

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Wiederkehrende chromosomale und epigenetische
Veränderungen beim oralen Plattenepithelkarzinom und
dem potentiell prämaligen oralen Lichen planus**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Christopher Georg Németh

aus Erlangen

Kiel 2019

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Dr. Volker Gaßling, Praxis für Mund-, Kiefer-
und Gesichts chirurgie

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Christof Dörfer, Klinik für Zahnerhaltungskunde
und Parodontologie

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel den 04.09.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Kopf- und Halskarzinome	1
1.2 Chronische Entzündungen und Oraler Lichen Planus	3
1.3 Chromosomale und epigenetische Veränderungen	4
1.4 Fragestellung.....	6
2 Material und Methoden	7
2.1 Chemikalien	7
2.2 Instrumente	7
2.3 Software.....	8
2.3.1 Illumina GenomeStudio Software.....	8
2.3.2 R Foundation R-Software	9
2.3.3 GraphPad Prism	9
2.3.4 Qlucore OMICS Explorer	10
2.3.5 GOrilla-Tool.....	10
2.4 Allgemeiner Ablauf der Studie	10
2.5 Patientenrekrutierung.....	11
2.6 Kontrolle auf HPV-Infektion	15
2.7 DNA-Isolierung und Bisulfit-Konvertierung	15
2.8 Array-basierte DNA-Methylierungsanalyse.....	17
2.9 Analyse chromosomaler Alterationen und des Chromosomenstatus.....	18
2.10 Untersuchung des Methylierungsalters.....	18
2.11 Gen-Ontologie-Analyse	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Wiederkehrende chromosomale Veränderungen beim OLP und dem OSCC.....	20
3.2 Identifizierung sich wiederholender aberranter Methylierungen an CpG-Loci beim OLP und dem OSCC.....	25
3.3 Lokalisierung abweichend methylierter CpG-Loci an Regionen verschiedener Chromosomenzustände.....	27
3.4 Gen-Ontologie-Analyse	29
3.5 OLP als mögliche Vorgängerläsion des OSCC.....	30

3.6 Der Einfluss exogener Noxen auf das DNA-Methylom beim OLP und OSCC.....	32
3.7 Das epigenetische Alter der OLP- und OSCC-Proben.....	32
4 Diskussion.....	34
5 Zusammenfassung	37
6 Literaturverzeichnis	38
7 Danksagung	46

Abkürzungen

ANOVA	Analysis Of Variance = Varianzanalyse
CNV	copy number variations = Veränderungen der Kopienzahl
CpG	Cytosin-Guanosin-Dinukleotid
CRC	colorectal carcinoma = kolorektales Karzinom
DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
FDR	false discovery rate
GO	Gene Ontology = Gen-Ontologie
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HNSCC	Head and Neck squamous cell carcinoma = Kopf- und Halskarzinom
HPV	humanes Papillomavirus
kb	Kilobasen
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
OLL	orale lichenoidale Läsion
OLP	oraler Lichen planus
OR	Odds-Ratio
OSCC	oral squamous cell carcinoma = orales Plattenepithelkarzinom
PCA	principal component analysis = Hauptkomponentenanalyse
PCR	polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
SNP	single nucleotide polymorphisms = Einzelnukleotid-Polymorphismen
UC	ulcerative colitis = Colitis ulcerosa

1 Einleitung

1.1 Kopf- und Halskarzinome

An einem Kopf- und Halskarzinom (Head and Neck squamous cell carcinoma (HNSCC)) erkranken jährlich ca. 700.000 Menschen weltweit (1). Es ist somit die sechsthäufigste Ursache krebserkrankter Todesfälle (2). Die am häufigsten auftretende Entität ist dabei das orale Plattenepithelkarzinom (oral squamous cell carcinoma (OSCC)) der Lippen, der Mundhöhle und des Pharynx, welches 2012 mit einer weltweiten Inzidenz von 529.500 und einer Mortalität von 292.300 Fällen auftrat (1). Die Fünf-Jahres-Überlebensrate des OSCC in Deutschland liegt für Frauen und Männer bei rund 55% (3) und das Risiko im Leben einmal an einem OSCC zu erkranken beträgt ca. 1,85% für Männer und 0,37% für Frauen (4). Hauptrisikofaktoren sind der Tabak- und Alkoholabusus, wobei das Risiko einer bösartigen Entartung bei alleinigem Tabakabusus bis zu 6-fach, bei einer Kombination von Alkohol- und Tabakabusus bis zu 30-fach erhöht ist (5). Dabei führt vor allem der Hauptmetabolit des Alkohols, Acetaldehyd, zu DNA-Schäden nach exzessivem Alkoholabusus. Ferner entstehen Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten, die zu oxidativem Stress führen (6, 7). Bei gleichzeitigen Tabak- und Alkoholabusus erhöht Alkohol zum einen die Permeabilität des Epithels wodurch kanzerogene Substanzen in tiefere Gewebeschichten eindringen können (8), zum anderen werden durch den Alkohol Bestandteile des Tabakrauches chemisch verändert und somit in ihrer kanzerogenen Wirkung noch potenziert (7). Insgesamt sind Tabak- und Alkoholabusus für über 75% der OSCC verantwortlich (9). Ein weiterer Risikofaktor sind chronische Infekte. Harald zur Hausen entwickelte und publizierte bereits in den 1970er Jahren die Hypothese, dass Infektionen an der Krebsentstehung beteiligt sind. Dabei untersuchte er die Rolle des humanen Papillomavirus (HPV) bei der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs. Er konnte in den 1980er Jahren erstmals die Subtypen HPV 16 und 18 aus entsprechendem Krebsgewebe isolieren. Das HPV ist ein doppelsträngiges DNA-Virus, welches Epithelzellen infiziert und zu einem unkontrollierten Wachstum führen kann. Es gehört zusammen mit einigen anderen Viren zu den sogenannten Onkoviren, welche weltweit an 10 bis 15 Prozent aller Krebserkrankungen beteiligt sind (10). Einzelne Genprodukte des HPV, insbesondere die Onkoproteine E6 und E7, führen zu einer Verhinderung der Apoptose durch Unterdrückung des Tumorsuppressorproteins p53 durch E6 und des Retinoblastomsuppressorproteins Rb

durch E7 sowie eine aberrante Telomeraseexpression (9). Heute sind HPV 16 und 18 nachgewiesenermaßen auch für die Entstehung eines Teils von oropharyngealen Tumoren (oropharyngeal squamous cell carcinoma) verantwortlich (11-13). Diese Tumorentität betrifft eher junge Patienten, die nicht die typischen Risikofaktoren wie Rauchen und Alkohol aufweisen (14, 15). HPV-positive Tumoren bilden dabei eine eigene Gruppe mit anderen genetischen Eigenschaften als HPV-negative Tumoren (16). Das Mundhöhlenkarzinom kann sich auch auf der Basis einer so genannten Präkanzerose, das heißt einer Gewebsveränderung, die ein erhöhtes Risiko zur malignen Entartung zeigt, entstehen. Dabei wird zwischen fakultativen und obligaten Präkanzerosen unterschieden, wobei fakultative Präkanzerosen ein eher geringes Risiko der bösartigen Transformation binnen fünf Jahren zeigen und obligate Präkanzerosen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in diesem Zeitraum entarten. Ein Beispiel für eine fakultative Präkanzerose ist die Leukoplakie, welche im einfachsten Fall eine einfache Verhornungsstörung darstellt. Sie ist von der World Health Organization (WHO) als weiße nicht abwischbare Mundschleimhautveränderung, die keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann, definiert. In komplizierten Fällen findet man hier Dysplasien, die leicht-, mittel- oder schwergradig sein können. Daher ist hier im Rahmen der Diagnostik eine histologische Untersuchung zwingend notwendig. Ein Beispiel für eine obligate Präkanzerose ist die Erythroleukoplakie. Das Behandlungskonzept des OSCC umfasst im Wesentlichen die chirurgische Entfernung des Primärtumors, die Bestrahlung des Tumorgebietes sowie der regionären Lymphabflusswege am Hals und eventuell eine systemische Chemotherapie. Die Entscheidung hängt hierbei ab vom Wachstumstyp des Tumors (Grading) und von einer möglichen Streuung (Metastasierung) des Tumors in das Lymph- und Blutgefäßsystem. Aber auch weitere histologische Parameter wie z.B. der Kapseldurchbruch einer Lymphknotenmetastase oder das Einwachsen des Tumors in umgebende Nervenfasern spielen in Hinsicht auf das Therapiekonzept eine Rolle. Wie bereits oben erwähnt versterben trotz eines umfassenden Therapiekonzeptes des OSCC in den ersten fünf Jahren rund 50 Prozent der betroffenen Patienten an dieser bösartigen Erkrankung. Daher werden dringend weitere Erkenntnisse über die Pathogenese des OSCC benötigt, um somit neue präventive und therapeutische Strategien zu entwickeln.

1.2 Chronische Entzündungen und Oraler Lichen Planus

Chronische Entzündungsvorgänge des Gewebes sind ein ganz wesentliches Kennzeichen der Tumorentstehung, welche sich im Spannungsbogen zwischen Genetik und Umgebungsfaktoren abspielen (17-20). Ein bekanntes Beispiel für den Zusammenhang von chronischer Entzündung und Krebsentstehung ist die Colitis ulcerosa (UC = ulcerative colitis), eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die ein mehrfach höheres Risiko der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms (CRC = colorectal carcinoma) zeigt. Bis zu 20% der CU-Patienten entwickeln binnen 30 Jahren ein CRC, wobei hier nicht die für das sporadische CRC typische Adenom-Karzinom-Sequenz stattfindet (21, 22). Vielmehr kann der chronische Entzündungsreiz zur Entwicklung von low- und high-grade Dysplasien führen, welche bis zur malignen Entartung voranschreiten können (22). Dieser kontinuierliche Entzündungsreiz mit seinen Auswirkungen auf die lokale Zellproliferation findet sich auch im Mundbereich in Form des oralen Lichen planus (OLP). Die Mundhöhle mit ihren speziellen vorherrschenden Bedingungen wie bakteriellen und viralen Infektionen oder immer wiederkehrenden chemischen Irritationen stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung chronisch entzündlicher Mundschleimhautveränderungen dar. Diese chronischen Entzündungsprozesse, wie sie auch beim OLP auftreten, sind ein vielfach diskutierter und anerkannter Faktor für die maligne Transformation des betroffenen Gewebes (17, 20, 23-25). Der OLP stellt die orale Manifestation der Dermatose Lichen ruber planus dar, welcher auch als Knötchenflechte bezeichnet wird. Im Gegensatz zur kutanen Form ist der OLP eine chronische, weiße, nicht abwischbare Mundschleimhautveränderung mit einer Prävalenz von 0,5 und 2,2% (26). Er ist eine T-Zell-vermittelte mukokutane entzündliche Erkrankung unbekannter Ätiologie (25). In der zweiten Ausgabe der "International histological classification of tumours: histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa" der WHO wird er als sogenannte prä-maligne bzw. präkanzeröse Kondition oder fakultative Präkanzerose bezeichnet. Die Transformationsrate liegt zwischen 0 und 5.6% (27). Histologisch erkennt man eine Hyperkeratose, Basalzelldegeneration, damit verbunden Bläschenbildung und ein lymphozytäres Zellinfiltrat (28), was ebenfalls auf eine entzündungsbedingte Genese hinweist. Die histologisch erkennbaren T-Lymphozyten infiltrieren das Schleimhautgewebe und richten ihre Abwehrreaktion gegen die basalen Keratozyten, dies sind die unteren Hautschuppzellen, weshalb der Lichen planus auch autoimmune Komponenten aufweist. Neben dem OLP gibt es noch die so genannten oralen lichenoiden Läsionen (OLL). Zu den OLL

zählen all die Veränderungen, die dem OLP ähnlich sind, jedoch nicht sowohl klinisch als auch histopathologisch als solcher diagnostiziert wurden und die meist durch einen zuweisbar auslösenden Reiz wie beispielsweise mechanische Irritationen durch scharfkantigen Zahnersatz, chemische Irritationen durch scharfe und stark gewürzte Speisen oder Zahnersatzmaterialien wie Amalgam entstanden sind. Dieser klare Zusammenhang mit einem entsprechenden angrenzenden Reiz ist dabei ein wichtiger Faktor bei der Unterscheidung zwischen OLP und OLL (26, 29-31). Bis heute ist nur wenig über das maligne Potenzial des OLP und die zugrunde liegenden molekularen Veränderungen, die bei der Karzinogenese eine Rolle spielen, bekannt.

1.3 Chromosomale und epigenetische Veränderungen

Man geht heute davon aus, dass prädisponierende Faktoren, wie Rauchen, Alkohol und chronische Infekte zu genetischen und epigenetischen Veränderungen führen, und so die genomische Instabilität, Tumorentstehung und Tumorprogression fördern. Neben den genetischen Veränderungen sind es v.a. epigenetische Veränderungen, d.h. alle Mechanismen, die zu einer Veränderung der Genexpression beitragen ohne Änderung der DNA-Sequenz, die eine wesentliche Rolle bei der Tumorentstehung haben. Die menschliche DNA ist aus zwei als Doppelhelix angeordneten Desoxyribonukleinsäure-Strängen aufgebaut. Sie besteht aus dem Zucker Desoxyribose, einem Phosphatrest und vier daran gebundenen organischen Basen. Diese sind Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T), die innerhalb des Doppelstranges Basenpaarungen von A-T sowie C-G eingehen. Die bestimmte Basenreihenfolge des gesamten DNA-Stranges macht den genetischen Code eines Individuums aus und wird als Basensequenz der DNA bezeichnet. Dabei bilden verschiedene Abschnitte mit individueller Basenfolge in der DNA verschiedene Gene, die wiederum für im Körper wichtige Proteine oder RNA kodieren. In menschlichen Zellen liegt die DNA nicht frei vor. Sie ist, mit Ausnahme der mitochondrialen DNA, in Form von Chromatin bzw. Chromosomen durch Proteine, insbesondere Histone, aufgewickelt. Kommt es auf genetischer Ebene durch Einwirkung von außen oder durch fehlerhafte Reparaturmechanismen der DNA zu einer Abänderung dieser Basensequenzen, so kann ein Gen seine Funktion verlieren. Lange war man der Ansicht, dass die Krebsentstehung durch die bereits zuvor erwähnte Veränderung der Gensequenz verursacht wird. In den letzten

Jahrzehnten sind jedoch die epigenetischen Veränderungen immer mehr in den Fokus der Tumorforschung gerückt worden, nachdem man erkannte, dass die alleinige Erklärung der Tumorentstehung durch veränderte Gensequenzen nicht ausreicht, um diese vollständig zu erklären. So galt bisher beispielsweise das Dogma der Biologie, dass ein Gen für ein Protein kodiert. Spätestens aber seit dem Abschluss des humanen Genomprojektes im Jahr 2003 weiß man, dass dies so nicht stimmt. Ein weiterer wesentlicher Grund hierfür waren auch Erkenntnisse aus der Zwillingsforschung, die zeigten, dass der Gesundheitszustand eineiiger Zwillinge im Laufe ihres Lebens unterschiedlich war (32). So konnte es sein, dass der eine Zwilling z.B. an Diabetes mellitus erkrankte und der andere nicht, obwohl sie genetisch isogen, also identisch sind (33). Heute weiß man, dass die Gene über epigenetische Mechanismen in Abhängigkeit von Umweltfaktoren (wie z.B. Rauchen, Alkohol oder Stress) gesteuert werden. Zu diesen Mechanismen gehören die DNA-Methylierungen, die Histon-Modifikationen und die Mikro-RNAs (34). Bei Letzteren handelt es sich um kleine, nicht Protein kodierende RNA-Moleküle, welche die Boten-RNAs (mRNAs) und somit die Expression von Genen regulieren. Histone sind, wie zuvor kurz erwähnt, eine Gruppe basischer Proteine, welche die DNA in Form von Chromosomen aufwickeln. Histonmodifikationen finden durch Azetylierungen, Phosphorylierungen, Methylierungen und einige weitere Mechanismen statt. Dabei erfolgen die epigenetischen Regulationen vor allem durch zwei Mechanismen: zum einen durch direkte Chromatinstrukturveränderungen zum anderen durch die Beeinflussung der Bindungshäufigkeit von Effektormolekülen (35). Die DNA-Methylierungen wiederum sind der am häufigsten vorkommende und bestuntersuchte epigenetische Regulationsmechanismus und finden an der DNA-Doppelhelix statt (36). Sie sind epigenetische Modifikationen der DNA, die durch Methyltransferasen Cytidine in Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden (CpG) methylieren. Diese CpGs finden sich gehäuft in den Promotoren von Genen. Dies sind Nukleotidsequenzen, die die regulierte Expression eines Gens ermöglichen (37). Methylierungen von Promotoren der DNA werden z.B. als Mechanismus der Ruhigstellung von Tumorsuppressorgenen angesehen (38, 39) und spielen eine wichtige Rolle bei der Progression einer malignen Entartung (40, 41). Aberrante Methylierungsmuster wurden bereits mit der Entstehung und Progression einer Vielzahl von Erkrankungen und Krebsarten assoziiert (42). Sie sind beteiligt an der Aktivierung von Onkogenen oder der Suppression von Tumorsuppressorgenen (34) und wurden auch mehrfach für Kopf-Hals-Tumoren beschrieben (43-46). In einer Studie mit 138 solcher Tumoren beschrieben die Autoren, dass Hypomethylierungen und genspezifische

Methylierungsprozesse zur malignen Entartung führen können (47). Andere Studien ergaben, dass beispielsweise p16[CDKN2A]- und miR-137-Promoter-Methylierungen mit einer Häufigkeit von 25 und 35% bei OLP-Patienten und 50 und 58.3% bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom auftraten, während keiner der untersuchten klinisch gesunden Patienten eine derartige Veränderung aufwies (48). Weitere genetische und epigenetische Veränderungen sind beispielsweise im Bereich der Gene TP53, FBXW7, HRAS, CDK2NA oder PIK3CA (49), PRC1 und PRC2 (polycomb repressive reflexes) zu finden (50-59). Auch beim OSCC spielen DNA-Methylierungen eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese (34) und laufen in entzündeten Geweben beschleunigt ab (60). Jedoch gibt es bislang nur wenige Studien, welche die epigenetischen Methylierungsmuster und Veränderungen beim OLP nachzuweisen versuchten (61, 62). Dabei sind Methylierungen als wichtiger Biomarker bei der Identifizierung früher Stadien von Kopf-Hals-Tumoren beschrieben worden (39).

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollten genetische und epigenetische Veränderungen, insbesondere aberrante Methylierungen, beim OSCC und dem potentiell prämaligen OLP untersucht werden. Im Speziellen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es wiederkehrende chromosomale Veränderungen beim OLP und dem OSCC im Vergleich zu gesundem Gewebe?
2. Gibt es wiederkehrende aberrante Methylierungen an CpG-Loci beim OLP und dem OSCC?
3. Gibt es Hinweise, dass der OLP als mögliche Vorgängerläsion des OSCC angesehen werden kann?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Zell-Lyse-Lösung	Qiagen, Niederlande
Protein-Ausfällungs-Lösung	Qiagen
DNA-Hydratations-Lösung	Qiagen
RNase-A-Lösung	Qiagen
Puregene Proteinase K	Qiagen
100% Isopropanol	Merck, Deutschland
70% Ethanol	Merck
Wasserbad	
Eis (gemahlen)	
Flüssig-Stickstoff	
Lokalanästhetikum Ultracain D-S	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

2.2 Instrumente

Stanze	Kai Medical, Japan
Skalpell	FEATHER, Japan
Nahtmaterial	Resorba, Deutschland
Nadelhalter	Aesculap, Deutschland
Schere	Aesculap
HumanMethylation450K BeadChip	Illumina, USA
QIAamp DNA Mini Kits	Qiagen, Deutschland

Gentra Puregene Kit	Qiagen
EZ DNA Methylation Kit	Zymo Research, USA
iScan System	Illumina
Pipetten & Pipettenansätze	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf AG

2.3 Software

GenomeStudio Software	Illumina, USA
R-Software	R Foundation, International
Prism	GraphPad Software, USA
OMICS Explorer	Qlucore, Schweden
GOrilla-Tool	Technion, Israel
Excel 2010	Microsoft, USA

2.3.1 Illumina GenomeStudio Software

Die Illumina GenomeStudio Software erlaubt die primäre Analyse von Sequenzierungs- und Microarray-Daten, die unter Verwendung von Illumina Arrays erbracht wurden. Dazu besteht sie aus acht eigenständigen Modulen zum Vergleich verschiedener Anwendungsdaten, um einen umfassenden Blick auf das Genom, die Genexpression und -regulation zu erhalten. Diese 8 Module sind:

- Ein DNA-Sequenzierungs-Modul
- Ein RNA-Sequenzierungs-Modul
- Ein ChIP-Sequenzierungs-Modul
- Ein Geotypisierungs-Modul
- Ein Gen-Expressions-Modul
- Ein Methylierungs-Modul
- Ein Protein-Analyse-Modul

- Ein polyploides Clustering-Modul

Dabei erlaubt die Illumina GenomeStudio Software eine Darstellung von einem allgemeinen Überblick über die Gesamtheit der erfassten Daten bis hin zur Auflösung einzelner Basenabfolgen zur genauen Bestimmung individueller Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP = single nucleotide polymorphisms), des Methylierungsstatus einzelner CpG-Loci, o.ä. Für unsere Forschung wurde die Software-Version 2011.1 mit dem Methylierungs-Analyse-Modul in Version 1.9.0 verwendet.

2.3.2 R Foundation R-Software

Die R-Software der R Foundation ist ein, dank öffentlich zugänglichen Quelltextes, relativ flexibles Programm, das der Programmiersprache „S“ ähnelt und häufig zur statistischen Datenbearbeitung, Berechnung, Auswertung und grafischen Darstellung genutzt wird. Dank des offenen Systems der R-Software können somit auch selbst geschriebene Module und Skripte für die individuellen eigenen Bedürfnisse erstellt werden, um optimale Ergebnisse zu erhalten. Diese können mit zahlreichen anderen Programmen für statistische Analysen verbunden und somit deren Funktionsumfang erweitert werden. In unseren Analysen verwendeten wir das Zusatzmodul „CopyNumber450k“ unter den Standardeinstellungen für den HumanMethylation450k BeadChip (*bereitgestellt von Papillon-Cavanagh S, Fortin J, Jay ND and Majewski J (2013). „CopyNumber450k: an R package for CNV inference using Illumina 450k DNA methylation assay.“*). Als Vergleich dienten hierbei die dem R-Paket beiliegenden Kontrolldaten (R-Paket „CopyNumber450kData“). Das Signifikanzniveau lag dabei bei $P < 0,01$. Darüber hinaus wurden Chi-Square und weitere statistische Tests durch die R- und Prism-Software (GraphPadSoftware, San Diego, CA) in Version 4.02 angewandt.

2.3.3 GraphPad Prism

Prism der Firma GraphPad aus Kalifornien, USA, ist eine Statistik-Software zur zweidimensionalen Darstellung statistischer Daten. Sie bietet unter anderem die Möglichkeit von Analysen nichtlinearer Regressionen, t-tests, nicht-parametrischer Vergleiche, ein-, zwei- oder dreiwegiger ANOVA (Analysis Of Variance), Kontingenztabelle oder Überlebensanalysen.

2.3.4 Qlucore OMICS Explorer

Der Qlucore OMICS Explorer der schwedischen Firma Qlucore ermöglicht es statistische Methoden mit Echtzeit-Visualisierung und einer grafischen Oberfläche in 2D- und 3D-Ausgabe zu kombinieren. So können mit Hilfe des Qlucore OMICS Explorer unter anderem:

- Gen-Expressionen: RNA-Seq., Microarrays, Echtzeit-PCR (polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion)
- miRNA: Mikroarrays, Echtzeit-PCR
- DNA-Methylierungen: Mikroarrays
- Protein-Expressionen: Mikroarrays, Antikörper-Arrays, 2D-Gele

analysiert oder durch Illumina HumanMethylation450K BeadChips und die Illumina GenomeStudio Software erhaltene Daten importiert und anschließend weiter verarbeitet werden. Wir exportierten daher die durch die Illumina GenomeStudio Software erhaltenen Daten in den Qlucore OMICS Explorer in der Version 3.0. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden anschließend Microsoft Excel 2010 sowie die R-Software verwendet.

2.3.5 GOrilla-Tool

GOrilla steht bei dem GOrilla-Tool für **Gene Ontology enRIchment anaLysis and visualiZAtion**. Es dient also der Analyse und Visualisierung GO-haltiger Abschnitte (s. 2.11.) innerhalb einer Liste an Genen. Es ist eine webbasierte Anwendung mit Hilfe derer man angereicherte GO-Begriffe in Listen von Genen veränderter Expression identifizieren kann, ohne spezielle Ziel- und Hintergrundsets hinterlegen zu müssen. Somit kann eine deutlich vereinfachte GO-Analyse (s. 2.11.) durchgeführt werden (63).

2.4 Allgemeiner Ablauf der Studie

Die DNA-Isolierung und anschließende Untersuchung wurde in den wissenschaftlichen Laboratorien der Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Ole Ammerpohl, mit den dort etablierten Methoden durchgeführt. Der schematisierte Ablauf von der Erfassung der Patienten über die

Probenentnahme bis zur Aufbereitung und Auswertung ist nachfolgend in Abbildung dargestellt.

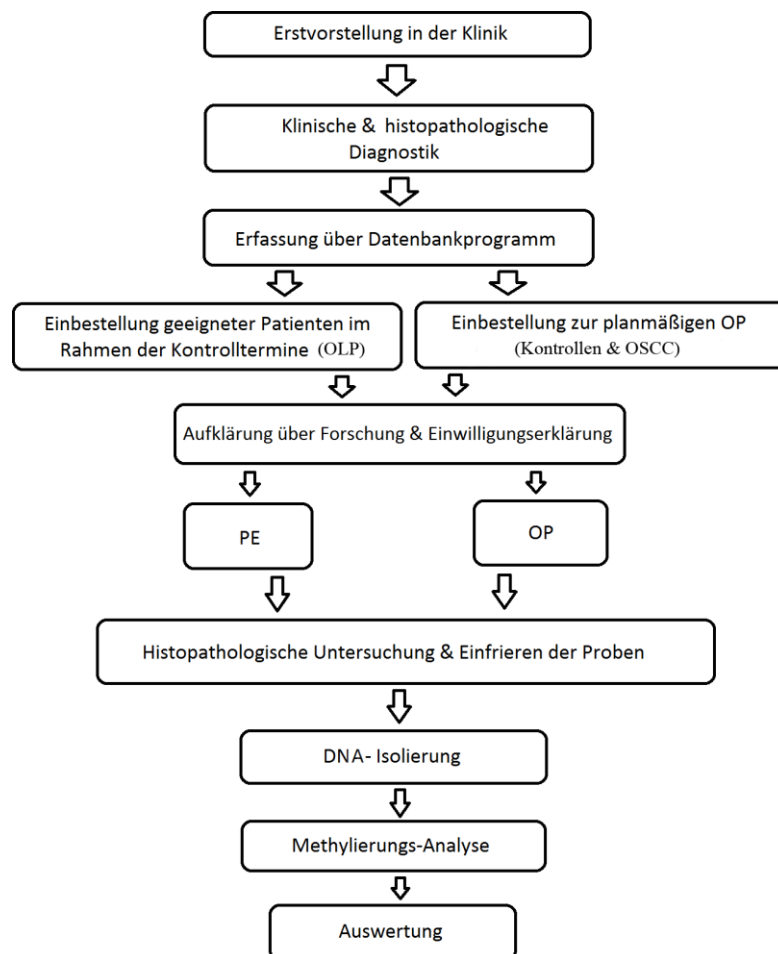


Abbildung 1: Flussdiagramm der Datenerhebung, Patientenrekrutierung und Arbeitsabläufe in schematischer Darstellung. Dieses Flussdiagramm stellt die einzelnen Arbeitsschritte unserer Studie dar.

2.5 Patientenrekrutierung

Zur Erfassung, Verwaltung und Selektion der Patienten programmierten wir ein auf der Programmiersprache Pascal basierendes Datenbankprogramm mit grafischer Benutzeroberfläche, welches die einzelnen Patienten unserer Mundschleimhautsprechstunde erfasste und Informationen über Lokalisation der Veränderungen, anamnestische Auffälligkeiten in Bezug auf Alkohol- und Tabakkonsum, Einschränkungen beim Essen und Allergien sowie die histopathologischen Untersuchungsergebnisse etwaiger diagnostischer Probenentnahmen speicherte, sodass für die weiteren Untersuchungen eine bestmögliche Auswahl nach den erweiterten Kriterien der OLP-Diagnostik nach van der Meij (64-66) möglich

war. Dabei konnte zwischen Leukoplakien, OLP und OSCC unterschieden und weiter in eindeutige, sprich sowohl klinisch als auch histopathologisch gesicherte Erkrankung, und nicht eindeutige, lediglich klinisch diagnostizierte Patienten, untergliedert werden.

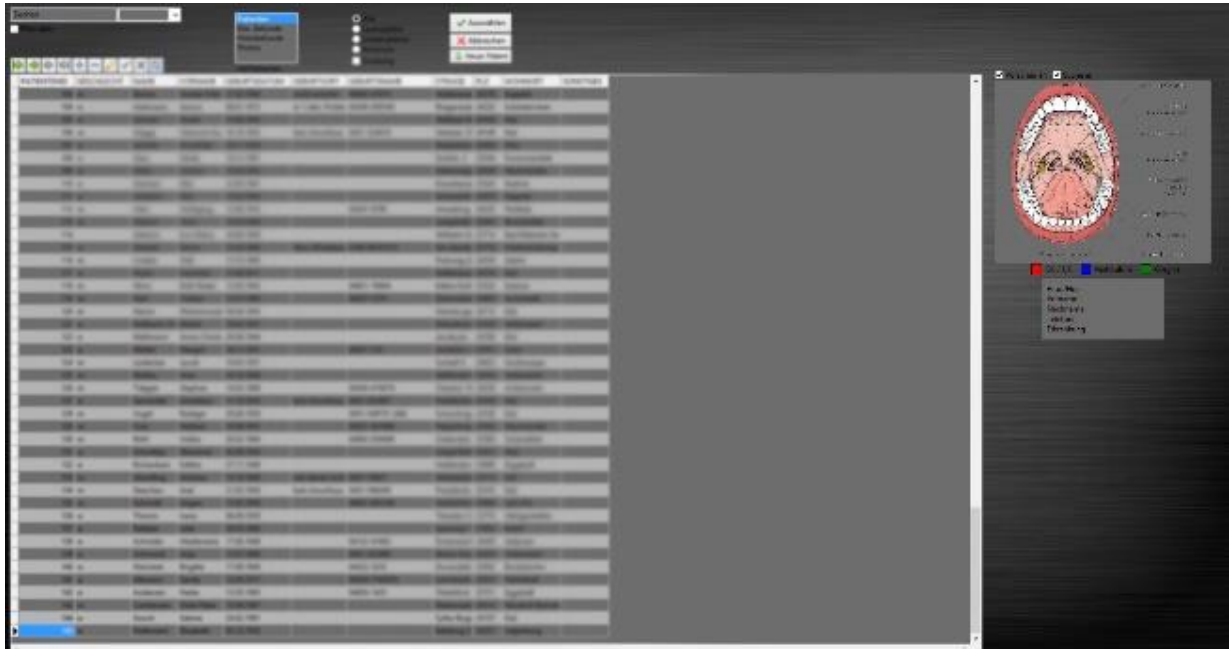


Abbildung 2: Patienten-Datenbank in der Übersicht. Die Abbildung zeigt die Übersicht aller Patienten in der von uns für diese Studie programmierten Datenbank.

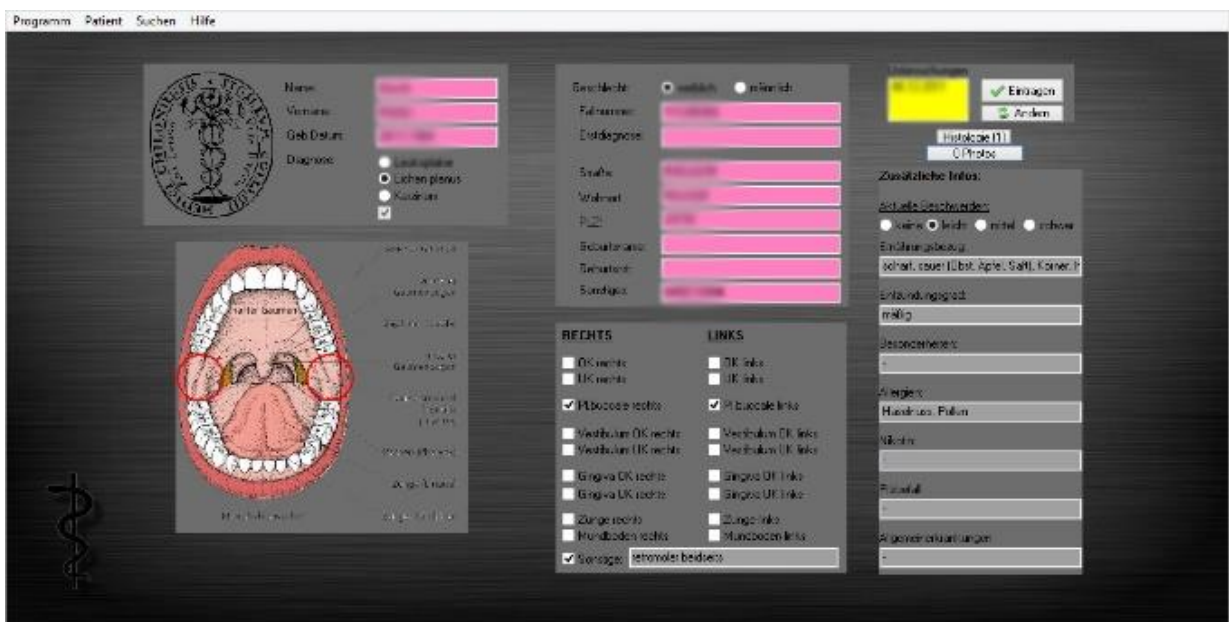


Abbildung 3: Patienten-Datenbank in der Individual-Ansicht. Die Abbildung zeigt die Individual-Ansicht einer OLP-Patientin in der von uns für diese Studie programmierten Datenbank.

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) (Referenznummer: D 426/08) genehmigt. Die Gewebeproben stammten alle von Operationen in der Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie des UKSH, Campus Kiel. Die Proben der Tumorgruppe (n=15) wurden während der entsprechenden Operationen aus der Haupttumormasse, jedoch außerhalb offensichtlich nekrotischen Materials entnommen und histopathologisch auf eine möglichst hohe Homogenität hin überprüft. Die Gewebe der Kontrollgruppe (n=18) stammten von „Resten“ geplanter/elektiver Operationen, hauptsächlich Zahnextraktionen und Dysgnathieoperationen, bei denen diese Gewebe andernfalls entsorgt worden wären. Ferner waren sowohl deren Anamnese als auch histopathologische Begutachtung frei von Erkrankungen der oralen Mukosa. Die Proben der OLP-Gruppe (n=8) stammten von diagnostischen Probeentnahmen der laufenden Routinediagnostik, die anschließend in zwei Teile (ein Teil für die histopathologische und einer für die spätere molekularbiologische Untersuchung) geteilt wurden. Um den für die Diagnostik bei unserer Studie angewandten Kriterien des OLP nach van der Meij (64-66) gerecht zu werden, mussten die Proben sowohl klinisch als auch histopathologisch als OLP definiert und beidseitig ausgeprägt sein, sodass von den initialen 117 OLP-Patienten schließlich nur die hier verbliebenen acht Proben verwendet wurden. Des Weiteren achteten wir darauf, dass all unsere Proben HPV-negativ getestet wurden. Die Proben für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden nach Entnahme unverzüglich bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Für alle Probeentnahmen erfolgte zuvor eine entsprechende Aufklärung und Einwilligung der Patienten.

Tabelle 1: Übersicht über die Proben dieser Studie. Eine kurze Übersicht der in unsere Studie eingeschlossenen Patienten.

Gruppe	n	Verhältnis f:m	weiblich (%)	männlich (%)	Alter (Median, Breite)	Rauchen	Alkohol	HPV
Kontrollen	18	13:5	72.2	27.8	25.5 (17 – 69)	8	9	0
OLP	8	6:2	75	25.0	60.5 (50 – 73)	4	6	0
OSCC	15	7:8	46.7	53.3	63.0 (43 – 89)	11	14	0

Tabelle 2: Detaillierte Übersicht der Proben dieser Studie. Eine Übersicht der einzelnen in unsere Studie eingeschlossenen Patienten.

Probe	Geschlecht	Alter [Jahre]	Rauchen	Alkohol	Gruppe
KO1	weiblich	19	nein	ja	Kontrolle
KO2	weiblich	18	nein	nein	Kontrolle
KO3	männlich	20	nein	nein	Kontrolle
KO4	weiblich	44	nein	nein	Kontrolle
KO5	weiblich	24	ja	ja	Kontrolle
KO6	weiblich	21	ja	ja	Kontrolle
KO7	weiblich	17	nein	nein	Kontrolle
KO8	weiblich	25	ja	ja	Kontrolle
KO9	weiblich	63	nein	nein	Kontrolle
KO10	männlich	43	nein	nein	Kontrolle
KO11	weiblich	23	nein	nein	Kontrolle
KO12	weiblich	50	nein	nein	Kontrolle
KO13	männlich	69	ja	ja	Kontrolle
KO14	männlich	45	ja	nein	Kontrolle
KO15	weiblich	21	nein	ja	Kontrolle
KO16	weiblich	29	ja	ja	Kontrolle
KO17	weiblich	54	ja	ja	Kontrolle
KO18	männlich	26	ja	ja	Kontrolle
L1	weiblich	73	nein	nein	OLP
L2	weiblich	71	ja	ja	OLP
L4	weiblich	62	nein	ja	OLP
L7	weiblich	50	ja	ja	OLP
L9	weiblich	54	nein	ja	OLP
L10	männlich	60	ja	ja	OLP
L12	weiblich	61	nein	ja	OLP
L14	männlich	53	ja	nein	OLP
K10	männlich	47	ja	ja	OSCC
K16	weiblich	66	ja	ja	OSCC
K20	männlich	69	nein	ja	OSCC
K23	weiblich	47	nein	nein	OSCC
K43	weiblich	68	ja	ja	OSCC
K25	weiblich	70	ja	ja	OSCC
K12	männlich	43	ja	ja	OSCC
K17	männlich	62	ja	ja	OSCC

K38	männlich	67	ja	ja	OSCC
K45	weiblich	55	ja	ja	OSCC
K35	männlich	89	nein	ja	OSCC
K37	männlich	70	ja	ja	OSCC
K39	männlich	61	ja	ja	OSCC
K13	weiblich	60	ja	ja	OSCC
K8	weiblich	63	nein	ja	OSCC

2.6 Kontrolle auf HPV-Infektion

Zunächst wurde die für den Nachweis beziehungsweise Ausschluss einer HPV-Infektion benötigte DNA aus den für die histopathologische Diagnostik genutzten paraffingefassten, formalinfixierten Gewebeschnitten gewonnen und mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits untersucht. Hierzu wurden die Objektträger durch je 5-minütige Xylol- und Ethanol-Einwirkung von dem Paraffin befreit und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Aus dem erhaltenen Gewebe wurde dann die DNA durch Inkubation für zwei bis vier Stunden bei 56°C und mehrfache Zentrifugierung bei Raumtemperatur aufgereinigt und deren Konzentration durch Absorptionsspektroskopie (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260nm) bestimmt. Dann wurde eine Size-Range-PCR nach BIOMED-2-Protokoll durchgeführt. Hierfür wurden entsprechende Zielstrukturen mit einer Basenpaarlänge von 100 (TBXAS1, Exon 9), 200 (RAG1, Exon 2), 300 (PLZF, Exon 1) sowie 400 (AF4, Exon 3) amplifiziert und auf einem 2%igen Agarosegel darauf getestet, ob die für die weitere Verarbeitung nötigen vier Banden sichtbar werden. Nach Bestätigung eines ausreichenden DNA-Gehalts aller Proben wurde eine weitere PCR zum eigentlichen HPV-Nachweis beziehungsweise HPV-Ausschluss durchgeführt. Dazu wurden die beiden für die HPV-spezifische L1-Region kodierenden Primersets MY09/11 und GP5⁺/6⁺ genutzt, welche auf Zuverlässigkeit und Wiederholbarkeit geprüft wurden (67). Dabei konnte bei keiner der Proben eine HPV-Assoziation nachgewiesen werden, sodass alle Proben in die weiteren Untersuchungen eingeschlossen wurden.

2.7 DNA-Isolierung und Bisulfit-Konvertierung

Mit Hilfe des Gentra Puregene Kits der Firma Qiagen kann DNA aus einem breiten Spektrum an Probe-Arten wie beispielsweise Blut, Gewebe oder bukkalen Zellen gewonnen werden. Laut Qiagen kann DNA mit hohem Molekulargewicht von 100-200 kb, die mit Hilfe des Gentra Puregene Kits gewonnen wurde, für mindestens 18 Jahre bei 4°C ohne Degradation gelagert werden. Die einfache Puregene-Prozedur nutzt dabei zur DNA-Isolierung eine modifizierte Aussalungspräzipitation, die in ihren Zwischenschritten eine sichere temporäre Lagerung teilweise gereinigter DNA erlaubt. Dabei ist die Reinheit der DNA nach Isolierung durch das Gentra Puregene Kit auch zur PCR oder restriktiven Verdauung verwendbar. Beim DNA-Isolierungsvorgang wird das zu untersuchende Gewebe zunächst in einem Reinigungsprozess von Verunreinigungen und Enzyminhibitoren wie Proteinen und divalenten Kationen befreit. Anschließend werden die Zellen mit anionischen Detergenzien lysiert und die DNA dabei von einem Stabilisator geschützt. Dieser Stabilisator limitiert die Aktivität sowohl intra- als auch extrazellulärer DNasen. RNA kann anschließend durch RNA-verdauende Enzyme entfernt werden. Andere Verunreinigungen wie beispielsweise Proteine werden durch Salzausfällung entfernt. Abschließend wird die DNA durch Ausfällung mit Alkohol rückgewonnen und in Hydratisierungslösung (*1 mM EDTA, 10 mM Tris.Cl pH 7.5*) gelöst. Das typische A260/A280Verhältnis aufbereiteter DNA liegt zwischen 1.7 und 1.9 und hat eine Größe von bis zu 200 kb. Zur Bestimmung wird die Absorption bei 260 und 280nm mit Hilfe eines Spektrophotometers gemessen, wobei sowohl DNA als auch RNA analysiert werden. Will man die alleinigen Absorptionswerte von DNA erhalten, so bedarf es eines Fluorometers. Die Länge der DNA kann mit Hilfe einer Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) auf einem Agarosegel bestimmt werden. Die isolierte DNA kann dann bei Temperaturen von 2-8°C, -20°C oder -80°C sicher aufbewahrt werden. Nach der Isolierung der DNA mit Hilfe des Qiagen Gentra Puregene Kits wurde zur Bestimmung des DNA-Methylierungsprofils eine Bisulfit-Konvertierung mit nachfolgender Amplifikation durchgeführt. Bei dieser auch Bisulfit-Sequenzierung genannten Prozedur werden unmethylierte Cytosine der DNA mit Bisulfit zu Uracilen konvertiert, während an C5-Position methylierte 5-Methylcytosine nicht mit dem Bisulfit reagieren und somit erhalten bleiben. Durch eine vorangehende Oxidation der Hydroxymethylcytosine kann eine mögliche Problematik der Differenzierung zwischen Hydroxymethylcytosinen und 5-Methylcytosinen gelöst werden (68). Zur Bisulfit-Konvertierung verwendeten wir das EZ DNA Methylation Kit an je 1µg DNA. Im Anschluss an die Bisulfit-Sequenzierung folgt eine Amplifikation des Materials, sprich eine Vermehrung der vorliegenden DNA-Sequenzen, durch

eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Daraufhin wurde die konvertierte DNA auf dem Infinium HumanMethylation450K BeadChip hybridisiert. Die anschließende bioinformatische Auswertung der Rohdaten von der Normalisierung der Daten bis zur Identifizierung differentiell methylierter CpG-Loci erfolgte mit der GenomeStudio Software (Illumina), der R-Software (R Foundation) sowie dem OMICS Explorer (Qlucore). Zur Gene Ontology Analyse wurde das GOrilla-Tool genutzt.

2.8 Array-basierte DNA-Methylierungsanalyse

Die Array-basierte DNA-Analyse wurde unter Verwendung des HumanMethylation450K BeadChips entsprechend der Herstellervorgaben durchgeführt. Der Illumina Infinium HumanMethylation450K BeadChip erlaubt die Untersuchung von 485.577 Methylierungsstellen pro Gewebeprobe (482,421 CpG-Abschnitte, 3091 Nicht-CpG-Abschnitte, 65 zufällige Einzelnukleotid-Polymorphismen) mit einer Einzel-Nukleotid-Auflösung. Er deckt 99% aller RefSeq Gene mit einem Durchschnitt von 17 CpG-Stellen pro Genregion entlang des Promotors, 5'UTR, ersten Exons, Genkörpers und 3'UTR ab. Dabei stellt er 96% der CpG-Inseln dar. Ferner beinhaltet die Diagnostik an Hand des Illumina Infinium HumanMethylation450K BeadChip Kits CpG-Stellen außerhalb von CpG-Inseln, nicht-CpG-methylierte Stellen innerhalb humaner Stammzellen, anderweitig methylierte Stellen zwischen Tumoren und gesunden Proben und unterschiedliche Gewebetypen übergreifend FANTOM 4 – Promotoren, DNase-hypersensitive Stellen sowie Mikro-RNA-Promotor-Stellen. Der BeadChip analysiert bis zu 12 Gewebeproben pro Array-Format, ist automatisierungskompatibel und erlaubt eine parallele Untersuchung von bis zu 96 Proben (bei voller LIMS-Unterstützung) wobei er nur 500ng (1µg bei Automatisierung) an Einsatzmenge benötigt. Die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse durch technische Replikate liegt bei >98% mit einer Falsch-positiv-Rate von <1%. Mittlerweile ist auch ein Protokoll mit Kompatibilität zu FFPE-Proben (formalin-fixed parafin-embedded) erhältlich. Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit dem Illumina iScan gescannt. Im Anschluss an die DNA-Analyse wurden diejenigen Daten von Loci auf den X- und Y-Chromosomen aus den weiteren Analysen ausgeschlossen, um geschlechtsbedingte Ergebnisse zu verhindern. Die Ergebnisse sind in einem MIAMI-kompatiblen Format beim Gene Expression Omnibus (GSE123781) erhältlich. Die Daten wurden aus der Genome Studio Software und dem OMICS Explorer (ver. 3.0;

Qlucore, Lund, Schweden) exportiert. Die „False discovery rate (FDR)“- und/oder Varianz ((σ/σ_{\max}) -Filter), welche für die individuellen Analysen angewendet wurden, sind in den entsprechenden Beschreibungen der Ergebnisse dargelegt. Microsoft Excel 2010 und R wurden für die grafische Präsentation der Daten verwendet.

2.9 Analyse chromosomaler Alterationen und des Chromosomenstatus

Zur Analyse etwaiger chromosomaler Alterationen des OLP, OSCC sowie der Kontrollgewebeproben nutzten wir das R-Paket „CopyNumber450k“, welches die Standardeinstellungen am HumanMethylation450K BeadChip verwendet. Die mit dem R-Paket gelieferten Kontrolldaten („CopyNumber450kData“) nutzten wir hierbei als Referenz mit als signifikant angesehenen p-Werten $< 0,01$. Darüber hinaus führten wir Chi-Square-Statistiken zur Berechnung spezieller Charakteristika sowie weitere statistische Tests mit der R- und Prism-Software durch. Ferner korrelierten wir jeden einzelnen Locus auf dem HumanMethylation450K BeadChip mit einem individuellen Chromosomenstatus bei diesem Zelltyp an Hand von Informationen, welche wir von Informationen über normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) aus der Ensembl-Datenbank entnahmen. Auch untersuchten wir Anreicherungen abweichend methylierter Loci an verschiedenen regulatorischen Regionen beim OLP oder OSCC im Vergleich zu den Kontrollproben. Eine Liste aller in die Methylierungsanalyse eingeschlossenen Loci diente dabei als Referenzliste. Anreicherungen von Loci, welche in CpG-Inseln oder bekannten abweichend methylierten Regionen lagen, wurden ebenfalls an Hand der Informationen einer Liste aller in die Studie eingeschlossener CpG-Loci, die als Referenz bei der Chi-Square-Analyse verwendet wurde, berechnet.

2.10 Untersuchung des Methylierungsalters

Steve Horvath (UCLA, CA) entwickelte eine Methode zur Berechnung des epigenetischen Methylierungsalters, anhand dessen bei zahlreichen Geweben das Alter des Gewebespenders relativ genau berechnet werden kann, auch wenn die untersuchten Zellen selbst nur einen sehr kurzen Lebenszyklus haben. Es zeigte sich, dass alle von ihm untersuchten 5.826 Krebsproben von 59 Krebszelllinien und 20 verschiedenen Krebsarten im Vergleich zu

gesunden Geweben signifikant erhöhte Methylierungsalter aufwiesen. Dabei fiel auf, dass je geringer das epigenetische Methylierungsalter vorangeschritten war, desto höher war die Anzahl an Mutationen in den entsprechenden Geweben, insbesondere auch von p53, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass ein beschleunigtes DNA-Methylierungsalter auf Prozessen beruht, die für die Genomstabilität verantwortlich sind. Dabei hatten Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches (UPCI SCC47, 6 Jahre) zusammen mit zwei Brustkrebszelllinien die geringste Abweichung vom tatsächlichen Alter der Patienten (69, 70). Zur Analyse des Methylierungsalters unserer Proben verwendeten wir mit Hilfe von Steve Horvath den DNA-Methylierungsalter-Rechner der Webseite: <https://dnamage.genetics.ucla.edu/>.

2.11 Gen-Ontologie-Analyse

Die Gen-Ontologie (Gene Ontology (GO)) stellt eine Abstrahierung von Daten oder Genen in Begriffe dar. Sie ist eine Art der biowissenschaftlichen Vereinheitlichung eines Teils des dort verwendeten Vokabulars in einer entsprechenden Ontologie-Datenbank in die drei Oberbegriffe oder Bereiche:

- Zelluläre Komponente,
- Biologischer Prozess und
- Molekulare Funktion,

wobei jedweder hieraus hervorgehende Terminus einen Aufbau aus einem Namen, einer Nummer sowie assoziierten Daten erhält und einer Vereinfachung der Kommunikation untereinander sowie in Publikationen etc. dienen soll. Ein weiterer Vorteil der Gen-Ontologie ist die Möglichkeit einer schnellen, vereinheitlichten Suche nach Begriffen der Biowissenschaften unter Verwendung entsprechender Suchalgorithmen eines Computer-Programmes wie des über seine Webseite zugreifbaren GOrilla-Tools. So können beispielsweise aus Analysen erhaltener Datensätze über veränderte Genexpressionen/Genaktivitäten die entsprechenden biologischen Prozesse, die von diesen Genen beeinflusst werden, schneller abgelesen und nähere Informationen über molekulargenetische oder epigenetische Ursachen klinischer Bilder gewonnen werden. Für die entsprechenden Gen-Ontologie-Analysen unserer Studie verwendeten wir das GOrilla-Tool (s. 2.3.5.).

3 Ergebnisse

3.1 Wiederkehrende chromosomale Veränderungen beim OLP und dem OSCC

In einem ersten Schritt analysierten wir die Anzahl und die Größe der genetischen Veränderungen der Kopienzahl (CNV = copy number variations) bei den Kontroll-, OLP- und OSCC-Proben jeweils auf Sequenzzugewinne und -verluste. Hierfür verwendeten wir den bereits durch Feber et al. (71) für die CNV-Analyse verwendbar beschriebenen Illumina HumanMethylation450k BeadChip. Es zeigten sich bei den Proben der oralen Plattenepithelkarzinome im Gegensatz zu den OLP- und gesunden Vergleichsproben signifikant erhöhte CNV ($p < 0,01$). Auch die Größe hinzugewonnener (Kontrolle gegen OSCC $p < 0,00001$ & OLP gegen OSCC $p < 0,001$) oder verlorener (Kontrollen gegen OSCC $p < 0,0001$ & OLP gegen OSCC $p < 0,01$) Regionen war beim OSCC signifikant erhöht im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Abbildung 4).

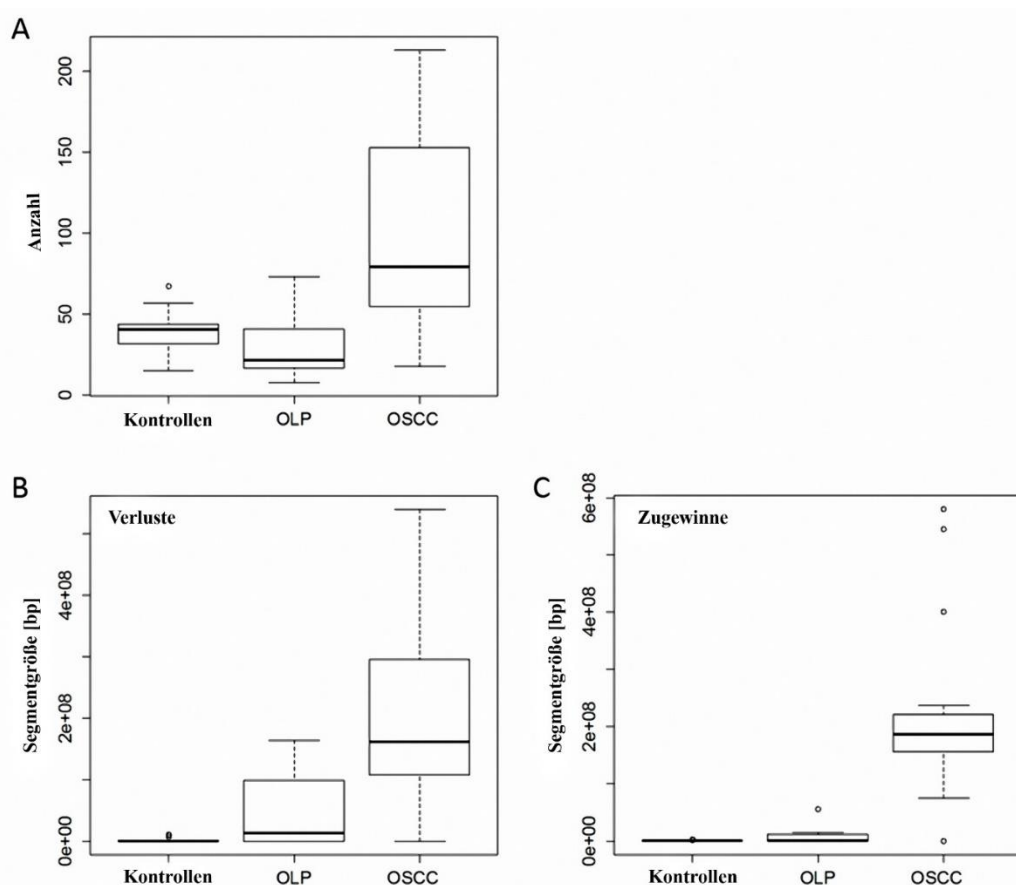


Abbildung 4: Chromosomale Alterationen bei normalem oralem Plattenepithel (Kontrollen), oralem Lichen planus (OLP) und dem oralen Plattenepithelkarzinom (OSCC). Die absolute Anzahl erkannter Alterationen in den jeweiligen Gruppen (A), die Segmentgröße in Basenpaaren [bp] der Verluste (B) und Segmentgröße in Basenpaaren der Zugewinne (C) sind in Form von Boxplots dargestellt, welche Quartile und Mediane anzeigen.

Weiter interessierte uns, ob es beim OLP und dem OSCC sich wiederholende CNV im Vergleich zu den klinisch gesunden Gewebeproben gab. Während wir beim OLP keine signifikanten sich wiederholenden Veränderungen nachweisen konnten, fanden wir solche bei allen OSCC-Proben. So gab es bei allen OSCC eine Zunahme an Chromosomenmaterial in Chromosom 9 oder eine Kombination von Zugewinn auf Chromosom 8 bei gleichzeitigem Verlust genetischer Informationen auf Chromosom 3 (Abbildungen 5-8).

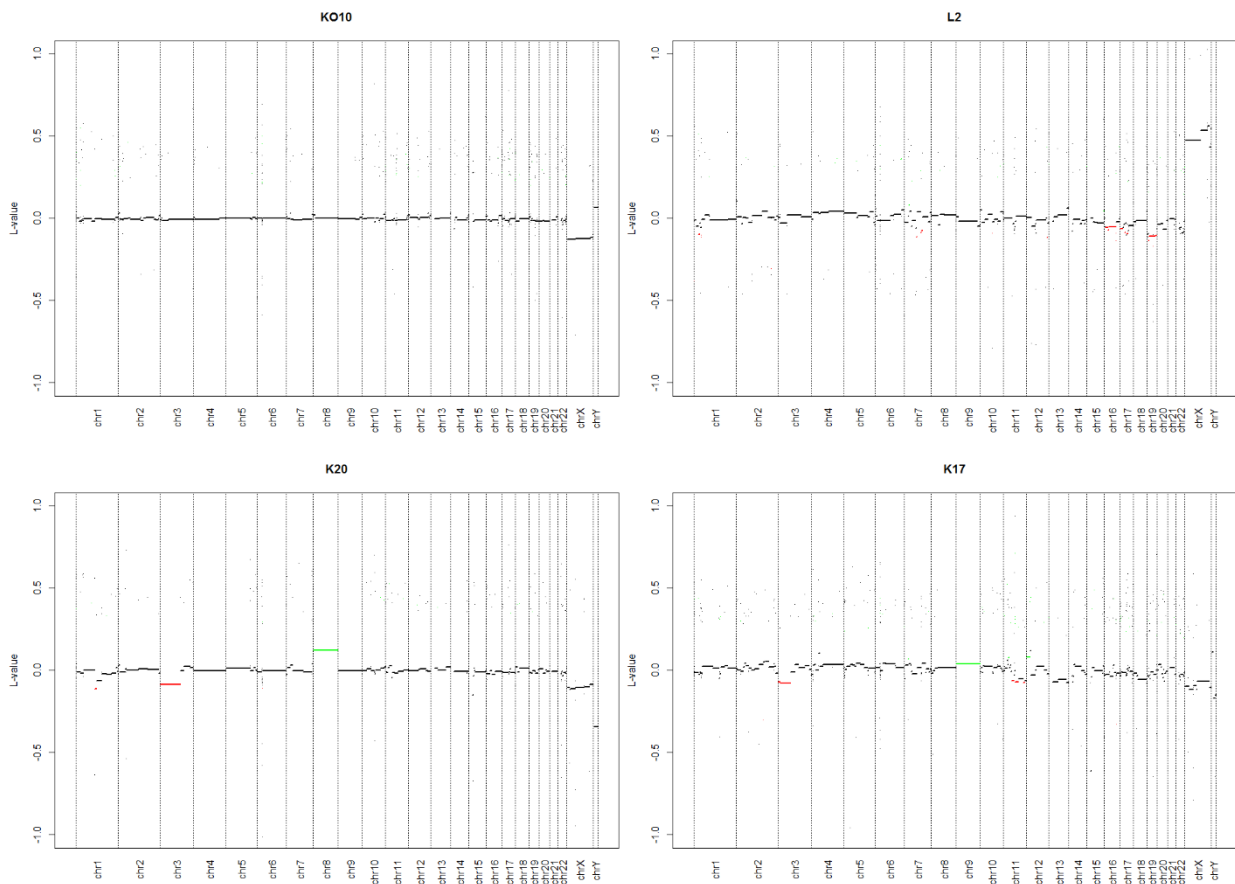


Abbildung 5: Detaillierte Darstellung chromosomaler Alterationen bei normalem oralem Plattenepithel (KO10), oralem Lichen planus (L2) und dem oralen Plattenepithelkarzinom (K20, K17). Für diese Darstellung wurden vier typische Beispiele ausgewählt. Die Nummern unter den Diagrammen geben die Chromosomen an. Grün: signifikante Chromosomzugewinne, Rot: signifikante Chromosomenverluste (wie durch das „CopyNumber450k“-Modul angegeben).

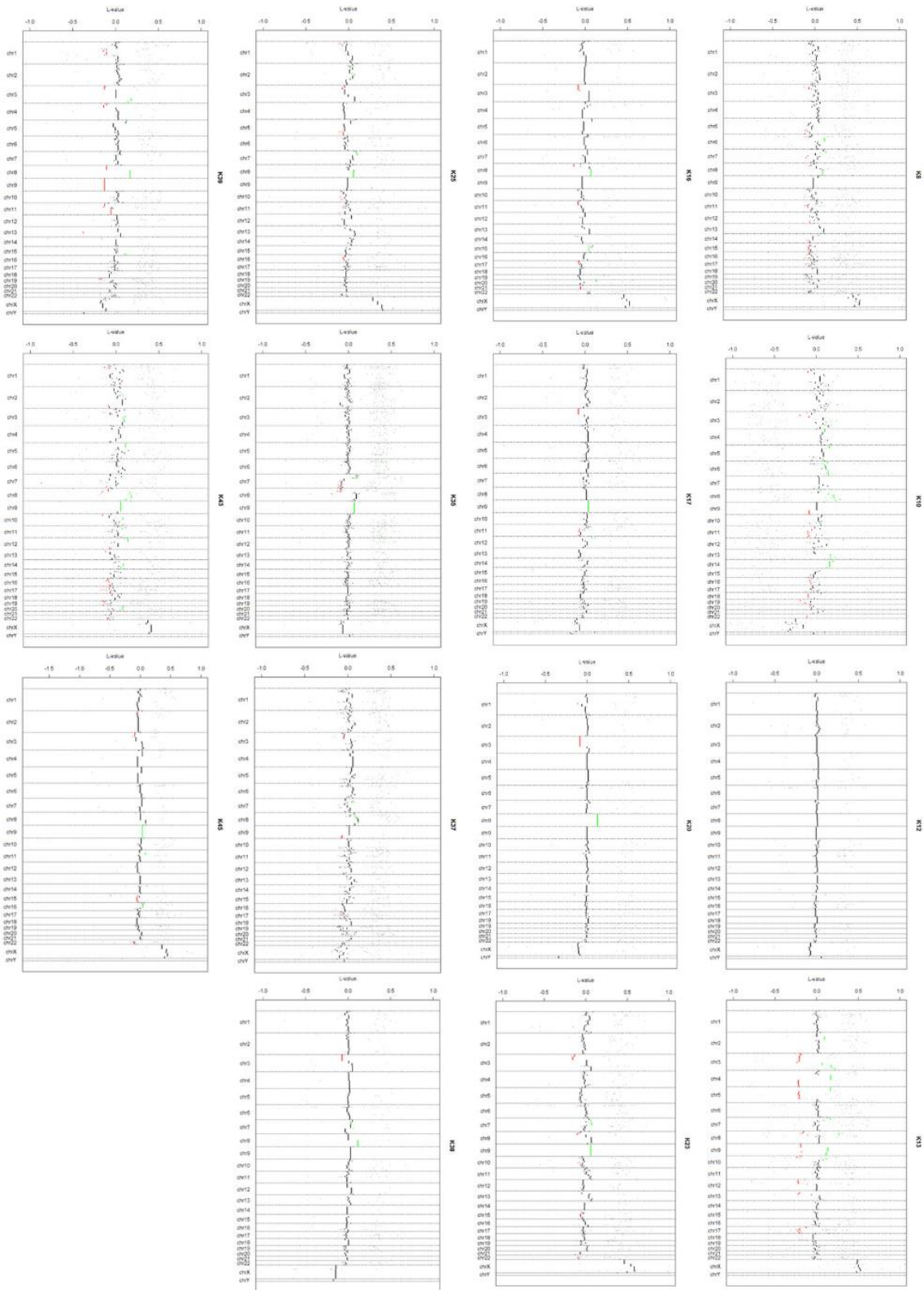


Abbildung 6: Detaillierte Darstellung von Zugewinnen und Verlusten genomischer Regionen bei allen einzelnen in unsere Studie aufgenommenen OSCC-Proben (n = 15). Die Nummern links der Diagramme geben die Chromosomen an. grün: signifikante Chromosomenzugewinne, rot: signifikante Chromosomenverluste (Daten durch „CopyNumber450k“-Modul erhalten).

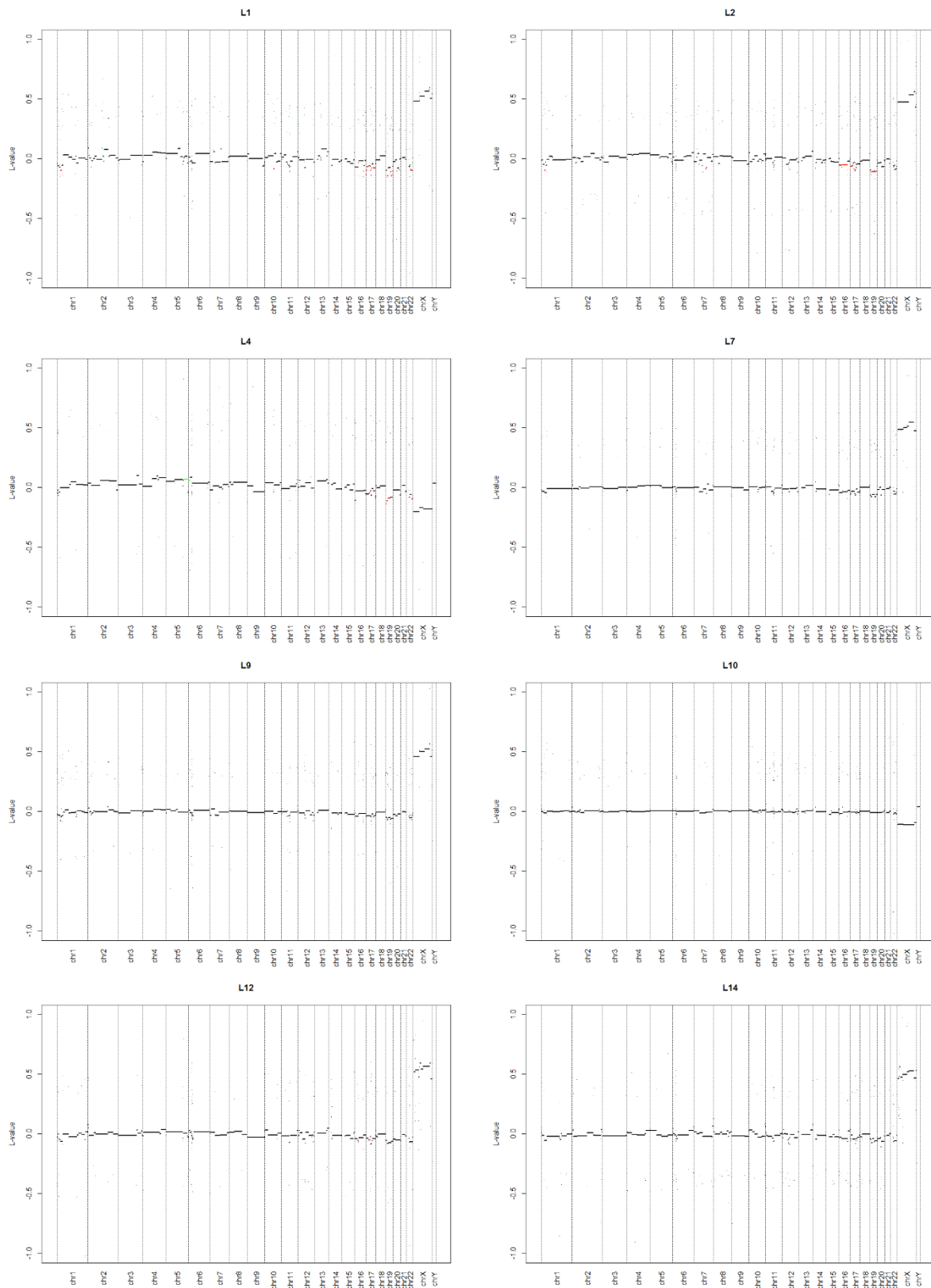


Abbildung 7: Detaillierte Darstellung von Zugewinnen und Verlusten genomischer Regionen bei allen einzelnen in unsere Studie aufgenommenen OLP-Proben (n = 8). Die Nummern unter den Diagrammen geben die Chromosomen an. grün: signifikante Chromosomzugewinne, rot: signifikante Chromosomenverluste (Daten durch „CopyNumber450k“-Modul erhalten).

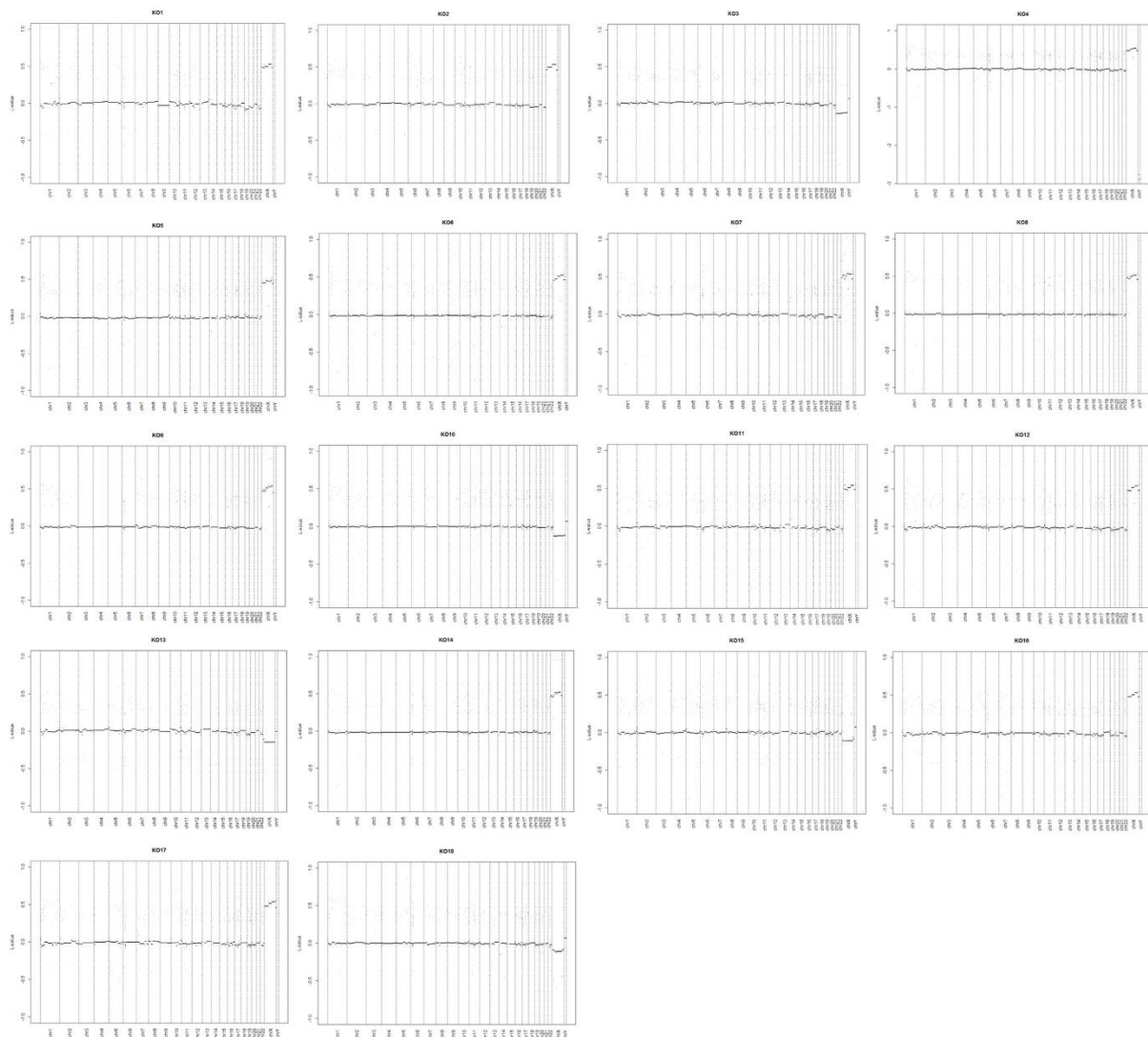


Abbildung 8: Detaillierte Darstellung von Zugewinnen und Verlusten genomischer Regionen bei allen einzelnen in unsere Studie aufgenommenen gesunden Kontroll-Proben (n = 18). Die Nummern unter den Diagrammen geben die Chromosomen an. grün: signifikante Chromosomenzugewinne, rot: signifikante Chromosomenverluste (Daten durch „CopyNumber450k“-Modul erhalten).

Die Veränderungen auf Chromosom 9, welche bei keiner der Kontroll- oder OLP-Proben vorkamen, begannen bei allen betroffenen 7 der 15 OSCC-Proben (K13, K17, K23, K35, K43 und K45) an Position 11.410 und beinhalteten bei den gemeinsamen mindestens 6.670.198 veränderten Basenpaaren mindestens 39 Gene (u.a. KANK1, DMRT1, DMRT3, UHRF2, JAK2, SMARCA2, SLC1A1, IL33, ERMP1 und FOXD4 (Tabelle nicht dargestellt)). Darüber hinaus zeigte sich ein Verlust auf Chromosom 3 bei 10 der OSCC- und einer der OLP-Proben (K13, K16, K17, K20, K23, K25, K38, K39, K43, K45, L1), welcher an Position 114.243 begann und zwischen

Position 427.757 und 122.296.369 endete. Die kleinste gemeinsame Region beinhaltete die für das CHL1 (cell adhesion molecule L1 like) - Gen kodierende Region. Einige zusätzliche genomische Regionen auf Chromosom 3 und 8 wiesen gemeinsame Verluste bei einigen der Proben auf, jedoch wurden diese nur bei einer Minderheit der Proben nachgewiesen oder kamen ebenfalls bei den Kontrollproben vor (Tabelle nicht dargestellt).

3.2 Identifizierung sich wiederholender aberranter Methylierungen an CpG-Loci beim OLP und dem OSCC

Um anderweitig methylierte CpG-Loci beim OLP, OSCC und den gesunden Kontrollproben zu identifizieren, führten wir eine ANOVA-Analyse der durch den 450k BeadChip erhaltenen Daten durch. Unter Anwendung einer $FDR < 1 \times 10^{-9}$ identifizierten wir 2.192 CpG-Loci, welche 978 abweichend methylierten Genen entsprachen (Tabelle nicht dargestellt). Eine auf diesen Loci basierende Hauptkomponentenanalyse (PCA = principal component analysis) (Abbildung 9 (A)) sowie eine hierarchische Clusteranalyse (Abbildung 9 (B)) zeigten eine Unterteilung in drei Gruppen mit deutlich homogener DNA-Methylierung innerhalb der einzelnen Gruppen.

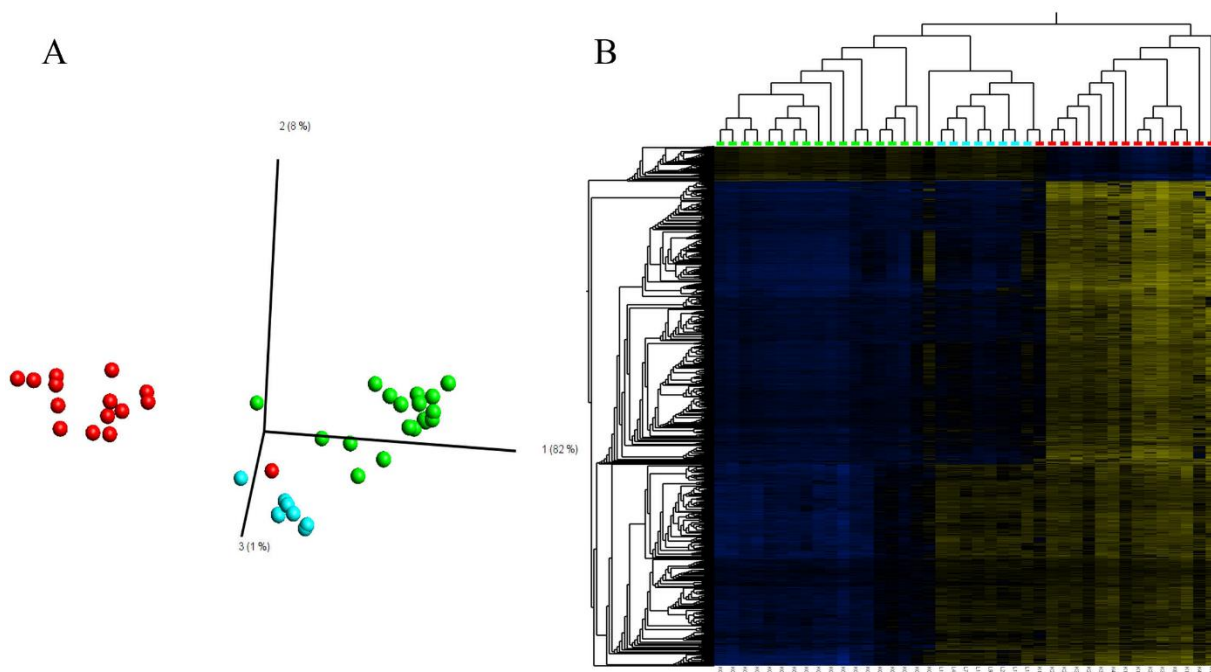


Abbildung 9: Hauptkomponentenanalyse (A) und hierarchische Clusteranalyse (B) von OSCC (rot), OLP (blau) und normalen Kontrollen (grün) basierend auf unterschiedlich methylierten Loci ($FDR < 1,0 \times 10^{-9}$, ANOVA, $n = 2.192$ Loci). Heatmap (B): blau: niedrige DNA-Methylierung, gelb: hohe DNA-Methylierung. Aus Präsentationsgründen wurden die durchschnittlichen DNA-Methylierungswerte auf 0 normalisiert (Durchschnitt = 0).

Diese drei Gruppen entsprachen den Vergleichs-, OLP- und OSCC-Kohorten. Dabei lagen alle Proben der OLP-Gruppe zwischen den gesunden und den OSCC-Proben, dabei jedoch näher an den gesunden denn den Tumorproben. Diese Zwischenposition zwischen gesunden und kanzerösen Proben zeigte sich auch bei einer t-test Statistik, die die gesunden Gewebe mit den OSCC-Proben verglich (Abbildung 10).

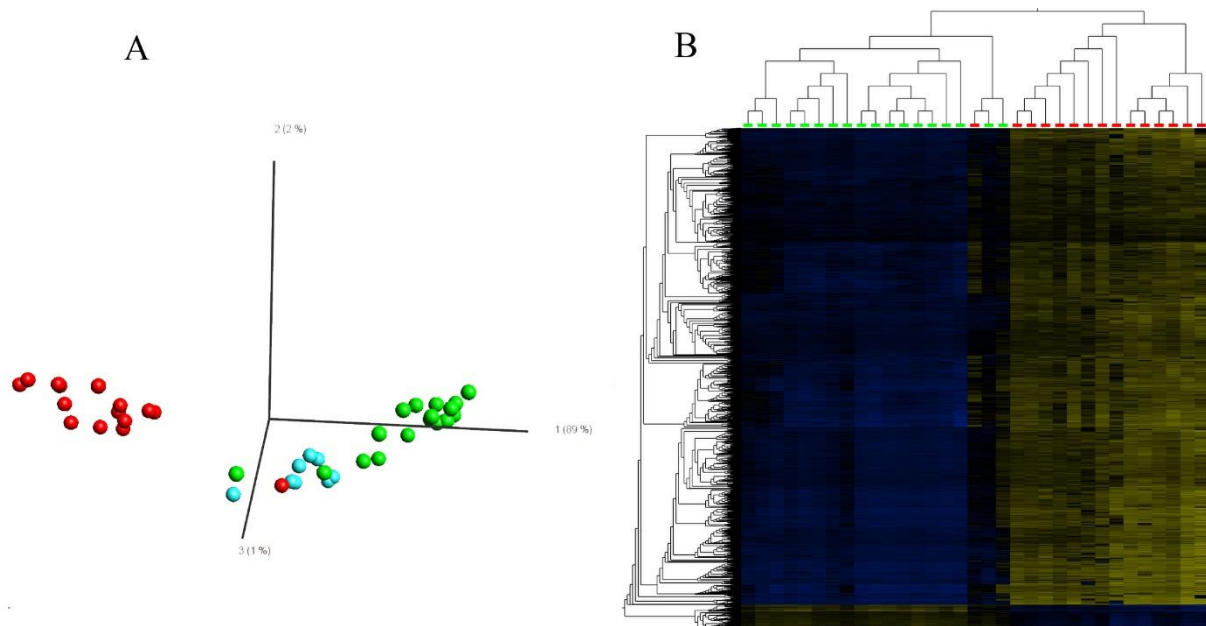


Abbildung 10: Hauptkomponentenanalyse (A) und hierarchische Clusteranalyse (B) von OSCC (rot) und Kontrollen (grün) basierend auf unterschiedlich methylierten Loci ($FDR < 1,08 \times 10^{-10}$, t-test, $n = 2.548$ Loci). PCA: blau: OLP-Proben. Heatmap (B): blau: niedrige DNA-Methylierung; gelb: hohe DNA-Methylierung. Aus Präsentationsgründen wurden die mittleren DNA-Methylierungswerte auf 0 normalisiert (Durchschnitt = 0). Die OLP-Proben wurden nicht in der t-test-Statistik aufgeführt, um Unterschiede zwischen Kontrollen und OSCC darzustellen.

In einer auf 2.548 Loci basierenden PCA, die zwischen Kontrollen und OSCC unterschied ($FDR < 1,08 \times 10^{-10}$), lagen die OLP-Proben hauptsächlich zwischen beiden Kohorten. Das gleiche gilt für eine PCA von 7.611 CpG-Loci, die die höchste Varianz im Datensatz ($\sigma/\sigma_{\max} \geq 0.4$) zeigte (Abbildung 11). Je eine Vergleichs- und eine Tumorprobe ballten sich mit den OLP-Proben.

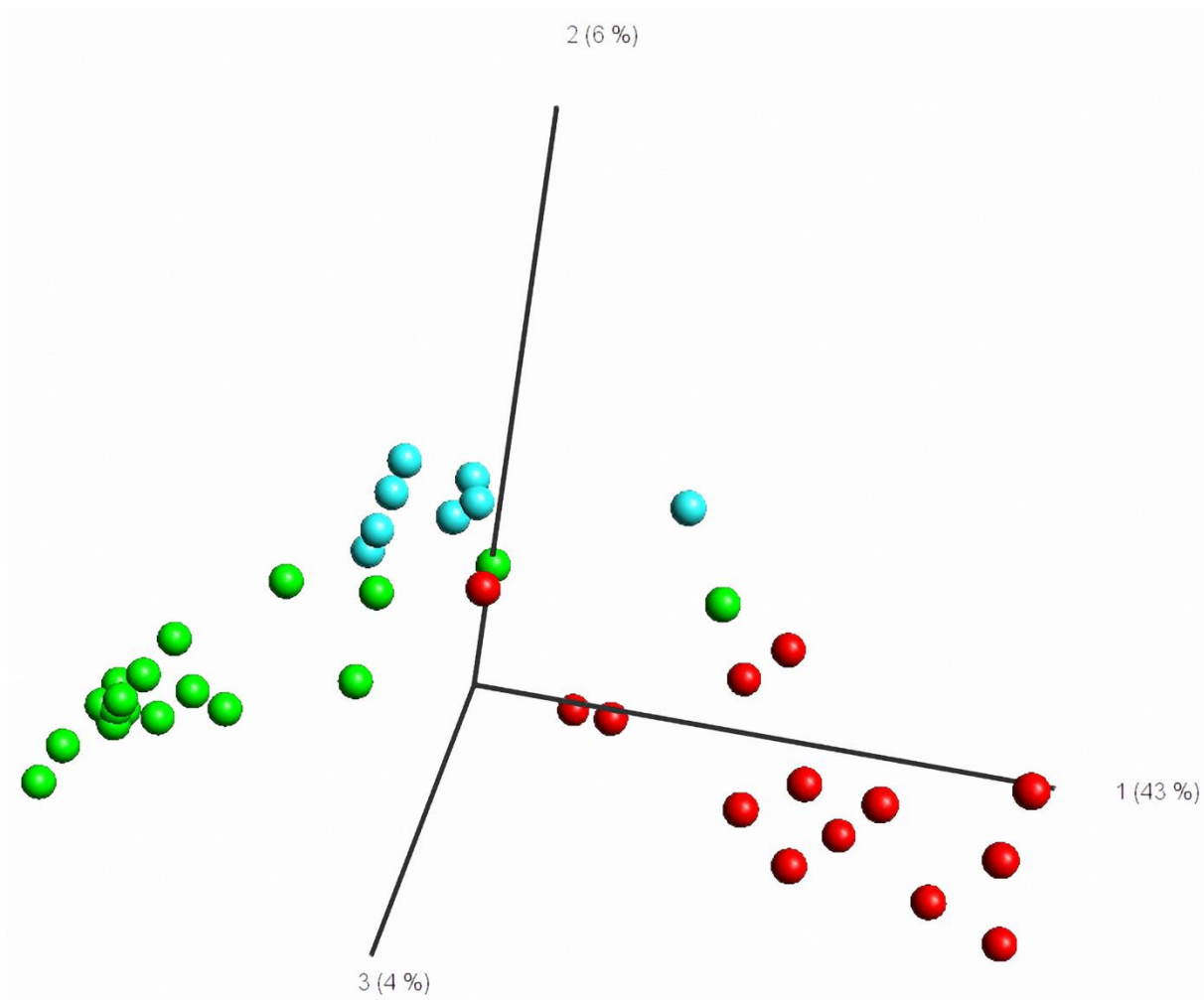


Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse von 7.611 CpG-Loci mit hoher Varianz im Datensatz (unbeaufsichtigter Ansatz, $\sigma/\sigma_{\max} \geq 0,4$). Kontrollen (grün); OLP (blau); OSCC (rot).

3.3 Lokalisierung abweichend methylierter CpG-Loci an Regionen verschiedener Chromosomenzustände

Um tieferen Einblick in die Lokalisierung abweichend methylierter CpG-Loci an chromosomalen Gebieten in verschiedenen Chromatinzuständen zu erhalten, benutzten wir Daten des chromosomalen Status bei normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) der Ensembl-Datenbank. Während die identifizierten Bereiche mit anderweitig methylierten Loci bei NHEK eine geringere Anzahl aktiver Promotoren (3,62fach, $p < 0,0001$) sowie heterochromatischer Regionen (2,52fach, $p < 0,0001$) aufwiesen, fanden wir eine signifikante Erhöhung abweichend methylierter Loci bei Sequenzen gehemmten Chromatins (2,47fach, $p < 0,0001$), Transkriptionsübergängen (2,00fach, $p < 0,0001$), Enhancern (im Mittel 1,5fach,

$p < 0,0001$) und insbesondere bei balancierten Promotoren (3,18fach, $p < 0,0001$) dieser NHEK (Abbildung 12).

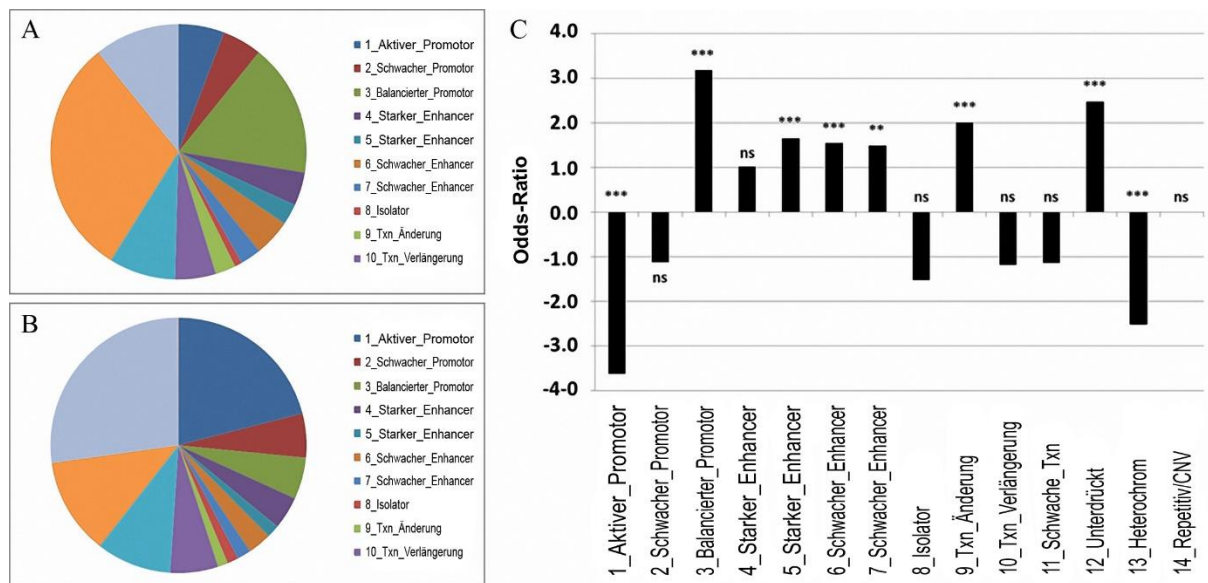


Abbildung 12: Anreicherung abweichend methylierter Loci an Regionen verschiedener Chromosomenzustände. Um den individuellen Chromosomenstatus zu bestimmen, wurden die von der Ensembl-Datenbank bereitgestellten Daten über den Chromosomenstatus bei NHEK verwendet. Kreisdiagramme des Chromatinstatus abweichend methylierter Loci (FDR < 1,0 x 10⁻⁹, ANOVA, n = 2.192 Loci) (A) und aller Loci, die bei unserer Studie auf dem HumanMethylation450k BeadChip untersucht wurden (B). (C): Balkendiagramm mit Odds-Ratios ausgewählter Chromosomenzustände beim OSCC, OLP und den Kontrollproben, die von abweichenden DNA-Methylierungen betroffen sind. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant.

Darüber hinaus zeigte sich, dass die aberrant methylierten Loci angereichert waren mit Loci in CpG-Insel-Regionen, DNase-I-hypersensitiven Stellen, Enhancern und bekannten abweichend methylierten Regionen (Abbildung 13).

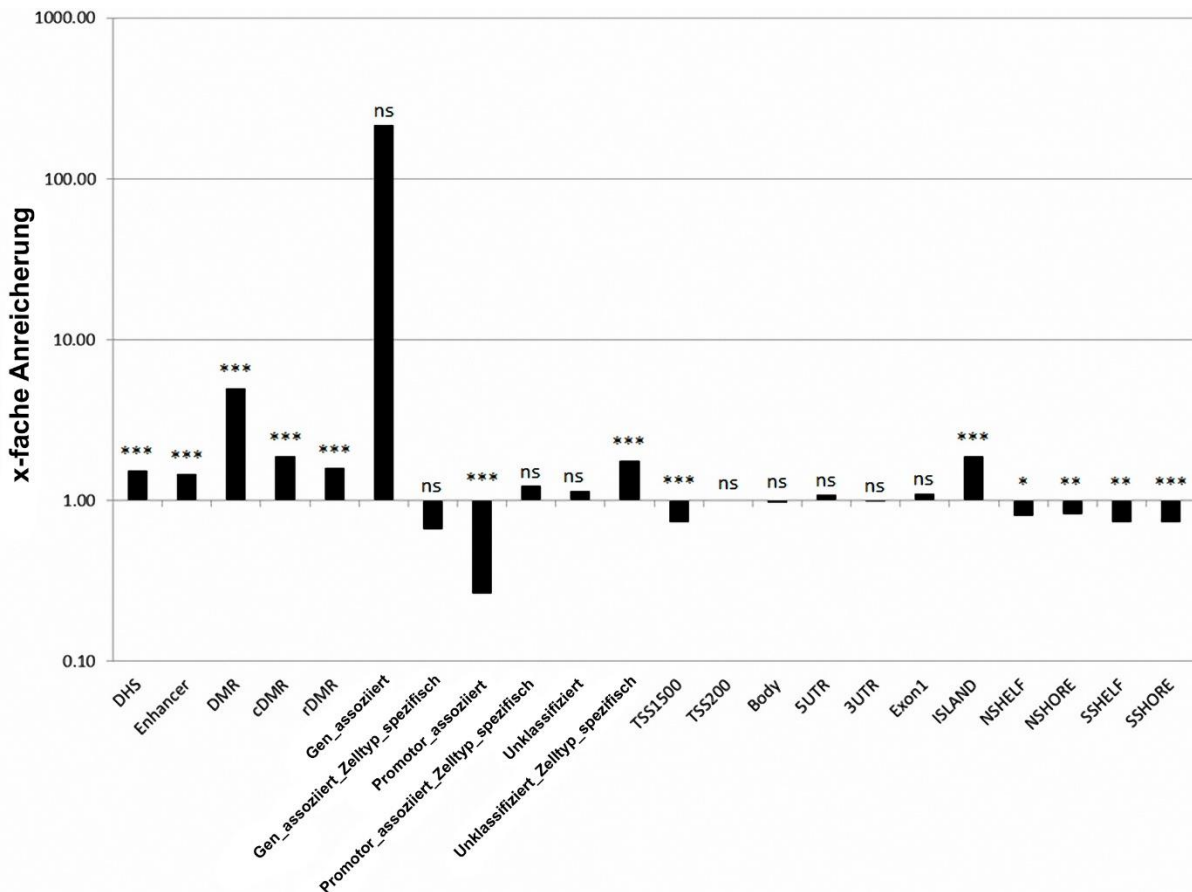


Abbildung 13: Anreicherungen abweichend methylierter Loci. Zur Bestimmung des individuellen Chromosomenstatus wurden die von Illumina durch Zuordnung der einzelnen Loci auf dem HumanMethylation450K BeadChip gelieferten Daten verwendet. Die Balkendiagramme zeigen die Anreicherungen ausgewählter Chromosomenstatus, die beim OSCC, OLP und den Kontrollproben von unterschiedlichen DNA-Methylierungen betroffen sind. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant.

3.4 Gen-Ontologie-Analyse

Eine Gen-Ontologie-Analyse der mit den 2.192 abweichend methylierten Loci korrespondierenden Gene unter Verwendung des GOrilla-Tools zeigte 117 signifikant angereicherte Prozesse ($FDR < 1 \times 10^{-2}$) von denen 39 Prozesse mindestens zweifach angereichert waren (Tabelle nicht dargestellt). Neun GO-Begriffe waren mindestens vierfach erhöht: glanduläre epitheliale Zelldifferenzierung (6,79fach), bei der Regulation der Genexpression involvierte Signaltransduktion (6,54fach), proximal/distale Musterbildung (6,23fach), embryonale Vordergliedmaßen-Morphogenese (5,66fach), Zelldifferenzierung im Rückenmark (4,67fach), Zelldifferenzierungsspezifikation (4,52fach), dorsal/ventrale Musterbildung (4,22fach) und Peptidhormonsekretion (4,00fach). Insgesamt enthält diese

Liste Prozesse, welche beispielsweise involviert sind bei der Zelldifferenzierung, embryonalen Entwicklung und Signaltransduktion.

3.5 OLP als mögliche Vorgängerläsion des OSCC

Unter dem Wissen, dass bis zu 5,6% der Patienten mit OLP ein OSCC entwickeln (27), wird OLP als mögliche Präläsion des OSCC angesehen. Daher stellten wir uns die Frage, ob jene Gene, welche beim OLP ein abweichendes Methylierungsmuster zeigen dies auch beim möglicherweise zweiten Schritt, dem OSCC, tun. Dazu gruppieren wir die zuvor identifizierten 2.192 abweichend methylierten Loci in 1. im Vergleich zu den Kontrollen sowohl beim OLP als auch dem OSCC hypermethylierte Loci (n=196, OLP und OSCC im Vergleich zu den Kontrollen), 2. nur beim OSCC hypermethylierte Loci (n=634, OSCC im Vergleich zu OLP und Kontrollen), sowie 3. nur beim OSCC hypomethylierte Loci (n=6, OSCC im Vergleich zu OLP und Kontrollen) (Abbildung 14).

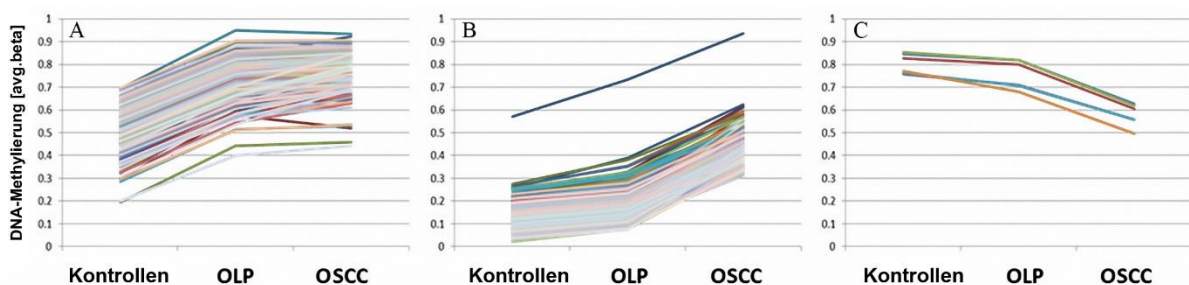


Abbildung 14: DNA-Methylierungswerte von Loci von denen angenommen wird, dass sie im Vergleich zu den normalen Kontrollen sowohl beim OLP als auch dem OSCC hypermethyliert sind. Hinzugewonnene Methylierungen von Kontrollen zu OLP (A); Loci, die ausschließlich beim OSCC hypermethyliert sind (B); und Loci mit fortschreitend abnehmenden DNA-Methylierungen von Kontrollen über OLP zu OSCC (C). Die verschiedenen Farben der Linien stehen für individuelle CpG-Loci.

Bei diesem Vorgehen wurden nur Loci mit einer Differenz von $> 0,2$ ($>20\%$) zwischen zwei Gruppen als abweichend methyliert angesehen. Auf 1.356 Loci traf dieses Kriterium nicht zu, sodass sie von diesem Analyseschritt ausgeschlossen wurden. Kein gemeinsamer Locus des OLP und OSCC war hypomethyliert im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Ein Locus (cg02188358, FLT1) zeigte fortschreitende Hypermethylierung beim Vergleich OLP zu Kontrollen ($\Delta \text{beta} > 0,2$) als auch OSCC zu OLP ($\Delta \text{beta} > 0,2$) ($p < 0,001$; Abbildung 15).

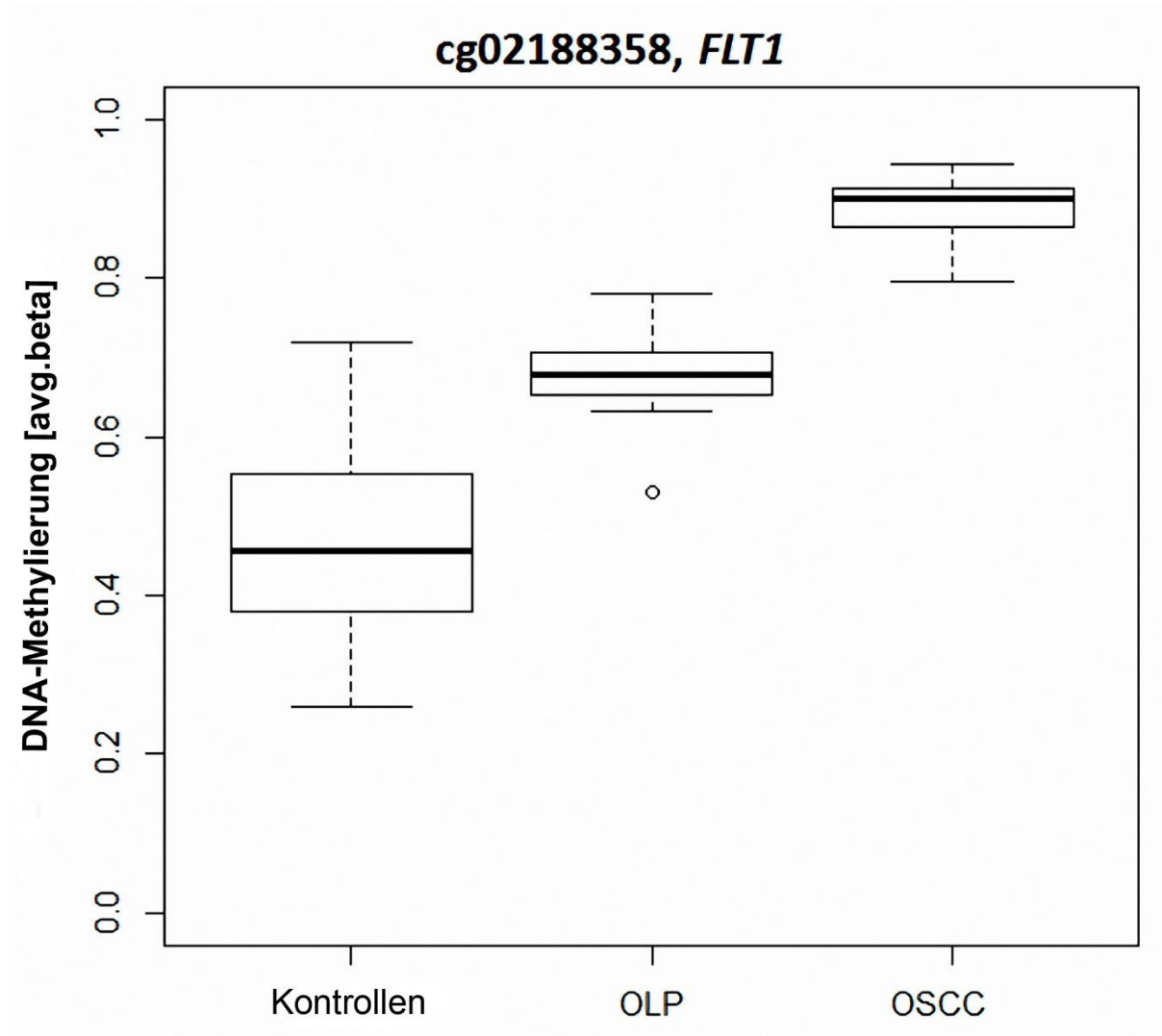


Abbildung 15: Boxplot zu DNA-Methylierungswerten des zum Gen *FLT1* gehörenden CpG-Lokus *cg02188358*. Dieser Locus zeigt kontinuierliche signifikante Zunahme der DNA-Methylierung von den Kontrollen über den OLP hin zum OSCC.

Loci, die sowohl bei OLP als auch OSCC hypermethyliert waren, waren signifikant reduziert an bei NHEK in aktiven Promotoren (OR: 0,20, $p < 0,0001$) und Regionen von Heterochromatin gelegenen Loci (OR: 0,34, $p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu war diese Gruppe angereichert mit Loci, welche in allein liegenden Promotoren (OR: 2,73, $p < 0,0001$), schwachen Enhancern (OR: 1,89, $p < 0,05$) und gehemmttem Chromatin (OR: 2,73, $p < 0,0001$) lokalisiert waren. Interessanterweise war die Gruppe von CpG-Loci, welche ausschließlich beim OSCC hypermethyliert war, auch reich an Loci, die bei NHEK in allein liegenden Promotoren (OR: 2,82, $p < 0,0001$), schwachen Enhancern (OR: 1,56, $p < 0,05$) sowie unterdrückten genomischen Sequenzen (OR: 2,51, $p < 0,0001$) lagen, während sie arm war an Loci in aktiven Promotoren (OR: 0,29, $p < 0,0001$) und heterochromatischen Regionen (OR: 0,42, $p < 0,0001$).

3.6 Der Einfluss exogener Noxen auf das DNA-Methylom beim OLP und OSCC

Da schon zuvor berichtet wurde, dass Rauchen und Alkoholkonsum eine Transformation zu Krebs fördern können (72), fragten wir uns, ob wir Alterationen im Methylierungsmuster des OLP und/oder OSCC eine Beziehung zu Rauchen und Alkoholkonsum zuweisen können. Jedoch konnten wir dabei keine signifikante Korrelation im Vergleich von Rauchern und Alkoholikern zu den Nichtrauchern und Nichtalkoholikern nachweisen. Dies entspricht den Ergebnissen einer anderen Studie, die ebenfalls bei der Methylierung von RASSF1A, RASSF2A, PTEN und HIN-1 beim oralen Plattenepithelkarzinom keine Assoziation mit dem Alter, Zigaretten- oder Alkoholkonsum nachweisen konnte (73).

3.7 Das epigenetische Alter der OLP- und OSCC-Proben

Da das Altern mit klaren Veränderungen des DNA-Methyloms korreliert, kann die DNA-Methylierung zur Berechnung des biologischen Alters einer Probe genutzt werden (69, 70). Abweichungen des biologischen, beziehungsweise epigenetischen Alters vom chronologischen Alter wurden bereits mit zahlreichen Erkrankungen, unter anderem auch verschiedenen Krebsentitäten assoziiert (74). Daher nutzten wir den „DNAm age calculator“ zur Bestimmung des epigenetischen Alters der OSCC-, OLP- sowie der Kontrollproben (Abbildung 16). Dabei fanden wir jedoch keine deutlichen Beschleunigungen oder Verlangsamungen des Alterns, weder beim OLP noch dem OSCC.

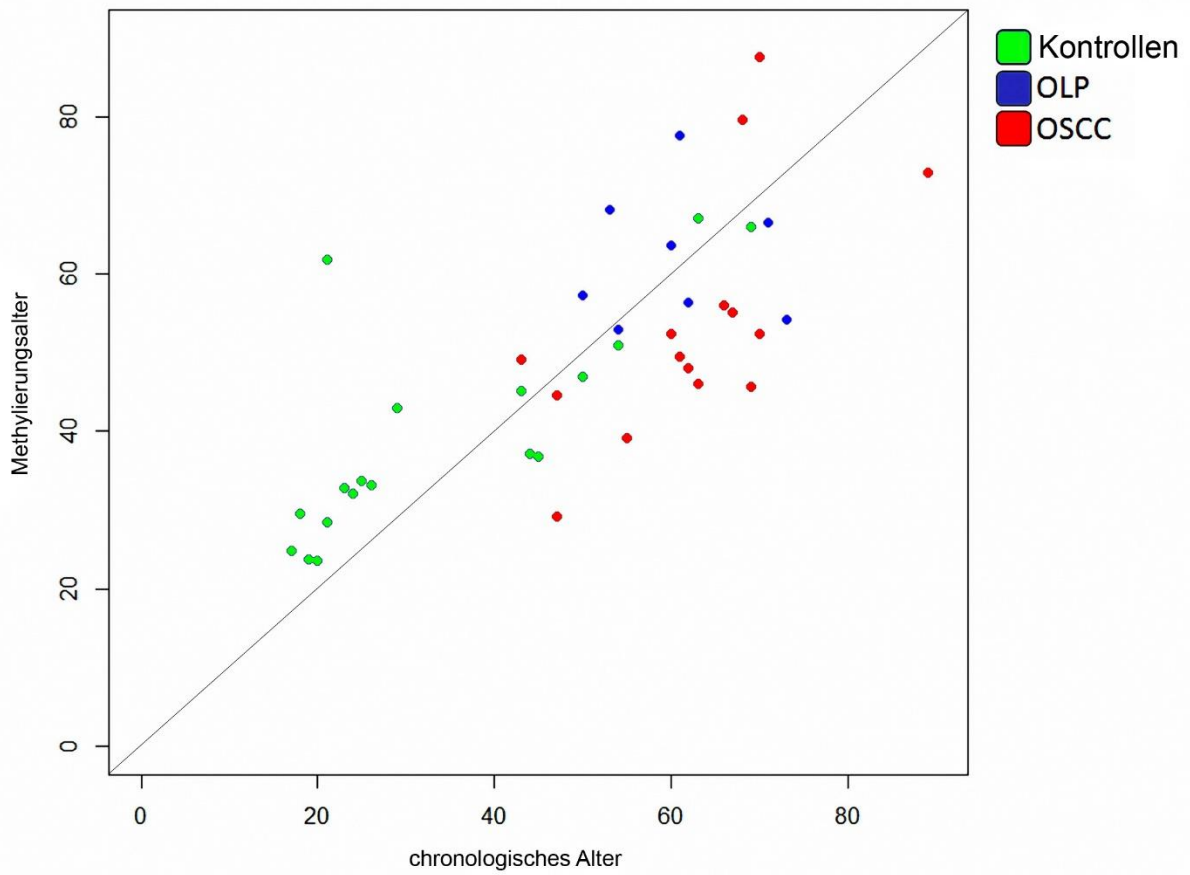


Abbildung 16: Das Streudiagramm zeigt die durch den Altersrechner von Steve Horvath bestimmte Korrelation des chronologischen Patientenalters mit dem epigenetischen "Methylierungsalter" der Proben. grün: Kontrollen; blau: OLP; rot: OSCC. Die schwarze Linie zeigt Positionen an denen das chronologische Alter dem Methylierungsalter entspricht.

4 Diskussion

In der vorliegenden Doktorarbeit untersuchten wir aberrante Methylierungsmuster von normaler Mundschleimhaut, OLP und OSCC, um ein besseres Verständnis der Karzinogenese des OSCC zu erhalten. Hierfür untersuchten wir 450.000 CpG Loci des Genoms, speziell in Hinsicht auf veränderte Methylierungsmuster zwischen normaler oraler Mukosa, OLP und OSCC. Bei dieser Analyse zeigten sich verschiedene veränderte Methylierungen, welche zu einem besseren Verständnis des OSCC und seiner Karzinogenese beitragen könnten.

Die Ätiologie des OLP und dessen potentiell prämaligner Status ist bislang nur schlecht verstanden (75-77). Es gibt jedoch deutliche Hinweise bezüglich einer Beziehung zwischen chronischen Entzündungen und Tumorentstehung. Es ist offensichtlich, dass die Mundhöhle mit ihren speziellen Umweltbedingungen wie z.B. bakteriellen und viralen Infektionen sowie fortlaufenden chemischen Irritationen einem besonderen Risiko der Entwicklung chronischer Entzündungen ausgesetzt ist. Es ist bekannt, dass das Zusammenspiel von entzündlicher Mikroumwelt und genetischen sowie epigenetischen Veränderungen mit der Zeit zur Entwicklung verschiedener Arten von Krebs führen kann (17-20, 23, 78). Ferner wurde darauf hingedeutet, dass bei Krebs vorkommende epigenetische Veränderungen, wie z.B. DNA-Methylierungen und Gen-Silencing, in entzündetem Gewebe beschleunigt ablaufen (60).

Unsere Studie hatte zum Ziel, genetische und epigenetische Veränderungen, die sowohl beim OLP als auch dem OSCC vorkommen, sowie für das OSCC spezifische Alterationen zu identifizieren. Diese Informationen könnten dabei behilflich sein, molekulare Schritte bei der Entwicklung von OLP und einem nachfolgenden Auftreten eines OSCC zu definieren. Während wir mehrere genetische Alterationen beim OLP identifizieren konnten, waren keine davon auf den OLP beschränkt, da sie ebenfalls bei normalen Kontrollen gefunden wurden. Nur zwei individuelle OLP-Proben zeigten Ähnlichkeiten in ihrem Alterationsmuster. Daher konnten, zumindest bei der begrenzten Anzahl an OLP-Proben unserer Studie, keine für den OLP spezifischen genetischen Alterationen identifiziert werden, welche eine Abgrenzung von normalen Gewebeproben erlaubten. Ferner unterschieden sich die Gruppen der OLP-, OSCC- und Kontrollpatienten in ihrem medianen Alter. Die gesunde Kontrollgruppe bestand hauptsächlich aus recht jungen Patienten, die meist auf Grund von Weisheitszahnextraktionen oder Dysgnathieoperationen operiert wurden. Die Entwicklung von OLP und insbesondere

dem OSCC tritt hingegen in höherem Alter auf. Ein höheres Alter bedeutet eine längere Exposition gegenüber Umweltfaktoren und gegebenenfalls einen anderen Lebensstil, was die Methylierungsmuster beeinflussen und das Krebsrisiko erhöhen kann (79). Aus diesen Gründen könnte eine größere Studie mit angepassten Gruppen hiermit verbundene Störfaktoren reduzieren. Im Gegensatz zum OLP konnten für das OSCC charakteristische genetische Alterationen auf Chromosom 3, 8 und 9 gefunden werden. Wiederkehrend hinzugewonnene Sequenzen auf Chromosom 9 beinhalten die Gene, welche für das bei der Apoptoseinduktion beteiligte KANK1 (KN motif and Ankyrin repeat domains 1) (80, 81) sowie für Hauptakteure bei der Karzinogenese gastrointestinaler und hämatologischer Neoplasien wie die UHRF2-Proteinligase (ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 2), JAK2 (Januskinase 2) oder SMARCA2 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, Unterfamilie a, Mitglied 2) (82-87) kodieren. Während sich diese hinzugewonnenen Sequenzen auf Chromosom 9 bei 47% aller OSCC-Proben fanden, kamen sie bei keiner der OLP- oder Kontrollproben vor. Ferner zeigten 67% aller OSCC Sequenzverluste auf Chromosom 3, welche an Position 114.243 begannen. Die kleinste bei diesen Proben verlorene Region beinhaltete lediglich das Gen, welches für CHL1 (cell adhesion molecule L1 like) kodiert. Das kodierte Protein könnte bei Signaltransduktionswegen beteiligt sein. CHL1-Veränderungen wurden auch mit verschiedenen Tumorentitäten in Verbindung gebracht und als Biomarker für Tumoren wie beispielsweise den Brustkrebs vorgeschlagen (88-91). Interessanterweise zeigte eine der OLP-Proben diese Veränderung, was auf einen fortgeschrittenen prämaligen Status ebendieser hinweisen könnte. Auch auf Chromosom 8 konnten bei einigen Patienten hinzugewonnene Sequenzen identifiziert werden, welche jedoch nicht gehäuft auftraten. Insgesamt identifizierten wir wiederkehrende genetische Alterationen beim OSCC, aber nicht beim OLP. Anzahl und Größe der beim OSCC gefundenen genetischen Alterationen war im Vergleich mit den OLP- und normalen Kontroll-Proben signifikant erhöht, was für eine erhöhte genetische Instabilität dieser neoplastischen Proben spricht. Da wir keine Änderung der Anzahl oder Größe genetischer Alterationen beim Vergleich zwischen OLP und Kontrollen feststellen konnten, sprechen unsere Daten dafür, dass die genetische Stabilität beim OLP nicht signifikant beeinträchtigt ist. Im Gegensatz zu den genetischen Alterationen identifizierten wir im Vergleich zu den Kontrollgeweben zahlreiche Alterationen des DNA-Methylierungsmusters sowohl beim OLP als auch dem OSCC. DNA-Methylom-Daten unterschieden deutlich zwischen allen drei Gruppen.

Interessanterweise war ein großer Teil der beim OLP aberrant methylierten CpG-Loci gleichermaßen methyliert beim OSCC. Dies unterstützt die Hypothese, dass der OLP eine Vorgängerläsion des OSCC ist: Teile des DNA-Methyloms sind bereits verändert und könnten somit die betroffene (präkanzeröse) Zelle darauf vorbereiten sich zu einer Krebszelle zu entwickeln. Allerdings war eine Vielzahl weiterer Epimutationen ausschließlich charakteristisch für das OSCC. Dies gilt insbesondere für die Hypermethylierung von Loci, die in bivalenten Promotoren liegen. Interessanterweise wurde über ähnliche Erkenntnisse bei Lebererkrankungen (Fettlebererkrankung, Leberzirrhose und hepatozelluläres Karzinom (HCC)) berichtet. Hier wurde über zunehmende Anzahl von Epimutationen bei der Erkrankungsprogression berichtet, während Hypermethylierungen bivalenter Promotoren und von Zielgenen des PRC2 (polycomb repressor complex 2) auf das HCC beschränkt waren (92, 93). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurden Hypermethylierungen bivalenter Promotoren als allgemeines Charakteristikum maligner Tumoren beschrieben (94). Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse unserer Studie die Hypothese, dass der OLP eine Vorgängerläsion des OSCC ist. Während OLP und OSCC bereits mehrere epigenetische Alterationen teilen, sind weitere Epimutationen und genetische Alterationen charakteristisch für das OSCC. Unsere Studienergebnisse könnten dabei helfen die frühe Diagnose zu verbessern, Patienten mit einem Risiko für die Entwicklung eines OSCC zu identifizieren und ein geeignetes Patientenmanagement zu fördern.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten genetische und epigenetische Veränderungen, insbesondere aberrante Methylierungen, beim oralen Plattenepithelkarzinom und dem potentiell prämaligen oralen Lichen planus untersucht werden. Im Speziellen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es wiederkehrende chromosomale Veränderungen beim oralen Lichen planus und dem oralen Plattenepithelkarzinom im Vergleich zu gesundem Gewebe?
2. Gibt es wiederkehrende aberrante Methylierungen an CpG-Loci beim oralen Lichen planus und dem oralen Plattenepithelkarzinom?
3. Gibt es Hinweise, dass der orale Lichen planus als mögliche Vorgängerläsion des oralen Plattenepithelkarzinoms angesehen werden kann?

Hierfür untersuchten wir 8 orale Lichen planus-, 15 orale Plattenepithelkarzinom- sowie 18 gesunde Vergleichsproben auf genetische und vor allem epigenetische Veränderungen. Dabei analysierten wir 450.000 CpG-Loci des Genoms, speziell in Hinsicht auf veränderte Methylierungsmuster. Unter Verwendung des HumanMethylation450K BeadChip identifizierten wir auf genetischer Ebene für das orale Plattenepithelkarzinom charakteristische veränderte chromosomale Muster, während wir keine wiederkehrenden Alterationen beim oralen Lichen planus nachweisen konnten. Im Gegensatz dazu konnten wir im Vergleich zu den normalen Kontrollen mehrere Alterationen des DNA-Methylierungsmusters beim oralen Lichen planus identifizieren, die auch beim oralen Plattenepithelkarzinom nachzuweisen waren. Unsere Daten unterstützen die Hypothese, dass oraler Lichen planus als eine Vorgängerläsion des oralen Plattenepithelkarzinoms angesehen werden kann und mehrere epigenetische Alterationen mit dem oralen Plattenepithelkarzinom teilt.

6 Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, SI EM DR, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0 CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer: International Agency for Research on Cancer. 2013.
2. Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(7):878-87.
3. Listl S, Jansen L, Stenzinger A, Freier K, Emrich K, Holleczeck B, et al. Survival of patients with oral cavity cancer in Germany. *PLoS One.* 2013;8(1):e53415.
4. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol.* 2005;16(3):481-8.
5. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48(11):3282-7.
6. Molina PE, Hoek JB, Nelson S, Guidot DM, Lang CH, Wands JR, et al. Mechanisms of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27(3):563-75.
7. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006;7(2):149-56.
8. Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. *Oral Oncol.* 1998;34(6):441-7.
9. Yakin M, Seo B, Hussaini H, Rich A, Hunter K. Human papillomavirus and oral and oropharyngeal carcinoma: the essentials. *Aust Dent J.* 2019;64(1):11-8.
10. Martin D, Gutkind JS. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 2:S31-42.
11. Kansy K, Thiele O, Freier K. The role of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma: myth and reality. *Oral Maxillofac Surg.* 2014;18(2):165-72.
12. Markopoulos AK. Role of human papillomavirus in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. *World J Exp Med.* 2012;2(4):65-9.
13. Zil ER, Baig S, Zaman U, Lucky MH. Human papilloma virus 16/18: Fabricator of trouble in oral squamous cell carcinoma. *Int J Infect Dis.* 2018;69:115-9.
14. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(9):709-20.

15. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004;78(21):11451-60.
16. Gillison ML, Akagi K, Xiao W, Jiang B, Pickard RKL, Li J, et al. Human papillomavirus and the landscape of secondary genetic alterations in oral cancers. *Genome Res*. 2019;29(1):1-17.
17. Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med*. 2010;10(4):369-73.
18. Mantovani A, Garlanda C, Allavena P. Molecular pathways and targets in cancer-related inflammation. *Ann Med*. 2010;42(3):161-70.
19. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.
20. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
21. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*. 2013;35(2):229-44.
22. Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2014;345(2):235-41.
23. Bonomi M, Patsias A, Posner M, Sikora A. The role of inflammation in head and neck cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014;816:107-27.
24. Tampa M, Mitran MI, Mitran CI, Sarbu MI, Matei C, Nicolae I, et al. Mediators of Inflammation - A Potential Source of Biomarkers in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Immunol Res*. 2018;2018:1061780.
25. Liu Y, Messadi DV, Wu H, Hu S. Oral lichen planus is a unique disease model for studying chronic inflammation and oral cancer. *Med Hypotheses*. 2010;75(6):492-4.
26. Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA, et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103 Suppl:S25 e1-12.
27. Reichart PA. [Oral precancerous conditions--an overview]. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2003;7(4):201-7.
28. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(4):350-65.

29. Feldmeyer L, Suter VG, Oeschger C, Cazzaniga S, Bornstein MM, Simon D, et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions - an analysis of clinical and histopathological features. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019.
30. van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;14(7):E310-4.
31. Alrashdan MS, Cirillo N, McCullough M. Oral lichen planus: a literature review and update. *Arch Dermatol Res*. 2016;308(8):539-51.
32. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(30):10604-9.
33. Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, Bork-Jensen J, Lara E, Calvanese V, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation differences in muscle and fat from monozygotic twins discordant for type 2 diabetes. *PLoS One*. 2012;7(12):e51302.
34. Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, De Rosa G, et al. Epigenetic dysregulation in oral cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):2331-53.
35. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011;21(3):381-95.
36. Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(5):576-81.
37. Gayon J. From Mendel to epigenetics: History of genetics. *C R Biol*. 2016;339(7-8):225-30.
38. Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene*. 2002;21(27):4231-6.
39. Arantes LM, de Carvalho AC, Melendez ME, Carvalho AL, Goloni-Bertollo EM. Methylation as a biomarker for head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2014;50(6):587-92.
40. Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med*. 2008;59:267-80.
41. Taberlay PC, Jones PA. DNA methylation and cancer. *Prog Drug Res*. 2011;67:1-23.
42. Paska AV, Hudler P. Aberrant methylation patterns in cancer: a clinical view. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25(2):161-76.

43. Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, Souza FP, Filho JF, Fukuyama EE, et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;173(1):31-7.
44. Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol.* 2006;7(1):77-82.
45. Loyo M, Brait M, Kim MS, Ostrow KL, Jie CC, Chuang AY, et al. A survey of methylated candidate tumor suppressor genes in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 2011;128(6):1393-403.
46. Sharma R, Panda NK, Khullar M. Hypermethylation of carcinogen metabolism genes, CYP1A1, CYP2A13 and GSTM1 genes in head and neck cancer. *Oral Dis.* 2010;16(7):668-73.
47. Poage GM, Houseman EA, Christensen BC, Butler RA, Avissar-Whiting M, McClean MD, et al. Global hypomethylation identifies Loci targeted for hypermethylation in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(11):3579-89.
48. Dang J, Bian YQ, Sun JY, Chen F, Dong GY, Liu Q, et al. MicroRNA-137 promoter methylation in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2013;42(4):315-21.
49. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015;517(7536):576-82.
50. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* 2000;24(2):132-8.
51. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2000;1(1):11-9.
52. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3(6):415-28.
53. Costello JF, Plass C, Cavenee WK. Aberrant methylation of genes in low-grade astrocytomas. *Brain Tumor Pathol.* 2000;17(2):49-56.
54. Faust C, Lawson KA, Schork NJ, Thiel B, Magnuson T. The Polycomb-group gene *eed* is required for normal morphogenetic movements during gastrulation in the mouse embryo. *Development.* 1998;125(22):4495-506.

55. Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, Sidow A, et al. Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell*. 2009;139(7):1290-302.
56. Bracken AP, Helin K. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(11):773-84.
57. Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, et al. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet*. 2007;39(2):232-6.
58. Gal-Yam EN, Egger G, Iniguez L, Holster H, Einarsson S, Zhang X, et al. Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(35):12979-84.
59. Martin-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, Wickham-Garcia E, et al. New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood*. 2009;113(11):2488-97.
60. Brower V. Epigenetics: Unravelling the cancer code. *Nature*. 2011;471(7339):S12-3.
61. Ha PK, Benoit NE, Yochem R, Sciubba J, Zahurak M, Sidransky D, et al. A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(8):3058-64.
62. Ha PK, Pilkington TA, Westra WH, Sciubba J, Sidransky D, Califano JA. Progression of microsatellite instability from premalignant lesions to tumors of the head and neck. *Int J Cancer*. 2002;102(6):615-7.
63. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:48.
64. van der Meij EH, van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(9):507-12.
65. van der Meij EH, Schepman KP, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;96(2):164-71.
66. van der Meij EH, Mast H, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncol*. 2007;43(8):742-8.

67. de Souza MMA, Hartel G, Whiteman DC, Antonsson A. Detection of oral HPV infection - Comparison of two different specimen collection methods and two HPV detection methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;90(4):267-71.
68. Booth MJ, Branco MR, Ficz G, Oxley D, Krueger F, Reik W, et al. Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science*. 2012;336(6083):934-7.
69. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013;14(10):R115.
70. Horvath S. Erratum to: DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2015;16:96.
71. Feber A, Guilhamon P, Lechner M, Fenton T, Wilson GA, Thirlwell C, et al. Using high-density DNA methylation arrays to profile copy number alterations. *Genome Biol*. 2014;15(2):R30.
72. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 1995;332(11):712-7.
73. Huang KH, Huang SF, Chen IH, Liao CT, Wang HM, Hsieh LL. Methylation of RASSF1A, RASSF2A, and HIN-1 is associated with poor outcome after radiotherapy, but not surgery, in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(12):4174-80.
74. Perna L, Zhang Y, Mons U, Holleczeck B, Saum KU, Brenner H. Epigenetic age acceleration predicts cancer, cardiovascular, and all-cause mortality in a German case cohort. *Clin Epigenetics*. 2016;8:64.
75. Eisenberg E. Oral lichen planus: a benign lesion. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58(11):1278-85.
76. Silverman S, Jr. Oral lichen planus: a potentially premalignant lesion. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58(11):1286-8.
77. Zhang L, Michelsen C, Cheng X, Zeng T, Priddy R, Rosin MP. Molecular analysis of oral lichen planus. A premalignant lesion? *Am J Pathol*. 1997;151(2):323-7.
78. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.

79. Dugue PA, Bassett JK, Joo JE, Jung CH, Ming Wong E, Moreno-Betancur M, et al. DNA methylation-based biological aging and cancer risk and survival: Pooled analysis of seven prospective studies. *Int J Cancer*. 2018;142(8):1611-9.
80. Guo X, Fan W, Bian X, Ma D. Upregulation of the Kank1 gene-induced brain glioma apoptosis and blockade of the cell cycle in G0/G1 phase. *Int J Oncol*. 2014;44(3):797-804.
81. Luo FY, Xiao S, Liu ZH, Zhang PF, Xiao ZQ, Tang CE. Kank1 reexpression induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine suppresses nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and promotes apoptosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):1658-65.
82. Segedi M, Anderson LN, Espin-Garcia O, Borgida A, Bianco T, Cheng D, et al. BRM polymorphisms, pancreatic cancer risk and survival. *Int J Cancer*. 2016;139(11):2474-81.
83. Pasic I, Wong KM, Lee JJ, Espin-Garcia O, Brhane Y, Cheng D, et al. Two BRM promoter polymorphisms predict poor survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*. 2018;57(1):106-13.
84. Chen CC, Chiu CC, Lee KD, Hsu CC, Chen HC, Huang TH, et al. JAK2V617F influences epigenomic changes in myeloproliferative neoplasms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;494(3-4):470-6.
85. Xu Y, Jin J, Xu J, Shao YW, Fan Y. JAK2 variations and functions in lung adenocarcinoma. *Tumour Biol*. 2017;39(6):1010428317711140.
86. Mori T, Ikeda DD, Yamaguchi Y, Unoki M, Project N. NIRF/UHRF2 occupies a central position in the cell cycle network and allows coupling with the epigenetic landscape. *FEBS Lett*. 2012;586(11):1570-83.
87. Lai M, Liang L, Chen J, Qiu N, Ge S, Ji S, et al. Multidimensional Proteomics Reveals a Role of UHRF2 in the Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT). *Mol Cell Proteomics*. 2016;15(7):2263-78.
88. Martin-Sanchez E, Mendaza S, Ulazia-Garmendia A, Monreal-Santesteban I, Blanco-Luquin I, Cordoba A, et al. CHL1 hypermethylation as a potential biomarker of poor prognosis in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(9):15789-801.
89. He LH, Ma Q, Shi YH, Ge J, Zhao HM, Li SF, et al. CHL1 is involved in human breast tumorigenesis and progression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;438(2):433-8.
90. Yang Z, Xie Q, Hu CL, Jiang Q, Shen HF, Schachner M, et al. CHL1 Is Expressed and Functions as a Malignancy Promoter in Glioma Cells. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:324.

91. Pezzolo A, Sementa AR, Lerone M, Morini M, Ognibene M, Defferrari R, et al. Constitutional 3p26.3 terminal microdeletion in an adolescent with neuroblastoma. *Cancer Biol Ther.* 2017;18(5):285-9.
92. Ammerpohl O, Pratschke J, Schafmayer C, Haake A, Faber W, von Kampen O, et al. Distinct DNA methylation patterns in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2012;130(6):1319-28.
93. Ahrens M, Ammerpohl O, von Schonfels W, Kolarova J, Bens S, Itzel T, et al. DNA methylation analysis in nonalcoholic fatty liver disease suggests distinct disease-specific and remodeling signatures after bariatric surgery. *Cell Metab.* 2013;18(2):296-302.
94. Bernhart SH, Kretzmer H, Holdt LM, Juhling F, Ammerpohl O, Bergmann AK, et al. Changes of bivalent chromatin coincide with increased expression of developmental genes in cancer. *Sci Rep.* 2016;6:37393.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang danke ich sehr für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, durchführen zu können.. Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. V. Gaßling, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, für die ausgezeichnete Anleitung und unermüdliche Betreuung der Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. O. Ammerpohl, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, für seine Unterstützung bei der Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn PD J.-H. Bräsen, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel für seine große Hilfe bei der Auswertung der histopathologischen Gewebeschnitte zur Bestätigung der klinischen Diagnosen.

Der Technischen Angestellten Frau G. Refrath, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel danke ich für die allzeit hervorragende Hilfestellung bei der fachgerechten Aufbewahrung der Proben.

Ein besonders großer Dank gilt allen Patienten, die sich bereit erklärten an der Studie teilzunehmen und es uns ermöglichten Proben der verschiedenen Erkrankungen sowie gesunder Vergleichsgewebe zu erhalten.

Auch möchte ich mich bei allen nicht genannten Mitarbeitern der beteiligten Kliniken bedanken.