch das Auswertekürzel „n“ (negativ) konnte mit „pn“ (schwache Expression) gleichgesetzt werden, da nur 3 Fälle einen kompletten Ausfall der Expression zeigen. Damit konnten die Auswertungskürzel auf Ausfall (n und pn), Expression bis an die Basalmembran (pp) und

Ergebnisse

Normbefund (ppp und p) reduziert werden. In Tabelle 11 sind die verschiedenen Expressionsmuster von CK13 in Korrelation zu den Dysplasieformen dargestellt. Sowohl das n/pn- als auch das pp-Muster mussten als atypisch angesehen werden. Abb. 40 verdeutlicht anhand einer Gewebeprobe aus dem Oropharynx den Unterschied zwischen dem Normalbefund einer CK13 Expression (ppp/p) in regelhaftem Plattenepithel und einer atypischen starken Expression bis an die Basalmembran (pp) in einer dSIN. Im direkten Vergleich derselben Gewebeprobe zeigt die CK17 IHC einen regelhaften Ausfall im regelhaften Plattenepithel und eine schwache Färbung der dysplastischen Epithelanteile (Abb. 40).

Tabelle 11 Ergebnisse der CK13 Expression nach Diagnose

	Kürzel	dSIN	Pleomorph	Verrukös	Gemischt	Gemischt	SIN	D0
		N=91	N=30	N=18	N=32	/verrukös N=14	N=13	N=26
Atypische Expression	n	1			1			2
	pn	48	13	13	13	9	2	1
	pp	19	7	2	6	1	5	0
Regelhafte Expression	p	23	10	3	12	4	6	2
	ppp							21

Wir konnten feststellen, dass die dSIN in 54 % (49 von 91) der Fälle einen Ausfall (n/pn) von CK13 und in 75 % (68 von 91) der Fälle ein atypisches Expressionsmuster (n/pn/pp) zeigte. In pleomorphen Dysplasien lag in 43 % (13 von 30) ein CK13 Ausfall vor, ein atypisches Expressionsmuster von CK13 fand sich in 67 % (20 von 30) der Fälle. Ein ähnliches Ergebnis erhielten wir für die verruköse Dysplasie mit 72 % (13 von 18) und 83 % (15 von 18), die gemischte Dysplasie mit 44 % (14 von 32) und 63 % (20 von 32) und die gemischt/verruköse Dysplasie mit 64 % (9 von 14) und 71 % (10 von 14). Bei der HPV-assoziierten Neoplasie (in der Studie synonym zur SIN) konnte ein Ausfall in 15 % (2 von 13)

Ergebnisse und ein atypisches Expressionsmuster in 54 % (7 von 13) der Fälle ermittelt werden. Passend zu den vorherigen Ergebnissen trat nur in 12 % des regelhaften Plattenepithels ein Ausfall bzw. ein atypisches Expressionsmuster von CK13 auf. In Abb. 39 ist der Übergang von einem normalen Plattenepithel in eine dSIN dargestellt, wobei zunächst ein regelhaftes Expressionsmuster von CK13 (kräftige bandartige Expression mit nur schwacher Expression im Stratum basale (ppp)) in ein atypisches Expressionsmuster mit einer starken bandartigen Expression von CK13 einschließlich des Stratum basale (pp) und anschließend in eine deutlich verminderte, inhomogene bis fehlende Expression von CK13 (pn/n) übergeht.

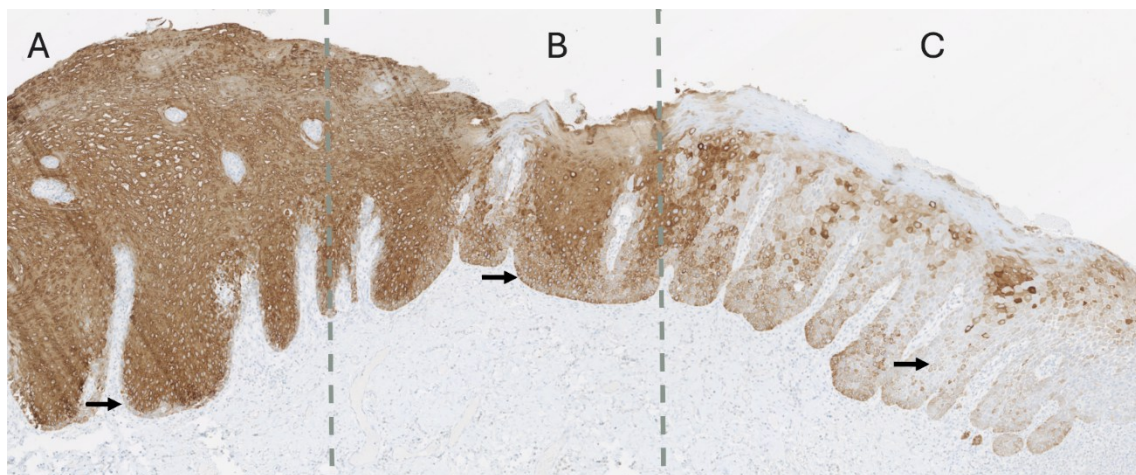


Abb. 39 Verlauf CK13 Expression zu Ausfall im Übergang von regelhaftem Epithel zu einer dSIN Zungenrand. **A** Positive CK13-Färbung entsprechend einem Normalbefund (ppp) mit kräftiger Expression nahezu im gesamten Epithel und nur schwacher, bandartiger Expression im Stratum basale (→) (pp). **B** Übergang in eine kräftige Expression, die bis zur Basalmembran reicht mit einem stark gefärbten basalen Band (→). **C** Übergang zu nahezu vollständigem Ausfall (→) von CK13 (pn/n) bei einer dSIN. Aus dem TMA 5mm-36ü Core 6-4, CK13, 5-fache Vergrößerung.

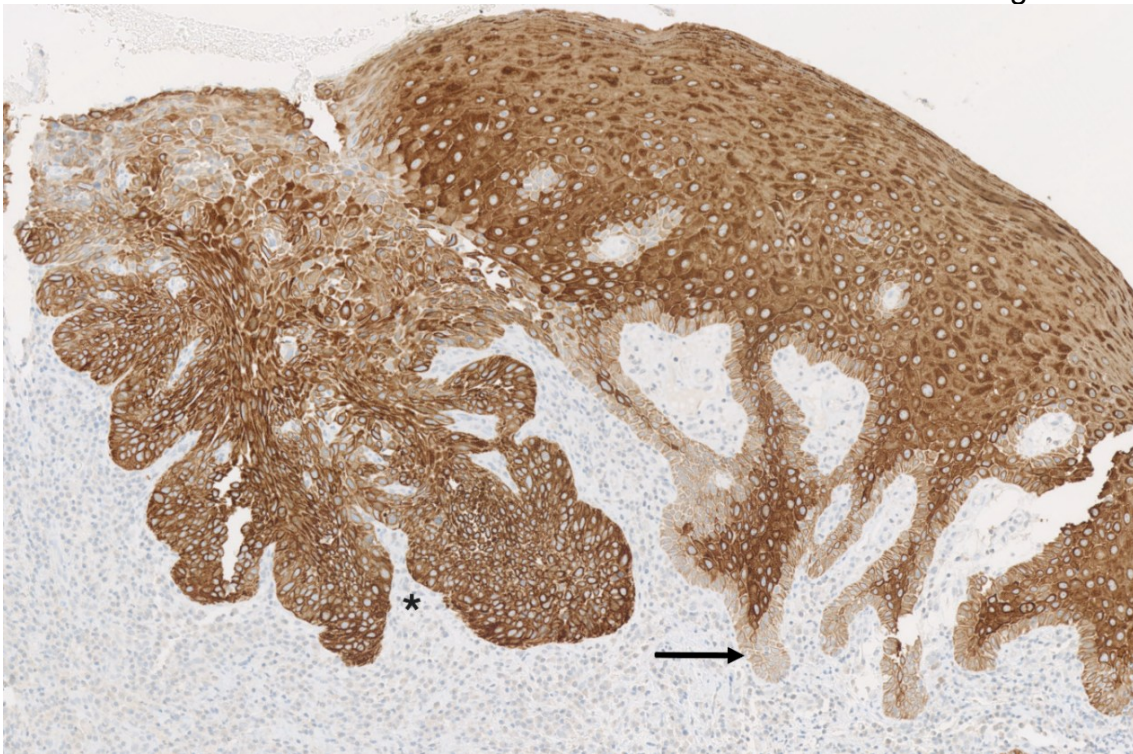


Abb. 40 CK13 normgerechte Expression in regelhaftem Plattenepithel neben atypischem Expressionsmuster in einer dSIN Oropharynx. Rechte Seite: Regelhafte Färbung (ppp) mit starker bandartiger Expression von CK13 im nicht-dysplastischen Plattenepithel und nur schwacher Expression im Stratum basale (helles Band) (→). **Linke Seite:** Starke Expression bis hin zur Basalmembran (pp) (*) im dysplastischen Plattenepithel (dSIN). Aus TMA 5mm-17 1-2, CK13, 10-fache Vergrößerung.

3.2.4 CK17

Die CK17 IHC ist in der Tumorphistopathologie sowie die CK13 IHC ebenfalls relevant. Das nicht-dysplastische Plattenepithel zeigt keine Expression von CK17. Nach anfänglich sehr detaillierter Auswertung der Expression mit mehreren Auswertungskürzeln stellte sich nach der zweiten Auswertungsrunde der Studienfälle heraus, dass bereits eine schwache Färbung eine Dysplasie kennzeichnet. Damit konnten die Befundkürzel „pn“ (schwache Expression), „p“ (starke Expression mit schwacher Expression im Stratum basale) und „pp“ (starke Expression in allen Epithelschichten) zusammengefasst werden.

Tabelle 12 Ergebnisse der CK17 nach Diagnosen

N=224		Kürzel	dSIN N=91	Pleomorph N=30	Verrukös N=18	Gemischt N=32	Gemischt/ verrukos N=14	SIN N=13	D0 N=26
Regelhafte Expression	n		7	1		1		4	18
Atypische Expression	pn		34	9	2	8	1	5	6
	p		40	16	5	22	9	4	2
	pp		10	4	11	1	4		

In den zumindest HE-morphologisch regelhaft erscheinenden Plattenepithelzellen konnte in 31 % (8 von 26) der Fälle eine Expression von CK17 nachgewiesen werden. Die dSIN wies in 92 % (84 von 91) der Fälle, die pleomorphe Dysplasie in 97 % (29 von 30), die gemischte Dysplasie in 97 % (31 von 32), die verruköse (18 von 18) sowie die gemischt-verruköse Dysplasie (14 von 14) in 100 % der Fälle eine Expression von CK17 auf. Vergleichbar zum atypischen Expressionsmuster der CK13 in 54 % (7 von 13) der Fälle schienen die HPV-assoziierten Dysplasien nicht unbedingt mit einer CK17 Expression einherzugehen. Diese trat nur in 69 % (9 von 13) Fällen auf. Ein Beispiel für dieses Ergebnis stellt Abb. 42 anhand einer Probe aus der Mundhöhle dar. Trotz einer eindeutigen p16 Expression im dysplastischen Plattenepithel fällt die CK17 IHC in der Gewebeprobe aus.

Somit spricht eine Expression von CK17 zwar für das Vorliegen einer Dysplasie, jedoch gelingt eine definitive Dysplasiediagnose ohne Hinzuziehung weiterer Marker und der konventionellen Morphologie nicht. Wie Abb. 41 zeigt, liegt in diesem Beispiel eine schwache Expression von CK17 im dysplastischen Plattenepithel vor. Das angrenzende regelhafte Plattenepithel weist wie zu erwarten war einen Ausfall der CK17 IHC auf.

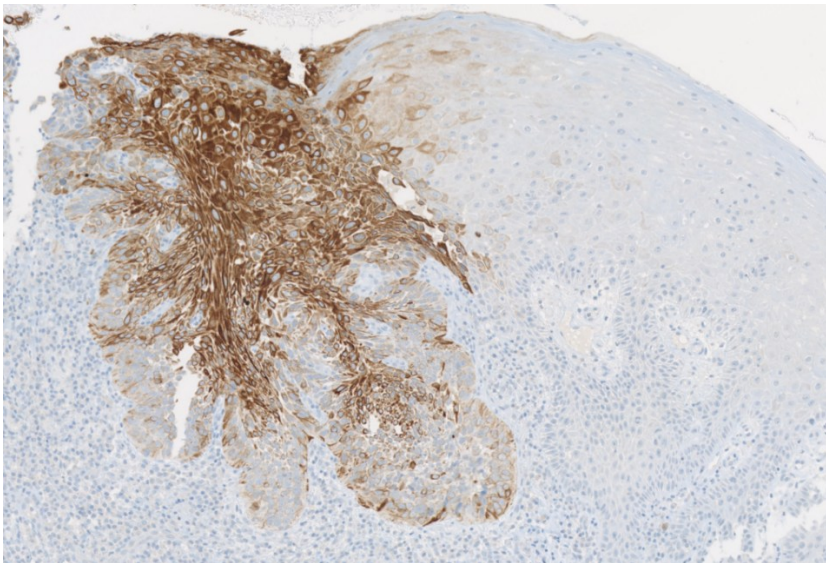


Abb. 41 Beispielhafte CK 17 Expression am Übergang von dysplastischem Plattenepithel einer dSIN in regelhaftes Epithel Oropharynx. Links: Dysplastischer Epithelanteil mit CK 17 Expression. Rechts regelhaft fehlende Expression von CK17 in nicht-dysplastischem Plattenepithel. Aus dem TMA 5mm-17 Core 1-2, CK17, 10-fache Vergrößerung

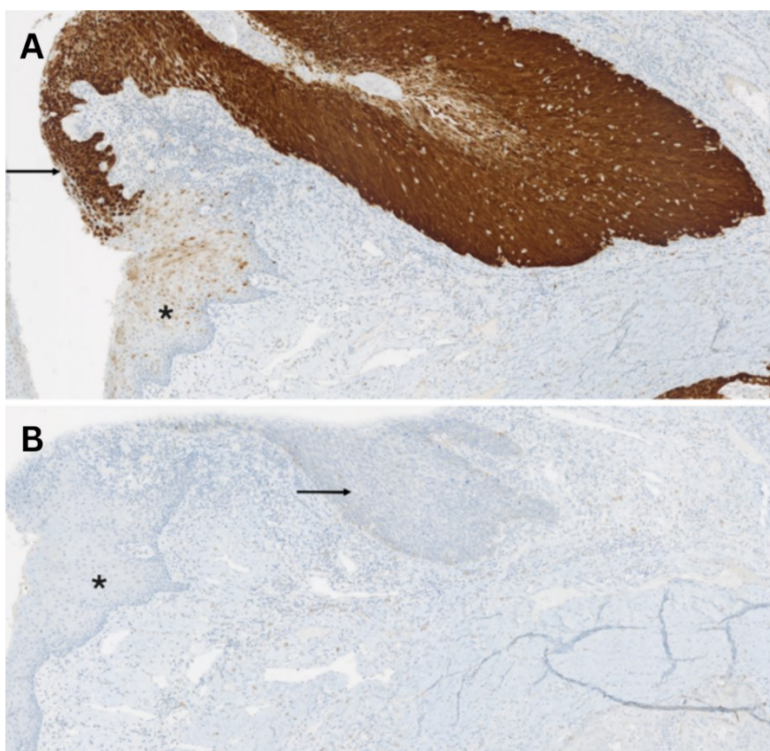


Abb. 42 Ausfall der CK17 in HPV-assoziiertes, p16 positiver, Dysplasie Mundhöhle. Übergang von regelhaftem Plattenepithel (*) in eine Dysplasie (SIN) (→). **A:** p16 starke, positive Expression über das gesamte Epithel (→), vereinbar mit einer HPV-assoziierten SIN III. Im regelhaftem Epithel (*) schütterere Expression. **B:** CK17 Ausfall in regelhaftem Epithel (*) entsprechend dem Normalbefund (n). CK17 Ausfall in dem angrenzenden dysplastischen Epithel (n) (→). Aus dem TMA 5mm-34 Core 1-2, 5-fache Vergrößerung.

3.2.5 MIB-1

Die Ergebnisse der MIB-1 IHC sind Abb. 43 und Tabelle 13 zusammengefasst. Als Normalbefund gilt eine Färbung der proliferationsaktiven basalen und parabasalen Zellen des Stammzell- (Befundkürzel „1“) und Proliferationskompartimentes (Befundkürzel „2“) des Plattenepithels. Das Befundkürzel „3“ beschreibt eine Proliferationsaktivität, welche sich auf gesamter Epithelbreite zeigte. In den Auswertungsprofilen wurde der höchste Wert angegeben. Diese Einteilung beruht nur auf dem Nachweis einer mitotischen Aktivität im Bezug zur Epithelhöhe, nicht jedoch auf der Anzahl der positiv gefärbten proliferationsaktiven Zellen oder der Stärke der Färbung.

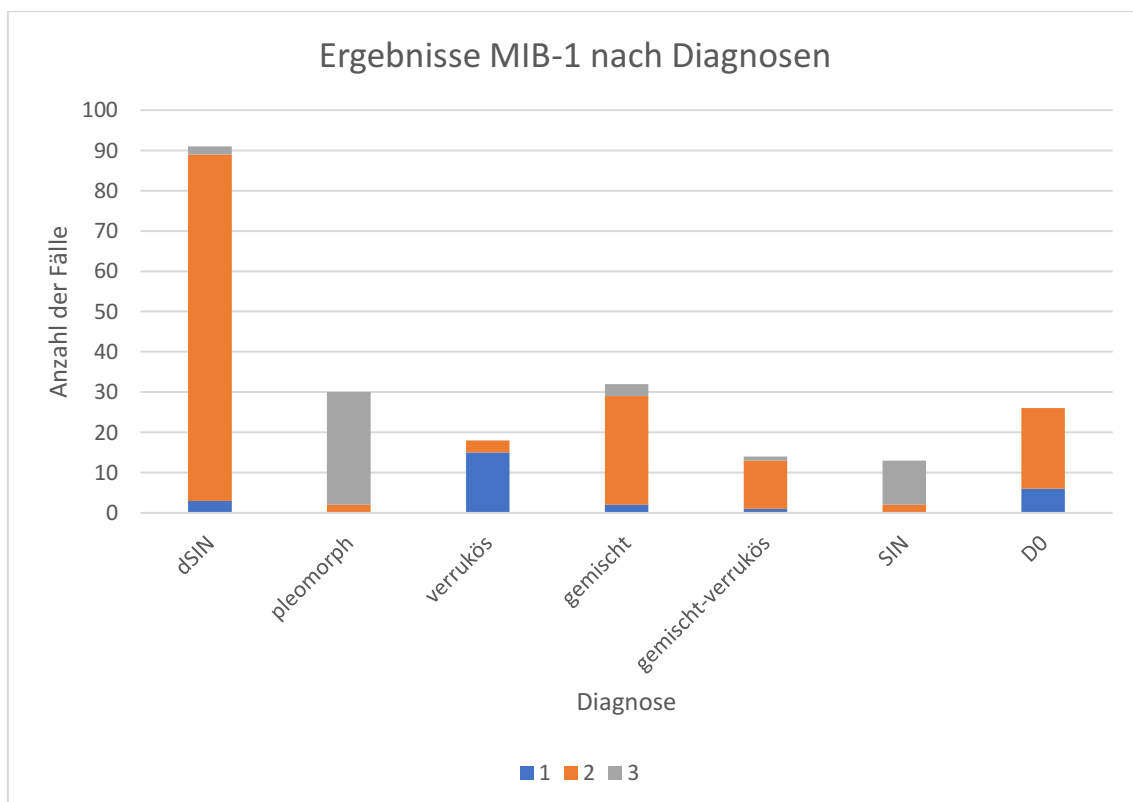


Abb. 43 Ergebnisse MIB-1 Expression nach Diagnosen

Abb. 43 verdeutlicht, dass sich die MIB-1 IHC gut zum Nachweis einer Proliferationsaktivität die sich auf gesamter Epithelhöhe zeigte für die pleomorphe Dysplasie und die HPV-assoziierte Dysplasie eignete. Im

Ergebnisse
Zusammenhang mit dem Nachweis von p16 für die SIN und dem Nachweis eines p53-Ausfalls oder einer Überexpression für die pleomorphe Neoplasie konnte der Grad der Dysplasie bestimmt werden. Die MIB-1 IHC könnte bei der Differenzierung zwischen pleomorpher Dysplasie und dSIN hilfreich sein: Eine atypische p53 Färbung im Zusammenhang mit einer MIB-1 1-2 würde für eine dSIN, mit einer MIB-1 2-3 für eine pleomorphe Dysplasie sprechen.

Auffallend in unseren Ergebnissen war die überwiegend basalständige (Befundkürzel 1), somit weitgehend nicht parabasale Proliferationsaktivität bei der verrukösen Dysplasie. Abb. 44 zeigt die MIB-1 Expression am Beispiel einer verrukösen Dysplasie aus der Mundhöhle mit einer eindeutig auf die Basalzellschicht beschränkten Expression und damit geringen Proliferationsaktivität dieser Läsion. Auch in einem verrukösen Karzinom ist die Expression auf die basale Epithelschicht beschränkt (Abb. 45).

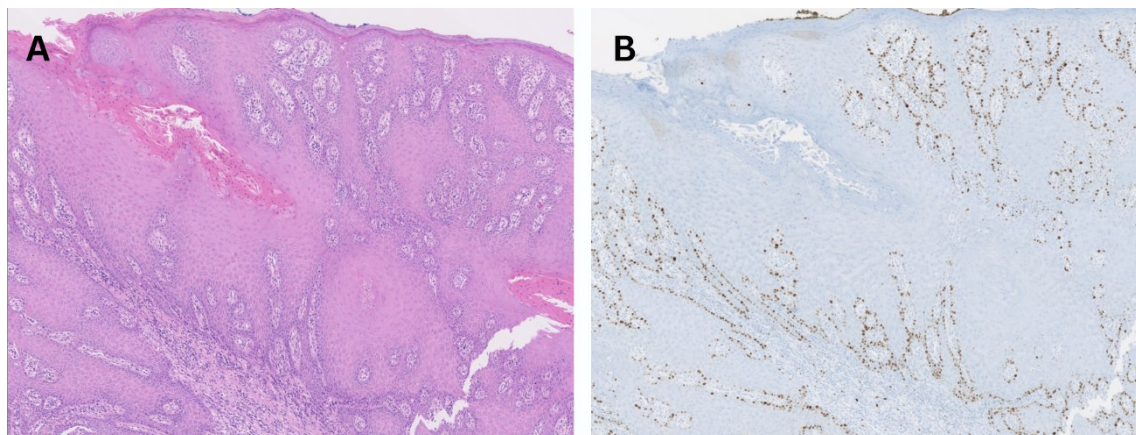


Abb. 44 MIB-1 Expression am Beispiel einer verrukösen Dysplasie Mundhöhle. A HE: Ausgeprägte, ballenartige Reteleisten, Hyperplasie, viel eosinophiles Zytoplasma in den suprabasalen Zellschichten, erhaltene Differenzierung des Epithels, Hyperkeratose. **B MIB-1:** Basalständige Färbung. Aus dem TMA 5mm-13 Core 3-2, 5-fache Vergrößerung.

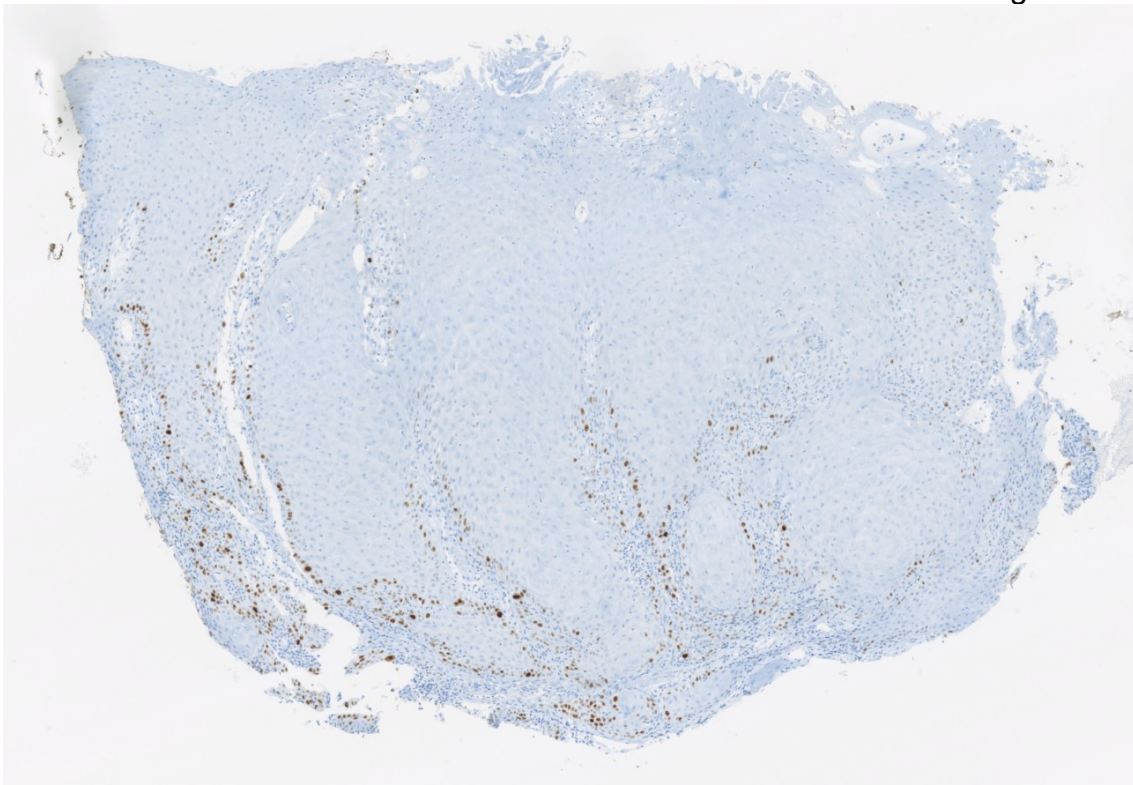


Abb. 45 Beispielhafte MIB-1 Expression in einem verrukösen Karzinom Harter Gaumen. Vereinzelt Expression der MIB-1 beschränkt auf das basale Kompartiment. Parabasal und weitere oberflächliche Schichten zeigen keine MIB1- Expression. Aus dem TMA 5mm-15ü Core 2-3, 5-fache Vergrößerung

Tabelle 13 Ergebnisse Auswertung MIB-1 nach Diagnosen

	N=224	dSIN N=91	Pleomorph N=30	Verrukös N=18	Gemischt N=32	Gemischt/verrukös N=14	SIN N=13	D0 N=26
1		3		15	2	1		6
2		86	2	3	27	12	2	20
3		2	28		3	1	11	

3.3 Effektivität der TMAs mit einem 1 mm, 2 mm und 5 mm Stanzdurchmesser

TMAs sind eine etablierte Methode, um viele Gewebeproben effektiv auswerten zu können. So ergeben sich finanzielle Vorteile, da ein Färbeprozess für alle Proben gleichzeitig stattfindet, entsprechend weniger Material verbraucht wird und Laborarbeitskraft deutlich eingespart werden kann. Die TMAs in Größe eines Standardparaffinblockes können bei sehr kleinem Durchmesser der Stanzzylinder (0,3 mm) bis zu 2501 verschiedene Gewebeproben aufnehmen. Es stellt sich aber die Frage, wie groß die Cores sein müssen, um eine gute Diagnostik zu sichern und wie klein sie sein können, um möglichst effektiv zu arbeiten. In der vorliegenden Studie wurden 1 mm, 2 mm und 5 mm Cores verwendet.

Insgesamt konnten von 1722 unterschiedlich durchmessenden Cores aller TMAs 138 Cores (8 %) nicht ausgewertet werden. Markercores der Leber waren bereits abgezogen.

16 % (59 von 364) der 1 mm Cores konnten nicht ausgewertet werden, da diese Cores oftmals nicht gut angeschnitten waren, im heißen Wasserbad sich aus der Ordnung des TMAs lösten oder bei der Färbung abgeschwommen waren (Abb. 46). Zusätzlich zu den 16 % war oftmals nur das invasive Carcinom histomorphologisch zu diagnostizieren, nicht jedoch die im Oberflächenepithel gelegene Plattenepitheldysplasie, welche stellenweise sehr diskret ausgeprägt ist. Die 1 mm Stanzzylinder eignen sich somit gut für die Untersuchung von invasiven Carcinomen, für eine Dysplasiediagnostik des plattenepithelialen Oberflächenepithels erscheint der Coredurchmesser zu gering.

Die 2 mm Cores (N = 381) ermöglichten eine bessere Diagnostik. Leider trat hier ebenfalls das Problem auf, dass oft nur Gewebe vom invasiven Carcinom vorlag ohne angrenzendes dysplastisches Plattenepithel. Damit waren diese Cores für die Auswertung der Dysplasien unbrauchbar. So konnten 10 % (39 von 381) der

Ergebnisse
2mm Cores nicht ausgewertet werden. Ein Beispiel eines TMAs mit 2 mm durchmessenden Gewebecores ist in Abb. 47 dargestellt.

Die TMAs mit 5 mm durchmessenden Stanzzyclindern (N = 985) waren für die Auswertung der Dysplasien am besten geeignet. Nur 4 % (39 von 985) der Cores konnten aufgrund fehlenden Epithels nicht ausgewertet werden. Diese TMAs bieten eine gute Übersicht und zeigen zumeist den Übergang von normalem zu dysplastischem Plattenepithel und oftmals auch zu dem angrenzenden invasiven Carcinom. Aufgrund des größeren Durchmessers der Stanzzyclinder können jedoch deutlich weniger Gewebeproben pro TMA untersucht werden; deshalb ist die Anzahl der 5 mm TMAs deutlich höher als die der anderen TMAs.

Abb. 48 zeigt einen TMA mit 5 mm durchmessenden Gewebecores. Im Vergleich zu Abb. 46 und Abb. 47 ist ersichtlich, dass deutlich weniger Gewebeproben platziert werden konnten.

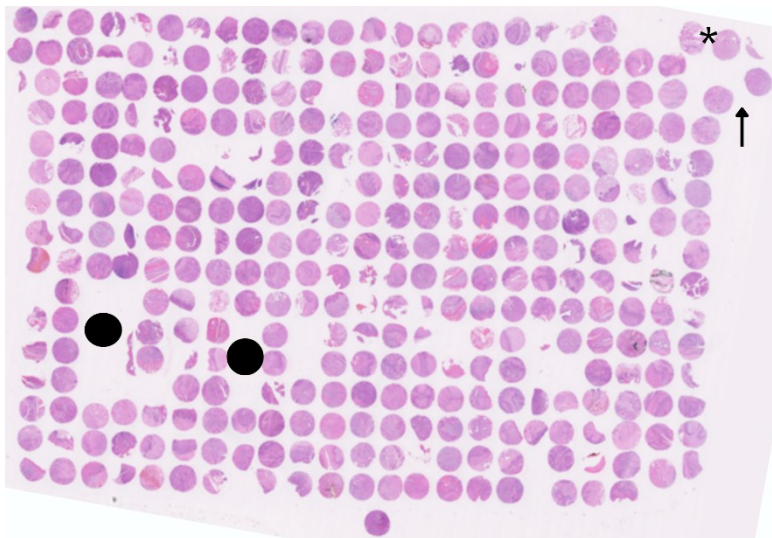


Abb. 46 Paraffinschnitt des TMA 1mm-01 in HE-Färbung Der Markercore der Leber sollte oben rechts (*) an Position 1-1 stehen. Jedoch ist hier beim Schneiden des Paraffinschnittes oder auf dem heißen Wasserbad der Schnitt aufgerissen, wodurch die Cores das kartesische Koordinatensystem verlassen haben (→) und damit die Auswertung erschwerten. Einige leere Stanzzyclinder (•).

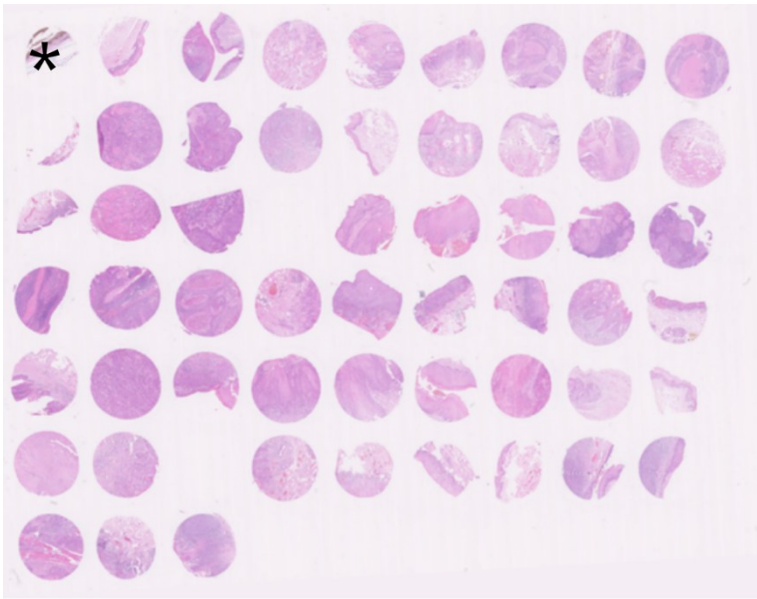


Abb. 47 Paraffinschnitt des TMA 2mm-04 in HE-Färbung Markercore der Leber oben links an Position 1-1 (*), leerer Stanzzyylinder an Position 3-6 und 4-3.

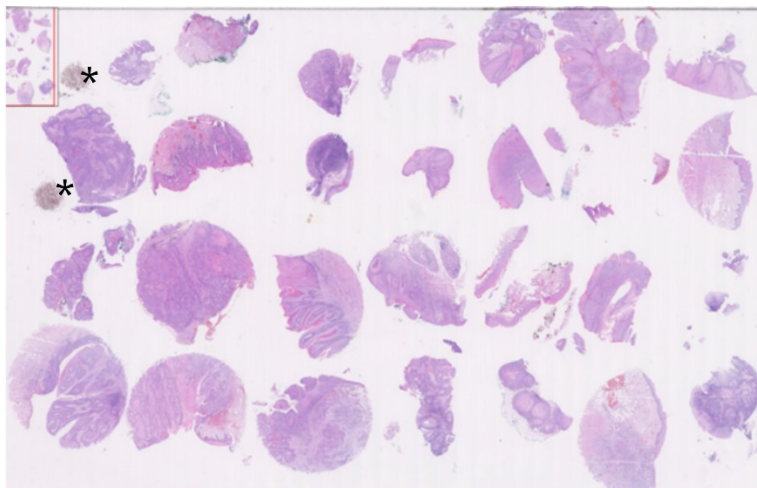


Abb. 48 Paraffinschnitt des TMA 5mm-03 in HE-Färbung Markercore mit einem Durchmesser von 1 mm der Leber neben Gewebe an Position 1-1 (*). Alle Stanzgewebe sind erhalten.

4 Diskussion

Die histopathologische Diagnose einer Dysplasie und ihre Einteilung nach WHO besitzt laut Literatur eine hohe Intra- und Interobserver-Variabilität und ist somit schwer reproduzierbar (Wils et al., 2023, Gupta et al., 2020). Die in der HE-Färbung zu beurteilenden morphologischen Merkmale bilden dennoch weiterhin die Grundlage in der Diagnostik der oralen Epitheldysplasie (OED) (Ko et al., 2024, Odell et al., 2021). Die Bestimmung von Zellmarkern mittels Immunhistologie und molekularpathologische Analysen könnten die Diagnostik objektiver, damit reproduzierbarer und letztlich sicherer machen. Das Ziel muss sein, aus klaren histomorphologischen, immunhistochemischen und molekularpathologischen Merkmalen eine gut reproduzierbare, einfache, prognostisch sinnvolle Klassifikation der OED zu erstellen.

4.1 Morphologische Einteilung der Dysplasie

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten oralen und oropharyngealen Dysplasien wurden nach der allein auf morphologischen Kriterien beruhenden Klassifikation von Arsenic und Kurrer eingeteilt, welche „full-thickness“ („basaloid“, „pleomorphic“) und „non-full-thickness“ („mixed“, „differentiated“, „verrucous“) Dysplasien unterscheiden (Arsenic and Kurrer, 2013).

Eine weitere Entität, die gemischt-verruköse Dysplasie, wird dieser Klassifikation während der Auswertung der vorliegenden Studie hinzugefügt, da 6 % (14 von 224) Fällen diese spezielle Morphologie aufweisen, welche nicht durch die Einteilung von Arsenic und Kurrer abgedeckt wird. Diese Entität ist in der rein morphologischen Einteilung für Fälle geschaffen worden, die sowohl das verruköse Wachstumsmuster als auch eine geringe basalständige Zellatypie zeigen. Möglicherweise stellt diese Dysplasieform die Vorstufe des in der WHO-Klassifikation bezeichneten „hybrid verrucous carcinoma (VC)“ oder „invasive well-differentiated squamous cell carcinoma (SCC) with verrucous features“ dar (Zidar et al., 2023).

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, ist die Diagnose einer verrukösen Dysplasie nicht ausschließlich durch ihre architektonischen Veränderungen zu treffen. So ist laut Odell et al. eine verruköse Dysplasie nicht allein durch das Auftreten einer Hyperkeratose gegeben. Zudem bestehen histomorphologisch viele Überschneidungen mit entzündlichen Veränderungen, benignen Läsionen (beispielsweise verruköser Hyperplasie) und dem papillären oder verrukösen Karzinom. Die Differenzierung zwischen der verrukösen Dysplasie und der proliferativen verrukösen Leukoplakie (PVL) ist ebenfalls wegen fehlender standardisierter histopathologischer Merkmale nur durch eine klinisch-pathologische Diagnostik möglich (Odell et al., 2021).

Schon diese 3 Subtypen einer OED (verrukös, gemischt, gemischt-verrukös) zeigen die Probleme in der Diagnostik und dem daraus wachsenden Wunsch bzw. die Notwendigkeit, spezifische Marker insbesondere für die verruköse Dysplasie zu finden (Novack et al., 2023b). Novack et al. (2023b) sprechen in diesem Zusammenhang vom zu findenden heiligen Gral - einem Marker, der das maligne Transformationsrisiko insbesondere für eine milde und moderate Dysplasie sowie für die PVL vorhersagt (Novack et al., 2023b) und letztlich damit auch die eindeutige Subtypisierung der OED ermöglicht.

Die dSIN, wie sie in der vorliegenden Studie und in einigen Literaturstellen (Purgina et al., 2015, Wasserman et al., 2016, Mai et al., 2018) bezeichnet wird, stellt eine weitere Form der non-full-thickness OED und konnte in der vorliegenden Arbeit in 91 von 224 (41 %) Fällen diagnostiziert werden. Laut Wils et al. tritt die differenzierte Dysplasie ebenso häufig auf wie die klassische Dysplasie (entspricht der OED laut WHO) (Wils et al., 2023). Ob die dSIN tatsächlich ebenso häufig wie die klassische OED auftritt, lässt sich in dieser Arbeit nicht beurteilen, da nicht alle dysplastischen Veränderungen in einem gewissen Zeitraum untersucht wurden. In der Routinediagnostik wurde diese Diagnose nur bei einem Patienten gestellt, da sich die Routinediagnostik nach der WHO-Einteilung der OED richtet. Die WHO teilt die OED je nach Aufsteigen der dysplastischen Epithelzellen im Epithelverband in 2 (low-grade, high-grade)

oder 3 Schweregrade (mild, moderate, severe) ein (Reibel et al., 2017). Die WHO weist jedoch darauf hin, dass eine schwere Dysplasie auch auf das basale Epitheldrittel beschränkt sein kann (Bishop et al., 2023). Dies ist im Grunde ein Widerspruch in sich, da eine schwere Dysplasie üblicherweise bis zur Epitheloberfläche reicht. Die WHO sollte somit dringend diese morphologisch klar erkennbare Entität, analog zur Dysplasie der Vulva, als solche anerkennen, gesondert beschreiben und auch z.B. als dSIN bezeichnen. Diese Forderung, welche wir bereits 2019 formulierten, wurde zwischenzeitlich auch von anderen Studien erhoben (Arsenic & Kurrer, 2013; Brouns et al., 2023; Wils et al., 2020; Wils et al., 2023). Aufgrund der von Arsenic und Kurrer vorbeschriebenen morphologischen Merkmale (Hyperkeratose, gute squamöse Differenzierung des Epithels, Zellkern- und Zellpolymorphie in der basalen bis parabasalen Epithelschicht, Hyperchromasie, veränderte Zellpolarität, Desorganisation der Epithelarchitektur, erhöhte Mitosefiguren, Akanthose, elongierte/anastomosierende Reteleisten) war es kein großes Problem, die beschriebenen 91 Fälle einer dSIN im Eingangsmaterial zu finden. Ähnliche Veränderungen liegen bei der pleomorphen Dysplasie auf der gesamten Epithelhöhe vor. Inwieweit die pleomorphe Dysplasie, welche in 13 % (30 von 224) der Fälle in der vorliegenden Studie diagnostiziert werden konnte, eine Weiterentwicklung der dSIN mit Aufsteigen der dysplastischen pleomorphen Zellen bis zur Epitheloberfläche darstellt, lässt sich histomorphologisch nicht sicher beurteilen. Weitere Studien dazu sind notwendig.

Wils et al. differenzieren zwischen differenzierter Dysplasie und klassischer Dysplasie. Sie schlagen vor, die klassische Dysplasie in die Grade 1-3 analog zur WHO-Klassifikation einzuteilen. Mit zunehmendem Grad der Dysplasie erhöht sich das Risiko einer malignen Transformation (Wils et al., 2023). Bei Arsenic und Kurrer findet sich keine Einteilung in Schweregrade. Jedoch lässt sich die basaloide Dysplasie als „full-thickness“, das heißt, die dysplastischen basaloide Epithelzellen reichen vom Stratum basale bis zur Epitheloberfläche, einer schweren Dysplasie (Grad 3) zuordnen. Laut Arsenic und Kurrer ist die „full-

Diskussion

thickness“ Dysplasie mit einem schlecht differenzierten Plattenepithelkarzinom (SCC) assoziiert (Arsenic and Kurrer, 2013). Eine morphologische Einteilung der basaloiden Dysplasie war im Eingangsmaterial durch die klare Definition von basaloiden Epithelzellen gut möglich, allerdings erstreckte sich die basaloide Dysplasie nicht immer über das gesamte Epithel. Diese Beobachtung legt nahe, dass ein Grading sinnvoll ist, da sonst von einer „non-full-thickness“ Dysplasie ausgegangen werden müsste, die laut Arsenic und Kurrer mit gut differenzierten SCC assoziiert ist. Die gemischte Dysplasie nach Arsenic und Kurrer könnte aus dem gleichen Grund in Grade eingeteilt werden.

Es zeigt sich somit, dass die Histomorphologie zur Einteilung der OED nicht ausreicht und insbesondere die Ätiologie der OED zur Einteilung zumindest mit herangezogen werden muss. Als Methoden zur Klärung der Ätiologie stehen insbesondere die kostengünstige Immunhistochemie und die molekulare Pathologie zur Verfügung. Möglicherweise könnte auch in naher Zukunft die Proteomanalyse mittels Massenspektrometrie zu einer besseren, detaillierteren Einteilung der OED führen (Umapathy et al., 2023).

4.2 Anwendung immunhistochemischer Marker für die Einteilung der Dysplasie

Novack et al. nutzen für ihre an der Ätiologie orientierten Einteilung der oralen squamösen intraepithelialen Neoplasie (OSIN) die Immunhistologie und die Molekularpathologie insbesondere zur Mutationsanalyse von *TP53* und zur HPV-Typ-Bestimmung. Sie unterscheiden die orale epitheliale Dysplasie (OED) und die proliferativen verrukösen Leukoplakie-Spektrum-Läsionen. Die OED wird weiter unterteilt in die 3 Gruppen der „HPV-assoziierten Dysplasie“, der „Nicht-HPV-assoziierten und nicht-p53-abhängigen Dysplasie“ und der „p53-abhängigen Dysplasie“ (Ko et al., 2024, Novack et al., 2023a). Die Gruppe der „Nicht-HPV-assoziierten und nicht-p53-abhängigen Dysplasie“ ist Marker negativ und teilt sich viele morphologische Merkmale insbesondere mit der proliferativen verrukösen Leukoplakie (Novack et al., 2023b).

In der 2023 herausgegebenen und somit neuesten WHO-Klassifikation der Kopf- und Halstumoren wurde die HPV-assoziierte orale Epitheldysplasie als eigenständige Entität in die oralen potenziell malignen Veränderungen (OPMDs) aufgenommen (Muller and Tilakaratne, 2022). In der vorliegenden Studie tritt eine HPV-assoziierte Dysplasie in der Mundhöhle in 3 von 155 Fällen (2 %) und im Oropharynx in 10 von 69 Fällen (14 %) auf. Diese Häufigkeiten werden auch in der Literatur genannt (Chaturvedi et al., 2013). Die Bestimmung als HPV-assoziierte Dysplasie erfolgte in der vorliegenden Arbeit anhand des für eine HPV-Infektion anerkannten Surrogatmarkers p16. Aufgrund ihres häufigen Auftretens sollte die p53-abhängige Dysplasie, also die dSIN oder die pleomorphe Dysplasie, als eigene Entität im Mundraum und Oropharynx analog zur Vulva (dVIN) aufgenommen werden. In 48 % (58/121) der p53-abhängigen Fälle unserer Studie lag eine Überexpression, in 47 % (57/121) ein Ausfall von p53 vor. Wie von Parra-Herran et al., Singh et al. und Dasgupta et al. anhand der dVIN festgestellt, liegt eine *TP53*-Mutation in diesen Fällen nahe (Parra-Herran et al., 2022, Singh et al., 2015, Dasgupta et al., 2018). Analog zur dVIN erlaubt

Diskussion

die Kombination aus morphologischen Merkmalen und der immunhistochemischen p53 Bestimmung die Diagnose einer dSIN, welche über eine *TP53*-Mutationsanalyse endgültig erhärtet werden kann. In 4 % (5 von 121) der Fälle konnte eine dSIN nicht sicher diagnostiziert werden, da die morphologischen Merkmale sich nicht eindeutig mit der Expression der p53 IHC unterstützen lassen. In diesen Fällen ist eine molekularpathologische Mutationsanalyse von *TP53* notwendig, die hier Klarheit über die Pathogenese schafft.

Neben der dSIN erscheint auch die von Arsenic und Kurrer (2013) morphologisch definierte pleomorphe Dysplasie p53-assoziiert zu sein. Die pleomorphe Dysplasie entspricht einer SIN III in der WHO-Klassifikation und damit einer hochgradigen Dysplasie (Muller and Tilakaratne, 2022). Auch wenn die pleomorphe Dysplasie als hochgradige Läsion anerkannt ist, sollte dennoch ein immunhistochemischer p53-Nachweis erbracht werden. Die Detektion einer *TP53*-Mutation ist für die Prognose wichtig, da eine maligne Progredienz über diese Pathogenese häufiger auftritt (Brouns et al., 2023, Ko et al., 2024).

Interessanterweise ist in 3 von 121 Fällen (2 %) gleichzeitig eine p53 abnorme Färbung (1 Fall mit Ausfall und 2 Fälle mit kräftiger Überexpression) und eine p16 positive Färbung zu beobachten. Diese Fälle werden aufgrund der morphologischen Merkmale als dSIN eingeteilt. Die gleiche Beobachtung machen Novak et al. und stellen fest, dass eine „null-like/basal sparing and mid-epithelial/basal sparing“ p53 Färbung auf eine high-risk HPV-Infektion hindeutet (Novack et al., 2023a). Acht andere Fälle wiesen ein basaloides Erscheinungsmuster, aber eine p16 negative und p53 abnorme Färbung auf. Auch diese Beobachtung deckt sich mit der von Ko et al. (2014) in der Vulva festgestellten atypischen dVIN, die ein HPV-typisches, basaloides Erscheinungsbild nachahmt und mit einer p53 abnormen Färbung eine *TP53*-Mutation nahelegt (Ko et al., 2024). p16 war in vielen Fällen schütter ausgeprägt, insbesondere in den Gewebeproben aus der Mundhöhle, was zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte. Novack et al. (2023b) stützen diese Beobachtung:

Sie stellen fest, dass p16 als guter Surrogatmarker für eine Epitheldysplasie mit HPV-Assoziation im Larynx und Oropharynx gilt, aber viele falsch positive Ergebnisse in der Mundhöhle liefert (Novack et al., 2023b).

Die in der vorliegenden Studie angewandten Marker CK13 und CK17 konnten nicht als spezifische Marker für „Nicht-HPV-assoziierte und nicht-p53-abhängige Dysplasie“ dienen, da insbesondere der Verlust von CK13 in Kombination mit einer Expression von CK17 auch bei den anderen Dysplasieformen gefunden werden kann und diese Zytokeratine somit nur das Vorliegen einer Dysplasie anzeigen. Eine Expression von CK17 kommt laut Dasgupta et al. (2018) nicht im regehaften Plattenepithel vor und steigt mit dem Grad der Dysplasie (Dasgupta et al., 2018). 92 % der dSIN, 97 % der pleomorphen Dysplasie, 97 % der gemischten Dysplasie, 100 % der verrukösen sowie der gemischt-verrukösen Dysplasie zeigten eine Expression von CK17 auf. Im Gegensatz zu den genannten Dysplasieformen zeigen nur 69 % der Fälle mit HPV-assoziiierter Dysplasie (SIN) eine Expression von CK17. Wils et al. postulieren, dass ein Verlust der CK13 Expression in Kombination mit dysplastischen Epithelveränderungen ein erhöhtes malignes Entartungsrisiko anzeigt (Wils et al., 2020). Neben Wils et al. (2020) zeigen auch weitere Literaturstellen (Dasgupta et al., 2018, Ko et al., 2024) den Vorteil einer CK13- und CK17-Diagnostik zum Dysplasienachweis. Allerdings machen eigene Befunde deutlich, dass bei einer Dysplasie durchaus eine normale CK13-Expression bei fehlender CK17-Expression gefunden werden kann. Die alleinige Beurteilung der Expression von CK13 und CK17 ist somit nicht zuverlässig zum Dysplasienachweis. Andere immunhistochemische Färbungen und die konventionelle Morphologie (HE-Färbung) sind für die richtige Beurteilung unerlässlich. So besitzen CK13 und CK17 bei den HPV-assoziierten Dysplasien nur eine schwache Aussagekraft.

In einer verrukösen Dysplasie, die als Dysplasie mit geringem Entartungsrisiko eingestuft wird, ließ sich jedoch in 83 % (15 von 18) der Fälle eine verringerte oder fehlende Expression von CK13 und in 100 % (18 von 18) der Fälle eine

Expression von CK17 nachweisen. Ob die jeweilige Stärke des Expressionsverlustes von CK13 bzw. der Expression von CK17 eine gesonderte Aussagekraft besitzt, lässt sich nicht endgültig beurteilen. Allerdings ist die Expression von CK17 unabhängig von ihrer Stärke bereits ein hilfreicher Hinweis auf eine dysplastische Veränderung. CK17 gilt auch als wichtiger Marker in der Diagnostik der dVIN (Podoll et al., 2017). Analog der morphologischen und immunhistochemischen Merkmale der dVIN und in Kombination mit anderen immunhistochemischen Merkmalen wie p53, CK13 und MIB-1 wurde CK17 in der vorliegenden Studie zur Diagnose einer dSIN verwendet.

Eine Variante der dSIN aus der vorliegenden Studie ist die verruköse dSIN. Hierbei handelt es sich um eine morphologische Kombination aus einer verrukösen Dysplasie, welche laut Literatur mit einem geringen malignen Entartungsrisiko einhergeht, und einer dSIN, welche als hochgradige Dysplasie eingestuft wird und somit ein hohes Entartungsrisiko aufweist. Arsenic und Kurrer (2013) beschreiben ebenfalls mögliche verruköse Anteile in der differenzierten Dysplasie. Bei der Auswertung der vorliegenden Studie fiel auf, dass die verruköse dSIN mit einer abnormen Expression von p53 assoziiert ist und damit wohl eine *TP53*-Mutation vorliegt. Die Ergebnisse der CK13 und CK17 immunhistochemischen Färbungen zeigten das Expressionsmuster einer Dysplasie. Die verruköse Morphologie der verrukösen dSIN sollte nicht dazu verleiten, diese Läsion als low-grade Dysplasie einzuschätzen. Die abnorme p53-Expression in der verrukösen dSIN stützt die Notwendigkeit einer immunhistochemischen Analyse von p53. Ko et al. (2024) stellen fest, dass aus einer low-grade Dysplasie mit abnormer p53 Expression kein verruköses Karzinom entsteht, sondern eher eine maligne Transformation in ein Plattenepithelkarzinom erfolgt. Daher liegt eine andere Pathogenese als für verruköse Karzinome vor. Auch Novack et al. (2023b) stellen für die proliferative verruköse Leukoplakie fest, dass eine abnorme p53 Expression eine maligne Transformation in ein Plattenepithelkarzinom wahrscheinlicher macht als in ein verruköses Karzinom. Diese Aussagen bestätigen die Wichtigkeit der korrekten

Diagnose einer verrukösen dSIN, welche eben nicht mit einer verrukösen Dysplasie verwechselt werden darf. Hosseinpour et al. (2017) fassen in ihrer Meta-Analyse zusammen, dass CK10 als möglicher Marker zur Unterscheidung eines verrukösen Tumors (also eines invasiven Carcinoms) von einer verrukösen Dysplasie hilfreich sein könnte (Hosseinpour et al., 2017). Die Ergebnisse von Kim et al. (2024) deuten darauf hin, dass spezifische long non-coding RNAs (lnc-RNAs) als Biomarker für eine frühe Diagnose und eine Differenzierung einer verruköser Hyperplasie von einem verrukösen Karzinom genutzt werden können (Kim et al., 2024). CK10 und die lnc-RNA könnten somit möglicherweise auch als Marker für verruköse Epithelveränderungen dienen. Die immunhistochemische Expression von MIB-1, ein Marker für die Epithelproliferation, war in der vorliegenden Studie eher basalständiger in einer verrukösen Dysplasie als in anderen Dysplasieformen. Somit kann MIB-1 allenfalls zu einer Unterscheidung einer verrukösen Dysplasie von einer gemischten Dysplasie herangezogen werden. MIB-1 ist damit ein eher unspezifischer Marker. Mallick et al. (2015) kommen zu dem Schluss, dass die MIB-1 Expression mit dem Ansteigen des Dysplasiegrades wächst (Mallick et al., 2015). Sakurai et al. (2000) bestätigen diese Beobachtung (Sakurai et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die dSIN aufgrund ihrer klaren ätiologischen und pathogenetischen Definition einer p53-Assoziation und einer damit einhergehenden eindeutigen Diagnosestellung eine eigenständige Entität in der OED darstellt und als solche Eingang in die WHO-Klassifikation der OED finden sollte. Eine gute Klassifikation beruht auf einfach und eindeutig zu beurteilenden morphologischen, immunhistochemischen und/oder molekularpathologischen Markern. Die bislang weitgehend auf morphologischen Kriterien beruhende WHO-Klassifikation der OED sollte somit schnellstmöglich auf eine ätiologisch-pathogenetische Grundlage gestellt werden.

4.3 Aussagekraft der Markerprofile

Die morphologische Diagnose und die immunhistochemischen Ergebnisse wurden für die einzelnen Fälle in Form von Markerprofilen (p53-p16-CK13-CK17-MIB-1-Diagnose) zusammengefasst. Es stellte sich heraus, dass die meisten Fälle einem typischen Markerprofil zugeordnet werden konnten. Dies könnte ein hilfreicher Schritt sein, um die Charakteristik der Pathogenese zu erkennen, die richtige Dysplasie-Einteilung vorzunehmen und die klinische Therapie dahingehend anzupassen. Ebenso kann mit Hilfe der Markerprofile erkannt werden, ob nur eine Ätiologie/Pathogenese bei einer bestimmten Dysplasie vorliegt oder beispielsweise zwei Dysplasielone (p53 Ausfall neben p53 Überexpression) oder eine HPV-Infektion bei gleichzeitiger p53-Überexpression/Verlust bei *TP53*-Mutation vorliegt (Becker et al., 2024). Im Einzelfall sollte insbesondere bei diesen Fällen die Entscheidung zu weiteren molekularpathologischen Untersuchungen großzügig getroffen werden, um die Ergebnisse der Markerprofile zu erhärten. Eine Aussage zur malignen Transformationsrate und zur Progression der einzelnen Dysplasieformen kann in dieser Studie nicht getroffen werden, da kein klinischer Verlauf zu den in die Studie eingeschlossenen Patientinnen und Patienten vorliegt.

4.4 Kombination der morphologischen und immunhistochemischen Merkmale zur Einteilung der Dysplasie

Die Anwendung immunhistochemischer (IHC) Marker zur Sicherung und Reproduzierbarkeit einer Diagnose ist z.B. durch die Anwendung von p16-Immunhistochemie für eine HPV-assoziierte Dysplasie im Bereich des Larynx und Oropharynx hinreichend bekannt (Novack et al., 2023b). Hinzu kommt, dass in diesem Fall auch die Ätiologie und Pathogenese der dysplastischen Veränderung erkannt wird, da eine p16 positive IHC mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine high-risk HPV-Infektion schließen lässt und damit eine Aussage über die Progression und die maligne Transformationswahrscheinlichkeit zulässt. In den Plattenepithelien des Urogenitaltraktes ist neben p16 auch p53 als Surrogatmarker etabliert (Novack et al., 2023a). Im oralen Plattenepithel ist aktuell weder p16 noch ein anderer Surrogatmarker anerkannt, wenngleich die WHO p16 als Marker vorschlägt (Bishop et al., 2023). p16 IHC bringt im oralen Plattenepithel häufig falsch positive Ergebnisse für eine high-risk HPV-Infektion und in vielen Studien wird die Korrelation zwischen positiven p16 Expressionsmustern und high-risk HPV-Infektionen in Frage gestellt (Lingen et al., 2013, Zafereo et al., 2016, Minami et al., 2017, Nauta et al., 2021). Des Weiteren kann die high-risk HPV-Infektion nur durch molekularpathologische Analysen bestätigt werden, die nicht immer verfügbar sind (Novack et al., 2023a). Die HPV-abhängige Dysplasie ist zwar mittlerweile auch durch die WHO anerkannt, nur manifestiert sich die HPV high-risk Dysplasie sehr viel seltener in der Mundhöhle als im Oropharynx (Vani et al., 2024). Viel wichtiger erscheint daher die Etablierung von p53 in der Diagnostik der oralen Epitheldysplasien (OEDs). Novack et al. (2023a) formulieren, dass es mit der p53 IHC auch möglich ist, eine HPV-Assoziation zu detektieren (Abb. 47). Eine p16 positive Expression mit einer das Stratum basale aussparenden (basal sparing) p53 wild-type Expression soll somit sensitiv und spezifisch für eine high-risk HPV-Infektion sein (Novack et al., 2023a). Die Charakterisierung der Ätiologie/Pathogenese beeinflusst maßgeblich die maligne Transformationsrate,

welche sich letztlich auf die klinische Therapie auswirkt. Die in dieser Studie angewandten morphologischen Klassifikationssysteme basieren auf der HE-Färbung für die OED (WHO, 2017 und Arsenic&Kurrer, 2013). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass die morphologische Klassifizierung um die IHC-Färbungen, insbesondere p53 und p16 ergänzt werden sollte um die beste Diagnose stellen zu können. Daher ist eine Klassifikation der OED notwendig, welche aus eindeutig zu beurteilenden Markern besteht und die morphologischen Kriterien mit den Expressionsmustern von p53 und p16 kombiniert.

Novack et al. (2023b) schlagen einen Algorithmus zur Einteilung der OED im Sinne einer Klassifikation der OED nach p53 und p16 Expression vor (Abb. 49 (Novack et al., 2023b)), aus welcher sich auch die klinische Therapieempfehlung ableitet. Diese Klassifikation beruht somit nicht rein auf der Morphologie (z.B. dSIN, pleomorphe SIN) sondern auf den Expressionsmustern der spezifischen Marker. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie favorisieren ebenfalls diese Art der Einteilung der OED. Auch wenn in der Routinediagnostik bislang nach wie vor die weitgehend auf der Morphologie beruhende Einteilung der OED nach WHO angewandt wird, erscheint es dennoch dringend notwendig, die Einteilung der OED auf eine ätiologische/pathogenetische Grundlage zu stellen. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde von der WHO mit der Anerkennung von HPV-assoziierten oralen Epitheldysplasien gemacht. Da sich bisweilen entzündlich-reaktive Veränderungen konventionell-morphologisch nicht von dysplastischen Veränderungen unterscheiden lassen (Pateras et al., 2024), ist eine Klärung der Ätiologie/Pathogenese dieser Veränderungen unerlässlich. Tabelle 14 zeigt die Korrelation der Einteilung der OED nach WHO mit den von Morsch modifizierten morphologischen Dysplasieformen nach Arsenic und Kurrer und der zu fordernden neuen Klassifizierung nach der Ätiologie/Pathogenese (Vogel and Morsch, 2025, Arsenic and Kurrer, 2013).

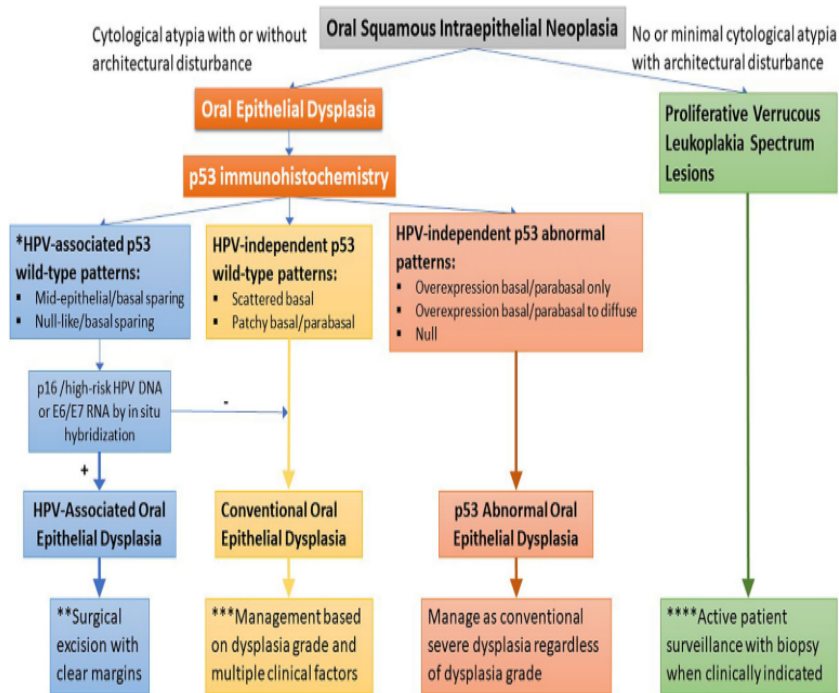


Figure 7.

Proposed algorithm and classification of oral squamous intraepithelial neoplasia: novel classification of oral squamous intraepithelial neoplasia using histomorphology, p53 immunohistochemical stain, and when indicated, p16 immunohistochemical stain and/or high-risk HPV DNA or E6/E7 RNA in situ hybridization. *When p53 shows a mid-epithelial/basal sparing pattern or null-like/basal sparing pattern (ie, HPV-associated wild-type patterns), even if the histology is not characteristic of classic HPV-associated oral epithelial dysplasia, p16 immunohistochemical stain and/or high-risk HPV DNA or E6/E7 RNA in situ hybridization are recommended. **HPV-associated oral epithelial dysplasia is amenable to surgical excision.^{1,20,21,26} ***Treatment options for conventional oral epithelial dysplasia are dependent on dysplasia grade and multiple clinical factors. Mild dysplasia is most often treated conservatively with clinical surveillance, whereas severe dysplasia is usually treated with surgical excision with clear margins. The management of moderate dysplasia is controversial and may range from more conservative measures, such as close surveillance, to topical chemotherapy or laser to surgical excision.^{1,39} ****Proliferative verrucous leukoplakia spectrum lesions are managed by active surveillance with biopsy when indicated.^{1,22} (Algorithm and classification designed by Y.C.K.). HPV, human papillomavirus.

Abb. 49 Klassifikation der squamösen intraepithelialen Neoplasie und Algorithmus zur Einteilung und Therapie nach Novack et al. (2023b) Neue Einteilung unter Verwendung der Histomorphologie, der p53 Immunhistochemie und, wenn indiziert, der p16 Immunhistochemie und/oder high-risk HPV DNA oder E6/E7 RNA in situ Hybridisierung (Novack et al., 2023b).

Tabelle 14 Korrelation der WHO-Klassifikation der OED (2023) mit den morphologischen und immunhistochemischen Diagnosen der OED nach Morsch

WHO (2023)	Morphologische Einteilung der Studie	Immunhistochemische Befunde der Studie
Schwere Dysplasie (SIN III)	Differenziert	P53-abhängig (dSIN oder pleomorph)
Schwere Dysplasie (SIN III)	Pleomorph	
Milde bis schwere Dysplasie (SIN I-III)	Basaloid	HPV-assoziiert (mild, moderat, schwer)
Milde Dysplasie (SIN I) Proliferative verruköse Leukoplakie (SIN II-III)	Verrukös	Nicht-HPV-assoziierte und nicht-p53-abhängige Dysplasie (mild, moderat, schwer)
Milde bis schwere Dysplasie (SIN I-III)	Gemischt Gemischt-verrukös	

4.5 Effektivität der TMAs

Vogel fasste in seinem Review 2014 unterschiedliche Herstellungsmethoden der TMAs und eine Auswahl an vorgefertigten TMAs unterschiedlicher Hersteller zusammen und beschreibt ihre Vor- und Nachteile. Die in dieser Studie verwendeten TMA-Akzeptorblöcke mit einer Größe der Stanzzyylinder von 1 mm und 2 mm beruhten auf der Kombination der Techniken von Song (2005; paraffinierte Agar-Stabilisationsblöcke) und Wilkens (2003; patentierte Klebebandtechnik) (Vogel, 2014, Wilkens, 2003, Song, 2005).

Der Vorteil der paraffinierten Agarblöcke bei den kleinen Stanzzyylinderdurchmessern von 1 mm und 2 mm besteht darin, dass die Stanzzyylinder beim Aufschmelzen des befüllten TMAs nicht umfallen. Durch das Aufschmelzen kommt es zu einer guten Verbindung zwischen den Stanzzyindern und dem umgebenden Paraffin des Agarblockes. Die Trägerfolie (z.B. alte Röntgenbilder) mit dem darauf liegenden doppelseitigen Klebeband fixiert den Agarblock und verhindert eine Formveränderung beim Aufschmelzen und beim anschließenden Erstarren des Paraffins. Beim Vorliegen einer guten Verbindung zwischen dem Agarblock und den Stanzzyindern kommt es nur selten zu einem Rollen oder Falten der Zylinder beim Schneiden bzw. Aufziehen des Paraffinschnittes auf den Objektträger im heißen Wasserbad (Vogel, 2014). Gerollte oder gefaltete Stanzzyylinderanschnitte schwimmen beim Färben des Objektträgers leichter ab. Trotz des Aufschmelzens der bestückten TMAs ist es dennoch in der vorliegenden Studie zum Rollen, Falten und Abschwimmen einiger Gewebeproben gekommen. Das ungenügende Anschneiden des zu übertragenden Gewebes am Donorblock ist ein weiterer Grund für das Fehlen eines Stanzzyylinderanschnittes in einem Paraffinschnitt des TMA, wodurch über dem Gewebe noch gewebefreies Paraffin liegt. Dadurch kommt das Gewebe von Interesse erst in tieferen Schnittstufen des TMA zum Vorschein. Das gleiche Problem trat vereinzelt bei den TMAs mit einem Stanzzyylinderdurchmesser von 5 mm auf. Insbesondere bei diesen kam es vermehrt zur Faltung der

Gewebeproben mit möglichem anschließendem Abschwimmen vom Objektträger bei der Färbung.

Im Rahmen dieser Studie wurden die im TMA eingestellten Gewebeproben mit unterschiedlichen, zumeist immunhistochemischen, Färbungen untersucht. Um möglichst selten einen TMA mit entsprechendem Gewebeverlust anzuschneiden, wurden in einem Schnittvorgang bis zu 25 Objektträger erstellt. Der Abstand zwischen dem ersten und dem 25. Objektträger betrug somit mindestens 62,5 μm . Da trotz erfolgter Nummerierung der Objektträger ein konsekutives Färben nicht gewährleistet war, fanden sich auf den Schnittpräparaten nicht mehr gleichartige Gewebsausschnitte, wodurch die Auswertung und der Vergleich der Muster der unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungen eingeschränkt und im schlimmsten Falle nicht mehr möglich war. Für die meisten Gewebezyylinder konnte jedoch eine regelhafte Auswertung erfolgen.

Hinsichtlich der Größe der Stanzzyylinder der TMAs konnten die 1 mm, 2 mm und 5 mm durchmessenden TMAs untereinander verglichen werden. Für die Studie war das Epithel relevant und sollte somit auch in den Gewebeproben der TMAs begutachtet werden können. Die 1 mm durchmessenden Stanzzyylinder reichten, wie in der Literatur bereits beschrieben, in einigen Fällen nicht aus, um genügend Gewebe für eine Dysplasiediagnose zu präsentieren (Ko et al., 2024). Im Gegensatz zu den dysplastischen Epithelanteilen ließ sich invasives Karzinomgewebe größtenteils in allen Schnitten wiederfinden. Die 2 mm durchmessenden Stanzzyylinder waren zur Auswertung von dysplastischem Epithel geeigneter als die 1 mm durchmessenden Stanzzyylinder. Meistens konnte neben dem dysplastischen Epithel auch gesundes Epithel erkannt werden. Die 5 mm durchmessenden Stanzzyylinder zeigten die gleichen Vorzüge wie die 2 mm durchmessenden Stanzzyylinder und erlaubten oftmals die gleichzeitige Bewertung von invasivem Karzinom und der angrenzenden Epitheldysplasie. Diese Eigenschaft stellte sich häufig als nützlich heraus, da das invasive Tumorepithel und das dysplastische Epithel manchmal unterschiedliche Expressionsmuster aufwiesen. Für die vorliegende Studie waren die invasiven

Karzinome allerdings zweitrangig. Die 2 mm und 5 mm durchmessenden Gewebestanzylinder erlaubten eine weitgehende Beurteilung des dysplastischen Epithels und eignen sich somit gut für eine solche Untersuchung.

In der vorliegenden Studie kam es zu Einschränkungen durch die Qualität der Gewebeproben. Diese wurden bis zu 20 Jahre gelagert und waren teilweise schon zerfallen, wodurch die benötigten Areale gegebenenfalls nicht mehr gänzlich vorhanden waren. Insbesondere die 1 mm durchmessenden Stanzylinder waren hiervon betroffen, da das Paraffin bisweilen zu spröde für Stanzen mit diesem kleinen Stanzdurchmesser war.

5 Zusammenfassung

Die Einteilung der oralen potenziell malignen Veränderungen (OPMD) und der oralen epithelialen Dysplasie (OED) im Mundraum und Oropharynx gemäß der WHO beruht weitestgehend auf morphologischen Kriterien, welche sich in der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung beurteilen lassen, jedoch einer deutlichen Intra- und Interobserver-Variabilität unterliegen. Erst in der 5. Ausgabe der WHO-Klassifikation von Kopf-Hals-Tumoren (2023) wurde eine ätiologisch definierte Unterform der OED eingeführt, nämlich die HPV-assoziierte OED, welche immunhistochemisch über die Überexpression des Surrogatmarkers p16 im von HPV befallenen Epithel oder über einen molekularpathologischen HPV-Nachweis diagnostiziert werden kann. Im Gegensatz hierzu wurde von der WHO die bereits am Urogenitaltrakt etablierte differenzierte vulväre intraepitheliale Neoplasie (dVIN), welche über eine fehlende Expression oder Überexpression von p53 und damit über eine *TP53*-Mutation definiert ist, nicht in den Kopf-Hals-Bereich in Form der differenzierten squamösen intraepithelialen Neoplasie (dSIN) übernommen. Die WHO definiert dennoch ein Korrelat für die dSIN in den OED über die Morphologie (schwere Epithelpleomorphie nur im unteren Epitheldrittel, knollenartige Reteleisten, Epithelknospung und Desorganisation der Basalzellen) und bezeichnet dieses Korrelat als schwere Dysplasie.

Ziel dieser Arbeit war vornehmlich, die dSIN im Einsendegut des Institutes für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen mit Hilfe der Morphologie und insbesondere der p53 Immunhistologie zu identifizieren, um die dSIN neben der HPV-assoziierten OED als ätiologisch klar definierte Entität zu etablieren. Ferner sollten weitere, von Arsenic und Kurrer (2013) auf morphologischer Basis beschriebene Dysplasieformen (basaloid, pleomorph, verrukös, gemischt) dem Expressionsmuster eines Markers oder mehrerer gut reproduzierbarer immunhistochemischer (IHC) Marker (p16, CK13, CK17, MIB-1) zugeordnet werden. Darüber hinaus sollte durch die Erstellung von Tissue Microarrays (TMAs) mit verschiedenen Gewebestanzylinderdurchmesser untersucht

Zusammenfassung

werden, welcher Durchmesser am besten zur Diagnostik von Epitheldysplasien geeignet ist.

Es wurden Proben von 227 Patientinnen und Patienten aus dem Zeitraum 1998-2018 mit der Diagnose einer SIN I–III im Mundraum und Oropharynx aus dem Pathologieinformationssystem PAS.net (Fa. Nexus) des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen insbesondere im Hinblick auf die Diagnose einer dSIN ausgewählt. Zuerst erfolgte eine Nachbegutachtung der in der Routinediagnostik verwendeten Original-HE-Schnitte, um mithilfe der morphologischen Merkmale der Klassifizierungssysteme nach WHO (4. Edition, 2017) und Arsenic und Kurrer (2013) vorläufige Diagnosen zu stellen. Dysplasietragende Gewebsareale wurden von den routinemäßig erstellten Paraffinblöcken (sogenannte Donorblöcke) als 1 mm, 2 mm und 5 mm durchmessende Paraffingewebestanzylinder (1722 Stanzylinder) in TMAs eingestellt. Von den TMAs wurden Paraffinschnitte angefertigt und konventionell-morphologisch und immunhistochemisch mittels HE, p53, p16, CK13, CK17 und MIB-1 gefärbt. Danach wurden die gefärbten TMA-Schnitte begutachtet und die Histomorphologie sowie die Expression der IHC-Marker dokumentiert. Die TMAs mit einem Stanzylinderdurchmesser von mindestens 2 mm erschienen aussagekräftiger als die mit einem Durchmesser von 1 mm, weshalb bei weiteren Untersuchungen Stanzylinder mit einem Durchmesser von mindestens 2 mm eingesetzt werden sollten. Anhand der Expressionsmuster wurde mindestens ein individuelles Markerprofil (p53-p16-CK13-CK17-MIB1) pro Patientin und Patient erstellt. Insgesamt konnten 224 Markerprofile für 215 Patientinnen und Patienten erstellt werden. Folgende Dysplasieformen konnten morphologisch abgegrenzt werden: dSIN, pleomorphe Dysplasie, verruköse Dysplasie, gemischte Dysplasie, basaloide Dysplasie und gemischt-verruköse Dysplasie.

Das immunhistochemische Panel erwies sich bei der Unterscheidung zwischen physiologischen und dysplastischen Epithelveränderungen sowie teilweise bei der Klassifizierung der vorliegenden Dysplasieform als relevant. Die Erstellung der Profile erschien hilfreich bei der Zusammenfassung mehrerer Gewebeproben

Zusammenfassung einer Patientin oder eines Patienten, um die Ätiologie bzw. Pathogenese der dysplastischen Veränderungen schnell erkennen und übersichtlich darstellen zu können. Mittels p16 konnte die HPV assoziierte OED (13/224), mit p53 die dSIN (91/224) und die pleomorphe Dysplasie (30/224) von den anderen OEDs abgegrenzt werden. Für die verruköse Dysplasie sowie die gemischte Dysplasie konnte jedoch keiner der in der Studie verwendeten Marker zur Spezifizierung dienen. Die gemischte Dysplasie erscheint als „waste-basket“ für alle Dysplasieformen, die nicht HPV-assoziiert, p53-abhängig oder durch ein verruköses Erscheinungsbild auffallen. Die Bewertung der beschriebenen IHC-Marker unterlag jedoch auch einer gewissen Inter- und Intraobserver-Variabilität bei dem einen oder anderen Fall. Selbst die Bewertung von p53 fiel in Einzelfällen nicht eindeutig aus, sodass durchaus eine weitergehende molekularpathologische *TP53*-Mutationsanalyse wünschenswert gewesen wäre und in der Routinediagnostik in unklaren Fällen empfehlenswert ist.

Es zeigt sich die Notwendigkeit, weitere spezifische Marker insbesondere für die verruköse Dysplasie zu identifizieren, um die histopathologische Diagnostik weniger untersucherabhängig und damit reproduzierbarer zu gestalten und die Klassifikation der OED auf eine ätiologische bzw. pathogenetische Basis zu stellen. Die routinemäßige Bestimmung von p53 bei OED im Mundraum und Oropharynx erscheint empfehlenswert. Dadurch können die ätiologisch klar definierten, p53-abhängigen Dysplasieformen - nämlich die dSIN und die pleomorphe Dysplasie - als eigenständige Entitäten diagnostiziert werden.

6 Quellenverzeichnis

- ABADIE, W. M., PARTINGTON, E. J., FOWLER, C. B. & SCHMALBACH, C. E. 2015. Optimal Management of Proliferative Verrucous Leukoplakia: A Systematic Review of the Literature. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 153, 504-11.
- ACKERMANN, S., DANNECKER, C., HORN, L.-C., GIESEKING, F., HAMPL, M., MEHLHORN, G., LUYTEN, A. & PETRY, K. U. 2018. Vulväre intraepitheliale Neoplasie (VIN). In: SCHNÜRCH, H.-G., HAMPL, M. & WÖLBER, L. (eds.) *Tumorerkrankungen der Vulva und Vagina: Leitlinienbasiertes Handbuch*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- ANDROPHY, E. J., HUBBERT, N. L., SCHILLER, J. T. & LOWY, D. R. 1987. Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *Embo j*, 6, 989-92.
- ARA, N., ATIQUE, M., AHMED, S. & ALI BUKHARI, S. G. 2014. Frequency of p53 gene mutation and protein expression in oral squamous cell carcinoma. *J Coll Physicians Surg Pak*, 24, 749-53.
- ARSENIC, R. & KURRER, M. O. 2013. Differentiated dysplasia is a frequent precursor or associated lesion in invasive squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx. *Virchows Arch*, 462, 609-17.
- AYALA, M. & FATEHI, M. 2023. Vulvar Intraepithelial Neoplasia. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- BECKER, A.-S., MERKEL, J., BOZKURT, I., STRÜDER, D. F., MALETZKI, C., HÜHNS, M. & ZIMPFER, A. H. 2024. p16 overexpression identifies oncogenic high-risk HPV infection in non-oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & Neck*, 46, 2569-2581.
- BERNARD, H. U., BURK, R. D., CHEN, Z., VAN DOORSLAER, K., ZUR HAUSEN, H. & DE VILLIERS, E. M. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401, 70-9.
- BISHOP, J. A., CHAN, J. K. C., GALE, N., HELLIWELL, T., HYRCZA, M. D., LEWIS JR, J. S., LONEY, E. L., MEHROTRA, R., METE, O., MULLER, S., NOSÉ, V., ODELL, E. W., SKALOVA, A., TILAKARATNE, W. M., WENIG, B. M., CREE, I. A., DENTON, E. R. E., FIELD, A. S., GILL, A. J., HODGE, J., KHOURY, J. D., LAX, S. F., LAZAR, A. J., MOCH, H., ROUS, B., SRIGLEY, J. R., TAN, P. H., THOMPSON, L. D. R., TSUZUKI, T. & WASHINGTON, M. K. 2023. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and neck tumours. *WHO classification of tumours series*. 5th ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer.
- BORBÉLY Á, A., MURVAI, M., KÓNYA, J., BECK, Z., GERGELY, L., LI, F. & VERESS, G. 2006. Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol*, 87, 287-294.
- BRANDIZZI, D., GANDOLFO, M., VELAZCO, M. L., CABRINI, R. L. & LANFRANCHI, H. E. 2008. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 13, E544-8.
- BROUNS, E. R., EVREN, I., WILS, L. J., POELL, J. B., BRAKENHOFF, R. H., BLOEMENA, E. & DE VISSCHER, J. 2023. Oral leukoplakia classification and staging system with incorporation of differentiated dysplasia. *Oral Dis*, 29, 2667-2676.
- BROWN, S. J. & MCLEAN, W. H. 2012. One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol*, 132, 751-62.

Quellenverzeichnis

- CANDI, E., SCHMIDT, R. & MELINO, G. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 328-40.
- CARDESA, A., SLOOTWEG, P.J., GALE, N., FRANCHI, A. 2017. *Pathology of the Head and Neck*, Springer Berlin, Heidelberg.
- CHATURVEDI, A. K., ANDERSON, W. F., LORTET-TIEULENT, J., CURADO, M. P., FERLAY, J., FRANCESCHI, S., ROSENBERG, P. S., BRAY, F. & GILLISON, M. L. 2013. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*, 31, 4550-9.
- CHEN, N. & ZHOU, Q. 2005. Constructing tissue microarrays without prefabricating recipient blocks: a novel approach. *Am J Clin Pathol*, 124, 103-7.
- CHO, K. J. & SONG, J. S. 2018. Recent Changes of Classification for Squamous Intraepithelial Lesions of the Head and Neck. *Arch Pathol Lab Med*, 142, 829-832.
- COLLIN, C., OUHAYOUN, J. P., GRUND, C. & FRANKE, W. W. 1992. Suprabasal marker proteins distinguishing keratinizing squamous epithelia: cytokeratin 2 polypeptides of oral masticatory epithelium and epidermis are different. *Differentiation*, 51, 137-48.
- DALE, B. A., SALONEN, J. & JONES, A. H. 1990. New approaches and concepts in the study of differentiation of oral epithelia. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1, 167-90.
- DASGUPTA, S., EWING-GRAHAM, P. C., VAN KEMENADE, F. J., VAN DOORN, H. C., NOORDHOEK HEGT, V. & KOLJENOVIC, S. 2018. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia (dVIN): the most helpful histological features and the utility of cytokeratins 13 and 17. *Virchows Arch*, 473, 739-747.
- DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF. 2021. *S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0* [Online]. AWMF 007/100OL. Available: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/Version_3/LL_Mundhoehlenkarzinom_Langversion_3.0.pdf [Accessed 12.08.2025].
- DOORBAR, J., QUINT, W., BANKS, L., BRAVO, I. G., STOLER, M., BROKER, T. R. & STANLEY, M. A. 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55-70.
- DRIEMEL, O., HERTEL, K., REICHERT, T. E. & KOSMEHL, H. 2006. Aktuelle Klassifikation der Präkursorläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 10, 89-94.
- FITZPATRICK, S. G., COHEN, D. M. & CLARK, A. N. 2019. Ulcerated lesions of the oral mucosa: clinical and histologic review. *Head and neck pathology*, 13, 91-102.
- GALE, N., GNEPP, D. R., POLJAK, M., STROJAN, P., CARDESA, A., HELLIWELL, T., ŠIFRER, R., VOLAVŠEK, M., SANDISON, A. & ZIDAR, N. 2016. Laryngeal Squamous Intraepithelial Lesions: An Updated Review on Etiology, Classification, Molecular Changes, and Treatment. *Adv Anat Pathol*, 23, 84-91.
- GALE, N., HILLE, J., JORDAN, R. C., NADAL, A. & WILLIAMS, M. D. 2017. *WHO Classification of Head and Neck Tumours - Tumours of the hypopharynx, larynx, trachea and parapharyngeal space*, Lyon (France), IARC.
- GALE, N. & ZIDAR, N. 2009. Benigne und potentiell maligne Läsionen des Plattenepithels und Plattenepithelkarzinom. In: CARDESA, A., RUDOLPH, P., MENTZEL, T. & SLOOTWEG, P. J. (eds.) *Pathologie: Kopf-Hals-Region, Weichgewebstumoren, Haut*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Quellenverzeichnis

- GANTI, K., BRONIARCZYK, J., MANOUBI, W., MASSIMI, P., MITTAL, S., PIM, D., SZALMAS, A., THATTE, J., THOMAS, M., TOMAIĆ, V. & BANKS, L. 2015. The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. *Viruses*, 7, 3530-51.
- GILLENWATER, A. M., VIGNESWARAN, N., FATANI, H., SAINTIGNY, P. & EL-NAGGAR, A. K. 2014. Proliferative verrucous leukoplakia: recognition and differentiation from conventional leukoplakia and mimics. *Head Neck*, 36, 1662-8.
- GLASS, S. H. 2024. *Oral cavity & oropharynx, Oral cavity squamous cell carcinoma, SCC-general* [Online]. Available: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/oralcavitysc.html> [Accessed 25.09.2025].
- GNEPP, D. R. & BISHOP, J. A. 2020. *Gnepp's Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck E-Book*, Elsevier Health Sciences.
- GUPTA, S., JAWANDA, M. K. & MADHUSHANKARI, G. S. 2020. Current challenges and the diagnostic pitfalls in the grading of epithelial dysplasia in oral potentially malignant disorders: A review. *J Oral Biol Craniofac Res*, 10, 788-799.
- HELLQUIST, H., CARDESA, A., GALE, N., KAMBIC, V. & MICHAELS, L. 1999. Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. *Histopathology*, 34, 226-33.
- HENDAWI, N., NIKLANDER, S., ALLSOBROOK, O., KHURRAM, S. A., BOLT, R., DOORBAR, J., SPEIGHT, P. M. & HUNTER, K. D. 2020. Human papillomavirus (HPV) can establish productive infection in dysplastic oral mucosa, but HPV status is poorly predicted by histological features and p16 expression. *Histopathology*, 76, 592-602.
- HENGSTERMANN, A., LINARES, L. K., CIECHANOVER, A., WHITAKER, N. J. & SCHEFFNER, M. 2001. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1218-23.
- HONDA, R., TANAKA, H. & YASUDA, H. 1997. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters*, 420, 25-27.
- HOSSEINPOUR, S., MASHHADIABBAS, F. & AHSAIE, M. G. 2017. Diagnostic Biomarkers in Oral Verrucous Carcinoma: A Systematic Review. *Pathol Oncol Res*, 23, 19-32.
- HU, W., FENG, Z. & LEVINE, A. J. 2012. The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. *Genes Cancer*, 3, 199-208.
- JIN, C. & LIANG, S. 2019. Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia: A Brief Review of Clinicopathologic Features. *Arch Pathol Lab Med*, 143, 768-771.
- JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. 2005. *Histologie*, Heidelberg, Springer Medizin.
- KIM, J., KANG, J.-H., NOH, M.-G., LEE, B., CHOI, Y.-D., KIM, O. J. & KIM, Y. 2024. New potential diagnostic markers for verrucous hyperplasia and verrucous carcinoma based on RNA-sequencing data. *Molecular and Cellular Probes*, 77, 101980.
- KO, Y. C. K., LIU, K. Y. P., CHEN, E., ZHU, S. Y. & POH, C. F. 2024. p53 Abnormal Oral Epithelial Dysplasias are Associated With High Risks of Progression and Local Recurrence-A Retrospective Study in a Longitudinal Cohort. *Mod Pathol*, 37, 100613.

Quellenverzeichnis

- KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M. & REED, J. C. 1996. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer Res*, 56, 2849-55.
- KRESTY, L. A., MALLERY, S. R., KNOBLOCH, T. J., LI, J., LLOYD, M., CASTO, B. C. & WEGHORST, C. M. 2008. Frequent alterations of p16INK4a and p14ARF in oral proliferative verrucous leukoplakia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17, 3179-87.
- LANE, D. P. 1992. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-16.
- LESCH, C., SQUIER, C., CRUCHLEY, A., WILLIAMS, D. & SPEIGHT, P. 1989. The permeability of human oral mucosa and skin to water. *Journal of dental research*, 68, 1345-1349.
- LEVINE, A. J. 2020. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer*, 20, 471-480.
- LI, C.-C., ALMAZROOA, S., CARVO, I., SALCINES, A. & WOO, S.-B. 2021. Architectural Alterations in Oral Epithelial Dysplasia are Similar in Unifocal and Proliferative Leukoplakia. *Head and Neck Pathology*, 15, 443-460.
- LINGEN, M. W., XIAO, W., SCHMITT, A., JIANG, B., PICKARD, R., KREINBRINK, P., PEREZ-ORDONEZ, B., JORDAN, R. C. & GILLISON, M. L. 2013. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*, 49, 1-8.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. 2024a. Allgemeine Histologie. In: LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. (eds.) *Taschenlehrbuch Histologie*. 7., vollständig überarbeitete Auflage ed. Stuttgart: Thieme.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. 2024b. Binde- und Stützgewebe. In: LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. (eds.) *Taschenlehrbuch Histologie*. 7., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Thieme.
- MACKENZIE, I. C., RITTMAN, G., GAO, Z., LEIGH, I. & LANE, E. B. 1991. Patterns of cytokeratin expression in human gingival epithelia. *J Periodontal Res*, 26, 468-78.
- MAHUL B. AMIN, S. B. E., FREDERICK L. GREENE, DAVID R. BYRD, ROBERT K. BROOKLAND, MARY KAY WASHINGTON, JEFFREY E. GERSHENWALD, CAROLYN C. COMPTON, KENNETH R. HESS, DANIEL C. SULLIVAN, J. MILBURN JESSUP, JAMES D. BRIERLEY, LAURI E. GASPAR, RICHARD L. SCHILSKY, CHARLES M. BALCH, DAVID P. WINCHESTER, ELLIOT A. ASARE, MARTIN MADERA, DONNA M. GRESS, LAURA R. MEYER 2016. *AJCC Cancer Staging Manual*, Springer Cham.
- MAI, K. T., HOGAN, K. & WASSERMAN, J. K. 2018. Laryngeal Squamous Cell Carcinomas are Commonly Associated With Differentiated Squamous Intraepithelial Neoplasia With or Without an Admixture With Usual Type of Squamous Intraepithelial Neoplasia: Clinical and Pathologic Significance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 26, 351-359.
- MASHBERG, A. & SAMIT, A. 1995. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA Cancer J Clin*, 45, 328-51.
- MEHANNA, H. M., RATTAY, T., SMITH, J. & MCCONKEY, C. C. 2009. Treatment and follow-up of oral dysplasia - a systematic review and meta-analysis. *Head Neck*, 31, 1600-9.
- MINAMI, K., KOGASHIWA, Y., EBIHARA, Y., NAKAHIRA, M., SUGASAWA, M., FUJINO, T. & YASUDA, M. 2017. Human papillomavirus and p16 protein

Quellenverzeichnis

- expression as prognostic biomarkers in mobile tongue cancer. *Acta Oto-Laryngologica*, 137, 1121-1126.
- MOLL, I., BAYERL, C., MEISSNER, M., ROSE, C., SCHOCH, D., SIEMANN-HARMS, U., VARWIG-JANßEN, D., WITTE, J. & KIMMIG, W. 2016. Allgemeine Dermatologie. In: MOLL, I. (ed.) *Duale Reihe Dermatologie*. 8. vollständig überarbeitete Auflage ed.: Thieme.
- MÜLLER, S., BOY, S. C., DAY, T. A., MAGLIOCCA, K. R., RICHARDSON, M. S., SLOAN, P., TILAKARATNE, W. M., ZAIN, R. B. & THOMPSON, L. D. R. 2019. Data Set for the Reporting of Oral Cavity Carcinomas: Explanations and Recommendations of the Guidelines From the International Collaboration of Cancer Reporting. *Arch Pathol Lab Med*, 143, 439-446.
- MULLER, S. & TILAKARATNE, W. M. 2022. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Head Neck Pathol*, 16, 54-62.
- MULLER, S., TILAKARATNE, W. M. & ODELL, E. W. 2023. Oral cavity and mobile tongue tumours. *WHO classification of head an neck tumours, 5th ed.* Lyon (France): International Agency for Research on Cancer.
- NAPIER, S. S. & SPEIGHT, P. M. 2008. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med*, 37, 1-10.
- NAUTA, I. H., HEIDEMAN, D. A. M., BRINK, A., VAN DER STEEN, B., BLOEMENA, E., KOLJENOVIC, S., BAATENBURG DE JONG, R. J., LEEMANS, C. R. & BRAKENHOFF, R. H. 2021. The unveiled reality of human papillomavirus as risk factor for oral cavity squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 149, 420-430.
- NEVILLE, B. W., DAMM, D. D., ALLEN, C. M. & CHI, A. C. 2023. *Oral and Maxillofacial Pathology-E-Book*, Elsevier Health Sciences.
- NOVACK, R., CHAPMAN, E., GAO, J., HORST, B., HOANG, L. N., NG, T. L. & KO, Y. C. K. 2023a. Utilization of p53 and p16 Immunohistochemistry in the Classification of Human Papillomavirus-Associated, p53 Wild-Type, and p53 Abnormal Oral Epithelial Dysplasia. *Mod Pathol*, 36, 100348.
- NOVACK, R., ZHANG, L., HOANG, L. N., KADHIM, M., NG, T. L., POH, C. F. & KEVIN KO, Y. C. 2023b. Abnormal p53 Immunohistochemical Patterns Shed Light on the Aggressiveness of Oral Epithelial Dysplasia. *Mod Pathol*, 36, 100153.
- ODELL, E., KUJAN, O., WARNAKULASURIYA, S. & SLOAN, P. 2021. Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. *Oral Dis*, 27, 1947-1976.
- PALIGA, A. & MAI, K. T. 2014. Squamous cell carcinomas of the anterior oral cavity are commonly associated with simplex (or differentiated) oral intraepithelial neoplasia: clinical and pathologic significance. *Int J Surg Pathol*, 22, 231-40.
- PARRA-HERRAN, C., NUCCI, M. R., SINGH, N., RAKISLOVA, N., HOWITT, B. E., HOANG, L., GILKS, C. B., BOSSE, T. & WATKINS, J. C. 2022. HPV-independent, p53-wild-type vulvar intraepithelial neoplasia: a review of nomenclature and the journey to characterize verruciform and acanthotic precursor lesions of the vulva. *Mod Pathol*, 35, 1317-1326.
- PATERAS, I. S., IGEA, A., NIKAS, I. P., LEVENTAKOU, D., KOUFOPOULOS, N. I., IERONIMAKI, A. I., BERGONZINI, A., RYU, H. S., CHATZIGEORGIOU, A., FRISAN, T., KITTAS, C. & PANAYIOTIDES, I. G. 2024. Diagnostic Challenges during Inflammation and Cancer: Current Biomarkers and Future Perspectives in Navigating through the Minefield of Reactive versus Dysplastic and Cancerous

Quellenverzeichnis

- Lesions in the Digestive System. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 1251.
- PETTI, S. 2003. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol*, 39, 770-80.
- PIM, D., STOREY, A., THOMAS, M., MASSIMI, P. & BANKS, L. 1994. Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene*, 9, 1869-76.
- PINTO, A. P. & CRUM, C. P. 2000. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. *Clin Obstet Gynecol*, 43, 352-62.
- PITIYAGE, G., TILAKARATNE, W. M., TAVASSOLI, M. & WARNAKULASURIYA, S. 2009. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol Med*, 38, 737-52.
- PODOLL, M. B., SINGH, N., GILKS, C. B., MOGHADAMFALAH, M. & SANDERS, M. A. 2017. Assessment of CK17 as a Marker for the Diagnosis of Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*, 36, 273-280.
- POETA, M. L., MANOLA, J., GOLDWASSER, M. A., FORASTIERE, A., BENOIT, N., CALIFANO, J. A., RIDGE, J. A., GOODWIN, J., KENADY, D., SAUNDERS, J., WESTRA, W., SIDRANSKY, D. & KOCH, W. M. 2007. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 357, 2552-61.
- PURGINA, B., HASSAN, M., OLBERG, B., LAI, C. K. & MAI, K. T. 2015. Histopathogenesis of non-HPV-related differentiated oral squamous intraepithelial neoplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 23, 273-9.
- REIBEL, J., GALE, N., HILLE, J., HUNT, J., LINGEN, M., MULLER, S., SLOAN, P., TILAKARATNE, W., WESTRA, W. & WILLIAMS, M. 2017. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. *WHO classification of head and neck tumours, 4th edition*, 9, 112.
- REICHART, P. A. & PHILIPSEN, H. P. 2005. Oral erythroplakia--a review. *Oral Oncol*, 41, 551-61.
- REYES, M. C. & COOPER, K. 2014. An update on vulvar intraepithelial neoplasia: terminology and a practical approach to diagnosis. *J Clin Pathol*, 67, 290-4.
- RILEY, R. R., DUENSING, S., BRAKE, T., MÜNGER, K., LAMBERT, P. F. & ARBEIT, J. M. 2003. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res*, 63, 4862-71.
- SCARTH, J. A., PATTERSON, M. R., MORGAN, E. L. & MACDONALD, A. 2021. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *J Gen Virol*, 102.
- SCHEFFNER, M., WERNES, B. A., HUIBREGTSE, J. M., LEVINE, A. J. & HOWLEY, P. M. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63, 1129-36.
- SCHWARZ-FURLAN, S. 2013. *Pathologie und histopathologische Prognosefaktoren oraler Karzinome* [Online]. ZWP online. Available: <https://www.zwp-online.info/fachgebiete/oralchirurgie/mundschleimhautrekrankungen/pathologie-und-histopathologische-prognosefaktoren-oraler-karzinome> [Accessed 25.09.2025].
- SINGH, N., LEEN, S. L., HAN, G., FARUQI, A., KOKKA, F., ROSENTHAL, A., JIANG, X. R., KIM, R., MCALPINE, J. N. & GILKS, C. B. 2015. Expanding the

Quellenverzeichnis

- Morphologic Spectrum of Differentiated VIN (dVIN) Through Detailed Mapping of Cases With p53 Loss. *The American Journal of Surgical Pathology*, 39, 52-60.
- SINGH, R. D., PATEL, K. R. & PATEL, P. S. 2016. "p53 mutation spectrum and its role in prognosis of oral cancer patients: A study from Gujarat, West India". *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 783, 15-26.
- SLOAN, P., GALE, N., HUNTER, K., LINGEN, M., NYLANDER, K., REIBEL, J., SALO, T. & ZAIN, R. B. 2017. *WHO classification of tumours of the head and neck: Malignant surface epithelial tumours: Squamous cell carcinoma*, Lyon, IARC Press.
- SMOTKIN, D. & WETTSTEIN, F. O. 1986. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4680-4.
- SONG, Y.-M. J., H.-J. 2005. *Recipient Block and Method for Preparation Thereof*. U.S. patent application.
- SQUIER, C. A. & KREMER, M. J. 2001. Biology of Oral Mucosa and Esophagus. *JNCI Monographs*, 2001, 7-15.
- SU, L., MORGAN, P. R. & LANE, E. B. 1996. Keratin 14 and 19 expression in normal, dysplastic and malignant oral epithelia. A study using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Journal of oral pathology & medicine*, 25, 293-301.
- THOMAS, M. C. & CHIANG, C. M. 2005. E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Mol Cell*, 17, 251-64.
- THOMPSON, E. F., SHUM, K., WONG, R. W. C., TREVISAN, G., SENZ, J., HUVILA, J., LEUNG, S., HUNTSMAN, D. G., GILKS, C. B., MCALPINE, J. N., HOANG, L. & JAMIESON, A. 2022. Significance of p53 and presence of differentiated vulvar intra-epithelial neoplasia (dVIN) at resection margin in early stage human papillomavirus-independent vulvar squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*.
- TILAKARATNE, W. M., KLINIKOWSKI, M. F., SAKU, T., PETERS, T. J. & WARNAKULASURIYA, S. 2006. Oral submucous fibrosis: review on aetiology and pathogenesis. *Oral Oncol*, 42, 561-8.
- TOMAIĆ, V. 2016. Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. *Cancers (Basel)*, 8.
- TOMAKIDI, P., BREITKREUTZ, D., FUSENIG, N. E., ZOLLER, J., KOHL, A. & KOMPOSCH, G. 1998. Establishment of oral mucosa phenotype in vitro in correlation to epithelial anchorage. *Cell Tissue Res*, 292, 355-66.
- TOWNSEND, M., KEJNER, A. E., NOUROLLAH-ZADEH, F., RIZZANTE, F. A. P., WOODS, T. R., RATHORE, S., ALTERMAN, D., TEICH, S., ALBERGOTTI, W. G., NEWMAN, J. G. & YOON, A. J. 2024. Eradication of proliferative verrucous leukoplakia with toll-like receptor 7 agonist (topical imiquimod): a case report. *Front Oncol*, 14, 1473889.
- ULFIG, N. 2019. Die Basalmembran. In: ULFIG, N. (ed.) *Kurzlehrbuch Histologie*. 5., unveränderte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG.
- UMAPATHY, V. R., NATARAJAN, P. M. & SWAMIKANNU, B. 2023. Review Insights on Salivary Proteomics Biomarkers in Oral Cancer Detection and Diagnosis. *Molecules*, 28.
- VANI, N. V., RAMA, R., MADHANAGOPAL, R., VIJAYALAKSHMI, R. & SWAMINATHAN, R. 2024. Human Papillomavirus–Attributable Head and Neck

Quellenverzeichnis

- Cancers in India—A Systematic Review and Meta-Analysis. *JCO Global Oncology*, e2300464.
- VOGEL, U. 2014. Overview on Techniques to Construct Tissue Arrays with Special Emphasis on Tissue Microarrays. *Microarrays (Basel)*, 3, 103-36.
- VOGEL, U. & MORSCH, M. 2025. 1180 Differentiated Type Squamous Intraepithelial Neoplasia (dSIN) in Oral and Oropharyngeal Mucosa is a Distinct Subtype of Oral Potentially Malignant Disorders. *Laboratory Investigation*, 105.
- VOGEL, U. F. & BUELTMANN, B. D. 2006. Simple, inexpensive, and precise paraffin tissue microarrays constructed with a conventional microcompound table and a drill grinder. *Am J Clin Pathol*, 126, 342-8.
- WARNAKULASURIYA, S. 2009. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*, 45, 309-16.
- WARNAKULASURIYA, S., JOHNSON, N. W. & VAN DER WAAL, I. 2007. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*, 36, 575-80.
- WARNAKULASURIYA, S., REIBEL, J., BOUQUOT, J. & DABELSTEEN, E. 2008. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 37, 127-133.
- WASSERMAN, J. K., BATEMAN, J. & MAI, K. T. 2016. Differentiated squamous intraepithelial neoplasia associated with squamous cell carcinoma of the anal canal. *Histopathology*, 68, 834-42.
- WEI, J., NAGY, T. A., VILGELM, A., ZAIKA, E., OGDEN, S. R., ROMERO-GALLO, J., PIAZUELO, M. B., CORREA, P., WASHINGTON, M. K., EL-RIFAI, W., PEEK, R. M. & ZAIKA, A. 2010. Regulation of p53 tumor suppressor by Helicobacter pylori in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*, 139, 1333-43.
- WERNES, B. A., LEVINE, A. J. & HOWLEY, P. M. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248, 76-9.
- WHO 2020. *WHO Classification of Tumours: Female Genital Tumours Volume 4*, IARC.
- WILKENS, L. 2003. *Verfahren und Vorrichtung zur präparation von Gewebeproben*. Germany patent application.
- WILS, L. J., POELL, J. B., EVREN, I., KOOPMAN, M. S., BROUNS, E., DE VISSCHER, J., BRAKENHOFF, R. H. & BLOEMENA, E. 2020. Incorporation of differentiated dysplasia improves prediction of oral leukoplakia at increased risk of malignant progression. *Mod Pathol*, 33, 1033-1040.
- WILS, L. J., POELL, J. B., PEFEROEN, L. A. N., EVREN, I., BROUNS, E. R., DE VISSCHER, J., VAN DER MEIJ, E. H., BRAKENHOFF, R. H. & BLOEMENA, E. 2023. The role of differentiated dysplasia in the prediction of malignant transformation of oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*, 52, 930-938.
- WINNING, T. A. & TOWNSEND, G. C. 2000. Oral mucosal embryology and histology. *Clinics in Dermatology*, 18, 499-511.
- YOUNG, R. 2014. WHO classification of tumours of female reproductive organs. *Monodermal Teratomas and Somatic-Type Tumours Arising from a Dermoid Cyst*. WHO, 170-171.
- ZAFEREO, M. E., XU, L., DAHLSTROM, K. R., VIAMONTE, C. A., EL-NAGGAR, A. K., WEI, Q., LI, G. & STURGIS, E. M. 2016. Squamous cell carcinoma of the oral cavity often overexpresses p16 but is rarely driven by human papillomavirus. *Oral Oncology*, 56, 47-53.
- ZIDAR, N., BISHOP, J. A., VIGNESWARAN, N., BINTI ZAIN, R. & WOO, S. 2023. Verrucous carcinoma of the oral cavity and mobile tongue. *In: MULLER, S.,*

Quellenverzeichnis

ODELL, E. & TILAKARATNE, W. M. (eds.) *WHO classification of tumours editorial board. Head and neck. 5th ed.* Lyon: International Agency for Research on Cancer.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik Tübingen am Institut für Pathologie und Neuropathologie unter Betreuung von Herrn PD Dr. Ulrich Vogel durchgeführt. Die Konzeption der Studie sowie die Korrektur des Manuskripts erfolgte durch Herrn PD Dr. Ulrich Vogel. Die Patientenrecherche wurde nach Einweisung durch die Mitarbeitenden des Institutes eigenständig durchgeführt. Die Tissue Microarrays wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Ulrich Vogel hergestellt, die Herstellung der Schnitte erfolgte nach Einweisung durch PD Dr. Ulrich Vogel eigenständig. HE-Färbungen und immunhistochemische Färbungen wurden vom Routinelabor und vom immunhistochemischen Labor des Institutes durchgeführt. Die histopathologische und immunhistochemische Auswertung erfolgte im Gesamten durch mich unter Supervision von Herrn PD Dr. Ulrich Vogel. Die Digitalisierung der Schnitte erfolgte eigenständig. Die deskriptiv-statistische Auswertung erfolgte ebenfalls ausschließlich eigenständig.

Die erhobenen Daten wurden von Herrn PD Dr. Ulrich Vogel und mir zur Erstellung eines Posters „Differentiated Type Squamous Intraepithelial Neoplasia (dSIN) in Oral and Oropharyngeal Mucosa is a Distinct Subtype of Oral Potentially Malignant Disorders“ für das United States and Canadian Academy of Pathology's (USCAP) 114. Jährliches Meeting, 22.-27. März 2025, in Boston, Massachusetts Kongress genutzt und sind in dem Journal „Laboratory Investigations“ von 2025, Abstract Nr. 1180, unter der DOI:10.1016/j.labinv.2024.103415 einzusehen.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Melanie Desire Beatrix Morsch

8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. Ulrich Vogel für seine mühelose Erreichbarkeit bei der Erhebung der Daten, seine Geduld bei zeitlichen Schwierigkeiten und seine Unterstützung bei der Durchführung unserer Studie bedanken. Die produktiven Gespräche und der konstruktive Austausch haben diese Arbeit möglich gemacht.

Ebenso danke ich Alexandra Baicu und Aleksander Slomiany für ihre Gastfreundschaft sowie Anna-Lisa Schlaipfer für ihr Organisationstalent. Gleichfalls danke ich Maike Werkes, die mich an viele Orte begleitet hat, an denen diese Arbeit entstehen konnte.

Ein besonderer Dank geht an Yacine Maringer für ihre Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit sowie an Enno Nölke, Christina Schulte und Julia Kuhnel, die mir stets zur Seite standen und mich jederzeit motiviert haben.