

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito
-Funktionsbereich Cytopathologie-

Retrospektive Fallkontrollstudie zur Etablierung einer diagnostischen
Fluoreszenz in Situ Hybridisierung an zytologischen Bürstenabstrichen von
auffälligen Mundschleimhautläsionen bei Menschen mit Fanconi-Anämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Mona von der Heyden, geb. Markgraf

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Jörg Felsberg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Silva de Araujo BE, Markgraf M, de Santana Almeida Araujo IK, Velleuer E, Dietrich R, Pomjanski N, Schramm M: A New Multi-Color FISH Assay for Brush Biopsy-Based Detection of Chromosomal Aneuploidy in Oral (Pre)Cancer in Patients with Fanconi Anemia. *Cancers (Basel)* 14 (14): 3468, 2022. PMID: 35884529 [1]

Zusammenfassung

Die Fanconi-Anämie (FA) ist eine seltene genetische Erkrankung mit Störungen der DNA-Reparatur und einem 500- bis 700-fach erhöhten Risiko für die Entstehung eines Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich, insbesondere oral. FA-Betroffene besitzen meist benigne, gelegentlich aber maligne, ausgedehnte oder multiple Mundschleimhautläsionen, die klinisch nicht sicher, aber gut mittels Bürstenabstriches und zytologischer Untersuchung zugeordnet werden können. Ein Teil der Abstriche bleibt aber aufgrund zu geringer Zahl auffälliger Zellen diagnostisch unklar. Die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) benötigt nur wenige Zellen zur weiteren diagnostischen Abklärung. Ziel der Studie ist die Etablierung eines diagnostischen Cutoffs für die FISH-Untersuchungen zur Abgrenzung benigner und (prä)maligner Läsionen.

Für die retrospektive Studie wurden 93 negative und 87 zytologisch unklare oder positive Mundschleimhautabstriche von FA-Betroffenen aus den Jahren 2007 bis 2017 und bekanntem weiterem Krankheitsverlauf mittels Mehrfarben-FISH, bestehend aus den DNA-Sonden für *CCND1*, *hTERC*, *MYC* sowie dem Zentromer des Chromosoms 6 hybridisiert. In einem zweiten Schritt wurden die Präparate mit zwei weiteren Sonden für 9p21 (*CDKN2A*) und das Zentromer des Chromosoms 9 re-hybridisiert. Die Zahl der Fluoreszenzsignale wurden für ca. 50 Zellen ermittelt und je Zelle auch kombiniert ausgewertet (Mehrfarben-FISH). Die diagnostischen Treffsicherheiten für eine chromosomale Aneuploidie im Vergleich mit dem Follow-Up Referenzstandard wurden mittels Youden-Indices analysiert.

Von den 180 ausgewählten und mittels FISH untersuchten Präparaten waren 160 auswertbar. Es ergaben sich bei der Doppelbestimmung in der Arbeitsgruppe fast perfekte (0,856) bis moderate (0,517) Kappa-Werte. Bei einem Schwellenwert von 7 oder mehr aneuploiden Zellen konnte je nach zugrunde gelegter Aneuploidie-Definition (D1-D4) und Auswertung aller Präparate bzw. nur der zytologisch unklaren und positiven, eine positive FISH-Diagnose mit einer Sensitivität von 61,5% bis 84,2% und einer Spezifität von 25% bis 92,6% für mindestens eine hochgradige orale epitheliale Dysplasie gestellt werden. D4 war mit einer Sensitivität von 69,2% bzw. 71,1% und einer Spezifität von 90,1% bzw. 72,5% zur Abgrenzung von gutartigen und bösartigen Mundschleimhautläsionen am besten geeignet. Die Re-Hybridisierung mit 9p21/Zentromer 9 Sonden ergab bei einem hohen Schwellenwert von mindestens 12 bzw. 30 Zellen mit relativer Deletion von 9p21 eine Sensitivität von 88,9% bzw. 62,9% und eine Spezifität von 67,2% bzw. 57,9%. Dies ist für eine klinische Anwendung zu gering. Es ergaben sich einige falsch-positive und falsch-negative Befunde der Mehrfarben-FISH. Erstere könnten auf ein bereits genetisch verändertes Feld aber morphologisch noch nicht fassbarer maligner Transformation zurückzuführen sein und lassen sich ggf. erst bei längerer Nachbeobachtungszeit bestätigen. Bei Letzteren könnten Schwierigkeiten bei der Hybridisierung und exakten Ermittlung der Fluoreszenzsignale aufgrund von abgebauter DNA ursächlich sein. Der ermittelte Cutoff-Wert sollte daher weiter in einer optimalerweise prospektiven Kohorte mit frischen Präparaten untersucht werden.

Summary

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disorder characterized by DNA repair defects and a 500-700-fold increased risk of developing carcinoma in the head and neck region, particularly in the oral cavity. FA patients usually have benign, but occasionally malignant, extensive or multiple oral mucosal lesions that cannot be clinically diagnosed with certainty but can be identified using brush biopsies and cytological examination. However, some of the biopsies remain diagnostically unclear due to the low number of abnormal cells. Fluorescence in situ hybridization (FISH) requires only a few cells for further diagnostic clarification. The aim of the study is to establish a diagnostic cutoff for FISH examinations to distinguish between benign and (pre)malignant lesions.

For the retrospective study, 93 negative and 87 cytologically unclear or positive oral mucosa swabs from FA patients from 2007 to 2017 with known further disease progression were hybridized using multicolor FISH, consisting of DNA probes for *CCND1*, *hTERC*, *MYC*, and the centromere of chromosome 6. In a second step, the preparations were re-hybridized with two additional probes for 9p21 (*CDKN2A*) and the centromere of chromosome 9. The number of fluorescence signals was determined for approximately 50 cells and also evaluated in combination for each cell (multicolor FISH). The diagnostic accuracy for chromosomal aneuploidy was analyzed using Youden indices in comparison with the follow-up reference standard.

Of the 180 specimens selected and examined using FISH, 160 were evaluable. The double determination in the working group yielded kappa values ranging from almost perfect (0.856) to moderate (0.517). With a threshold value of 7 or more aneuploid cells, depending on the defined aneuploidy definition (D1-D4) and evaluation of all specimens or only those that were cytologically unclear and positive, a positive FISH diagnosis with a sensitivity of 61.5% to 84.2% and a specificity of 25% to 92.6% for at least one high-grade oral epithelial dysplasia. D4 was best suited for distinguishing between benign and malignant oral mucosal lesions, with a sensitivity of 69.2% and 71.1% and a specificity of 90.1% and 72.5%. Re-hybridization with 9p21/centromere 9 probes at a high threshold of at least 12 or 30 cells with relative deletion of 9p21 yielded a sensitivity of 88.9% and 62.9%, and a specificity of 67.2% and 57.9%. This is too low for clinical application. There were some false-positive and false-negative findings in the multicolor FISH. The former could be due to a genetically altered field that is not yet morphologically detectable malignant transformation and may only be confirmed after a longer follow-up period. In the latter case, difficulties in hybridization and accurate determination of the fluorescence signals due to degraded DNA could be the cause. The determined cutoff value should therefore be further investigated in an optimally prospective cohort with fresh specimens.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADDResS	Translational Research for Persons with Abnormal DNA Damage Response
AML	akute myeloische Leukämie
AUC	area under the curve
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
c	content
CASP8	Caspase 8
CCND1	<i>Cyclin D1 Gen</i>
CDK	cyclinabhängige Kinasen
CDKN2A	<i>cyclinabhängiger Kinase-Inhibitor 2A</i>
CEP	DNA-Sonde für die Zentromerregion
CKS1B	<i>cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1</i>
CT	Computertomographie
D	Aneuploidie-Definition
DAPI	4,6-Diamidin-2-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	<i>epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor</i>
ESACP	European Society for Analytical Cellular Pathology
FA	Fanconi-Anämie
FCF	Fanconi Cancer Foundation
FHIT	fragile histidine triad
FISH	Fluoreszenz in Situ Hybridisierung
FN	falsch-negativ
FP	falsch-positiv
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HCl	Chlorwasserstoff
HNSCC	Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich
HRAS	Harvey Rat Sarcoma Virus
hTERC	<i>human telomerase RNA component</i>
HPV	humanes Papillomavirus
IOD	integrierte optische Dichte
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KMT	Knochenmarkstransplantation
Konfidenzint.	Konfidenzintervall
LOH	loss of heterozygosity
LSI	lokusspezifische Indikatorsonde
MET	MET Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase
MYC	<i>MYC Proto-Oncogene</i>
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat

NaCl	Natriumchlorid
NP-40	Nonoxynol-40
NPV	negativer prädiktiver Wert
OED	oral epithelial dysplasia
OSCC	orales Plattenepithelkarzinom
OPMD	orale potenziell maligne Erkrankungen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PI3Ks	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
PPV	positiver prädiktiver Wert
ROC	Receiver operating characteristic
RS	Referenzstandard
SCC	20x Kochsalz-Natriumcitrat
Sens.	Sensitivität
Spez.	Spezifität
SV	Strukturvariante
TERC	<i>telomerase RNA component</i>
TERT	telomerase reverse transcriptase
TN	richtig negativ
TP	richtig positiv
TP53	<i>Tumorsuppressor-Gen 53</i>
UC	Urothelkarzinom
US	United States
Y	höchster Youdenindex
Youd.	Youdenindex

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Fanconi-Anämie (FA).....	1
1.1.1	Genetische Grundlagen und molekulare Diagnostik	1
1.1.2	Klinische Merkmale	2
1.2	Orales Plattenepithelkarzinom in der Allgemeinbevölkerung	3
1.2.1	Definition	3
1.2.2	Risikofaktoren	3
1.2.3	Orale potenziell maligne Erkrankungen	3
1.2.4	Genetische Veränderungen.....	4
1.2.5	Therapie und Prognose	5
1.3	Orales Plattenepithelkarzinom bei FA.....	6
1.3.1	Unterschiede zur Allgemeinbevölkerung.....	6
1.3.2	Risikofaktoren	6
1.3.3	Orale potenziell maligne Erkrankungen	6
1.3.4	Genetische Veränderungen.....	7
1.3.5	Therapie.....	7
1.4	Zytologische Mundschleimhautdiagnostik	8
1.4.1	Bürstenbiopsie und zytologische Diagnostik von OPMDs und OSCC	8
1.4.2	Zytologische Befundung und Klassifikation	10
1.4.3	DNA-Bildzytometrie	11
1.5	Bürstenbiopsie-basierte zytologische Diagnostik bei FA.....	12
1.6	Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH).....	13
1.6.1	FISH in der zytologischen Diagnostik	13
1.6.2	FISH bei Mundschleimhautläsionen.....	15
1.6.3	Pilotstudie zur Anwendung einer Mehrfarben-FISH bei FA-assoziierten OSCC	15
1.6.4	Vorbereitung einer FISH zur klinischen Anwendung an Mundschleimhautläsionen	17
1.7	Ziele der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Ethikvotum und Abgrenzung der eigenen Leistung	19
2.2	Studienaufbau, Auswahl und Markierung geeigneter Präparate	20

2.3	Geräte, Materialien und Lösungen.....	21
2.4	Mehrfarben-FISH, Hybridisierung	25
2.5	9p21-FISH, Rehybridisierung	28
2.6	Auswertung mit dem Fluoreszenz-Mikroskop	30
2.6.1	Auswertungsalgorithmus, Aneuploidie-Definitionen (D1-D4) in der Mehrfarben-FISH	30
2.6.2	Auswertungsalgorithmus, homozygote und relative Deletion in der 9p21-FISH	32
2.7	Positiver und negativer Follow-up Referenzstandard	32
2.8	Statistische Auswertung	33
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Patientenangaben und Studienausschlüsse.....	37
3.2	Berechnungen der diagnostischen Treffsicherheit für die Zytologie	38
3.3	Mehrfarben-FISH.....	39
3.3.1	Anzahl aneuploider Zellen.....	39
3.3.2	Ermittlung des Cutoff-Wertes und diagnostische Treffsicherheiten.....	41
3.3.3	Vergleich der Treffsicherheiten der eigenen Auswertungen mit den publizierten [1] Treffsicherheiten der Studie bei Cutoff 6	47
3.3.4	Übereinstimmung der eigenen Auswertungen mit den publizierten Daten eines unabhängigen Untersuchers [1] bei Cutoff 7	48
3.3.5	Falsch-positive und falsch-negative FISH-Befunde.....	49
3.4	9p21-FISH	50
3.4.1	Ermittlung des Cutoff-Wertes und diagnostische Treffsicherheiten.....	50
4	Diskussion	54
4.1	Überblick.....	54
4.2	Verteilung des Studienkollektivs.....	55
4.3	Ergebnisse der Zytologie im Literaturvergleich.....	56
4.4	Ergebnisse der Mehrfarben-FISH im Literaturvergleich	57
4.4.1	Auswahl der Algorithmen D1-D4 und euploide Polyploidisierung	57
4.4.2	Anzahl aneuploider Zellen.....	57
4.4.3	Ermittlung des Cutoff-Werts und Treffsicherheiten	58
4.4.4	Diskussion der falsch-positiven und falsch-negativen FISH-Befunde.....	62
4.5	Ergebnisse der 9p21-FISH im Literaturvergleich.....	64
4.5.1	Homozygote und relative Deletion	64

4.5.2	Ermittlung des Cutoff-Werts und Treffsicherheiten	65
4.6	Anwendung der Mehrfarben-FISH in der Mundschleimhautzytologie der Allgemeinbevölkerung und ggf. Austausch einzelner Sonden.....	67
4.7	Schlussfolgerung	67
5	Literaturverzeichnis.....	69

1 Einleitung

1.1 Fanconi-Anämie (FA)

1.1.1 Genetische Grundlagen und molekulare Diagnostik

Bei der Fanconi-Anämie (FA) handelt es sich um eine seltene genetische Erkrankung [2], die durch eine erhöhte Chromosomeninstabilität und eine beeinträchtigte DNA-Reparatur gekennzeichnet ist [3-5]. Die Trägerhäufigkeit beträgt in Nordamerika 1:181 und in Israel 1:93 [2]. Mutationen in einem von bislang 23 bekannten Genen führen zu der Erkrankung [6, 7]. Sie wird vorwiegend autosomal-rezessiv, aber auch bei jeweils einem Gen autosomal-dominant oder x-chromosomal vererbt. Die Gene kodieren für Proteine, die am FA-DNA-Reparaturweg beteiligt sind. Der DNA-Reparaturweg erkennt und beseitigt DNA-Schäden, insbesondere DNA-Quervernetzungen, und ist für die Stabilisierung des Genoms verantwortlich [8, 9]. Der FA-DNA-Reparaturweg wird vor allem während der DNA-Replikation aktiv und repariert DNA-Quervernetzungen. Das geschieht durch eine Monoubiquitinierung der Proteine FANCI und FANCD2 (I-D2-Komplex). Die Monoubiquitinierung ist von FANCL (E3-Ubiquitin-Ligase) abhängig. FANCL ist Teil des FA-Kernkomplexes. Ein Mangel in einem der Untereinheiten des FA-Kernkomplexes führt zu FA [10]. Die häufigsten Mutationen entstehen dabei in den Genen FANCA (60-70%), FANCC (14%) und FANCG (10%). Je nach verursachendem Gen wird die FA entsprechend in eine Komplementationsgruppe (z.B. FA-A, -C, -G) eingeordnet [7]. Die Komplementationsgruppen sind zum Teil mit klinischen Merkmalen assoziiert. Die klinischen Merkmale können bei der FA aber stark variieren, was die klinische Diagnose erschwert. Eindeutige Diagnosen liefern zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen [6]. Sie werden bei klinischen Auffälligkeiten oder positiver Familienanamnese angewendet.

Bei der zytogenetischen Untersuchung werden Lymphozyten einer Blutprobe mit Diepoxybutan und Mitomycin auf erhöhte Chromosomenbrüchigkeit getestet. Die Lymphozyten können auch in einer Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Sie verbleiben dabei länger in der G2-Phase als normale Lymphozyten. Sind die Tests negativ, kann ein Mosaizismus vorliegen. Bei einem Mosaizismus treten u.a. durch Rückmutationen Lymphozyten mit normaler und brüchiger DNA im Untersuchungsmaterial auf. Bei hohem klinischem Verdacht werden daher zusätzlich Fibroblasten aus einer Hautstanze untersucht. Wurde die FA bestätigt, erfolgt mithilfe molekulargenetischer Untersuchungen, d.h. einer Genanalyse, die Einteilung in die Komplementationsgruppen [8, 9]. Bei der Genanalyse wird nur noch in besonderen Fällen das gesamte Genom sequenziert. In der Regel werden mittlerweile Next-Generation-Sequencing-Paneltests angewendet, die zuvor ausgewählte Gene untersuchen. Sie sind schneller und kostengünstiger als Komplementationsanalysen [11].

1.1.2 Klinische Merkmale

Zu den drei Hauptmerkmalen der FA zählen körperliche Anomalien, fortschreitendes Knochenmarksversagen und ein erhöhtes Krebsrisiko [12].

Bei etwa 75% der FA-Betroffenen treten angeborene körperliche Anomalien auf. Einige Fehlbildungen kommen häufiger vor als andere, sind aber im gesamten Organ- und Skelettsystem möglich. Zu den häufigsten Fehlbildungen ($\geq 20\%$) zählen [6]:

- Kleinwüchsigkeit
- endokrine Störungen (z.B. Hypothyreose)
- abnorme Hautpigmentierungen (z.B. Café-au-lait-Flecken)
- Skelettfehlbildungen (z.B. fehlender oder hypoplastischer Daumen)
- Mikrozephalie
- Augenanomalien
- Anomalien im Urogenitaltrakt (z.B. verminderte Fruchtbarkeit bei Männern)

Knochenmarksversagen kann bei FA-Betroffenen in jedem Alter auftreten. Die ersten Anzeichen entwickeln die meisten bereits im ersten Lebensjahrzehnt [13]. Die Inzidenz beträgt bis zu einem Alter von 40 Jahren 90% [14].

Es kommt dabei zu einem fortschreitenden Mangel der weißen und roten Blutkörperchen meist beginnend mit den Thrombozyten und Leukozyten, die durch Makrozytose begleitet wird [6]. Der Mangel geht mit entsprechenden Symptomen wie Müdigkeit, blasser Haut, erhöhter Infektanfälligkeit, Blutergüssen oder Nasenbluten einher [12].

Auch das Sweet-Syndrom kann bei FA-Betroffenen vorkommen. Es entsteht durch neutrophile Hautinfiltrationen, die zu schmerzhaften erythematösen Plaques führen [15].

Die einzige kurative Therapie bei Knochenmarksversagen ist die Knochenmarkstransplantation (KMT) [16].

Durch verbesserte Transplantationsprotokolle und erweiterte Therapiemöglichkeiten überleben viele FA-Betroffene heutzutage bis ins Erwachsenenalter [13, 14].

Kennzeichnend für die Fanconi-Anämie ist das erhöhte Krebsrisiko. Es äußert sich in einem erhöhten Risiko für Leukämien und solide Tumore [6].

Die FA-Betroffenen entwickeln oft eine akute myeloische Leukämie (AML) oder ein myelodysplastisches Syndrom mit AML als Folge. Das relative Risiko, an einer AML zu erkranken, ist etwa 500-fach erhöht [6, 17].

Solide Tumore können die erste Manifestation von FA sein [18]. Zu den häufigsten betroffenen Regionen bei FA zählen Kopf-Hals-Bereich, Gehirn, Niere (Wilms-Tumor), Leber, Speiseröhre und Vulva [19]. In der Allgemeinbevölkerung hingegen treten Tumore am häufigsten in der Brust, Lunge, Prostata, Darm und der Haut auf und zeigen somit ein anderes Spektrum primärer Tumorentitäten. Zudem werden sie in der Regel in einem wesentlich höheren Alter von 60-70 Jahren diagnostiziert [20].

Bei FA können Lebertumore bereits bei Jugendlichen auftreten. Sie stehen im Zusammenhang mit der Einnahme von Androgenen, die bei Knochenmarksversagen

indiziert sein können. Hirn- und Nierentumore treten in der Regel vor dem 10. Lebensjahr auf, vor allem bei Mutationen im FANCD1- und FANCN-Gen [19].

Der häufigste solide Tumor und die Haupttodesursache bei FA im Erwachsenenalter ist das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC). Es tritt am häufigsten in der Mundhöhle auf (OSCC) [21-23].

1.2 Orales Plattenepithelkarzinom in der Allgemeinbevölkerung

1.2.1 Definition

Das orale Plattenepithelkarzinom (OSCC) ist eine maligne epitheliale Neoplasie mit plattenepithelialer Differenzierung, die vom Schleimhautepithel ausgeht [24].

1.2.2 Risikofaktoren

Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines OSCC sind Tabak- und Alkoholkonsum. In Kombination verstärkt sich der Effekt erheblich. Ein weiterer Risikofaktor ist die chronische Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) [25]. Darüber hinaus ist das Kauen von Betelnüssen in vielen südostasiatischen Ländern ein wichtiger Risikofaktor für ein OSCC [26, 27].

Beim Tabakkonsum steigt das Risiko mit der Anzahl an Zigaretten und der Dauer des Konsums und sinkt auch wieder proportional nach einer Rauchentwöhnung [28]. Bei Vorliegen eines OSCC führt fortgesetzter Tabakkonsum zu einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv und einem schlechteren Überleben [29-31].

Der Alkoholkonsum wirkt durch seine endogene Verstoffwechselung zu Acetaldehyd krebserregend [32]. Fehlt das entsprechende Enzym zum weiteren Abbau des Acetaldehyds (Aldehyddehydrogenase) durch ein mutiertes Gen, dann häuft es sich an und erhöht weiter das Krebsrisiko [27, 33].

Gleichzeitiger Tabak- und Alkoholkonsum wirkt synergistisch und erhöht die Acetaldehydproduktion [34].

Es besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen einer HPV16-Infektion und einem OSCC der Mundhöhle, vor allem im Oropharynx. HPV16 spielt auch eine Rolle bei der Karzinogenese des Gebärmutterhalskrebs [35]. Die HPV-DNA dringt in das Wirtsgenom ein und ermöglicht die Expression viraler Onkogenprodukte E6 und E7. Diese binden unter anderem an das Protein p53 und hemmen seine anti-onkogene Funktion [36].

Betelnüsse enthalten u.a. Alkaloide und Nitrosamine, die sich mit dem Speichel vermischen und maligne Läsionen in der Mundhöhle verursachen [26, 27]

Weitere Risikofaktoren wie mangelnde Mundhygiene, Mundspüllösungen, vitaminarme Ernährung und sozioökonomische Faktoren werden diskutiert [27].

1.2.3 Orale potenziell maligne Erkrankungen

Orale potenziell maligne Erkrankungen (OPMD) sind orale Läsionen mit einem Risiko zur Entartung in ein OSCC [24]. Die Läsionen können in der gesamten Mundhöhle auftreten. Die meisten Entartungen treten an der Zunge oder am Mundboden auf [37]. Zu den OPMDs

mit einem hohen Risiko zur Entartung zählen Leukoplakien, Erythroplakien und Erythroleukoplakien.

Die Leukoplakie ist eine weißliche, nicht abwischbare Veränderung der Mundschleimhaut, die keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann [38]. Sie kommt mit einer Prävalenz von 1-4% am häufigsten vor [39]. Sie tritt häufiger bei Männern auf. Frauen haben jedoch ein höheres Risiko für eine maligne Transformation [40]. Auch mit dem Alter steigt das Risiko [39]. Die mittlere jährliche Gesamttransformationsrate beträgt 1,56% [41]. Die Erythroplakie ist eine rötliche Veränderung der Mundschleimhaut, die keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann [24]. Sie kommt seltener vor als die Leukoplakie (<0,1%) [42], geht jedoch häufiger mit einer malignen Entartung einher [37, 38]. Auch eine Mischform mit der Leukoplakie als Erythroleukoplakie ist möglich [38].

Die Oberflächenbeschaffenheit kann bei den drei Läsionen stark variieren. Meist sind sie flach, papulös oder verrukös. Histologisch können die Läsionen leichte bis schwere epitheliale Dysplasien aufweisen [24]. Die proliferative verruköse Leukoplakie nimmt eine Sonderstellung ein, da sie trotz meist niedriger oder gelegentlich fehlender Dysplasie eine besonders hohe Transformationsrate von 70% aufweist [43]. Insgesamt ist das Transformationsrisiko bei den OPMDs ohne Berücksichtigung dysplastischer Veränderungen jedoch gering [41].

1.2.4 Genetische Veränderungen

OSCC haben zwar alle ihren Ursprung in den Epithelzellen der Schleimhaut, sind jedoch genetisch sehr heterogen. Es existieren zahlreiche molekulare Veränderungen während der Karzinogenese [44]. Die Karzinogenese beginnt wahrscheinlich mit einer Anhäufung von Mutationen in einer einzelnen adulten Stammzelle [45, 46]. Kopf-Hals-Karzinome (HNSCC) und eben auch OSCC lassen sich unter Berücksichtigung einer HPV-Kanzerogenese in drei verschiedene Untergruppen einteilen. Der HPV-Status wurde daher in die TNM Klassifikation mit aufgenommen [47]. Bei den drei Untergruppen handelt es sich um HPV negative HNSCC mit niedrigen oder hohen Genkopienzahlveränderungen und um HPV positive HNSCC [44].

Die HPV-negativen Tumore ohne Kopienzahlveränderungen treten häufig bei Frauen ohne Alkohol- oder Tabakkonsum auf [48]. Die Ätiologie ist unklar. Sie weisen aktivierende HRAS (*Harvey Rat Sarcoma Virus*)- und inaktivierende Caspase 8 (CASP8)-Mutationen und eine günstigere Prognose auf [44, 49].

Die HPV-negativen Tumore mit Kopienzahlveränderungen weisen zahlreiche Mutationen und Chromosomengewinne und -verluste auf. Bei Karzinomen findet man typischerweise Veränderungen an den Chromosomenarmen 11q, 4q und 8p. In frühen dysplastischen Veränderungen findet man häufig einen Verlust an Heterozygotie an den Chromosomen 3p, 9p und 17p (Mutation bei *TP53*) [44].

Bei den Regionen mit Chromosomengewinnen sowie -verlusten handelt es sich oft um Regionen, die Tumorsuppressor- und Onkogene beinhalten. Auf dem Chromosom 9p findet man in der Region 9p21 das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* (cyclinabhängiger Kinase-Inhibitor 2A), welches für das Protein p16 kodiert. Der Verlust trägt gemeinsam mit der Amplifikation von *CCND1* (Cyclin D1 Gen) in der Region 11q13 zu einer unkontrollierten

DNA-Replikation bei. Beide Proteine sind am Zellzyklus beteiligt. Zur Verhinderung einer unkontrollierten DNA-Replikation wird im Normalfall der Tumorsuppressor p53 aktiviert. Das Tumorsuppressor-Gen 53 (*TP53*) liegt auf Chromosom 17p (17p13). Es ist jedoch in vielen Tumorarten bereits inaktiviert und weist Allelverluste auf [50]. Zwei weitere häufig amplifizierte Onkogene sind die Wachstumsfaktorrezeptoren *EGFR* (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) und *MET* (*MET Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase*). Sie sind funktionell mit der Kontrolle des Zellwachstums verbunden [44, 49]. Auch das Onkogen *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*) in der Region 3q26 ist häufig amplifiziert. Es kodiert für die katalytische p110 α -Untereinheit der PI3Ks (Phosphoinositid-3-Kinasen) der Klasse 1 und ist an verschiedenen zellulären Eigenschaften wie Proliferation, Überleben und Motilität beteiligt [44]. Bei den HPV-positiven Tumoren handelt es sich am häufigsten um eine HPV-16-Infektion. Die viralen Onkogen-Produkte E6 und E7 gelten als Marker für eine maligne Transformation der HPV-Infektion. Sie unterstützen die virale Replikation bei in die Wirts-DNA integriertem HPV-Genom, indem sie unter anderem p53 hemmen und hierdurch zur Zellproliferation beitragen [44].

1.2.5 Therapie und Prognose

Die Therapie sollte interdisziplinär in einem Tumorboard abgestimmt werden. Sie ist abhängig von der Lage und Größe des Primärtumors, dem Allgemeinzustand des Patienten, den voraussichtlichen funktionellen und ästhetischen Konsequenzen und dem voraussichtlichen Behandlungserfolg. Sie besteht aus einer chirurgischen Entfernung, Strahlen- und Chemotherapie, welche einzeln oder in Kombination durchgeführt werden können. Ziel der Behandlung ist eine kurative oder palliative Tumorkontrolle bei möglichst geringen funktionellen oder ästhetischen Beeinträchtigungen. Bei der chirurgischen Entfernung werden tumorfreie Resektionsgrenzen angestrebt mit entsprechender Rekonstruktion [51]. Häufig ist zudem eine Ausräumung der Halslymphknoten notwendig (Neck Dissection), da OSCCs früh lymphogen metastasieren [24]. Die Strahlentherapie kann ergänzend allein oder in Kombination mit der Chemotherapie eingesetzt werden. Auch eine Bestrahlung vor chirurgischer Therapie ist möglich. Die Gesamtdosis beträgt dabei ca. 60-70 Gray. Bei der Chemotherapie wird in der Regel Cisplatin verwendet. Eine alleinige Chemotherapie erfolgt nur zu palliativen Zwecken. In solchen Situationen wird in der Leitlinie auch eine Kombination mit einem monoklonalen Antikörper empfohlen. Der Antikörper richtet sich dabei gegen *EGFR* und hemmt das Tumorwachstum. Bei Versagen einer platinbasierten Chemotherapie kann auch eine Immuntherapie mit Nivolumab zum Einsatz kommen [51].

Die Prognose ist abhängig von der Tumorgroße, der Invasionstiefe und der Metastasierung und somit auch abhängig vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und Therapie. Der Tumor wächst aggressiv und hat eine hohe Rezidivneigung. Im Bereich der Zunge ist die Prognose aufgrund der frühen lymphatischen Invasion am schlechtesten. Histologisch verschlechtern unter anderem eine perineurale und lymphatische Invasion und eine Knocheninfiltration die Prognose [24].

1.3 Orales Plattenepithelkarzinom bei FA

1.3.1 Unterschiede zur Allgemeinbevölkerung

Das HNSCC bei FA unterscheidet deutlich von dem in der Allgemeinbevölkerung. Es hat mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 57,3% [52] eine schlechtere Prognose als in der Allgemeinbevölkerung mit 70% [53]. Es gibt folgende wesentliche Unterschiede [6, 54]:

- die Inzidenz ist um das 500-700-fache erhöht
- sie treten mit 20-50 Jahren statt mit 60-70 Jahren auf
- die Diagnose wird häufiger in fortgeschrittenen Stadien gestellt
- ein höherer Anteil an HNSCC befindet sich in der Mundhöhle (65%)
- sie entwickeln mit größerer Wahrscheinlichkeit ein zweites primäres Karzinom (mehr als 60% statt etwa 30%)
- Zweitkarzinome befinden sich häufiger im Urogenitaltrakt und der Haut statt in der Lunge und der Speiseröhre
- sie reagieren schlecht auf die Therapie

1.3.2 Risikofaktoren

Es gibt drei wesentliche Risikofaktoren, die die Entwicklung eines OSCC bei FA begünstigen. Dazu zählt das Alter, die KMT und der Alkohol- und Tabakkonsum.

Die meisten FA-Betroffenen leben heute aufgrund verbesserter Therapiemöglichkeiten der hämatologischen Erkrankungen bis ins Erwachsenenalter. Mit zunehmendem Alter steigt jedoch auch die Inzidenz von Krebserkrankungen bei FA erheblich an und stellt mittlerweile die Haupttodesursache dar. Das Alter allein ist daher ein wesentlicher Risikofaktor für OSCC bei FA. Die Erkrankung tritt oft früher als in der Allgemeinbevölkerung auf und das Risiko nimmt mit dem Alter deutlich zu. Das liegt vor allem an der kumulativen genomischen Instabilität aufgrund von DNA-Reparaturdefekten [54, 55].

Nach einer KMT haben FA-Betroffene unter bestimmten Bedingungen wie dem Auftreten einer Graft-versus-Host-Disease (GvHD) ein erhöhtes Krebsrisiko [16]. Auch bei Personen, die erfolgreich mit einer KMT behandelt wurden, besteht ein erhöhtes Risiko für solide Tumore [56]. FA-Betroffene müssen sich nach erfolgter KMT einer lebenslangen Nachsorge unterziehen. Es können auch noch Jahre nach einer KMT Spätfolgen auftreten [13]. Das liegt an der erhöhten Toxizität, der die FA-Betroffenen während der KMT ausgesetzt sind [6].

Ein weiterer Risikofaktor ist der Alkohol- und Tabakkonsum. Auch Passivrauchen und alkoholhaltige Mundspüllösungen zählen dazu.

Der Einfluss von HPV als Risikofaktor ist aufgrund unterschiedlicher Studienergebnisse bei FA umstritten, dennoch wird eine HPV-Impfung auch aufgrund des deutlich erhöhten Risikos anogenitaler Plattenepithelkarzinome empfohlen [54].

1.3.3 Orale potenziell maligne Erkrankungen

OPMDs treten wie oben in der Allgemeinbevölkerung beschrieben auch bei FA auf. Die Besonderheit besteht darin, dass sie meist nicht einzeln vorkommen, sondern multipel und

in ausgedehnter Form. In der Regel sind sie nicht maligne. Aufgrund des Entartungspotenzials sollten sie jedoch regelmäßig auf Malignität geprüft werden [54].

In der Studie von Velleuer et al. 2014 [21] wird bereits beschrieben, dass erfahrungsgemäß (über 500 untersuchte FA-Betroffene) das Auftreten von oralen potenziell malignen Erkrankungen bei FA häufig ist.

In der Studie von Velleuer et al. 2020 [23] wurden 737 auffällige Läsionen mittels eines zytologischen Bürstenabstriches auf eine maligne Transformation untersucht und die diagnostische Genauigkeit des Tests bestimmt. Bei den Läsionen handelte es sich vorwiegend um Leukoplakien, aber auch um Erythroplakien, Erosionen und Erythroplakien mit Erosionen. Sehr wenige Leukoplakien (2 von 405) hatten dabei im Verlauf positive Befunde. Die meisten positiven Befunde zeigte die Gruppe der Erythroplakien mit Erosionen (76 von 114).

1.3.4 Genetische Veränderungen

Zum Zeitpunkt des Beginns der eigenen Arbeiten zur Dissertation war bezüglich genetischer Veränderungen bei OSCC der FA-Betroffenen nur sehr wenig bekannt. Die später mehrfach zitierte Arbeit von Webster et al. [57] wurde erst nach Auswahl der DNA-Sonden für die vorliegende Untersuchung zur Mehrfarben Fluoreszenz in Situ Hybridisierung publiziert und ist daher besonders auch für deren Relevanz interessant. OSCCs weisen bei FA eine große Anzahl an Strukturvarianten (SVs) auf. SVs sind Deletionen, Translokationen und Inversionen, die mit dem Verlust von *TP53* entstehen. SVs befinden sich bevorzugt in frühen Replikationsregionen oder an fragilen Stellen. Sie sind oft miteinander verbunden und verursachen eine genomische Instabilität. Sie treten in langen Ketten auf und sind häufig in onkogenhaltigen Regionen der Chromosomen 3, 7, 8, 9 und 11 lokalisiert. Die genomische Instabilität verursacht eine erhöhte Rate an Kopienzahlveränderungen bei wichtigen HNSCC-assoziierten Genen. Zu den häufig amplifizierten Genen gehören dabei *PIK3CA*, *MYC* (*MYC Proto-Oncogene*), *CCND1*, und *EGFR* und zu den deletierten Genen u.a. *CDKN2A*. Sonden für *MYC*, *CCND1* und *CDKN2A* wurden für die eigenen FISH-Studie eingeschlossen. *PIK3CA* wurde nicht ausgewählt, sondern *TERC* (*telomerase RNA component*). Beide liegen aber in der Region 3q26. Am häufigsten treten *PIK3CA*- und *MYC*-Amplifikationen gemeinsam auf. Bei FA HNSCCs gibt es keine Hinweise auf eine HPV-Infektion. Plattenepithelkarzinome bei FA sind somit meist HPV-negativ, *TP53*-mutiert und weisen häufige Kopienzahlveränderungen auf.

Der FA-DNA-Reparaturweg schützt vor der SV-Bildung. Bei manifester FA ist er insuffizient und führt durch DNA-Quervernetzungen beispielsweise durch Formaldehyd, das in Tabakrauch enthalten ist, zu Knochenmarksversagen und zur Karzinogenese [57].

1.3.5 Therapie

Die Therapie von OSCC stellt bei FA eine besondere Herausforderung dar [54]. Der Einsatz von Chemo- und Strahlentherapie, wie in der Allgemeinbevölkerung üblich, ist bei FA mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Auch nicht maligne transformierte Zellen reagieren aufgrund der Grunderkrankung empfindlicher auf Chemotherapeutika und

Bestrahlung. Erschwerend kommt hinzu, dass die Tumore bei FA in der Regel sehr aggressiv sind und sich bei Diagnose oft bereits in fortgeschrittenen Stadien befinden. Die Strahlen- und Chemotherapie ist sowohl in Standard- als auch in niedrigen Dosen mit schweren bis tödlichen Toxizitäten und schlechten Behandlungsergebnissen verbunden. Diejenigen die eine Strahlentherapie überleben, erleiden schwere Nebenwirkungen wie Xerostomie, Dysphagie, Ösophagusstenose oder Kehlkopfödem. Die chirurgische Therapie stellt hingegen eine gut verträgliche Behandlungsmöglichkeit dar. Sie sollte genauso durchgeführt werden wie in der Allgemeinbevölkerung. Die Häufigkeit von Komplikationen ist nicht signifikant erhöht. Sie gilt daher als die bevorzugte Therapieform bei FA [54].

1.4 Zytologische Mundschleimhautdiagnostik

1.4.1 Bürstenbiopsie und zytologische Diagnostik von OPMDs und OSCC

Der Goldstandard für die Untersuchung auffälliger Mundschleimhautläsionen ist in der Allgemeinbevölkerung die Inzisionsbiopsie. Bei dem Eingriff wird eine Gewebeprobe entnommen und histologisch untersucht. Der große Nachteil der Untersuchung ist die hohe Invasivität vor allem bei multiplen und ausgedehnten Läsionen. Eine flächige Bürstenbiopsie kann bei ausgedehnten Läsionen alternativ zu mehrfachen simultanen Inzisionsbiopsien eingesetzt werden oder zur Verlaufskontrolle mit Restunsicherheit bei der Dignität. Auch bei homogenen Leukoplakien ohne Malignitätsverdacht kann sie verwendet werden [43]. In einem Cochrane Review von 2021 [58] betrug die Sensitivität 90% und Spezifität 94% für die Diagnostik von OSCC und OPMD (unabhängig vom Dysplasiegrad). Ebenso kann die Bürstenbiopsie mit zytologischer Untersuchung bei multiplen Mundschleimhautläsionen eingesetzt werden, die schon allein aus Gründen der Patientenführung nicht alle biopsiert werden sollten oder können.

Bei der Untersuchung wird eine zytologische Bürste rotierend über die Läsion gestrichen, um möglichst viele Zellen zu gewinnen [59]. Stellt sich dabei eine Läsion als verdächtig heraus, wird weiterhin eine invasive Biopsie empfohlen [43].

Leitliniengemäß [43] sollte bei der zahnärztlichen Untersuchung halbjährlich eine Inspektion und Palpation der gesamten Mundhöhle erfolgen. Orale Läsionen, die länger als zwei Wochen bestehen und keiner definierten Grundkrankheit oder Ursache zugeordnet werden können, gelten als verdächtig und sollten auf Malignität geprüft werden. Dabei gilt die histologische Untersuchung als Goldstandard. Dazu wird unter lokaler Betäubung eine Probe aus dem Randbereich der Läsion entnommen (Inzisionsbiopsie) oder die gesamte Läsion entfernt und untersucht (diagnostische Exzisionsbiopsie). Eine Exzisionsbiopsie ist angezeigt, wenn eine Inzisionsbiopsie für die gesamte Läsion nicht repräsentativ ist. Bei ausgedehnten Läsionen kann alternativ zu mehrfachen simultanen Biopsien eine flächige Bürstenbiopsie erfolgen. Auch bei einer Verlaufskontrolle mit Restunsicherheit bei der Dignität ist eine Bürstenbiopsie angezeigt. Dabei werden Zellen mithilfe einer Bürste entnommen und zytologisch untersucht. In einer Studie von Remmerbach et al. 2017 [60] wurden die Treffsicherheiten 113 oraler Bürstenbiopsien von konventionellen und flüssig-

keitsbasierten Präparaten miteinander verglichen. Dabei erzielten die konventionellen Präparate eine Sensitivität von 96,3% und eine Spezifität von 90,6%. Die flüssigkeitsbasierten Präparate hatten eine Sensitivität von 97,5% und eine Spezifität von 68,8%. In einem Cochrane Review von 2021 [58] betrug die Sensitivität 90% und die Spezifität 94% für ein OSCC oder eine OPMD (mit geringer, mittelgradiger oder hochgradiger Dysplasie). Eine hochgradige intraepitheliale Dysplasie ist eine obligate Präkanzerose, stellt das Stadium vor dem invasiven Karzinom dar und soll mithilfe der Bürstenbiopsie bereits erkannt werden, um frühzeitig therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können. Bei Vorliegen einer geringen Dysplasie wird die Läsion weiter beobachtet. Bei einer mäßigen oder hochgradigen Dysplasie sollte die Läsion vollständig exzidiert werden [43].

Die Bürstenbiopsie ist nicht die einzige nicht-invasive Methode, um auffällige Mundschleimhautläsionen zu untersuchen. Es gibt noch weitere Verfahren wie die Untersuchung mit Toluidinblau. Das Toluidinblau ist ein Farbstoff, der direkt auf die auffällige Läsion aufgetragen und nach Abspülen mit Essigsäure beurteilt wird [61]. Das Verfahren besitzt eine sehr hohe Sensitivität, jedoch eine niedrige Spezifität, da es auch Ulzerationen anfärbt [62].

Die Umsetzung der Leitlinien stößt bei der Inzisionsbiopsie in einigen Punkten an ihre Grenzen. Sie betreffen die Patientenführung, das vermeidbare Operationsrisiko und die Genauigkeit der Untersuchung. In der klinischen Praxis werden orale Bürstenbiopsien oft zur Verlaufsbeobachtung bekannter und bioptisch gesicherter OPMDs eingesetzt, wie z.B. dem Lichen planus oder bei anderen chronischen Läsionen mit einem (geringen) Risiko für eine maligne Transformation, die nicht repetitiv biopsiert werden können oder sollen. Eine weitere Anwendung wäre in der wenig invasiven Nachsorge des OSCC.

Orale Läsionen im Frühstadium sind in der Regel nicht schmerzhaft. Meist wird der Patient erst bei der Kontrolluntersuchung beim Hauszahnarzt darauf aufmerksam gemacht und zum Oralchirurgen oder Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen zur weiteren Abklärung überwiesen. Die Herausforderung für den Patienten besteht darin, trotz fehlender Schmerzen die Dringlichkeit für die Abklärung zu erkennen und sich freiwillig einem invasiven Eingriff zu unterziehen. Das Risiko besteht, dass der Patient sich daher nicht in der Oralchirurgie oder der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie vorstellt.

Die Inzisionsbiopsie stellt einen invasiven Eingriff dar mit entsprechenden Risiken wie Wundheilungsstörungen, Nachblutungen und Schmerzen. Hier bestünde die Möglichkeit, die klinisch auffällige Läsion mithilfe einer nicht-invasiven Bürstenbiopsie zu untersuchen und nur Patienten mit auffälligen morphologischen Befunden invasiv zu untersuchen. Eine solche Vorselektion geht aber über die Leitlinien hinaus. Vor allem bei multiplen oralen Läsionen stellt sich die Frage der ethischen Vertretbarkeit mehrerer Inzisionsbiopsien, wenn alternative Möglichkeiten zur Verfügung stehen, die das Operationsrisiko senken und die Patientenführung verbessern.

Ein weiteres Problem der Inzisionsbiopsie besteht darin, dass nur ein bestimmter Bereich der Läsion untersucht wird. Es besteht das Risiko, dass nur ein Bereich untersucht wird, der histologisch nicht auffällig ist. Eine Bürstenbiopsie hingegen entnimmt Zellen der gesamten Läsion. Bei größeren Läsionen können mehrere Bürstenbiopsien entnommen werden. Der Bereich für die Inzisionsbiopsie kann so eingegrenzt werden. Flächige Bürstenbiopsien bei ausgedehnten Läsionen sehen auch die Leitlinien vor. Bei auffälligen oralen Läsionen in späteren Stadien liegen häufig bereits Schmerzen vor. Auch hier ist es möglich zuerst eine Bürstenbiopsie durchzuführen. Die Bürstenbiopsie kann die Verdachtsdiagnose bestätigen und Differentialdiagnosen ausschließen. Das Vorgehen geht jedoch über die Leitlinien hinaus.

Liegt ein bioptisch gesichertes oder klinisch eindeutiges Plattenepithelkarzinom vor, können bildgebende Maßnahmen wie Ultraschall, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie oder Positronen-Emissions-Tomographie erfolgen. Zudem erfolgt die Stadieneinteilung gemäß der TNM-Klassifikation. Sie beschreibt die anatomische Ausdehnung, das Vorhandensein regionaler Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen mit Organbefall und ist wichtig für die Therapie und Prognose des OSCC [51].

1.4.2 Zytologische Befundung und Klassifikation

Für die konventionelle Zytologie wird die Bürste auf einem Objektträger rotierend ausgestrichen und mit Alkoholspray fixiert. Für die flüssigkeitsbasierte Zytologie wird die Bürste in einem Transportbehälter mit Fixationsmedium eingesendet. Im Labor erfolgt dann die Präparateherstellung aus der Flüssigkeit und die Färbung der Präparate nach Papanicolaou [60].

Unter dem Lichtmikroskop werden die Präparate befundet und in Deutschland gemäß einer Konsensus-Klassifikation der deutschen Gesellschaften für Pathologie und Zytologie in der Regel in folgende Diagnosegruppen eingeteilt [63]; jeder Diagnosegruppe ist dabei zur besseren klinischen Anwendbarkeit die Malignitätswahrscheinlichkeit zugeordnet, also die Wahrscheinlichkeit, mit der bösartige Zellen vorliegen [63].

- Negativ: bösartige Zellen nicht nachweisbar
(Malignitätswahrscheinlichkeit nahe 0%)
- Zweifelhaft: bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen
(Malignitätswahrscheinlichkeit ca. 30%)
- Dringender Verdacht: bösartige Zellen wahrscheinlich
(Malignitätswahrscheinlichkeit ca. 70%)
- Positiv: bösartige Zellen nachweisbar
(Malignitätswahrscheinlichkeit nahe 100%)
- Unzureichendes Untersuchungsmaterial

Bei den nicht eindeutigen Diagnosegruppen „zweifelhaft“ und „dringender Verdacht“ kann es sich um Zellveränderungen handeln, die morphologisch sowohl einer Dysplasie, als auch reaktiven Veränderungen beispielsweise bei einer Entzündung oder einer Therapiefolge zugeordnet werden können [64].

Ein unzureichendes Untersuchungsmaterial liegt vor, wenn sich nicht genügend auswertbare Zellen im Präparat befinden oder diese nicht ausreichend beurteilt werden können. Eine zu geringe Zahl relevanter Zellen kann durch Fehler bei der Bürstenentnahme (z.B. Läsion nicht getroffen, Wattestäbchen verwendet, zu leichter Anpressdruck beim Bürsten, zu starke Blutung) entstehen oder bei der Präparateherstellung (z.B. Zellen entfernt, überlappende Zellen, Artefakte).

1.4.3 DNA-Bildzytometrie

Die Anwendung von weiteren zytologischen Techniken wie DNA-Bildzytometrie hat für die aktuellen Leitlinien [43, 51] keine ausreichende Evidenz und wird daher nicht empfohlen. Es gibt jedoch Studien, die zeigen, dass eine ergänzende Anwendung der DNA-Bildzytometrie die Treffsicherheiten erhöht. In einer Studie von Maraki et al. 2004 [59] erzielte die ergänzende Anwendung der DNA-Bildzytometrie eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 97,4%. Auch in einer Studie von Remmerbach et. al. 2004 [65] erzielte die Ergänzung mithilfe der DNA-Bildzytometrie eine Sensitivität von 97,8% und eine Spezifität von 100% und damit deutlich höhere Treffsicherheiten als bei alleiniger konventionell-mikroskopischer Untersuchung. In einer Metaanalyse zum prädiktiven Wert von DNA-Aneuploidie in einer malignen Transformation einer OPMD ergab sich ein 3,12-fach erhöhtes Risiko aneuploider Läsionen für eine Krebsentstehung [66]. Diese Daten sprechen für die Anwendung der DNA-Bildzytometrie und erhöhen damit deutlich die diagnostischen Treffsicherheiten der Bürstenbiopsie.

Bei nicht eindeutigen zytologischen Diagnosen kann, wenn möglich, eine DNA-Bildzytometrie zur weiteren Analyse durchgeführt werden. Sie ist am selben Präparat wie die zytologische Diagnostik nach einer Entfärbung und erneuter Färbung nach Feulgen möglich [67]. Zwar kann auch nach einer positiven konventionellen zytologischen Diagnose eine ergänzende DNA-Bildzytometrie erfolgen. Diese ergibt aber aufgrund des bereits sehr hohen positiven prädiktiven Wertes (PPV) [65] der zytologischen Diagnostik in der Regel keinen Mehrwert. In der Studie von Remmerbach et al. 2004 [65] konnte gezeigt werden, dass von 71 zytologisch positiven Präparaten auch 68 histologisch positiv beurteilt wurden (PPV: 95,4%). Ähnliches gilt für die Anwendung nach negativer Zytologie. Auch die DNA-Bildzytometrie kann falsch negative Befunde oft nicht korrigieren, da diese meist aufgrund des Samplings die diagnostisch relevanten Zellen nicht enthalten. Das Übersehen von suspekten Zellen im Präparat kommt vor, ist aber seltener [59, 65]. Bei der DNA-Bildzytometrie wird der DNA-Gehalt der Zellkerne fotometrisch mithilfe der integrierten optischen Dichte (IOD) gemessen. Grundlage ist die stöchiometrische Reaktion des Farbstoffes mit der DNA in der Feulgen-Färbung; d.h. die Menge an DNA ist mit der Intensität der Färbung und der Fläche eines Zellkerns korreliert. Um den DNA-Gehalt normaler Epithelien (2c, c=content) festzulegen, ist die Messung der IOD von 30 Referenzzellen mit bekanntem normalem diploidem Chromosomensatz (z.B. normale Plattenepithelien) notwendig. Des Weiteren wird dann der DNA-Gehalt von suspekten Zellen (Analysezellen) gemessen. Die Zahl der gemessenen Referenz- und Analysezellen wird in einem Histogramm gegen den DNA-Gehalt aufgetragen. Eine Population normaler

proliferierender Zellen zeigt in einem DNA-Histogramm einen Häufigkeitsgipfel (Stammlinie) bei 2c. Eine Stammlinie ist hierbei definiert als die proliferierende G₀/G₁ Fraktion mit einem Verdopplungsgipfel oder einzelnen Zellen im Verdopplungsbereich, bzw. S- und G₂/M im Zellzyklus [65, 68]. Bei reaktiven Veränderungen beobachtet man meist euploid-diploide oder euploid-polyploide DNA-Verteilungen mit Stammlinie(n) bei 2c und/oder 4c. Selten wird bei der euploiden Polyploidisierung (= Verdopplung ganzer Chromosomensätze) eine Stammlinie bei 8c oder auch höher (16c etc.) beobachtet. Dieses Phänomen kommt in der Mundschleimhaut beispielsweise beim oralen Lichen Planus vor oder bei einer HPV-Infektion und ist von einer DNA-Aneuploidie abzugrenzen [69]. Das Vorliegen einer DNA-Aneuploidie, gilt als Marker für Neoplasien [68]. Als DNA-Aneuploidie bezeichnet man DNA-Verteilungen von Zellpopulationen, die sich signifikant von denen normaler (ruhender, proliferierender oder polyploider Zellen) unterscheiden [65]. Eine DNA-Verteilung gilt als aneuploid, wenn eine Stammlinie um 10% vom 2c-Gehalt (oder 4c- etc. Gehalt) abweicht d.h. Stammlinienwerte von <1,80c oder >2,20c bzw. <3,60c oder >4,40c [70] oder wenn Einzelzellen mit einem abnorm hohen DNA-Gehalt größer 9c nachgewiesen werden [68].

Der Nachweis von DNA-Aneuploidie ist bei Mundschleimhautläsionen ein Biomarker für eine maligne Transformation und stellt mindestens die Indikation für eine histologische Untersuchung dar. Es kann diskutiert werden, ob direkt eine Exzisionsbiopsie der Läsion erfolgen kann. Maraki et al. 2004 [59] schlägt nach dem Nachweis einer DNA-Aneuploidie eine vollständige Entfernung der Läsion mit anschließender histologischer Untersuchung vor.

Ein Nachteil der Methode ist die Notwendigkeit einer Mindestanzahl von ca. 100-300 Analysezellen [65]. In der Studie von Velleuer et al. [23] an Mundschleimhautläsionen von FA-Betroffenen konnten daher von 168 relevanten Proben nur 101 Proben mittels DNA-Bildzytometrie untersucht werden. Ca. 40% der Proben konnten demnach wegen unzureichender Zellzahl nicht weiter untersucht werden. Die Methode der DNA-Bildzytometrie ist durch Konsensus-Konferenzen der European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) standardisiert [68, 70-72].

1.5 Bürstenbiopsie-basierte zytologische Diagnostik bei FA

OSCCs entstehen bei FA am häufigsten auf der Zunge [54]. Je früher Dysplasien oder Plattenepithelkarzinome erkannt werden, desto weniger invasiv ist die Therapie [43].

Die sorgfältige Inspektion und Palpation der Mundhöhle spielt daher eine wichtige Rolle. Sie sollte mit 10 Jahren beginnen und mindestens halbjährlich erfolgen [54]. Jede Läsion sollte mithilfe einer Kamera und einer Mundlandkarte dokumentiert werden [73, 74].

Aufgrund der zahlreichen sichtbaren Läsionen bei FA erscheinen Inzisionsbiopsien nicht sinnvoll. Sie sind schmerzhaft und invasiv. Bei FA kann die Anzahl notwendiger histologischer Biopsien durch die Bürstenbiopsie deutlich reduziert werden [23]. In die US-amerikanische Leitlinie der Fanconi Cancer Foundation (FCF) wurde die Bürstenbiopsie

2020 als Screening-Verfahren bei FA aufgenommen [54]. Dies basiert vor allem auf der Studie von Velleuer et al. 2020 [23].

In dieser Studie wurden über einen Zeitraum von 12 Jahren 1233 sichtbare orale Läsionen von 713 FA-Betroffenen mittels Bürstenbiopsie untersucht. In Fällen, in denen die Zytologie nicht eindeutig negativ oder positiv war, wurde falls möglich eine DNA-Bildzytometrie durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend mit einem klinisch-histologischen Follow-up verglichen. Insgesamt konnten 737 Läsionen in die statistische Auswertung aufgenommen werden. Von einigen FA-Betroffenen waren keine ausreichenden Follow-up Daten verfügbar. Die Malignitätswahrscheinlichkeiten der einzelnen zytologischen Befundkategorien ließen sich aus der Studie ableiten und entsprechen erstaunlich genau den Schätzwerten der Konsensusklassifikation (negativ nahe 0%, zweifelhaft 32%, dringend verdächtig 76%, positiv 100%). Die Sensitivität der Zytologie für die Detektion mindestens einer high-grade OED (*oral epithelial dysplasia*) betrug 97,7% und die Spezifität 84,5%. Die wo sinnvoll und möglich zusätzlich angewandte DNA-Bildzytometrie erhöhte die Sensitivität auf 100% und die Spezifität auf 92,2%. 63% der OSCC und OPMD mit high-grade oraler epithelialer Dysplasie konnten in einem nicht-invasiven oder frühen Stadium entdeckt werden. Der negative prädiktive Wert (NPV) betrug 99,6%, die Methode kann somit den Bedarf an invasiven Biopsien deutlich verringern. Zytologisch negative Ergebnisse sind somit glaubhaft, zytologisch positive Ergebnisse waren ebenfalls alle im Follow-up positiv. Allerdings waren von 168 zytologisch zweifelhaften und dringend tumorverdächtigen Mundschleimhautabstrichen 67 nicht weiter mittels DNA-Bildzytometrie untersuchbar. Diese Ausstriche wurden zwar, da sie auffällig waren, als statistisch positiv in der oben genannten Studie ausgewertet, um den NPV nicht zu verringern. In der klinischen Praxis ist aber ein zytologisch unklares Ergebnis für das weitere Vorgehen nicht hilfreich und würde entweder zu Kontrolluntersuchungen oder zu einer histologischen Biopsie führen. Meist war eine zu geringe Zahl auffälliger Zellen in einem Abstrich die Ursache für die Nichtanwendung der DNA-Bildzytometrie, welche eine Mindestzahl von Analysezellen benötigt. Um diese diagnostische Lücke zu schließen, bedarf es Methoden, die mit einer geringeren Zahl suspekter Zellen in einem Abstrich auskommen wie beispielsweise die Mehrfarben Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (siehe Kapitel 1.6).

1.6 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH)

1.6.1 FISH in der zytologischen Diagnostik

Die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) ist eine molekulare Methode zur Detektion chromosomaler Aberrationen. Der große Vorteil der Methode besteht in der geringen Zahl benötigter suspekter Zellen (25-50 Zellen) zur diagnostischen Abklärung. Das Verfahren wird insbesondere als Mehrfarben-FISH bereits in verschiedenen Organsystemen eingesetzt, meist um unklare zytologische Befunde durch Hinzunahme der FISH weiter abzuklären [75, 76].

Bei dem Verfahren werden direkt oder indirekt mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs markierte DNA-Sonden an komplementäre Zielsequenzen gebunden und unter dem

Fluoreszenzmikroskop mit speziellen Filtern sichtbar gemacht. Der Zugewinn oder Verlust bestimmter Gensequenzen, der im Zusammenhang mit der Tumorentwicklung steht [77], kann dadurch unter anderem bestimmt werden. Maligne Veränderungen werden so durch zusätzliche diagnostische Marker, die unabhängig von der Zellmorphologie sind, erkannt. Die Untersuchung ist daher für die Frühdiagnostik von Tumoren von besonderem Interesse [78]. Zur Abgrenzung einer echten Amplifikation oder Deletion des entsprechenden Gens von einer Polysomie oder Monosomie werden meist zusätzliche FISH-Sonden für die Zentromer-Region der entsprechenden Chromosomen verwendet. Dies ist beispielsweise für die Detektion einer Gendeletion wie dem *CDKN2A*-Gen in der Region 9p21 wichtig. Eine normale Zahl der Fluoreszenzsignale der Zentromersonde für das Chromosom 9 im Ansatz zeigt bei Verlust der Signale für 9p21 hier die Deletion der entsprechenden Genregion.

Es gibt unter anderem DNA-Sonden für die Zentromerregionen (CEP) und lokusspezifische Indikatorsonden (LSI). CEPs werden zum Nachweis einer chromosomalen Aneuploidie (Aneusomie) verwendet, während LSI-Sonden im Allgemeinen zum Nachweis von Deletionen, Duplikationen, Amplifikationen oder Translokationen bestimmter Gene eingesetzt werden [75].

Durch die Vielzahl chromosomaler Veränderungen bei einer malignen Transformation ist der gleichzeitige Nachweis mehrerer struktureller und numerischer Veränderungen sinnvoll und erhöht die diagnostische Sicherheit, dass tatsächlich eine maligne Transformation einer Läsion oder einer Zellpopulation vorliegt. Das konnte beispielsweise in einer frühen Studie einer Mehrfarben-FISH von Sokolova et al. 2000 [79] gezeigt werden. Dort wurden unter anderem zum Nachweis eines Urothelkarzinoms (UC) Urinproben von 179 Patienten mit einer Mehrfarben-FISH untersucht.

Mehrere Sonden wurden getestet und vier mit der höchsten kombinierten Sensitivität ausgewählt. Dabei handelte es sich um drei Zentromersonden (CEP 3,7,17) und eine lokusspezifische Sonde (9p21). Die Zentromersonden sollten die frühen chromosomalen Veränderungen erfassen und die lokusspezifische Sonde die homozygote Deletion auf dem p16-Gen. Die CEP7-Sonde erreichte als Einzelsonde die höchste Sensitivität von 76%. In Kombination mit den drei anderen Sonden wurde die Gesamtsensitivität aber am meisten erhöht (95%).

Als aneuploid galt eine Zelle, wenn sie eine Zunahme des genetischen Materials in mehreren Chromosomen aufwies (Signalerhöhung bei zwei von drei Zentromersonden). Damit sollten Artefakte oder Zellen in der S-Phase mit noch inkompletter Verdopplung des Chromosomensatzes möglichst ausgeschlossen werden. Der Nachweis dieser Polysomie in mindestens vier ausgezählten Zellen galt als spezifischer Indikator für eine maligne Transformation. Für die 9p21 Sonde galt die homozygote Deletion in mindestens 12 ausgezählten Zellen als Kriterium für Positivität. Die 9p21 Sonde zeigte zwar eine geringe Gesamtsensitivität (29%), erkannte in der Studie jedoch UCs, die durch die CEP-Sonden nicht detektiert wurden.

1.6.2 FISH bei Mundschleimhautläsionen

Die Mehrfarben-FISH kombiniert verschiedene fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden, um chromosomale Veränderungen in Zellen nachzuweisen, die auf eine maligne Transformation hindeuten [79].

In der Urin- und Lungenzytologie sowie bei diversen anderen Organsystemen wird FISH in der Routinediagnostik eingesetzt, in der Mundschleimhautzytologie insbesondere bei FA-Betroffenen hingegen noch nicht.

Die meisten Studien beziehen sich auf OSCCs in der Allgemeinbevölkerung. In der Allgemeinbevölkerung zeigen HNSCCs oft Veränderungen der chromosomalen Kopienzahl und strukturelle Aberrationen. Die Veränderungen betreffen unter anderem Onkogene, plattenepitheliale Transkriptionsfaktoren, Thyrosinrezeptor-Kinase-Gene und Tumorsuppressorgene [49]. Diese lohnen sich, auch mittels FISH zu untersuchen.

Für die Frühdiagnostik einer maligne transformierten Mundschleimhautläsion mit FISH sind vor allem genetische Daten von Vorstufen des OSCCs interessant. In verschiedenen Studien an Vorstufen des OSCCs in der Allgemeinbevölkerung ergaben beispielsweise Amplifikationen von *hTERT* [80], *MYC* [81, 82], *EGFR* [82-84], *CCND1* [82, 83], *CKS1B* (*cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1*) [85] oder *PIK3CA* [86] sowie eine Deletion von *CDKN2A* (9p21) oder *FHIT* (*fragile histidine triad*, 3p14) [87] Hinweise auf einen progredienten Verlauf einer Läsion. Da für parallele Läsionen von FA-Betroffenen zum Zeitpunkt der Planungen für eine adjuvante FISH-Untersuchung noch keine Daten existierten, wurden im Funktionsbereich Cytopathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf beispielsweise diese und weitere Literaturdaten für die Auswahl von FISH-Sonden einbezogen.

In Analogie zur adjuvanten FISH-Untersuchung bei anderen Organsystemen sollte auch für Mundschleimhautläsionen eine Mehrfarben-FISH aus 4 verschiedenen DNA-Sonden in einem Ansatz etabliert werden.

1.6.3 Pilotstudie zur Anwendung einer Mehrfarben-FISH bei FA-assozierten OSCC

Zur Etablierung einer Mehrfarben-FISH zur Abklärung zytologisch unklarer Mundschleimhautläsionen bei FA-Betroffenen wurden nach Durchsicht der verfügbaren Literatur zu FISH-Untersuchungen oraler Läsionen der Allgemeinbevölkerung unter Berücksichtigung häufiger Deletionen und Amplifikationen einige kommerziell erhältliche FISH-Sonden ausgewählt. Diese Arbeiten wurden vom Team im Funktionsbereich Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

In einer von Silva de Araujo et al. [88] publizierten Pilotstudie wurden anhand von 5 Zelllinien von OSCC von FA-Betroffenen sowie einer Feinnadelaspirationsbiopsie einer zystischen zervikalen Lymphknotenmetastase eines FA-assozierten OSCC genetische und chromosomale Veränderungen mittels FISH untersucht. Als Kontrolle dienten zwei zytologisch negative Bürstenabstriche der Mundschleimhaut von FA-Betroffenen. Es wurden 13 verschiedene kommerziell erhältliche FISH-Sonden zu 4 verschiedenen

Untersuchungsansätzen zusammengestellt. Dies waren im Mehrfarben-FISH Ansatz 1 DNA-Sonden für das Zentromer des Chromosoms 6, *C-MYC*, *EGFR* und Region 5p15. Im Ansatz 2 wurden DNA-Sonden für das Zentromer des Chromosoms 9, *hTERC* und Region 9q34, im Ansatz 3 Sonden für das Zentromer des Chromosoms 11 und *CCND1* verwendet. Im Mehrfarben-FISH Ansatz 4 wurden DNA-Sonden für die Zentromerregionen der Chromosomen 3, 7 und 17 sowie eine Sonde für die Region 9p21 (UROVysion, Firma Abbott, siehe Kapitel 1.6.1) verwendet. Es wurden bis zu 50 zytomorphologisch abnorme Zellkerne je Sonde ausgewertet und die Zahl der Fluoreszenzsignale notiert. Die tumornegativen Kontrollen zeigten dabei jeweils ein disomes Muster mit durchschnittlich 2 Genkopien der untersuchten Regionen. Die Tumorproben zeigten aber eine Erhöhung der durchschnittlichen Kopienzahl von 3 (bei 9p21) bis zu 5,7 (bei *CCND1*).

Die 4 verschiedenen Reaktionsansätze können zusätzlich als Mehrfarben-FISH kombiniert ausgewertet werden: In den Ansätzen 1 und 4 wurde eine Zelle als chromosomal aneuploid definiert, wenn mindestens 2 der 4 DNA-Sonden mehr als 2 Kopien zeigten. In Ansatz 3 wurde eine *CCND1* Amplifikation als eine Ratio von *CCND1*/CEP11 ≥ 2 definiert. In Ansatz 4 lag eine relative Deletion von 9p21 dann vor, wenn die Signalzahl der 9p21 Sonde geringer war als die durchschnittlichen Signalzahlen für die Zentromersonden 3, 7 und 17.

Alle untersuchten Tumorproben zeigten eine chromosomale Aneuploidie in mindestens 34,8 von 50 Zellen, die tumornegativen Kontrollen hingegen maximal eine chromosomal aneuploide Zelle. Eine relative Deletion von 9p21 zeigte sich mit Ausnahme einer Tumorzelllinie bei mindestens 29,5 von 50 Zellen. Eine Tumorprobe zeigte mit einer Ratio von 2,72 eine Amplifikation von *CCND1*. Anschließend wurden drei zytologisch unklare Mundschleimhautabstriche mit der Mehrfarben-FISH in Ansatz 1 untersucht. Zwei Abstriche zeigten dabei durchschnittlich 34,5 bzw. 39,5 chromosomal aneuploide Zellen. Das Follow-up der beiden Läsionen ergab ein mikroinvasives OSCC bzw. zeigte ein genetisch verändertes Schleimhautfeld in der Nachbarschaft eines invasiven OSCC. Der dritte Abstrich zeigte durchschnittlich nur 1,5 chromosomal aneuploide Zellen. Das Follow-up zeigte hier eine schwere chronische und aktive ulzerierende Gingivitis in der histologischen Biopsie ohne Anhalt für Malignität.

Zusammenfassend ergeben sich somit gute Anhaltspunkte dafür, dass die ausgewählten FISH-Sonden für die Detektion einer chromosomalen Aneuploidie selbst in wenigen FA Plattenepithelkarzinomzellen geeignet sind. Für eine sinnvolle klinische Anwendung können nicht 13 Sonden verwendet werden. Sechs der in der Pilotstudie verwendeten kommerziell erhältlichen Sonden eignen sich aufgrund der Daten aus obiger Pilotstudie und der Farbe des Fluorochroms dabei gut in Kombination für die weitere Untersuchung in Fallserien [1]. Sie lassen sich zu einer Mehrfarben-FISH aus 4 Sonden und einer 9p21-FISH mit zusätzlicher Sonde für das Zentromer 9 aufteilen.

1.6.4 Vorbereitung einer FISH zur klinischen Anwendung an Mundschleimhautläsionen

Für die Auswahl der 4 Sonden der Mehrfarben-FISH eignen sich insbesondere solche Sonden, deren durchschnittliche Signalzahl von vier (Tetrasomie) abweicht, um eine bessere Abgrenzbarkeit gegenüber reaktiven Veränderungen mit euploider Polyploidisierung zu ermöglichen.

Das Mehrfarben-FISH beinhaltet die DNA-Sonden für *CCND1* (grüne Fluoreszenz), *TERC* (gelbe Fluoreszenz), *MYC* (rote Fluoreszenz) und Zentromer des Chromosoms 6 (blaue Fluoreszenz).

Das *CCND1*-Gen liegt auf dem Chromosom 11 (11q13.3) und kodiert für das Protein Cyclin D1 [89]. Physiologisch bildet es Komplexe mit cyclinabhängigen Kinasen (CDK4, CDK6) und steuert den Übergang von der G₁- zur S-Phase des Zellzyklus, um die DNA-Replikation einzuleiten [90]. Bei Amplifikation oder Polysomie wird das Gen zu einem Onkogen mit einer Überexpression des Proteins und trägt zu der Entstehung von Hämopathien und soliden Tumoren, insbesondere Plattenepithelkarzinomen, bei [91].

Das *TERC*-Gen liegt auf dem Chromosom 3 (3q26.2) und kodiert für eine RNA-Komponente der Telomerase [92]. Ein weiterer Bestandteil der Telomerase ist die Proteinkomponente TERT (*telomerase reverse transcriptase*). Die Telomerase verlängert die Telomerenden, die bei dem Zellzyklus verkürzt werden. Sie verwendet dazu die eigene RNA-Komponente als Vorlage. Eine Telomeraseaktivität konnte in vielen Tumorzellen nachgewiesen werden [93].

Das *MYC*-Gen liegt auf dem Chromosom 8 (8q24.21) und kodiert für den Transkriptionsfaktor *MYC* [94]. Es reguliert proliferationsfördernde Signalwege und gilt als Onkogen [95]. In einer Studie von Sokolova et al. [96] an 235 zytologischen Abstrichpräparaten der Zervix uteri von 235 Patientinnen mit 99 Präparaten einer hochgradigen Dysplasie zeigten 3q26 (enthält *TERC*) und 8q24 (enthält *MYC*) signifikant höhere Kopienzahlen in gleichzeitig HPV-infizierten Zellen bei hochgradiger Dysplasie im Vergleich zu normalen Zellen.

Bei CEP6 handelt es sich um eine Sonde für das Zentromer des Chromosoms 6. Die Sonde wird bereits in einer Mehrfarben-FISH für die Lungenzytologie angewendet. Zudem ist sie mit einem blauen Fluoreszenzfarbstoff kombiniert kommerziell erhältlich.

Die 9p21-FISH beinhaltet die DNA-Sonden für *CDKN2A* (grünes Signal) und das Zentromer des Chromosoms 9 (orangeses Signal).

Das *CDKN2A*-Gen liegt auf dem Chromosom 9 (9p21.3) [97] und kodiert für das Protein P16. P16 hemmt die Interaktion von Cyclin D1 mit cyclinabhängigen Kinasen (CDK4, 6) und verhindert den Übergang von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus. Eine Veränderung des Gens ist an der Entwicklung von Tumoren beteiligt [44, 98].

Bei CEP9 handelt es sich um eine Sonde für das Zentromer des Chromosoms 9. Sie dient dem Nachweis der normalen Kopienzahl des Chromosoms 9 im Vergleich zum möglichen Genort-spezifischen Verlust von 9p21 [99].

1.7 Ziele der Arbeit

Für die klinische Anwendung der FISH-Untersuchung in der geplanten Anwendung an einer Fallserie zur Abklärung zytologisch unklarer Mundschleimhautläsionen bei FA-Betroffenen muss ein Schwellenwert (Cutoff) bestimmt und in einer Kohorte von FA betroffenen Personen validiert werden [88].

Für eine Diagnosestellung ist ein Cutoff nötig, um positive und negative Befunde der FISH-Untersuchung zu definieren. Ein zu geringer Cutoff birgt die Gefahr falsch positiver Resultate aufgrund von Artefakten und normaler sich im Zellzyklus befindenden Zellen. Ein zu hoher Cutoff ist wenig sensitiv. Diesen Wert gilt es daher, anhand einer retrospektiven Studie an zytologischen Präparaten unterschiedlicher Diagnosekategorien und bekanntem klinisch-histologischem Follow-up zu ermitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum und Abgrenzung der eigenen Leistung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Fallkontroll-Studie. Das erforderliche positive Ethikvotum wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf am 27.01.2020 mit der Studiennummer 2019-625 erteilt.

Die Arbeit stellt einen Teilaspekt der im Funktionsbereich Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführten Teilstudie 5 des ADDRESS Projektes dar. ADDRESS ist ein vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderter Forschungsverbund und steht für „Translational Research for Persons with Abnormal DNA Damage Response“. Das Projekt beschäftigt sich mit seltenen Erkrankungen. Das Thema der Teilstudie 5 ist die „Verbesserung der Früherkennung des Mundkrebses sowie seiner Vorstufen mittels mikroskopisch-zytologischer und genetischer Methoden bei Menschen mit Fanconi-Anämie“. Die Studie ist in drei Abschnitte gegliedert. Die vorliegende Doktorarbeit ist Teil des zweiten Abschnittes.

Der erste Abschnitt beinhaltet eine Pilotstudie zur Auswahl geeigneter FISH-Sonden. Der zweite Abschnitt beinhaltet zum einen die retrospektive Fall-Kontroll-Studie, auch mit Daten der vorliegenden Doktorarbeit, zur Bestimmung eines Schwellenwertes und zum anderen eine retrospektive Validierungsstudie. Der dritte Abschnitt besteht aus einer prospektiven Kohortenstudie. Die Pilotstudie [88] und die retrospektiven Studien [1] wurden 2022 veröffentlicht. Die Daten der vorliegenden Doktorarbeit sind Teil einer Doppelbestimmung der FISH-Untersuchungen und wurden zur Bestimmung der Untersuchervariabilität herangezogen. Die Berechnungen der vorgenannten Veröffentlichung wurden anhand der FISH-Untersuchungen von Dr. Silva de Araujo erstellt. Daher sind die Berechnungen in der vorliegenden Doktorarbeit selbständig durchgeführt und auch noch nicht veröffentlicht.

Im Detail wird die eigene Leistung wie folgt abgegrenzt:

Das Heraussuchen geeigneter Mundschleimhautabstriche aus dem Archiv und das Vormustern auf Eignung erfolgte durch den wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. Silva de Araujo des Funktionsbereichs Cytopathologie. Die abschließende Beurteilung der Eignung für die geplanten FISH-Untersuchungen und Markierung der relevanten Objektträgerareale führten die beiden diagnostisch erfahrenen Zytopathologen des Funktionsbereichs Cytopathologie Dr. Schramm und Dr. Pomjanski durch. Die Laborarbeiten der FISH-Präparate mit Hybridisierung und Rehybridisierung der Präparate erfolgten durch den wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. Silva de Araujo und durch mich. Insgesamt habe ich 64

von 180 Präparaten mit der Mehrfarben-FISH hybridisiert und 34 von 160 Präparaten mit der 9p21-FISH rehybridisiert. Die Auswertung aller 180 hybridisierten und 160 rehybridisierten Präparate unter dem Fluoreszenz-Mikroskop erfolgten unabhängig in Doppelbestimmung durch den wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. Silva de Araujo (Untersucher 1) und durch mich (Untersucher 2). Die Ergebnisse des Untersuchers 1 wurden bereits veröffentlicht. Meine Daten wurden dabei für die Berechnung der Untersuchervariabilität verwendet [1]. In der vorliegenden Arbeit stelle ich meine eigenen Ergebnisse der FISH-Untersuchungen vor. Die statistische Auswertung der Gesamtstudie mit den publizierten Daten [1] erfolgte durch die Statistikerin Frau de Santana Almeida Araujo des Funktionsbereichs Cytopathologie. Anhand des Beispiels dieser Auswertung werden für die von mir erhobenen und in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten die Berechnungen selbständig neu durchgeführt (siehe Kapitel 2.8).

2.2 Studienaufbau, Auswahl und Markierung geeigneter Präparate

Aus dem Archiv des Funktionsbereichs Cytopathologie des UKD wurden Präparate aus der laufenden FA Mundkrebs-Überwachungsstudie, in großen Teilen publiziert von Velleuer et al. 2020 [23] ausgewählt, da dort bereits Follow-up-Daten für die oralen Läsionen bekannt waren. Ausgehend von 754 Mundschleimhautläsionen mit verfügbaren Präparaten und korrespondierenden Follow-up-Daten wurden 93 zytologisch negative und 87 zytologisch zweifelhafte, tumorverdächtige und positive Präparate aus den Jahren 2007 bis 2017 ausgewählt. Dies sind Bürstenabstriche von oralen Läsionen, die mittels Zervixbürstchen (CervixBrush, Firma CellPath Ltd, Newton, Großbritannien) oder spezieller Bürstchen für die orale Zytologie (Orcellex, Firma Rovers, Oss, Niederlande) abgestrichen wurden. Die Bürstenabstriche wurden vor allem in den ersten Studienjahren als konventionelle Ausstrichpräparate sowie später meist als Zytospinpräparate von flüssigkeitsbasierten Mundschleimhautabstrichen (SafePrep, Firma Mediate, Burgdorf, Deutschland oder BD SurePath, Firma BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) angefertigt. Nicht alle diese Präparate aus der Mundkrebs-Überwachungsstudie waren für die retrospektive Schwellenwert-Studie geeignet. Meist lagen zwar mehrere Objektträger einer Läsion vor, die diagnoserelevanten Zellen waren aber nicht auf jedem Objektträger vorhanden. Einige Präparate waren bereits nach Feulgen umgefärbt und archiviert und eine FISH-Untersuchung damit nicht mehr möglich. Auch gab es nicht immer mehrere zytologische Präparate einer Mundschleimhautläsion mit gutem Zellerhalt und ausreichender Zahl relevanter Zellen. Deshalb mussten die Präparate erneut durch die Mitarbeiter des Funktionsbereichs Cytopathologie durchgesehen und die relevanten Areale für die folgenden FISH-Untersuchungen markiert werden (siehe auch Kapitel 2.1). Insgesamt

wurden die Objektträger mit dem besten Zellerhalt und bestem Gehalt relevanter Zellen für die FISH-Studie verwendet. Zytologisch negative geeignete Präparate lagen im Überschuss vor, so dass für die FISH-Studie ausgewählt wurde. Es wurden hingegen alle geeigneten zytologisch zweifelhaften, dringend tumorverdächtigen und positiven Präparate ohne eine weitere Auswahl eingeschlossen. Diagnoserelevante Bereiche auf den Objektträgern wurden mit einem Diamantstift markiert. Die markierten Bereiche waren entweder 15x15mm, 18x18mm oder 12mm im Durchmesser groß und sollten später mittels FISH untersucht werden.

Den Aufbau der retrospektiven FISH-Studie zeigt Abb. 1.

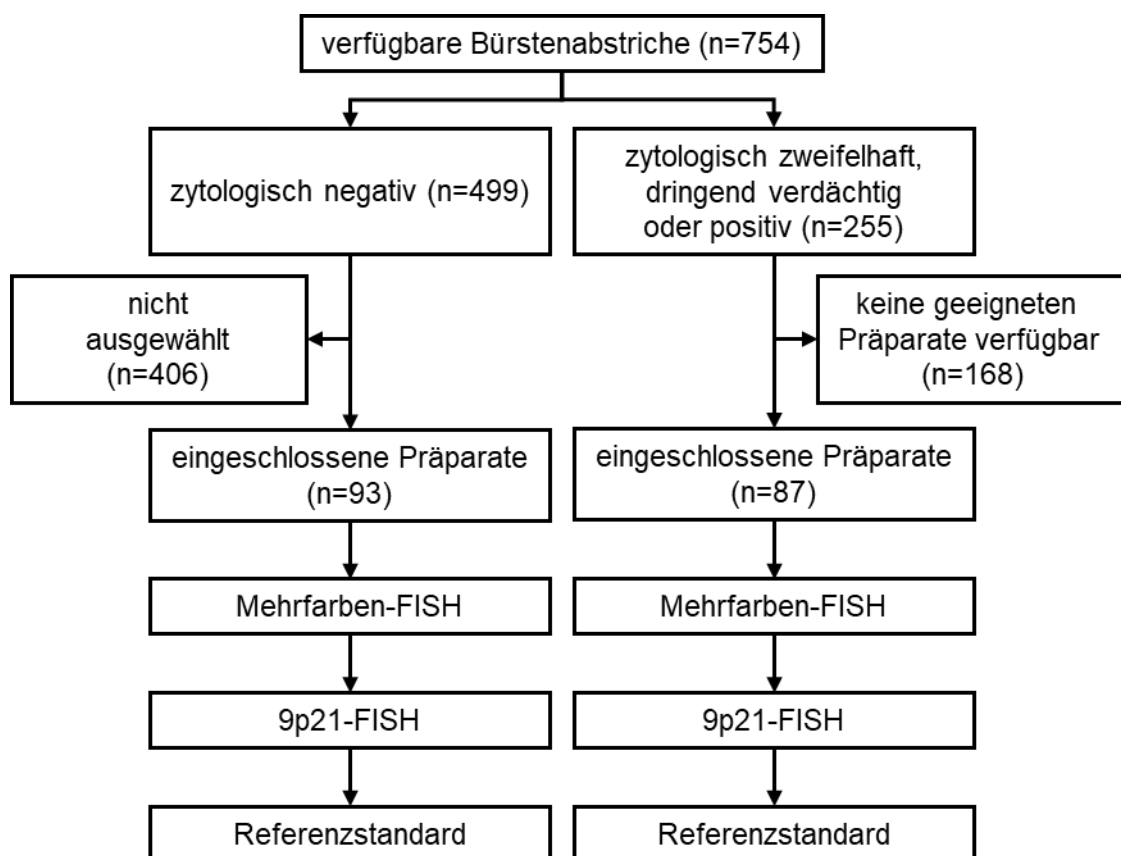


Abb. 1: Flussdiagramm der FISH-Studie

2.3 Geräte, Materialien und Lösungen

In der folgenden Tabelle 1 sind die benötigten Geräte und Materialien für die FISH-Untersuchungen mit Herstellerangaben aufgelistet.

Gerät/Material	Hersteller	Typennummer
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen	Basis Plus 210 S
Auswertungssoftware	Zeiss AG, Jena	AxioVision SE64 Rel. 4.9
Deckgläser 18x18mm, 15x15mm, Ø12mm, 24x60mm	VWR International GmbH, Darmstadt	
Fluoreszenzfilter Sp. Aqua	AHF Analysentechnik AG, Tübingen	<i>excitation 436/ beamsplitter 455/ emission 480</i>
Fluoreszenzfilter Sp. Green	AHF Analysentechnik AG, Tübingen	<i>excitation 500/ beamsplitter 515/ emission 535</i>
Fluoreszenzfilter Sp. Gold	AHF Analysentechnik AG, Tübingen	<i>excitation 546/ beamsplitter 555/ emission 575</i>
Fluoreszenzfilter Sp. Orange	AHF Analysentechnik AG, Tübingen	<i>excitation 546/ beamsplitter 560/ emission 585</i>
Fluoreszenzfilter Sp. Red	AHF Analysentechnik AG, Tübingen	<i>excitation 575/ beamsplitter 593/ emission 624</i>
Fluoreszenzfilter DAPI	AHF Analysentechnik AG, Tübingen	<i>Nicht bekannt</i>
Fluoreszenzmikroskop (FISH-Mikroskop)	Zeiss AG, Jena	Axio Imager M1
Gefrierschrank	Liebherr International S.A., Ehingen	Komfort
Glasküvette	nicht bekannt	
Hybridisierungskasten	verdunkelter Diakasten (keine Herstellerangabe)	
Kühlschrank	Liebherr International S.A., Ehingen	ES
Kunststoffküvette (verdunkelt)	nicht bekannt	
Mikroskop- Beleuchtung	Zeiss AG, Jena	HBO-100
Mikroskop-Kamera	Zeiss AG, Jena	AxioCam MRm
Netzteil	Zeiss AG, Jena	Power Supply 231
Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg	10µl, 100µl, 1000µl
Präzisionsheizplatte	Harry Gestig GmbH, Düsseldorf	Präzitherm Type PZ-28-1T
Präzisionswaage	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern	EW 600-2M
Vortexer	JKA Technische Dienstleistungs GmbH & Co. KG, Arnstein	Minishaker MS-1
Wärmeschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau	B 6060

Tabelle 1 (Anfang): Geräte und Materialien für die FISH-Untersuchungen

Gerät/Material	Hersteller	Typennummer
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach	WB/0B7-45 WBU 45
Zentrifuge	Qualitron Inc.	DW-41-230

Tabelle 1 (Fortsetzung): Geräte und Materialien für die FISH-Untersuchungen

Für die FISH-Untersuchungen wurden folgende Lösungen und Reagenzien verwendet (siehe Tabelle 2 und Tabelle 3).

Lösungen	Hersteller
4,6-Diamidin-2-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA
20x Kochsalz-Natriumcitrat (SCC)	Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA
Chlorwasserstoff (HCl) 25%	Merck KGaA, Darmstadt
destilliertes Wasser	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 100%	VWR International GmbH, Darmstadt
Fixogum (Thermokleber)	Marabu GmbH & Co. KG, Tamm
Immersionsöl 518F	Zeiss AG, Jena
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Nonoxynol-40 (NP-40)	Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Pepsin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Vysis CEP 6, Spectrum-Aqua	Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA
Vysis CEP 9, Spectrum-Green	Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA
Vysis IntelliFISH Hybridisierungspuffer	Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA
Vysis LSI CCND1, Spectrum-Green	Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA
Vysis LSI TERC, Spectrum-Gold	Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA
Vysis LSI MYC Spectrum-Red	Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA
Vysis LSI CDKN2A, Spectrum-Orange	Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 2: Lösungen und Reagenzien für die FISH-Untersuchungen

Aus einigen Reagenzien (siehe Tabelle 2) wurden die notwendigen Stamm- und Gebrauchslösungen für die FISH-Untersuchungen von dem wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. Silva de Araujo und der medizinisch-technischen Assistentin des Funktionsbereichs Cytopathologie Frau Kazimirek hergestellt (siehe Tabelle 3).

Stamm- und Gebrauchslösung Herstellung

20x SCC Stammlösung	• 132g 20xSCC in 400ml Aqua dest. lösen • mit HCl auf pH 5,3 einstellen • mit destilliertem Wasser auf 500ml auffüllen • durch 0,45µm Porendurchmesser filtern
2x SSC Gebrauchslösung (bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar, gebrauchte Lösung am Ende des Tages verwerfen)	• 100ml 20x SCC Stammlösung (pH 5,3) mit 850ml Aqua dest. auffüllen • mit NaOH auf pH 7 einstellen • mit destilliertem Wasser auf 1000ml auffüllen
0,4x SCC mit NP-40 Gebrauchslösung (bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar, gebrauchte Lösung am Ende des Tages verwerfen)	• 20ml 20xSCC Stammlösung (pH 5,3) mit 950 ml destilliertem Wasser auffüllen • 1ml NP-40 hinzugeben • mit NaOH auf pH 7-7,5 einstellen • mit destilliertem Wasser auf 1000ml auffüllen
Pepsin Stammlösung (10%, 0,1g/ml) (Aliquots bei -20°C mehrere Jahre haltbar, nicht mehr als 10x wieder auftauen)	• 100mg (0,1g) Pepsin in 1ml destilliertem Wasser lösen • 100µl Aliquots in Eppendorf-Röhrchen pipettieren
Pepsin Gebrauchslösung (0,02%)	• 4,9ml destilliertes Wasser mit 100µl 1 M HCl und 10µl Pepsin-Stammlösung mischen
0,5% HCl/70% Ethanol (2 Monate bei Raumtemperatur haltbar)	• 8ml 25% HCl in 392ml 70% Ethanol lösen
1% Formalin/PBS (6 Wochen bei Raumtemperatur haltbar)	• 1g Paraformaldehyd in 100ml PBS Puffer lösen (bei 50°C auf Wärmeplatte mit Magnetrührer)
PBS Stammlösung	• 1,46g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$), 0,24g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 0,2g Kaliumchlorid (KCl) und 8,0g Natriumchlorid (NaCl) • mit 900ml destilliertem Wasser auffüllen • unter ständigem Rühren vollständig lösen • mit 1 N HCl auf pH 7,3 einstellen • mit destilliertem Wasser auf 1000ml auffüllen
PBS Gebrauchslösung (ca. 4 Wochen bei Raumtemperatur haltbar)	• 50ml PBS Stammlösung (1:20) mit 950ml destilliertem Wasser auffüllen
70%, 80%, 85%, 95% Ethanol	• jeweils 100% Ethanol mit destilliertem Wasser verdünnen

Tabelle 3: Herstellung der Stamm- und Gebrauchslösungen für die FISH-Untersuchungen, PBS= phosphatgepufferte Salzlösung

2.4 Mehrfarben-FISH, Hybridisierung

Alle 180 eingeschlossenen Präparate wurden nach Papanicolaou gefärbt. Für die Mehrfarben-FISH wurden die Präparate mit einem Sondenmix aus vier FISH-Sonden hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte durch den wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. Silva de Araujo des Funktionsbereichs Cytopathologie und durch mich. Es wurden Sonden für *CCND1* (Vysis LSI *CCND1*, Spectrum-Green), *TERC* (Vysis LSI *TERC*, Spectrum-Gold), *MYC* (Vysis LSI *MYC*, Spectrum-Red) und für das Zentromer von Chromosom 6 (Vysis CEP 6, Spectrum-Aqua) verwendet. Die Hybridisierung erfolgte nach einem im Funktionsbereich Cytopathologie etablierten Protokoll. Für das FISH-Protokoll wurden zuvor Stamm- und Gebrauchslösungen angesetzt (siehe Tabelle 3).

Das Protokoll erstreckt sich über mehrere Tage. Fünf Tage werden benötigt, um das Deckglas mit Eindeckmedium der dauerhaft eingedeckten und archivierten zytologischen Präparate zu entfernen und zwei aufeinanderfolgende Tage für die Hybridisierung der Präparate mit den FISH-Sonden. Für die Hybridisierung müssen die Präparate unter Schonung der Zellen erst vorbereitet und die DNA für die FISH-Sonden zugänglich gemacht werden (siehe Tabelle 4). Die FISH-Sonden können sich nur an die komplementären Genregionen binden, wenn die DNA in Einzelsträngen vorliegt. Die doppelsträngige DNA der Zellen wird daher im FISH-Protokoll vor der Hybridisierung denaturiert.

In der Regel werden vier Präparate gleichzeitig hybridisiert. Zuerst muss das Deckglas vorsichtig entfernt werden. Dazu müssen die Präparate 2 Tage in eine (Glas-)Küvette mit Xylol eingestellt werden. Dann müssen sie erneut 3 Tage in einer weiteren Küvette mit Xylol ohne Deckglas inkubiert werden, um Reste des Eindeckmedium zu entfernen, welches sonst die Zugänglichkeit der FISH-Sonden zu den Zellstrukturen verhindert. Dann erfolgt das eigentliche zweitägige Hybridisierungsprotokoll.

Am ersten Tag werden die Präparate zu Beginn langsam in absteigender Ethanolreihe rehydriert. Die Präparate werden dazu je zweimal für 5 Minuten in einzelnen Küvetten mit 100%, 95% und 80% Ethanol eingestellt. Dann kommen sie zur Entfärbung für 15 Minuten in 0,5% HCl/70% Ethanol.

Zum Waschen werden die Präparate dann in einer Küvette für 2 Minuten unter fließendes Leitungswasser gebracht, für 3 Minuten in eine Küvette mit destilliertem Wasser und dann für 5 Minuten zur Vorbereitung der Hybridisierung bei 73°C in 2x SCC Pufferlösung in einer Küvette im Wasserbad eingestellt.

Damit die DNA im Zellkern für die FISH-Sonden zugänglich wird, erfolgt ein enzymatischer Andau der Zellen mit Pepsin. Dazu werden die Präparate in einem mit Papiertüchern befeuchteten Kasten gelegt und mit der vorgewärmten 0,02%igen Pepsinlösung (37°C) bedeckt. Der Kasten wird dann mit den bedeckten Präparaten für 15 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.

Zur Entfernung der Pepsinreste werden die Präparate 5 Minuten lang bei Raumtemperatur in 10% PBS eingestellt. Nun werden die Zellen für 5 Minuten in 1% Formalin/PBS fixiert. Eine Entfernung der Formalinreste erfolgt für 5 Minuten wieder in PBS.

Nun werden die Präparate für die Hybridisierung in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 85%, 100%) für jeweils 2 Minuten dehydriert und anschließend maximal 5 Minuten zur Entfernung von Ethanolresten an der Luft getrocknet.

Schritt	Medium	Dauer	Funktion
1	Xylol	2 Tage	Entfernung des Deckglases
2	Xylol	3 Tage	Entfernung des Eindeckmediums
3	Objektträger trocknen lassen	5 min	Entfernung des Xylols
4	2x 100% Ethanol	je 5 min	Rehydrierung
5	2x 95% Ethanol		
6	2x 80% Ethanol		
7	0,5% HCl/ 70% Ethanol	15 min	Waschen und Entfärben der Objektträger
8	fließendes Leitungswasser	2 min	
9	destilliertes Wasser	3 min	
	Pepsin-Lösung vorbereiten		
10	2x SCC 73°C (Wasserbad)	5 min	Vorbereitung der Hybridisierung, waschen
11	0,2mg/ml Pepsin in 0,01 mol/l HCL 37°C (feuchter Kasten im Wärmeschrank)	15 min	Enzymatischer Andau von Zellproteinen
	Hybridisierungspuffer 5 min auftauen und 5 sec zentrifugieren, 3 sec vortexen und 3 sec zentrifugieren		
	Hybridisierungspuffer mit destilliertem Wasser mischen (siehe Tabelle 5)		
12	PBS Gebrauchslösung	5 min	Entfernung der Pepsinreste
	Sonden 5 sec zentrifugieren, 3 sec vortexen und 3 sec zentrifugieren		
13	1% Formalin/PBS	5 min	Fixierung der Zellen
	Sonde zur Hybridisierungspufferlösung hinzugeben (siehe Tabelle 5)		
14	PBS Gebrauchslösung	5 min	Entfernung des Formalins
	Sondenmischung 5 sec zentrifugieren, 30 sec vortexen und 3 sec zentrifugieren		
15	70% Ethanol	2 min	Dehydrierung
16	85% Ethanol		
17	100% Ethanol		
18	Lufttrocknung	ca. 5 min	Verdunstung des Ethanols
19	Sondenmischung auf die Deckgläser pipettieren, mit dem Präparat aufnehmen und mit dem Thermokleber versiegeln		
20	Präparate im feuchten Kasten bei 37°C für 5 min in den Wärmeschrank legen		
21	Heizplatte 73°C (mit Kastendeckel abdecken)	10 min	Denaturierung der DNA
22	Präparate in der feuchten Kammer zur Hybridisierung bei 37°C für 14-16 Stunden (über Nacht) in den Wärmeschrank legen		

Tabelle 4: FISH-Protokoll zur Hybridisierung mit der Mehrfarben-FISH, Teil 1 von 2, min=Minuten, sec=Sekunden

Die Vorbereitung der FISH-Sonden-Mischung erfolgt zwischen den vorgenannten Inkubationsschritten. Die FISH-Sonden werden mit einer Hybridisierungspufferlösung

gemischt. Der Vysis IntelliFISH-Hybridisierungspuffer und die FISH-Sonden werden im Gefrierfach bei -20°C gelagert. Sie werden vor Gebrauch kurz zentrifugiert, mit dem Vortexer gemischt und wieder zentrifugiert. Dann wird der visköse Hybridisierungspuffer zuerst mit destilliertem Wasser gemischt und dann erst die FISH-Sonden hinzupipettiert. Für die Hybridisierung einer 18mmx18mm großen Fläche werden 8µl, für 15x15mm 6µl und für einen Durchmesser von 12mm 3µl Sondenmischung benötigt. Der FISH-Sondenmix ist 1:5 verdünnt (siehe Tabelle 5).

	Deckglas 18x18mm	Deckglas 15x15mm	Deckglas Ø12mm
Hybridisierungspuffer	5,6µl	4,2µl	2,1µl
destilliertes Wasser	0,8µl	0,6µl	0,3µl
FISH-Sonden	1,6µl	1,2µl	0,6µl
Gesamt	8,0µl	6,0µl	3,0µl

Tabelle 5: Sondenmischung für die Mehrfarben-FISH mit einer Verdünnung der DNA-Sonden von 1:5

Die Sondenmischung wird dann erneut zentrifugiert, auf dem Vortexer durchmischt und wieder zentrifugiert. Dann kann sie auf die entsprechend der mit dem Diamantschreiber eingeritzten hybridisierenden Fläche ausgewählten Deckgläser pipettiert werden. Die Deckgläser werden durch kurzes Andrücken an den zu hybridisierenden markierten Bereich vom vorbereiteten Präparat aufgenommen. Die Ränder des Deckglases werden dann mit einem Thermokleber versiegelt, um ein Austrocknen zu verhindern und die Präparate für 5 Minuten in einen mit Papiertüchern befeuchteten Kasten bei 37°C in den Wärmeschrank gelegt.

Dann werden die Präparate für 10 Minuten bei 73°C auf einer Heizplatte im Dunkeln denaturiert. Es liegt jetzt einzelsträngige DNA im Zellkern vor. Nun verbleiben die Präparate für die Hybridisierung über Nacht bei 37°C im befeuchteten Kasten.

Am nächsten Tag muss der Sondenüberschuss entfernt werden (siehe Tabelle 6). Dazu werden die Präparate 2 Minuten lang in 0,4x SSC/NP-40 bei Raumtemperatur in eine verdunkelte Kunststoffküvette gelegt, um das Deckglas entfernen zu können. Dann werden die Präparate erneut 2 Minuten lang in eine Küvette mit 0,4x SSC/NP-40 im Wasserbad bei 73°C eingestellt. Danach werden die Präparate ein letztes Mal für 1 Minute in 0,4x SSC/NP-40 bei Raumtemperatur in einer verdunkelten Kunststoffküvette inkubiert. Anschließend werden sie zur Entfernung von Waschpufferresten fünfmal kurz in destilliertes Wasser getaucht, an der Luft getrocknet und dann mit zwei Tropfen 4,6-Diamidin-2-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) gegengefärbt. Zum Abschluss wird ein 24x60mm Deckglas aufgelegt und die Ränder mit einem Thermokleber versiegelt. Die Präparate können bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4°C gelagert werden. Danach sollten sie bei -20°C gelagert werden [1].

Schritt	Medium	Dauer	Funktion
23	Thermokleber von den Präparaten entfernen		
24	0,4x SCC/NP-40 bei Raumtemperatur (verdunkelte Kunststoffküvette)	2 min	Entfernung des Deckglases
25	0,4x SCC/NP-40 73°C (im Wasserbad)	2 min	Entfernung des Sondenüberschusses
26	0,4x SCC/NP-40 bei Raumtemperatur (verdunkelte Kunststoffküvette)	1 min	Entfernung des Sondenüberschusses
27	destilliertes Wasser	3 sec	Waschen
28	Lufttrocknung	3 min	
29	Gegenfärbung mit DAPI und 24x60mm Deckglas		
30	mit Thermokleber versiegeln		
31	bis zur Auswertung im Kühlschrank bei 4°C lichtgeschützt lagern, danach dauerhaft bei -20°C		

Tabelle 6: FISH-Protokoll zur Hybridisierung mit der Mehrfarben-FISH, Teil 2 von 2

2.5 9p21-FISH, Rehybridisierung

Die 180 mit der Mehrfarben-FISH hybridisierten Präparate wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet (siehe Kapitel 2.6). Alle 160 hierbei auswertbaren Präparate wurden anschließend durch den wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. Silva de Araujo oder durch mich nach einem institutsinternen Protokoll mit den beiden Sonden für die Region 9p21 und CEP9 wie folgend beschrieben rehybridisiert. Verwendet wurden dazu die Sonde für 9p21 (Vysis LSI *CDKN2A*, Spectrum-Orange) und die entsprechende Zentromersonde von Chromosom 9 (Vysis CEP9, Spectrum-Green).

Für die Rehybridisierung müssen das Deckglas, die DAPI-Färbung und die FISH-Sonden wieder entfernt werden. Dann können die Präparate mit den beiden weiteren FISH-Sonden rehybridisiert werden. Für die Rehybridisierung sind zwei aufeinanderfolgende Tage notwendig (Tabelle 7). Es werden in der Regel vier Präparate gleichzeitig rehybridisiert.

Zunächst werden die Präparate 5 Minuten lang in einer Küvette mit 100% Ethanol eingestellt, um die Deckgläser zu entfernen und dann für 3 Minuten zur Entfernung von Ethanolresten an der Luft getrocknet.

Zur Entfernung der DAPI-Färbung werden die Präparate 5 Minuten in eine verdunkelte Kunststoffküvette mit 0,4x SCC/NP-40 bei Raumtemperatur gestellt. Dann erneut für 5 Minuten in einer Küvette mit 0,4x SCC/NP-40 in einem auf 85°C erhitztem Wasserbad inkubiert, um die Sonden der Mehrfarben-FISH zu entfernen. Danach kommen die Präparate zur Abkühlung für 3 Minuten in eine Küvette mit 2x SCC und dann wieder zur Komplettierung des Ablösevorganges der FISH-Sonden 5 Minuten in eine Küvette mit 0,4x SCC/NP-40 bei 85°C im Wasserbad. Dann kommen die Präparate zum Waschen für 3

Minuten in eine Küvette mit 2x SCC und anschließend ca. 20 Minuten in destilliertes Wasser, bis das Wasserbad 73°C erreicht hat. Dann werden die Präparate 5 Minuten lang bei 73°C in einer Küvette mit 2x SCC im Wasserbad inkubiert.

Als nächstes werden die Präparate für die Hybridisierung dehydriert und dazu für jeweils 2 Minuten in eine Küvette mit 70%, 85% und 100% Ethanol gestellt und zur Entfernung von Ethanolresten maximal 5 Minuten an der Luft getrocknet.

Schritte	Medium	Dauer	Funktion
1	100% Ethanol	5 min	Entfernung des Deckglases
2	Lufttrocknung	3 min	Verdunstung des Ethanols
3	0,4x SCC/NP-40 (verdunkelte Kunststoffküvette) bei Raumtemperatur	5 min	Entfernung der DAPI Färbung
4	0,4x SCC/NP-40 85°C (Wasserbad)	5 min	Entfernung der Sonden
5	2x SCC bei Raumtemperatur	3 min	Abkühlung
6	0,4x SCC/NP-40 85°C (Wasserbad)	5 min	Entfernung der Sonden
7	2x SCC bei Raumtemperatur	3 min	Abkühlung
8	destilliertes Wasser	ca. 20 min	Warten auf Abkühlung des Wasserbades auf 73°C
	Hybridisierungspuffer 5 min auftauen und 5 sec zentrifugieren, 3 sec vortexen und 3 sec zentrifugieren		
	Hybridisierungspuffer mit destilliertem Wasser mischen (siehe Tabelle 8)		
9	2x SCC 73°C (Wasserbad)	5 min	Waschen
	Sonden 5 sec zentrifugieren, 3 sec vortexen und 3 sec zentrifugieren		
	Sonde zur Hybridisierungspufferlösung hinzugeben (siehe Tabelle 8), Sondenmischung 5 sec zentrifugieren, 30 sec vortexen und 3 sec zentrifugieren		
10	70% Ethanol	2 min	Dehydrierung
11	85% Ethanol	2 min	
12	100% Ethanol	2 min	
13	Lufttrocknung	ca. 5 min	Verdunstung des Ethanols
14	Sondenmischung auf die Deckgläser pipettieren, mit dem Präparat aufnehmen und mit dem Thermokleber versiegeln		
15	Präparate im feuchten Kasten bei 37°C für 5 min in den Wärmeschrank legen		
16	Heizplatte 73°C (abdecken mit Kastendeckel)	8 min	Denaturierung
17	Präparate in der feuchten Kammer zur Hybridisierung bei 37°C für 14-16 Stunden (über Nacht) in den Wärmeschrank legen		
18	der Folgetag erfolgt analog zur Hybridisierung mit der Mehrfarben-FISH (siehe Tabelle 6)		

Tabelle 7: FISH-Protokoll zur Rehybridisierung mit der 9p21-FISH

Die Vorbereitung der FISH-Sonden-Mischung erfolgt zwischen den Schritten und analog wie bei der Mehrfarben-FISH beschrieben. Es wird jedoch eine Konzentration von 1:10 verwendet (siehe Tabelle 8). Auch die weiteren Schritte erfolgen wie bereits bei der Mehrfarben-FISH beschrieben (Kapitel 2.4) [1].

	Deckglas 18x18mm	Deckglas 15x15mm	Deckglas Ø12mm
Hybridisierungspuffer	5,6µl	4,2µl	2,1µl
destilliertes Wasser	1,6µl	1,2µl	0,6µl
FISH-Sonden	0,8µl	0,6µl	0,3µl
Gesamt	8,0µl	6,0µl	3,0µl

Tabelle 8: Sondenmischung für die 9p21-FISH mit einer Verdünnung der DNA-Sonden von 1:10

2.6 Auswertung mit dem Fluoreszenz-Mikroskop

Nach der Hybridisierung und Rehybridisierung wurden die Präparate jeweils unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Die Auswertung erfolgte unabhängig in Doppelbestimmung durch den wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. Silva de Araujo (Untersucher 1) und durch mich (Untersucher 2). Bei dem Fluoreszenz-Mikroskop handelt es sich um ein motorisiertes Axio Imager M1-Mikroskop mit x63- und x100-Ölimmersionsobjektiven, HBO100 Quecksilberdampflampe und der untenstehend beschriebenen Kamera. Die Qualität der Hybridisierung wurde anhand der Stärke und Verteilung der Fluoreszenzsignale in neutrophilen Granulozyten als interner Kontrolle bestimmt. Bei der Auswertung wurden Signale der FISH-Sonden von bis zu 50 möglichst auffälligen Zellkernen mit einem Auswertungsbogen ausgezählt. Auffällige Zellkerne wurden bereits in der DAPI-Färbung zum Beispiel durch eine Kernvergrößerung, unregelmäßige Form oder fleckige Färbung erkannt und bevorzugt ausgezählt. Bei der Auszählung wurde darauf geachtet, geteilte Signale als ein Signal zu zählen. Der Abstand zwischen zwei unabhängigen Signalen sollte mindestens zwei Signalbreiten betragen. Zellen mit überlappenden Kernen oder Artefakten (z.B. durch Bakterien) wurden nicht ausgewertet.

Aufnahmen von den Präparaten unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurden mit einer Zeiss AxioCam MRm 1,4 Megapixel Kamera und mit der AxioVision SE64 Rel. 4.9 Software als dreidimensionale Schichtaufnahmen (Z-stack) erstellt und softwaregestützt als 2-dimensionale Projektion dargestellt. Die Fotos der FISH-Präparate in dieser Arbeit stammen aus unserer bereits unter der Creative Commons 4.0 Lizenz publizierten Studie und dürfen verwendet werden [1].

2.6.1 Auswertungsalgorithmus, Aneuploidie-Definitionen (D1-D4) in der Mehrfarben-FISH

Grundsätzlich gilt jede Zelle mit zwei Signalen pro FISH-Sonde in der Mehrfarben-FISH als euploid. Um zu entscheiden, ab wann ein Signalmuster für eine Zelle als chromosomal

aneuploid gilt, wurden im Funktionsbereich Cytopathologie vier verschiedene Definitionen (D1-D4) entwickelt (Tabelle 9). Damit sollte die beste diagnostische Treffsicherheit für mindestens eine hochgradige OED ermittelt werden.

Aneuploidie-Definitionen

D1	mindestens 3 FISH-Sonden mit >2 Signalen
D2	alle Sonden mit >2 Signalen
D3	alle Sonden mit >2 Signalen oder 3 Sonden mit >2 Signalen, wenn <i>MYC</i> mit ≥ 4 Signalen
D4	alle Sonden mit >2 Signalen oder 3 Sonden mit >2 Signalen, wenn <i>MYC</i> mit ≥ 5 Signalen

Tabelle 9 Aneuploidie-Definitionen D1-D4 in der Mehrfarben-FISH

Bei den Definitionen wird eine Tetrasomie d.h. das Vorhandensein von vier Fluoreszenz-Signalen in allen FISH-Sonden, nicht als chromosomal aneuploid definiert. Eine Abweichung von ± 1 Fluoreszenzsignal bei einer der vier Sonden war hierbei erlaubt. Eine Tetrasomie kommt sowohl bei malignen Tumoren als auch bei einer euploiden Polyploidisierung vor und wird daher zur Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen bei reaktiven, entzündlichen Mundschleimhautläsionen, welche mit einer euploiden Polyploidisierung einhergehen können, nicht als aneuploid gewertet [1, 100].

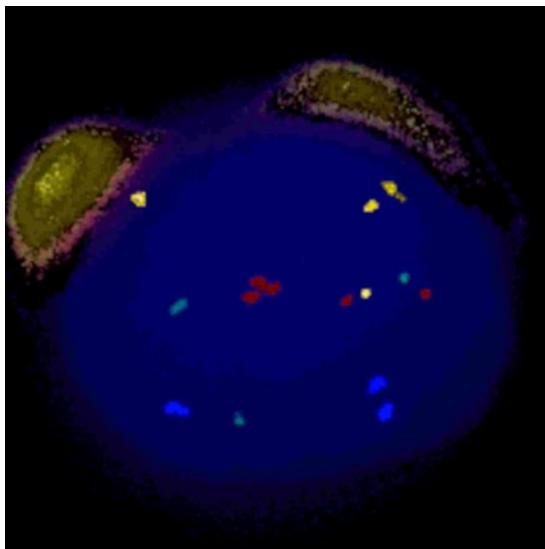


Abb. 2: Zelle unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung mit einem aneuploiden Signalmuster von 3-4-4-3 für *CCND1* (grün), *TERC* (gelb), *MYC* (rot) und *CEP6* (blau); das Bild stammt aus der Publikation [1] mit dem Bildtitel „Representative images of the multi-color fluorescent in situ hybridization (FISH) assay (*CCND1*, green; *TERC*, yellow; *MYC*, red; *CEP6*, blue) and the 9p21 FISH assay (*CEP9*, green; *CDK2NA*, orange). [...]“ und wurde von Bruno Eduardo Silva de Araujo erstellt und lizenziert unter CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Von mir vom Original zugeschnitten.

2.6.2 Auswertungsalgorithmus, homozygote und relative Deletion in der 9p21-FISH

Mit der 9p21-FISH wird die homozygote und relative Deletion von 9p21 in einer Zelle bestimmt. Eine homozygote Deletion liegt vor bei einer Signalzahl von CEP9 ≥ 1 und einer Signalzahl von 9p21 gleich 0. Eine relative Deletion liegt vor, wenn die Signalzahl der 9p21-Sonde kleiner ist als die der CEP9-Sonde, jedoch ungleich 0.

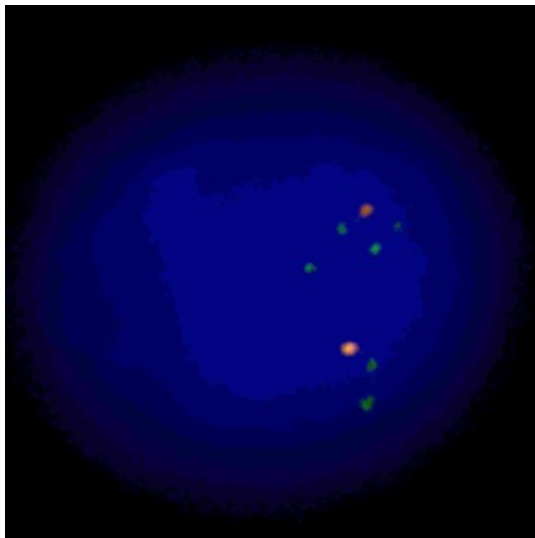


Abb. 3: Zelle unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung mit einer relativen Deletion von *CDK2NA* (orange, 2 Signale) bei einer Polysomie des Chromosoms 9, dargestellt mit CEP9 (grün, 5 Signale); das Bild stammt aus der Publikation [1] mit dem Bildtitel „Representative images of the multi-color fluorescent in situ hybridization (FISH) assay (*CCND1*, green; *TERC*, yellow; *MYC*, red; CEP6, blue) and the 9p21 FISH assay (CEP9, green; *CDK2NA*, orange). [...]“ und wurde von Bruno Eduardo Silva de Araujo erstellt und lizenziert unter CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Von mir vom Original zugeschnitten.

2.7 Positiver und negativer Follow-up Referenzstandard

Die Kriterien für einen positiven und negativen Follow-up Referenzstandard sind in Tabelle 10 beschrieben und wurden für die retrospektive FISH-Studie aus der im Funktionsbereich Cytopathologie laufenden Mundkrebs-Überwachungsstudie übernommen [1, 23].

Kriterien	
positiver Follow-up Referenzstandard	• histologische Diagnose eines OSCC oder einer hochgradigen oralen epithelialen Dysplasie innerhalb von 6 Monaten nach der Bürstenbiopsie • oder positive zytologische Diagnose oder der Nachweis von DNA-Aneuploidie mit einem konsistenten klinischen Verlauf, d.h. OSCC-Therapie, definitive Bildgebung oder palliative Versorgung
negativer Follow-up Referenzstandard	• negative Histologie oder histologische Diagnose einer geringgradigen oralen epithelialen Dysplasie innerhalb von 6 Monaten nach der Bürstenbiopsie • oder ein negativer klinischer Verlauf innerhalb von zwei Jahren nach der Bürstenbiopsie

Tabelle 10: Kriterien für einen positiven und negativen Follow-up Referenzstandard

2.8 Statistische Auswertung

Die Statistik wurde für die Gesamtstudie von der Statistikerin des Funktionsbereichs Cytopathologie Frau de Santana Almeida Araujo durchgeführt und von mir für die eigenen, bisher nicht im Detail in der Veröffentlichung Silva de Araujo et al. dargestellten Ergebnisse [1] neu berechnet und ergänzt.

Zuerst wurde die Anzahl der Signale pro Zelle und Präparat aus den Auswertungsbögen der Untersucher 1 und 2 einzeln in das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics (Version 25; IBM Corporation, New York, USA) eingegeben. Dann wurde jede Zelle aus den Untersuchungen mit der Mehrfarben-FISH mithilfe fünf verschiedener Codes im SPSS-Syntax-Editor als aneuploid oder nicht aneuploid eingestuft. Mit dem ersten Code wurden tetraploide Zellen erkannt, die nicht als aneuploid gelten sollen und mit den anderen Codes die Aneuploidiedefinitionen D1-D4. Zusätzlich wurde eingegeben, ob eine Zelle bei der Mehrfarben-FISH einen Signalgewinn aufweist oder nicht. Die relative und homozygote Deletion der 9p21-FISH wurde ebenfalls für jede Zelle ermittelt und eingegeben. Alle Daten wurden in zwei Datensätzen in SPSS zusammengefasst. Ein Datensatz mit allen Präparaten und ein Datensatz nur mit den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten.

In diesen tabellarischen Datensätzen wurde pro Präparat die zytologische Diagnose und die Follow-up-Diagnose eingegeben, dann für die Untersucher 1 und 2 die Gesamtanzahl aneuploider Zellen pro Präparat für D1-D4, zusätzlich auch für die einzelnen Sonden der Mehrfarben-FISH die Anzahl der Zellen mit >2 Signalen pro Präparat. Während der

Auswertung für die Publikation stellte sich als Konsens in der Arbeitsgruppe heraus, dass aus Gründen der klinischen Anwendbarkeit und der statistischen Auswertung ein Cutoff-Wert von mindestens 6 chromosomal aneuploiden Zellen für eine positive Mehrfarben-FISH optimal ist. Deshalb wurden in die Tabellen die einzelnen FISH-Diagnosen „positiv“ und „negativ“ für die Definitionen D1-D4 bei einem Cutoff-Wert von 6 eingetragen. Für die 9p21-FISH wurden in derselben Tabelle noch die Gesamtzahl an Zellen mit einer homozygoten Deletion und einer relativen Deletion pro Präparat eingegeben. Mit diesen Datensätzen konnten die Auswertungen erstellt werden.

Die Auswertungen lagen bereits aus der Publikation [1] für den Untersucher 1 vor. Meine eigenen Auswertungen (Untersucher 2) wurden analog dazu mit IBM SPSS Statistics (Version 29; IBM Corporation, New York, USA) und Microsoft® Excel® und Word® (Version 2410, © Microsoft 365) erstellt und dazu die zwei oben beschriebenen Datensätze der Statistikerin als Vorlage verwendet. Hierzu wurden Boxplot-Diagramme mit der Anzahl aneuploider Zellen für die Definitionen D1-D4 direkt mit Word® mithilfe der zwei Datensätze erstellt.

In einem Boxplot-Diagramm wurden metrische Daten grafisch in Quartilen dargestellt (siehe Abb. 4). In einer Box befinden sich 50% aller Werte. In Word® wird darin der Mittelwert mit einem Kreuz und der Median mit einer durchgezogenen Linie markiert. Das untere Ende der Box ist das erste Quartil und das obere Ende das dritte Quartil. Dazwischen befindet sich der Interquartilsabstand. Unterhalb des ersten Quartils befinden sich die niedrigsten 25% der Werte und oberhalb des dritten Quartils die höchsten 25% der Werte. Die Streuung ober- und unterhalb der Box wird mithilfe von t-förmigen Whiskern dargestellt. Sie gehen maximal bis zum 1,5-fachen des Interquartilsabstandes. Alle weiteren Werte befinden sich als Ausreißer punktförmig ober- und unterhalb der Whisker [101].

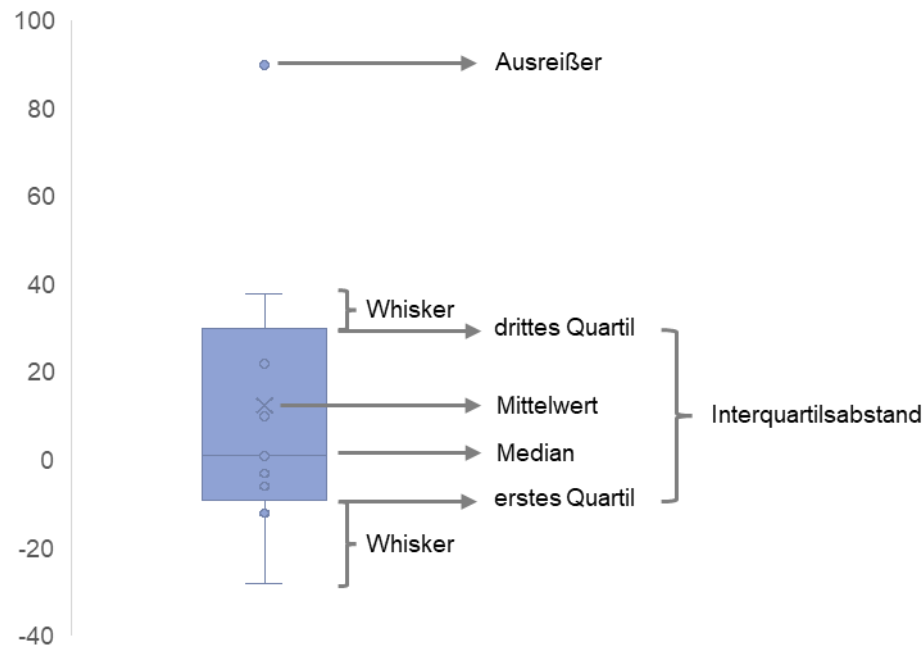


Abb. 4: Aufbau eines Boxplot-Diagramms

Außerdem wurden ROC (*Receiver operating characteristic*)-Kurven und die Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC (*area under the curve*)-Wert) mit Angabe von p-Wert und 5% Konfidenzintervall bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ mit ROC Analysen in SPSS erstellt. Die grafische Darstellung der ROC-Kurven wurden mithilfe der Koordinaten aus SPSS in Word® erstellt. Sensitivität, Spezifität und Youdenindex für unterschiedliche Cutoffs chromosomal aneuploider Zellen wurden mit Excel® berechnet.

Die Berechnung der zytologischen Treffsicherheiten erfolgte mithilfe einer Vierfeldertafel aus den Datensätzen als Excel®Tabelle.

Nach der Berechnung der von der Publikation ggf. abweichenden Cutoff-Werte in dieser Arbeit (siehe Ergebnisteil) wurden die Datensätze mit den neuen Werten ergänzt. Damit konnten dann in SPSS Kreuztabellen für die Mehrfarben- und 9p21-FISH erstellt und die Werte für Sensitivität und Spezifität um die Fallzahlen ergänzt werden.

Zudem wurden damit die Kappa-Werte zur Ermittlung der Untersucherunterschiede aus doppelter Auswertung mithilfe von SPSS berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ gesetzt. Bewertet wurden die Kappa-Werte mit folgenden Kriterien nach Landis et al. 1977 [102] (Tabelle 11):

Kappa-Wert	Übereinstimmung
<0	mangelhaft
0-0,2	gering
>0,2	mäßig
>0,4	moderat
>0,6	substanziell
>0,8	fast perfekt

Tabelle 11: Interpretation der Kappa-Werte nach Landis et al. [102]

3 Ergebnisse

3.1 Patientenangaben und Studienausschlüsse

Das Flussdiagramm der Studie nach den FISH-Untersuchungen und Follow-up zeigt Abb. 5:

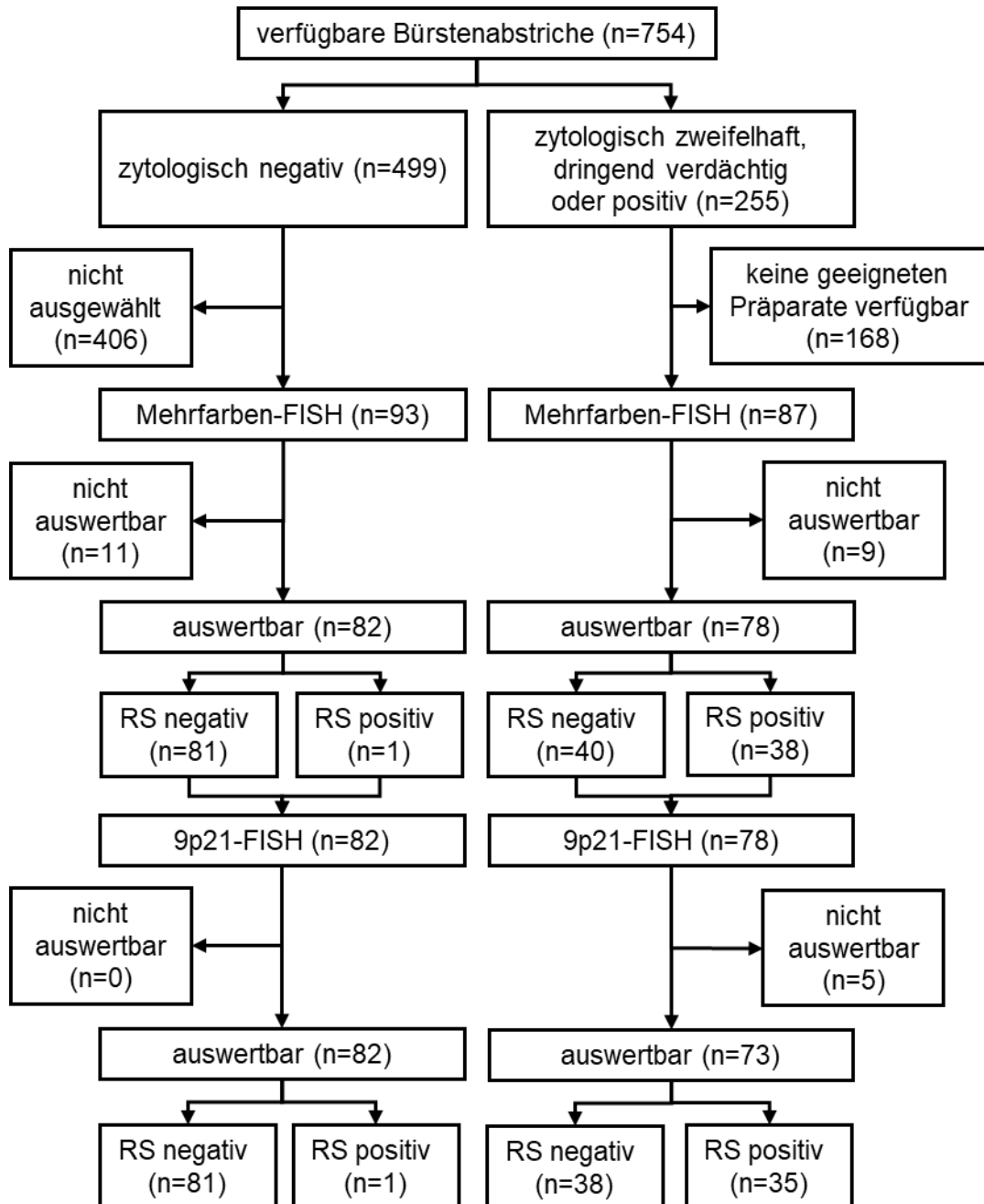


Abb. 5: Flussdiagramm der FISH-Studie nach den FISH-Untersuchungen, RS = Referenzstandard

In der Fall-Kontroll-Studie konnten 160 von 180 untersuchten Mundschleimhautpräparaten suspekter oraler Läsionen von FA-Betroffenen mit der Mehrfarben-FISH ausgewertet werden und davon 155 zusätzlich nach Rehybridisierung mit der 9p21-FISH.

Ausgeschlossen wurden alle Präparate, die auch in der Publikation [1] ausgeschlossen wurden. Nach der Mehrfarben-FISH mussten insgesamt 20 Präparate und nach der 9p21-FISH 5 Präparate ausgeschlossen werden, weil die FISH aufgrund zu schwacher Fluoreszenzsignale nicht auswertbar war. Bei der 9p21-FISH handelte es sich dabei ausschließlich um zytologisch zweifelhafte Präparate. Die auswertbaren Präparate stammten aus den Jahren 2007 bis 2017 von insgesamt 80 Patienten. Jeder Patient trug zwischen einem und 13 Präparate bei.

69 Präparate stammten von weiblichen FA-Betroffenen und 91 von männlichen. Das Alter zum Zeitpunkt der Bürstenentnahme betrug 9-46 Jahre (siehe Tabelle 12) [1]. Der Anteil von FA-Betroffenen mit durchgemachter Knochenmarkstransplantation mit negativem Follow-up Referenzstandard betrug 68,6% (83 von 121), mit positivem Follow-up 61,5% (24 von 39) und ist damit ähnlich.

	Negatives Follow-up	Positives Follow-up
Gesamtzahl	121	39
Geschlecht (weiblich/männlich)	56/65	13/26
Medianes Alter in Jahren	26 (10-46)	30 (9-40)
Mediane Nachbeobachtung in Monaten	45 (9-86)	31 (0-101)
Knochenmarkstransplantation (ja/nein)	83/38	24/15

Tabelle 12: Patientenangaben

3.2 Berechnungen der diagnostischen Treffsicherheit für die Zytologie

Von den 160 Mundschleimhautläsionen sind 82 zytologisch negativ und 78 zytologisch zweifelhaft (n=60), dringend verdächtig (n=10) oder positiv (n=8). Insgesamt haben 121 Läsionen ein negatives Follow-up, davon sind 81 zytologisch negativ, 38 zweifelhaft, 2 dringend verdächtig. 39 Läsionen haben ein positives Follow-up, davon ist eine zytologisch negativ, 22 zweifelhaft, 8 dringend verdächtig und 8 positiv (siehe Abb. 6) [1].

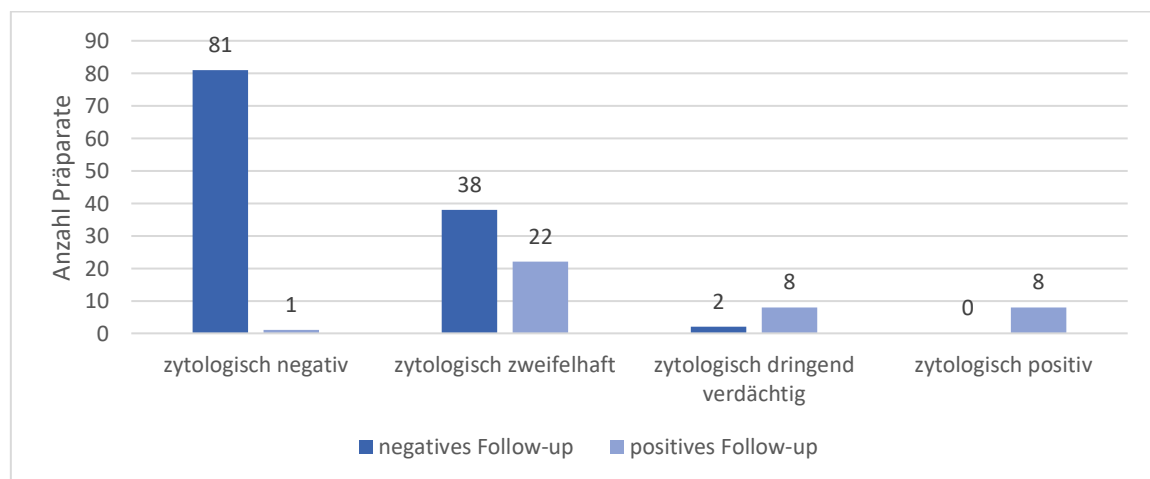


Abb. 6: Vergleich zytologischer Diagnosen mit Follow-up Daten

Zur Berechnung der diagnostischen Treffsicherheit für die Zytologie wurde eine Vierfeldertafel erstellt (siehe Tabelle 13). Die zweifelhaften und dringend verdächtigen zytologischen Präparate wurden dabei zur Maximierung der Sensitivität der positiven Diagnosegruppe zugeordnet, da möglichst keine klinisch bedeutsame Läsion verpasst werden sollte.

Zytologie	Negatives Follow-up	Positives Follow-up	Gesamt
Negativ	81	1	82
Positiv (zweifelhaft/ dringend verdächtig/ positiv)	40	38	78
Gesamt	121	39	160

Tabelle 13: Vierfeldertafel zur Berechnung der diagnostischen Treffsicherheit für die Zytologie

Aus der Vierfeldertafel ergibt sich für die Zytologie eine Sensitivität von 97,4% (38/39) und eine Spezifität von 66,9% (81/121). Der PPV beträgt 48,7% (38/78) und der NPV 98,8% (81/82).

3.3 Mehrfarben-FISH

Die folgenden Auswertungen wurden jeweils durchgeführt für alle mittels FISH untersuchten Mundschleimhautläsionen, um auch die FISH-Ergebnisse nach negativer Zytologie beurteilen zu können, sowie nur für zytologisch auffällige, das heißt zweifelhafte, dringend tumorverdächtige oder positive Läsionen. Letztere Auswertung wurde durchgeführt, da für eine klinische Anwendbarkeit der FISH als Abklärungstest sicher nicht alle zytologisch unklaren Läsionen untersucht werden können.

3.3.1 Anzahl aneuploider Zellen

Mithilfe der Aneuploidie-Definitionen (D1-D4) wurde die Anzahl aneuploider Zellen für jedes Präparat ermittelt. Die Boxplots stellen die Anzahl der aneuploiden Zellen jeweils bei positivem und negativem Follow-up grafisch dar (Abb. 7). Die meisten abgestrichenen Mundschleimhautläsionen mit positivem Follow-up weisen erwartungsgemäß eine höhere Anzahl aneuploider Zellen auf als die mit negativem Follow-up. Mit D1 werden die meisten Zellen als aneuploid eingestuft und mit D2 die wenigsten. Auch die negative Follow-up-Gruppe weist in allen Definitionen aneuploide Zellen auf, deren Zahl bei einigen Mundschleimhautläsionen durchaus erheblich ist. Auffällig ist die starke Streuung mit einigen im Follow-up negativen Präparaten, die viele aneuploide Zellen enthalten.

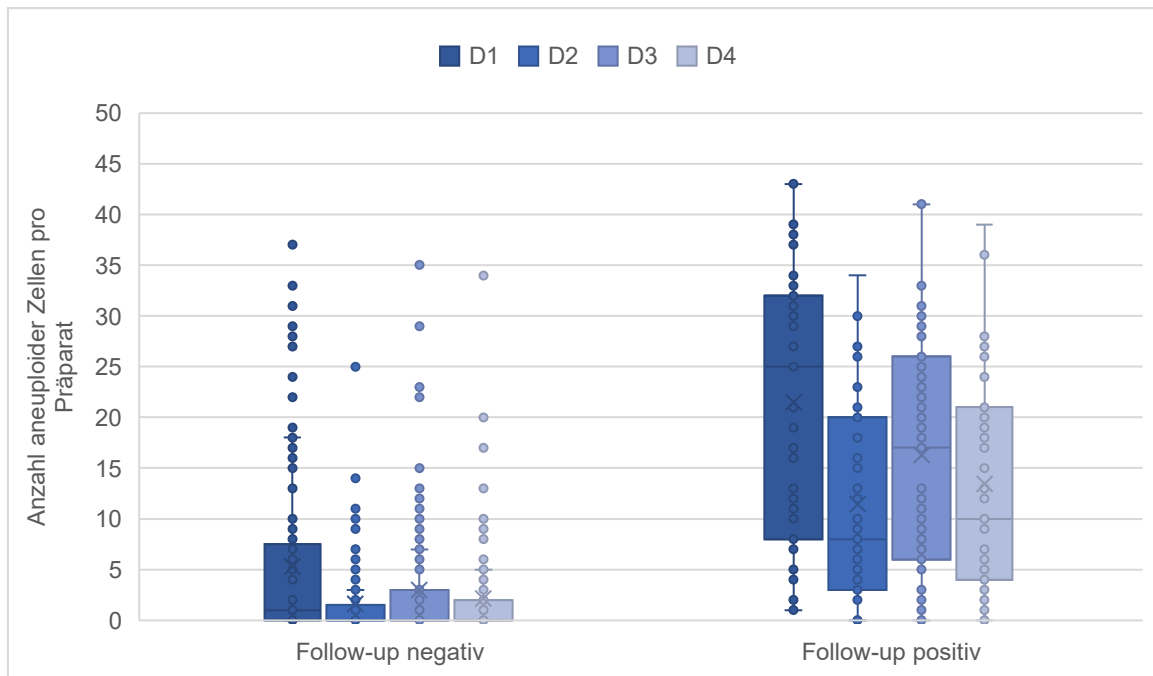


Abb. 7: Boxplot zur Darstellung der Anzahl aneuploider Zellen pro Präparat für jede Aneuploidiedefinition (D1-D4) (alle Präparate)

Dieselbe Auswertung wurde auch nur für die zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparate erstellt (Abb. 8).

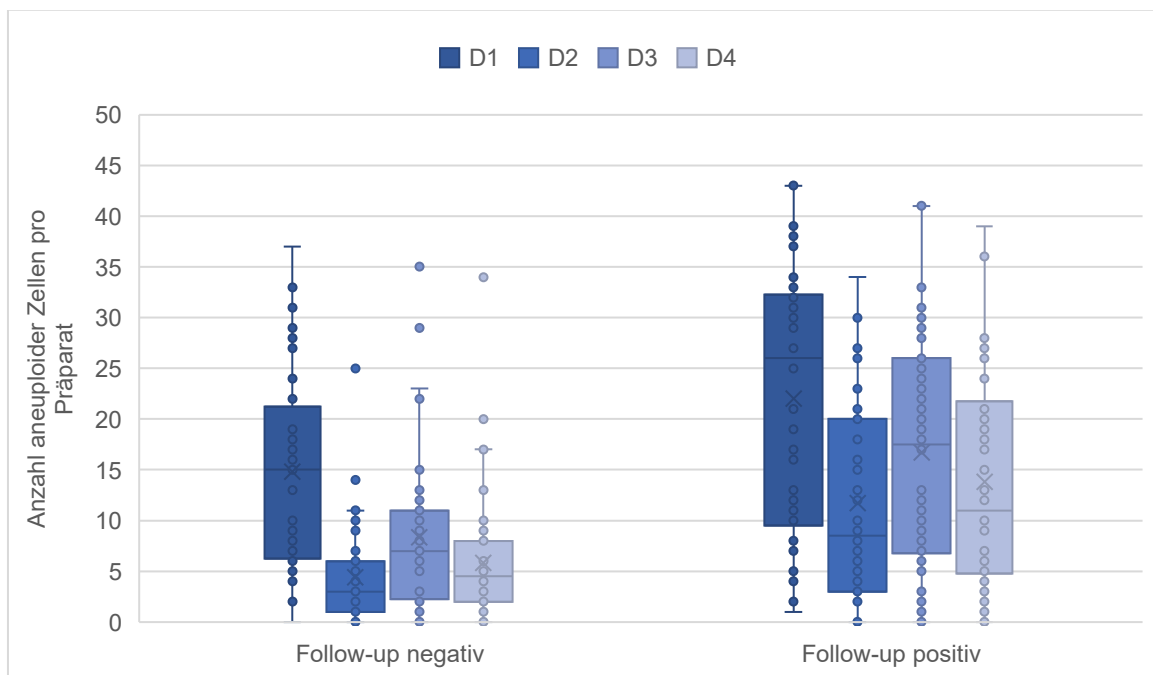


Abb. 8: Boxplot zur Darstellung der Anzahl aneuploider Zellen pro Präparat für jede Aneuploidiedefinition (D1-D4) (nur zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate)

Ohne die zytologisch negativen Präparate verlagert sich die negative Follow-up-Gruppe weiter in Richtung einer höheren Anzahl aneuploider Zellen, bleibt jedoch weiterhin vornehmlich unterhalb der positiven Follow-up-Gruppe.

Die Darstellung der positiven Follow-up-Gruppe bleibt erwartungsgemäß nahezu unverändert, da es im Studienkollektiv nur eine zytologisch negative Mundschleimhautläsion mit positivem Follow-up gibt.

3.3.2 Ermittlung des Cutoff-Wertes und diagnostische Treffsicherheiten

Zur Ermittlung des Cutoff-Wertes für eine positive FISH-Diagnose (chromosomale Aneuploidie) wurde der Wert mit dem höchsten Youdenindex (Sensitivität+Spezifität-1) für die vier Aneuploidie-Definitionen berechnet. Der höchste Youdenindex gibt die beste diagnostische Treffsicherheit an. Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität, die für die Berechnung des Youdenindex notwendig sind, wurden ROC-Kurven erstellt (Abb. 9 und Abb. 10). Aus den Koordinaten der x-Achse (1-Spezifität) und der y-Achse (Sensitivität) wurde der Youdenindex errechnet.

Die Berechnung erfolgte wieder sowohl für alle Präparate des Studienkollektivs (Tabelle 14) als auch nur für die zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparate (Tabelle 15).

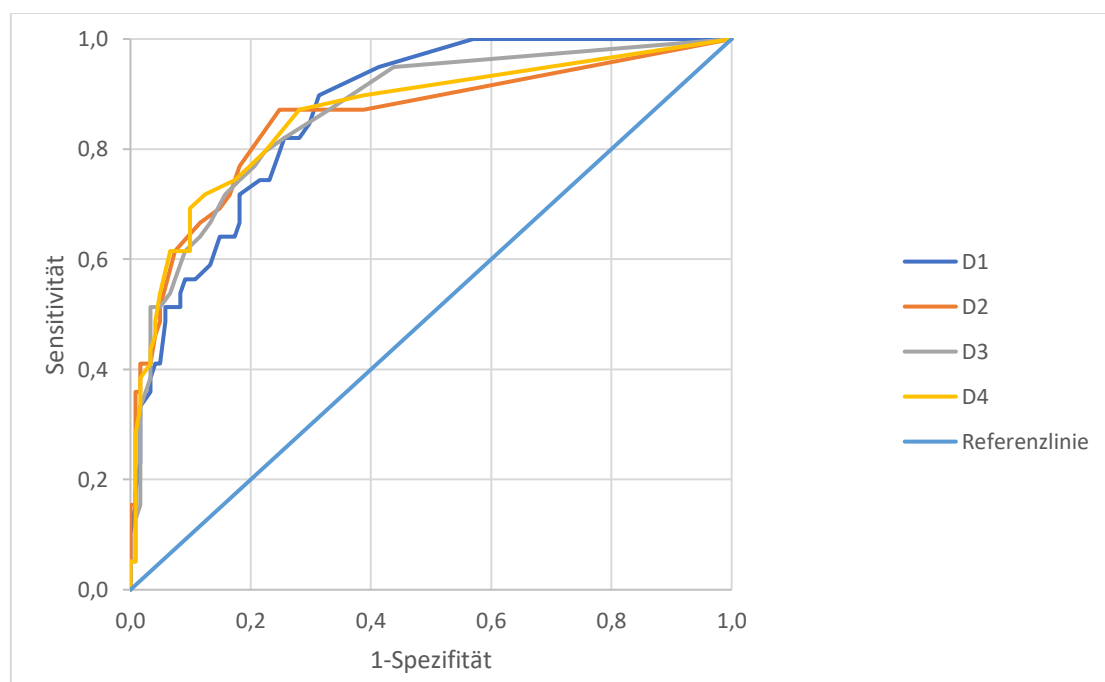


Abb. 9: ROC-Kurve für die Mehrfarben-FISH (alle Präparate)

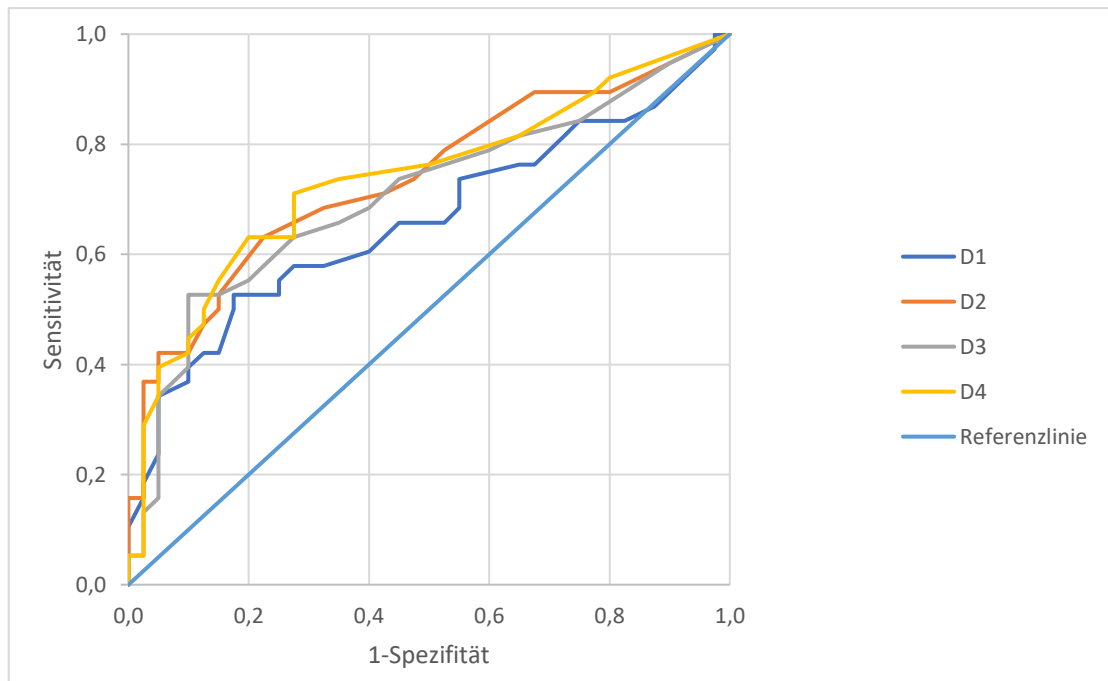


Abb. 10: ROC-Kurve für die Mehrfarben-FISH (nur zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate)

	Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.		Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.
D1	1	1,000	0,430	0,430	D3	1	0,949	0,562	0,511
	2	0,949	0,587	0,535		2	0,872	0,669	0,541
	3	0,897	0,686	0,583		3	0,821	0,744	0,564
	5	0,846	0,702	0,549		4	0,795	0,777	0,572
	6	0,821	0,719	0,540		6	0,769	0,793	0,563
	7	0,821	0,744	0,564		7	0,744	0,818	0,562
	8	0,795	0,752	0,547		8	0,718	0,843	0,561
	9	0,744	0,769	0,512		9	0,667	0,868	0,534
	10	0,744	0,785	0,529		10	0,641	0,884	0,525
	11	0,718	0,818	0,536		11	0,615	0,909	0,524
	12	0,692	0,818	0,510		12	0,564	0,926	0,490
	13	0,667	0,818	0,485		13	0,538	0,934	0,472
	14	0,641	0,826	0,467		14	0,513	0,950	0,463
	16	0,641	0,851	0,492		16	0,513	0,967	0,480
	17	0,590	0,868	0,458		18	0,487	0,967	0,454
	18	0,564	0,893	0,457		19	0,462	0,967	0,428
	19	0,564	0,909	0,473		20	0,436	0,967	0,403
	20	0,538	0,917	0,456		21	0,410	0,967	0,377
	22	0,513	0,917	0,430		22	0,385	0,967	0,352
	23	0,513	0,934	0,447		23	0,359	0,975	0,334

Tabelle 14 (Anfang): Errechnung des Youdenindex mithilfe der Koordinaten der ROC Kurve (alle Präparate). Y=höchster Youdenindex

	Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.		Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.
	25	0,513	0,942	0,455		24	0,333	0,983	0,317
	26	0,487	0,942	0,429		25	0,282	0,983	0,266
	28	0,410	0,950	0,361		26	0,256	0,983	0,240
	29	0,410	0,959	0,369		27	0,205	0,983	0,189
	30	0,385	0,967	0,352		29	0,154	0,983	0,137
	31	0,359	0,967	0,326		30	0,128	0,992	0,120
	32	0,333	0,983	0,317		31	0,103	0,992	0,094
	33	0,231	0,983	0,214		32	0,077	0,992	0,069
	34	0,179	0,992	0,171		34	0,051	0,992	0,043
	36	0,154	0,992	0,146		38	0,051	1,000	0,051
	38	0,103	1,000	0,103		42	0,000	1,000	0,000
	39	0,077	1,000	0,077					
	41	0,051	1,000	0,051					
	44	0,000	1,000	0,000					
D2	1	0,872	0,612	0,483	D4	1	0,897	0,612	0,509
	2	0,872	0,752	0,624	Y	2	0,872	0,719	0,591
	3	0,769	0,818	0,587		3	0,795	0,777	0,572
	4	0,718	0,835	0,553		4	0,769	0,802	0,571
	5	0,692	0,851	0,544		5	0,744	0,826	0,570
	6	0,667	0,884	0,551		6	0,718	0,876	0,594
	7	0,615	0,926	0,541		7	0,692	0,901	0,593
	8	0,513	0,950	0,463		8	0,615	0,901	0,516
	9	0,487	0,950	0,438		9	0,615	0,934	0,549
	10	0,462	0,959	0,420		10	0,538	0,950	0,489
	11	0,410	0,967	0,377		11	0,487	0,959	0,446
	12	0,410	0,983	0,394		13	0,462	0,959	0,420
	13	0,385	0,983	0,368		14	0,436	0,967	0,403
	14	0,359	0,983	0,342		16	0,410	0,967	0,377
	15	0,359	0,992	0,351		18	0,385	0,983	0,368
	16	0,333	0,992	0,325		19	0,359	0,983	0,342
	17	0,308	0,992	0,299		20	0,333	0,983	0,317
	19	0,256	0,992	0,248		21	0,282	0,992	0,274
	21	0,205	0,992	0,197		23	0,231	0,992	0,223
	22	0,179	0,992	0,171		25	0,179	0,992	0,171
	24	0,154	0,992	0,146		27	0,103	0,992	0,094
	26	0,154	1,000	0,154		28	0,077	0,992	0,069
	27	0,103	1,000	0,103		31	0,051	0,992	0,043
	29	0,051	1,000	0,051		35	0,051	1,000	0,051
	32	0,026	1,000	0,026		38	0,026	1,000	0,026
	35	0,000	1,000	0,000		40	0,000	1,000	0,000

Tabelle 14 (Fortsetzung): Errechnung des Youdenindex mithilfe der Koordinaten der ROC Kurve (alle Präparate). Y=höchster Youdenindex

Für alle Präparate liegt der höchste Youdenindex (0,624) bei einem Cutoff-Wert von 2 mit der Aneuploidiedefinition D2. Die Sensitivität beträgt 87,2% und die Spezifität 75,2%. Der zweithöchste Youdenindex (0,594) liegt bei einem Cutoff-Wert von 6 mit der Aneuploidie- definition D4. Hier beträgt die Sensitivität 71,8% und die Spezifität 87,6%.

	Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.		Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.	
D1	1	1,000	0,025	0,025	D3	1	0,947	0,100	0,047	
	2	0,974	0,025	-0,001		2	0,895	0,175	0,070	
	3	0,921	0,075	-0,004		3	0,842	0,250	0,092	
	5	0,868	0,125	-0,007		4	0,816	0,350	0,166	
	6	0,842	0,175	0,017		6	0,789	0,400	0,189	
	7	0,842	0,250	0,092		7	0,763	0,475	0,238	
	8	0,816	0,275	0,091		8	0,737	0,550	0,287	
	9	0,763	0,325	0,088		9	0,684	0,600	0,284	
	10	0,763	0,350	0,113		10	0,658	0,650	0,308	
	11	0,737	0,450	0,187		11	0,632	0,725	0,357	
	12	0,711	0,450	0,161		12	0,579	0,775	0,354	
	13	0,684	0,450	0,134		13	0,553	0,800	0,353	
	14	0,658	0,475	0,133		14	0,526	0,850	0,376	
	16	0,658	0,550	0,208		16	0,526	0,900	0,426	Y
	17	0,605	0,600	0,205		18	0,500	0,900	0,400	
	18	0,579	0,675	0,254		19	0,474	0,900	0,374	
	19	0,579	0,725	0,304		20	0,447	0,900	0,347	
	20	0,553	0,750	0,303		21	0,421	0,900	0,321	
	22	0,526	0,750	0,276		22	0,395	0,900	0,295	
	23	0,526	0,800	0,326		23	0,368	0,925	0,293	
	25	0,526	0,825	0,351	Y	24	0,342	0,950	0,292	
	26	0,500	0,825	0,325		25	0,289	0,950	0,239	
	28	0,421	0,850	0,271		26	0,263	0,950	0,213	
	29	0,421	0,875	0,296		27	0,211	0,950	0,161	
	30	0,395	0,900	0,295		29	0,158	0,950	0,108	
	31	0,368	0,900	0,268		30	0,132	0,975	0,107	
	32	0,342	0,950	0,292		31	0,105	0,975	0,080	
	33	0,237	0,950	0,187		32	0,079	0,975	0,054	
	34	0,184	0,975	0,159		34	0,053	0,975	0,028	
	36	0,158	0,975	0,133		38	0,053	1,000	0,053	
	38	0,105	1,000	0,105		42	0,000	1,000	0,000	
	39	0,079	1,000	0,079						

Tabelle 15 (Anfang): Errechnung des Youdenindex mithilfe der Koordinaten der ROC Kurve (nur zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate). Y=höchster Youdenindex

	Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.		Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.	
	41	0,053	1,000	0,053						
	44	0,000	1,000	0,000						
D2	1	0,895	0,200	0,095	D4	1	0,921	0,200	0,121	
	2	0,895	0,325	0,220		2	0,895	0,225	0,120	
	3	0,789	0,475	0,264		3	0,816	0,350	0,166	
	4	0,737	0,525	0,262		4	0,789	0,425	0,214	
	5	0,711	0,575	0,286		5	0,763	0,500	0,263	
	6	0,684	0,675	0,359		6	0,737	0,650	0,387	
	7	0,632	0,775	0,407	Y	7	0,711	0,725	0,436	Y
	8	0,526	0,850	0,376		8	0,632	0,725	0,357	
	9	0,500	0,850	0,350		9	0,632	0,800	0,432	
	10	0,474	0,875	0,349		10	0,553	0,850	0,403	
	11	0,421	0,900	0,321		11	0,500	0,875	0,375	
	12	0,421	0,950	0,371		13	0,474	0,875	0,349	
	13	0,395	0,950	0,345		14	0,447	0,900	0,347	
	14	0,368	0,950	0,318		16	0,421	0,900	0,321	
	15	0,368	0,975	0,343		18	0,395	0,950	0,345	
	16	0,342	0,975	0,317		19	0,368	0,950	0,318	
	17	0,316	0,975	0,291		20	0,342	0,950	0,292	
	19	0,263	0,975	0,238		21	0,289	0,975	0,264	
	21	0,211	0,975	0,186		23	0,237	0,975	0,212	
	22	0,184	0,975	0,159		25	0,184	0,975	0,159	
	24	0,158	0,975	0,133		27	0,105	0,975	0,080	
	26	0,158	1,000	0,158		28	0,079	0,975	0,054	
	27	0,105	1,000	0,105		31	0,053	0,975	0,028	
	29	0,053	1,000	0,053		35	0,053	1,000	0,053	
	32	0,026	1,000	0,026		38	0,026	1,000	0,026	
	35	0,000	1,000	0,000		40	0,000	1,000	0,000	

Tabelle 15 (Fortsetzung): Errechnung des Youdenindex mithilfe der Koordinaten der ROC Kurve (nur zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate). Y=höchster Youdenindex

Bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten liegt der höchste Youdenindex (0,436) bei einem Cutoff-Wert von 7 mit der Aneuploidiedefinition D4. Die Sensitivität beträgt 71,1% und die Spezifität 72,5%. Auch bei der Aneuploidiedefinition D2 liegt der höchste Youdenindex (0,407) bei einem Cutoff-Wert von 7 mit einer Sensitivität von 63,2% und einer Spezifität von 77,5%. Für die Aneuploidie-Definitionen D1 und D3 wäre der Cutoff-Wert von 25 bzw. 16 chromosomal aneuploiden Zellen sehr hoch.

Ein Cutoff-Wert von 7 mit Anwendung der Aneuploidie-Definitionen D2 und D4 ist für eine diagnostische Anwendung bei auffälliger Zytologie am besten geeignet. Für das Gesamt-

kollektiv ergibt sich für die Aneuploidiedefinition D2 hier ein Youdenindex von 0,541, der damit deutlich niedriger ist als der für diese Definition optimale Youdenindex von 0,624. Für das Gesamtkollektiv ergibt sich für die Aneuploidiedefinition D4 mit Cutoff 7 ein Youdenindex von 0,593. Dieser ist nur geringfügig niedriger als der optimale Youdenindex bei einem Cutoff von 6 aneuploiden Zellen (0,594).

Als Optimum aus allen oben genannten Auswertungen ergibt sich somit für eine positive FISH-Diagnose die Anwendung der Aneuploidie-Definition D4 mit einem Cutoff von 7 aneuploiden Zellen.

Einen Vergleich anhand von Kreuztabellen der diagnostischen Treffsicherheit und Korrelation mit den Fallzahlen für die Aneuploidiedefinitionen D1-D4 bei einem Cutoff-Wert von 7 zeigen Tabelle 16 und Tabelle 17. Anhand der ROC-Kurven wurden die AUC-Werte mit 5% Konfidenzintervallen angegeben. Das Signifikanzniveau beträgt 0,05.

D	Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.	AUC	AUC p-Wert	AUC 5% Konfidenzint.
D1	7	0,821 (32/39)	0,744 (90/121)	0,564	0,782	<0,001	0,699-0,866
D2	7	0,615 (24/39)	0,926 (112/121)	0,541	0,771	<0,001	0,673-0,868
D3	7	0,744 (29/39)	0,818 (99/121)	0,562	0,781	<0,001	0,692-0,870
D4	7	0,692 (27/39)	0,901 (109/121)	0,593	0,797	<0,001	0,705-0,889

Tabelle 16: Diagnostische Treffsicherheiten und Fallzahlen (in Klammern) bei einem Cutoff-Wert von 7 für D1-D4 (alle Präparate), Signifikanzniveau $\alpha=0,05$, D=Aneuploidiedefinition, AUC=Fläche unter der ROC-Kurve, Konfidenzint.=Konfidenzintervall

D	Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.	AUC	AUC p-Wert	AUC 5% Konfidenzint.
D1	7	0,842 (32/38)	0,250 (10/40)	0,092	0,546	0,484*	0,418-0,674
D2	7	0,632 (24/38)	0,775 (31/40)	0,407	0,703	0,002	0,585-0,821
D3	7	0,763 (29/38)	0,475 (19/40)	0,238	0,619	0,070*	0,494-0,744
D4	7	0,711 (27/38)	0,725 (29/40)	0,436	0,718	0,001	0,602-0,834

Tabelle 17: Diagnostische Treffsicherheiten und Fallzahlen (in Klammern) bei einem Cutoff-Wert von 7 für D1-D4 (nur zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate), *nicht signifikant bei Signifikanzniveau $\alpha=0,05$

Der Youdenindex und der AUC-Wert sind bei einem Cutoff-Wert von 7 bei der Aneuploidiedefinition 4 am höchsten. D4 ist daher nach obigen Auswertungen am besten für die Detektion aneuploider Zellen geeignet. Bei allen Präparaten beträgt die Sensitivität bei D4 69,2% und die Spezifität 90,1%. Bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten 71,1% bzw. 72,5%. Insgesamt betragen die Werte für die Sensitivität bei Auswertung aller Präparate je nach Definition 61,5% bis 82,1% und bei Auswertung der zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparate 63,2% bis 84,2%. Die höchste Sensitivität zeigt sich in beiden Gruppen bei D1, jedoch auch jeweils mit der niedrigsten Spezifität. Insgesamt betragen die Werte für die Spezifität bei allen Präparaten je nach Definition 74,4% bis 92,6% und bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten 25% bis 77,5%. Die Werte der Spezifität sind bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten erwartungsgemäß niedriger, da die zytologisch negativen Mundschleimhautläsionen fehlen, welche meist ein negatives Follow-up haben.

3.3.3 Vergleich der Treffsicherheiten der eigenen Auswertungen mit den publizierten [1] Treffsicherheiten der Studie bei Cutoff 6

Die Berechnungen der Treffsicherheiten der eigenen Auswertungen wurden zu Vergleichszwecken mit dem in der Publikation der Arbeitsgruppe anhand von Auswertungen eines unabhängigen Untersuchers ermittelten Cutoff-Wert von 6 durchgeführt (Tabelle 18 und Tabelle 19).

D	Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.	AUC	AUC p-Wert	AUC 5% Konfidenzint.
D1	6	0,821 (32/39)	0,719 (87/121)	0,540	0,770	<0,001	0,685-0,854
		<i>0,897 (35/39)</i>	<i>0,727 (88/121)</i>	<i>0,625</i>	<i>0,812</i>	<i><0,001</i>	<i>0,738-0,886</i>
D2	6	0,667 (26/39)	0,884 (107/121)	0,551	0,775	<0,001	0,681-0,870
		<i>0,795 (31/39)</i>	<i>0,860 (104/121)</i>	<i>0,654</i>	<i>0,827</i>	<i><0,001</i>	<i>0,745-0,909</i>
D3	6	0,769 (30/39)	0,793 (96/121)	0,563	0,781	<0,001	0,694-0,869
		<i>0,872 (34/39)</i>	<i>0,818 (99/121)</i>	<i>0,690</i>	<i>0,845</i>	<i><0,001</i>	<i>0,772-0,918</i>
D4	6	0,718 (28/39)	0,876 (106/121)	0,594	0,797	<0,001	0,707-0,887
		<i>0,872 (34/39)</i>	<i>0,835 (101/121)</i>	<i>0,707</i>	<i>0,853</i>	<i><0,001</i>	<i>0,781-0,925</i>

Tabelle 18: Diagnostische Treffsicherheiten bei einem Cutoff-Wert von 6 für D1-D4 (alle Präparate), kursiv=Daten aus der Publikation[1] zum Vergleich, Signifikanzniveau $\alpha=0,05$

D	Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.	AUC	AUC p-Wert	AUC 5% Konfidenzint.
D1	6	0,842	0,175	0,017	0,509	0,897*	0,380-0,637
		(32/38)	(7/40)				
		<i>0,921</i>	<i>0,225</i>	<i>0,146</i>	<i>0,573</i>	<i>0,267*</i>	<i>0,446-0,700</i>
D2	6	0,684	0,675	0,359	0,680	0,006	0,559-0,800
		(26/38)	(27/40)				
		<i>0,816</i>	<i>0,600</i>	<i>0,416</i>	<i>0,708</i>	<i>0,002</i>	<i>0,591-0,825</i>
D3	6	0,789	0,400	0,189	0,595	0,150*	0,468-0,721
		(30/38)	(16/40)				
		<i>0,895</i>	<i>0,475</i>	<i>0,370</i>	<i>0,685</i>	<i>0,005</i>	<i>0,566-0,804</i>
D4	6	0,737	0,650	0,387	0,693	0,003	0,575-0,812
		(28/38)	(26/40)				
		<i>0,895</i>	<i>0,525</i>	<i>0,420</i>	<i>0,710</i>	<i>0,001</i>	<i>0,593-0,826</i>
		(34/38)	(21/40)				

Tabelle 19: Diagnostische Treffsicherheiten bei einem Cutoff-Wert von 6 für D1-D4 (nur zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate), kursiv= Daten aus der Publikation[1] zum Vergleich, *nicht signifikant bei Signifikanzniveau $\alpha=0,05$

Bei einem Cutoff-Wert von 6 ergeben sich bei den eigenen Daten erwartungsgemäß für jede Aneuploidiedefinition gleiche oder höhere Werte für die Sensitivität und niedrigere Werte für die Spezifität als bei einem Cutoff-Wert von 7. D4 hat damit bei Auswertung aller Präparate eine Sensitivität von 71,8% und eine Spezifität von 87,6%. Bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten beträgt die Sensitivität von D4 73,7% und Spezifität 65,0%. In den publizierten Daten eines unabhängigen Untersuchers [1] für D4 ergaben sich höhere Werte für die Sensitivität (87,2% und 89,5%) als in der eigenen Auswertung, jedoch auch niedrigere Werte für die Spezifität (83,5% und 52,5%).

3.3.4 Übereinstimmung der eigenen Auswertungen mit den publizierten Daten eines unabhängigen Untersuchers [1] bei Cutoff 7

Die Übereinstimmung zwischen den eigenen Auswertungen und denen eines unabhängigen Untersuchers wurde für die verschiedenen Definitionen (D1-D4) bei einem Cutoff-Wert von 7 für sämtliche Präparate und nur für die zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparate berechnet (Tabelle 20 und Tabelle 21).

Aneuploidiedefinition	Kappa-Wert
D1	0,856
D2	0,717
D3	0,803
D4	0,711

Tabelle 20: Untersucherunterschiede aus doppelter Auswertung der FISH-Präparate: Kappa-Werte für D1-D4 ($p < 0,001$) bei einem Cutoff-Wert von 7 (alle Präparate)

Aneuploidiedefinition	Kappa-Wert
D1	0,557
D2	0,599
D3	0,597
D4	0,517

Tabelle 21: Untersucherunterschiede aus doppelter Auswertung der FISH-Präparate: Kappa-Werte für D1-D4 ($p < 0,001$) bei einem Cutoff-Wert von 7 (zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate)

Dabei ergeben sich Kappa-Werte von 0,856 (D1 alle Präparate) bis 0,517 (D4 nur zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate). Der Grad der Übereinstimmung ist damit moderat bis fast perfekt. Es gibt höhere Übereinstimmungen bei den Auswertungen aller Präparaten als bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten.

3.3.5 Falsch-positive und falsch-negative FISH-Befunde

Unabhängig von der angewendeten Aneuploidie-Definition wurden in der eigenen Auswertung einige Präparate falsch-positiv oder falsch-negativ eingestuft. Zur besseren Einordnung wurden die FISH-Diagnosen daher mit den zytologischen Diagnosen bei einem Cutoff-Wert von 7 und der Aneuploidiedefinition D4 verglichen (Tabelle 22).

FISH	zytologisch negativ	zytologisch zweifelhaft	zytologisch dringend verdächtig	zytologisch positiv
FN	1	11	0	0
TN	80	27	2	0
FP	1	11	0	0
TP	0	11	8	8

Tabelle 22: Vergleich der FISH-Diagnosen und zytologischen Diagnosen bei einem Cutoff Wert von 7 und Aneuploidiedefinition D4, FN=falsch-negativ, TN=richtig-negativ, FP=falsch-positiv, TP=richtig positiv

Die falschen FISH-Befunde treten dabei überwiegend auf, wenn die zytologische Diagnose zweifelhaft ist. Der Anteil bei den falsch-negativen FISH-Befunden aus dieser Gruppe beträgt 91,7% (11/12) und bei den falsch-positiven ebenfalls. Insgesamt stimmen 15,0% (24/160) der FISH-Diagnosen nicht mit dem Follow-up der Mundschleimhautläsionen

überein und 85,0% (136/160) sind richtig. Die falschen FISH-Befunde können die Anwendung in der klinischen Diagnostik einschränken. Vor allem die falsch-negativen Befunde hätten zur Folge, dass keine weitere bioptische Abklärung stattfindet und die Läsion übersehen wird und weiter fortschreiten kann.

3.4 9p21-FISH

Als Ergebnis der Pilotstudie [88] erschien die Etablierung einer 9p21-FISH sinnvoll. Daher wurden die Sonden der Mehrfarben-FISH von den Präparaten abgelöst und diese mit Sonden für 9p21 und CEP9 rehybridisiert. Es konnten Daten für 155 Präparate erhoben werden, 5 Präparate waren nach der Mehrfarben-FISH nicht mehr auswertbar.

3.4.1 Ermittlung des Cutoff-Wertes und diagnostische Treffsicherheiten

Zur Ermittlung der Cutoff-Werte für eine relative Deletion von 9p21 wurden anhand der Zahl der ermittelten Zellen mit 9p21 Deletion pro Präparat ROC-Kurven erstellt (Abb. 11 und Abb. 12). Aus den Koordinaten konnte, wie bei der Mehrfarben-FISH, der Youdenindex errechnet werden. Der optimale Cutoff-Wert wurde anhand des höchsten Youdenindex ermittelt. Es liegen nach Auswertung ausschließlich Zellen mit einer relativen Deletion vor. Überraschenderweise weist keine Zelle eine homozygote Deletion von 9p21 auf. Die Berechnung des Youdenindex aus den Koordinaten der ROC-Kurve erfolgte sowohl für alle Präparate des Studienkollektivs (Tabelle 23 links) als auch nur für die zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparate (Tabelle 23 rechts). Die ROC-Kurve für die Auswertung der relativen Deletion von 9p21 für die zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparate liegt nahe an der Referenzlinie (Abb. 12).

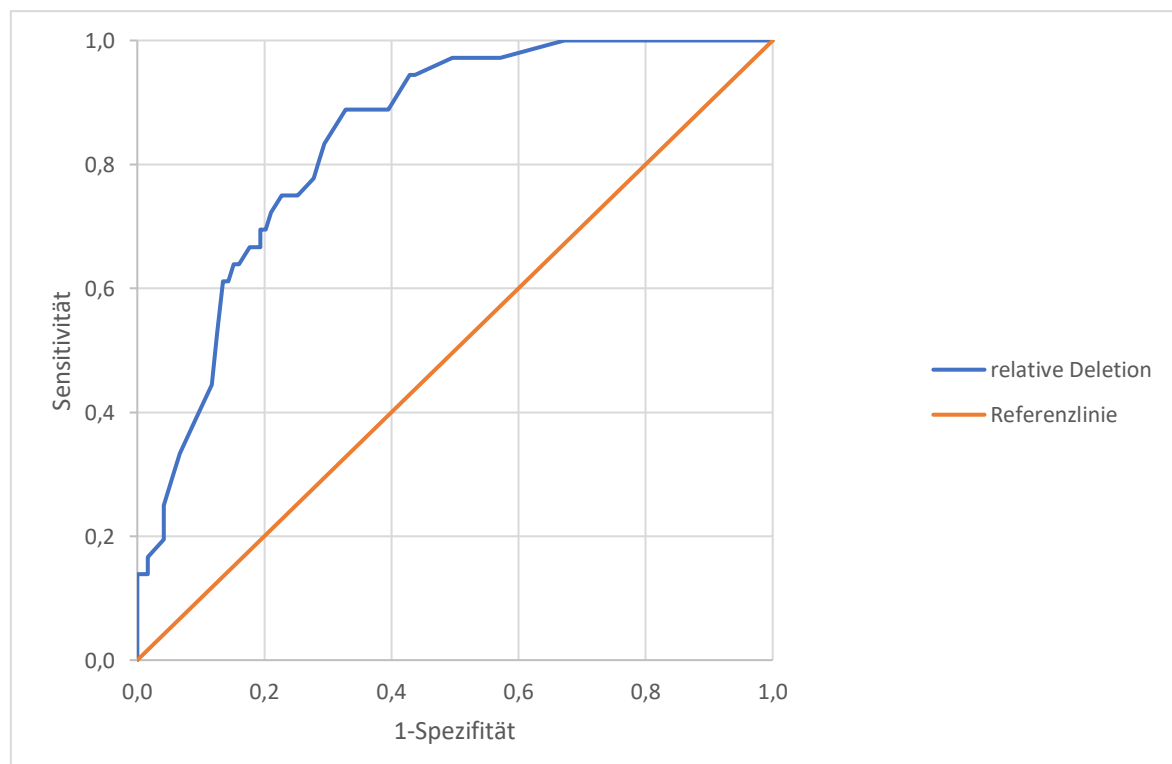


Abb. 11: ROC Kurve für die 9p21-FISH (alle Präparate)

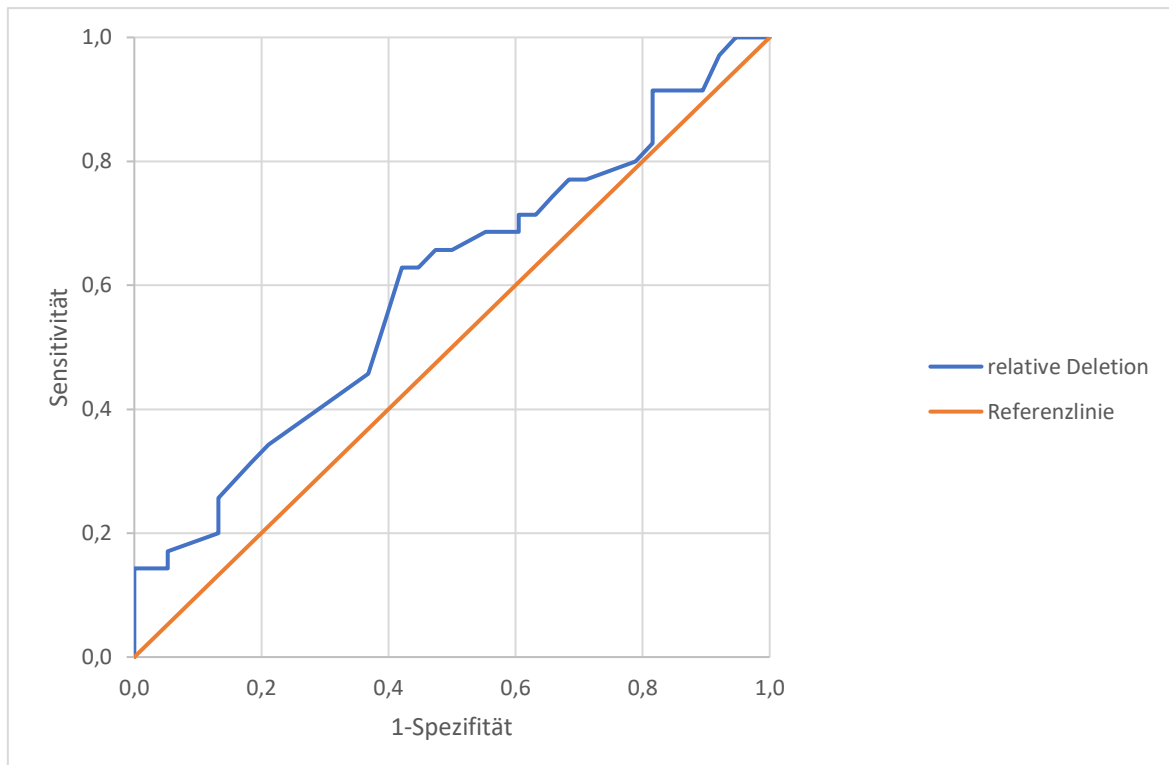


Abb. 12 ROC Kurve für die 9p21-FISH (zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate)

Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.	Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.
1	1,000	0,042	0,042	1	1	0,000	0,000
2	1,000	0,109	0,109	3	1,000	0,026	0,026
3	1,000	0,235	0,235	6	1,000	0,053	0,053
4	1,000	0,328	0,328	7	0,971	0,079	0,050
5	0,972	0,429	0,401	9	0,914	0,105	0,020
6	0,972	0,504	0,476	10	0,914	0,132	0,046
7	0,944	0,563	0,507	11	0,914	0,184	0,098
8	0,944	0,571	0,516	13	0,886	0,184	0,070
9	0,889	0,605	0,494	14	0,857	0,184	0,041
10	0,889	0,630	0,519	15	0,829	0,184	0,013
11	0,889	0,664	0,553	16	0,800	0,211	0,011
12	0,889	0,672	0,561	18	0,771	0,289	0,061
13	0,861	0,689	0,550	19	0,771	0,316	0,087
14	0,833	0,706	0,539	20	0,743	0,342	0,085
15	0,806	0,714	0,520	21	0,714	0,368	0,083
16	0,778	0,723	0,500	23	0,714	0,395	0,109

Tabelle 23 (Anfang): Ermittlung des Cutoff-Wertes anhand des höchsten Youdenindex für die relative Deletion von 9p21 (Berechnung für alle Präparate links, für zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate rechts)

Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.	Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.	
18	0,750	0,748	0,498	24	0,686	0,395	0,080	
19	0,750	0,773	0,523	25	0,686	0,447	0,133	
20	0,722	0,790	0,512	26	0,657	0,500	0,157	
21	0,694	0,798	0,493	27	0,657	0,526	0,183	
23	0,694	0,807	0,501	29	0,629	0,553	0,181	
24	0,667	0,807	0,473	30	0,629	0,579	0,208	Y
25	0,667	0,824	0,490	31	0,543	0,605	0,148	
26	0,639	0,840	0,479	32	0,457	0,632	0,089	
27	0,639	0,849	0,488	33	0,400	0,711	0,111	
29	0,611	0,857	0,468	34	0,343	0,789	0,132	
30	0,611	0,866	0,477	35	0,314	0,816	0,130	
31	0,528	0,874	0,402	36	0,257	0,868	0,126	
32	0,444	0,882	0,327	37	0,200	0,868	0,068	
33	0,389	0,908	0,296	38	0,171	0,947	0,119	
34	0,333	0,933	0,266	39	0,143	0,947	0,090	
35	0,306	0,941	0,247	40	0,143	0,974	0,117	
36	0,250	0,958	0,208	41	0,143	1,000	0,143	
37	0,194	0,958	0,152	43	0,086	1,000	0,086	
38	0,167	0,983	0,150	45	0,029	1,000	0,029	
39	0,139	0,983	0,122	46	0,000	1,000	0,000	
40	0,139	0,992	0,130					
41	0,139	1,000	0,139					
43	0,083	1,000	0,083					
45	0,028	1,000	0,028					
46	0,000	1,000	0,000					

Tabelle 23 (Fortsetzung): Ermittlung des Cutoff-Wertes anhand des höchsten Youdenindex für die relative Deletion von 9p21 (Berechnung für alle Präparate links, für zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate rechts)

Der höchste Youdenindex liegt für die Auswertung mit allen Präparaten bei einem Cutoff-Wert von 12 mit einer Sensitivität von 88,9% und einer Spezifität von 67,2%. Bei der Auswertung der zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparate liegt der Cutoff-Wert mit dem höchsten Youdenindex bei 30 mit einer Sensitivität von 62,9% und einer Spezifität von 57,9%. Beide Cutoff-Werte erscheinen sehr hoch für eine diagnostische Anwendung.

Einen Vergleich anhand von Kreuztabellen der diagnostischen Treffsicherheit und Korrelation mit den Fallzahlen bei einem Cutoff-Wert von 12 für alle Präparate und 30 für die zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten zeigt die Tabelle 24. Anhand der ROC-Kurven werden die AUC-Werte mit ihren 5% Konfidenzintervallen angegeben. Das Signifikanzniveau beträgt 0,05.

	Cutoff	Sens.	Spez.	Youd.	AUC	AUC p- Wert	AUC Konfidenzint.	5%
alle Präparate	12	0,889 (32/36)	0,672 (80/119)	0,561	0,841	<0,001	0,777-0,905	
zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate	30	0,629 (22/35)	0,579 (22/38)	0,208	0,597	0,154*	0,466-0,728	

Tabelle 24 Diagnostische Treffsicherheiten bei einem Cutoff-Wert von 12 für die Auswertung bei allen Präparaten und einem Cutoff-Wert von 30 für die Auswertung bei zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten, *nicht signifikant bei Signifikanzniveau $\alpha=0,05$

4 Diskussion

4.1 Überblick

Um die FISH-Untersuchung in der klinischen Anwendung zur Abklärung zytologischen unklarer Mundschleimhautläsionen bei FA-Betroffenen zu etablieren, wird in der vorliegenden retrospektiven Studie an zytologischen Präparaten unterschiedlicher Diagnosekategorien und bekanntem klinisch-histologischem Follow-up ein Cutoff-Wert bestimmt. Dies ist die Anzahl chromosomal-aneuploider Zellen, ab der ein Mundschleimhautabstrich als positiv gilt in Abgrenzung zu FISH-negativen Befunden. Die Diagnose soll den mikroskopischen zytologischen Befund ergänzen und hat für die FA-Betroffenen aufgrund des erhöhten Risikos für Mundschleimhautkrebs und bestehender limitierter Therapiemöglichkeiten weitreichende Konsequenzen. Ein negatives Ergebnis würde bei passendem klinischem Bild dazu führen, dass die Läsion weiter beobachtet wird [54]. Bei einem falsch negativen Ergebnis würde eine klinisch relevante Läsion übersehen und kann weiter voranschreiten. Bei einem auffälligen zytologischen Befund und möglicherweise auch zukünftig bei einem positiven FISH-Ergebnis, eine entsprechende Etablierung in die klinische Praxis vorausgesetzt, sollte in der Regel eine Inzisionsbiopsie zur histologischen Abklärung durchgeführt werden. Zu diskutieren wäre es, ob bei entsprechendem klinischem Befund und zytologischer Diagnose direkt eine therapeutische Intervention angeschlossen werden könnte, beispielsweise in Form einer Exzisionsbiopsie. Bei einem falsch positiven FISH-Ergebnis würde sich der FA-Betroffene einer invasiven diagnostischen Maßnahme oder gar Therapie unterziehen, die nicht notwendig gewesen wäre. Mithilfe der Bürstenbiopsie sollen gerade invasive diagnostische Eingriffe vermieden werden. Der große Vorteil der FISH-Untersuchung besteht darin, dass kein zusätzliches Untersuchungsmaterial am FA-Betroffenen gewonnen werden muss und die Untersuchung am selben Material wie die zytologische Untersuchung erfolgt. In Ergänzung zur mikroskopisch-zytologischen Untersuchung erfolgt derzeit im Funktionsbereich Cytopathologie bei unklaren Befunden eine ergänzende DNA-Bildzytometrie zur Ploidie-Diagnostik. Diese ist aufgrund einer hohen Anzahl notwendiger Zellen nicht immer technisch möglich [23]. Die FISH-Untersuchung benötigt in der Regel weniger Zellen für eine Diagnose. Sie wird aber bisher nicht in der klinischen Anwendung bei Mundschleimhautläsionen eingesetzt. In anderen Organsystemen ist sie hingegen am zytologischen Untersuchungsmaterial bereits etabliert [75, 76]. In der Klinik übliche Cutoffwerte sind meist 4 bis 6 chromosomal aneuploide Zellen bei einer Untersuchung von zunächst wenigen nach zytomorphologischen Kriterien auffälligen Zellen, beispielsweise 25.

Die Auswahl geeigneter FISH-Sonden für die Mundschleimhautdiagnostik bei FA-Betroffenen erfolgte bereits in der vorangegangenen Proof-of-concept Studie [88]. Mit der Mehrfarben-FISH soll eine chromosomale Aneuploidie nachgewiesen werden und mit der 9p21-FISH eine homozygote oder relative Deletion von 9p21. Für die vorliegende Schwellenwert-Studie werden Restpräparate aus der Studie von Velleuer et al. 2020 [23] verwendet, da bei diesen Mundschleimhautläsionen bereits Follow-up-Daten vorliegen.

4.2 Verteilung des Studienkollektivs

Insgesamt gibt es von den 160 untersuchten und auswertbaren Präparaten 121 mit negativem Follow-up und 39 mit positivem Follow-up.

Bei den Präparaten mit negativem Follow-up Referenzstandard sind 46,3% (56/121) weiblich und 53,7% (65/121) männlich. Das Geschlecht ist somit fast gleich verteilt mit einer leichten Verschiebung zum männlichen Geschlecht. Bei den Präparaten mit positivem Follow-up Referenzstandard sind hingegen mit 33,3% (13/39) ein Drittel weiblich und mit 66,7% (26/39) zwei Drittel männlich. Es ist damit eine Verschiebung hin zum männlichen Geschlecht erkennbar.

In der Studie von Velleuer et al. 2020 [23], aus der die verwendeten Präparate stammen, wurden weltweit die meisten Mundschleimhautabstriche von FA-Betroffenen untersucht. Die Geschlechterverteilung kann daher als Referenz bei dieser Erkrankung verwendet werden. Die Präparate mit negativem Follow-up Referenzstandard sind ebenfalls fast gleich verteilt mit einer leichten Verschiebung zum männlichen Geschlecht (51%). Bei den Präparaten mit positivem Follow-up Referenzstandard gibt es mit 72,1% ebenfalls eine Verschiebung hin zum männlichen Geschlecht. Die Geschlechterverteilung der eigenen Studie ist damit im Vergleich mit Velleuer et al. 2020 [23] repräsentativ für die FA-Betroffenen.

Zu diskutieren ist daher das männliche Geschlecht als Risikofaktor für Mundschleimhautkrebs oder eine high-grade orale epitheliale Dysplasie bei FA-Betroffenen in der Früherkennungs- oder Screening-Situation. Bislang wird es an chirurgischen Kollektiven nicht als Risikofaktor beschrieben und tritt bei beiden Geschlechtern gleich häufig auf [52, 54]. Einschränkend muss aber genannt werden, dass in dieser Studie FA-Betroffene unterschiedlich viele Präparate (1-13) beigesteuert haben und es so zu Verschiebungen in der Geschlechterverteilung kommen kann.

Bei den Präparaten mit negativem Follow-up Referenzstandard beträgt das mediane Alter zum Zeitpunkt der Bürstenentnahme 26 (10-46) und bei den Präparaten mit positivem Follow-up Referenzstandard 30 (9-40). Das mediane Alter ist mit einem Unterschied von 4 Jahren in beiden Gruppen ähnlich jung.

Das Alter selbst ist für die FA-Betroffenen ein Risikofaktor für Mundschleimhautkrebs. Das Vorkommen ist mit einem Alter von 20-50 Jahren wesentlich früher als in der Allgemeinbevölkerung mit 60-70 Jahren [54]. Das mediane Alter im Studienkollektiv liegt damit genau in diesem Bereich.

Eine Knochenmarkstransplantation haben bei den Präparaten mit negativem Follow-up Referenzstandard 68,6% (83/121) und bei den Präparaten mit positivem Follow-up Referenzstandard 61,5% (24/39) der FA-Betroffenen erhalten. In der Verteilung gibt es daher keine relevanten Unterschiede in den beiden Gruppen. In diesem Studienkollektiv gibt es daher keine Hinweise für einen Einfluss einer Knochenmarkstransplantation auf die Entwicklung von Mundschleimhautkrebs oder einer hochgradigen oralen epithelialen Dysplasie.

4.3 Ergebnisse der Zytologie im Literaturvergleich

In dieser Studie ergibt sich für die Treffsicherheit der Zytologie eine Sensitivität von 97,4% und eine Spezifität von 66,9%. Die Werte können später mit den Treffsicherheiten der FISH verglichen werden.

Im Vergleich zu einem Cochrane Review mit Darstellung der oralen Bürstenzytologie zur Detektion von Mundkrebs und OPMDs bei Betroffenen aus der Allgemeinbevölkerung mit sichtbaren oralen Läsionen von 2021 [58] mit einer Sensitivität von 90% und einer Spezifität von 94% liegt die Sensitivität etwas niedriger und die Spezifität deutlich höher als in der vorliegenden Studie.

Die niedrige Spezifität lässt sich am ehesten durch eine hohe Anzahl zweifelhafter Präparate (n=39) mit negativem Follow-up Referenzstandard erklären. Diese zweifelhaften Befunde werden in der vorliegenden Arbeit bereits als statistisch positiv gewertet, um die Sensitivität möglichst hoch zu halten und keine diagnostisch relevanten Befunde zu übersehen. Dies ist bei FA-Betroffenen aufgrund der eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten insbesondere bei fortgeschrittenen Läsionen besonders wichtig. In anderen Studien werden zytologisch zweifelhafte Befunde oft den statistisch negativen Befunden zugeordnet.

Die Präparate der vorliegenden Studie stammen im Wesentlichen dem Kollektiv, welches zur Beschreibung der diagnostischen Treffsicherheit der Zytologie von Velleuer et al. 2020 [23] publiziert wurde. Hier betrug die Sensitivität der Zytologie zur Detektion mindestens einer high-grade OED 97,7% und die Spezifität 84,5%. Hierbei wurden ebenfalls bereits zytologisch zweifelhafte Befunde als statistisch positiv gewertet. Der Unterschied zu den eigenen Daten wird begründet mit dem geringeren Anteil von Läsionen mit positivem Follow up bei Velleuer et al. 2020 [23], nämlich 86 von 737 verglichen mit 39 von 160 Läsionen in der eigenen Arbeit.

Bei der Darstellung von Treffsicherheiten der zytologischen Diagnostik ist generell zu beachten, dass es in den meisten zytologischen Klassifikationssystemen unklare Befundkategorien bezüglich einer malignen Transformation gibt. Es gibt nicht nur positive und negative Befundkategorien, sondern im Fall der Konsensus-Klassifikation der deutschen Gesellschaften für Pathologie und Zytologie, welche für die Mundschleimhautzytologie verwendet wird, auch zweifelhafte und dringend verdächtige Befunde, die sich in dem Risiko für Malignität unterscheiden (vgl. Kapitel 1.4.2) [63]. Diese unklaren Befunde müssen für die statistische Berechnung dichotomisiert, d.h. den „positiven“ oder „negativen“ Testergebnissen zugeordnet werden, was die klinische Bedeutung eines unklaren Befundes mit einer Unsicherheit im weiteren therapeutischen Vorgehen nicht richtig abbildet. Die Mehrfarben-FISH ergibt hingegen nur positive und negative Befunde mit der besseren Einordnung für das weitere therapeutische Vorgehen.

Allerdings entsteht in der vorliegenden Arbeit hier das Problem, dass es insbesondere bei zytologisch als „zweifelhaft“ klassifizierten Läsionen zu falsch positiven und falsch negativen FISH-Befunden kommt (siehe auch Kapitel 4.4.4). Dies könnte die

Anwendbarkeit der Mehrfarben-FISH als Reflextest nach unklarer, insbesondere zweifelhafter Zytologie einschränken.

4.4 Ergebnisse der Mehrfarben-FISH im Literaturvergleich

4.4.1 Auswahl der Algorithmen D1-D4 und euploide Polyploidisierung

Für die Einstufung eines Signalmusters als chromosomal euploid oder aneuploid werden vier Aneuploidiedefinitionen verwendet. Als auffällig gilt eine Fluoreszenzmarkierung immer dann, wenn mehr als zwei Signale gezählt werden, d.h. mehr als zwei Kopien des mit einer fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde dargestellten Genomabschnittes vorliegen. Durch die Kombination vier unterschiedlich farbiger Fluoreszenzsonden lassen sich unterschiedliche Auswertungsalgorithmen für die Signalmuster definieren (siehe Kapitel 2.6.1). Mit der ersten Definition D1 werden die meisten Zellen als aneuploid eingestuft und mit D2 die wenigsten. Bei D1 reichen bereits mehr als zwei Signale in mindestens drei Sonden aus, um eine Zelle als chromosomal aneuploid zu definieren. D2 hingegen muss als einzige Definition in allen vier FISH-Sonden Auffälligkeiten aufweisen.

Eine Tetrasomie wird in jeder Aneuploidiedefinition berücksichtigt. Sie kommt sowohl bei malignen als auch bei benignen Veränderungen vor. Bei benignen Veränderungen kann sie auftreten im Rahmen einer euploiden Polyploidisierung, welche in Wechselgeweben wie der respiratorischen Schleimhaut aber auch der oralen Schleimhaut z.B. bei Entzündungen oder reparativen Vorgängen auftritt [100]. Durch deren Ausschluss sollen falsch-positive Ergebnisse vermieden werden mit dem Risiko, dass auch chromosomal tetraploide, aber bereits maligne transformierte Zellen übersehen werden.

Die Aneuploidiedefinitionen 3 und 4 berücksichtigen eine gering erhöhte Kopienzahl des *MYC*-Onkogens ab 4 bzw. 5 als aneuploid. Dies geschieht ebenfalls mit dem Ziel, falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden und dem Risiko, maligne transformierte Zellen zu verpassen. Viele Mundschleimhautläsionen mit negativem Follow-up wiesen in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Anzahl von *MYC*-Signalen auf. In einer Studie von Segura et al. 2013 [81] wurde mittels FISH und Immunhistochemie der *MYC*-Status in Läsionen eines oralen Lichen planus von 22 Patienten ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass Läsionen des oralen Lichen planus mit Progression zu einem OSCC eine erhöhte Kopienzahl des *MYC*-Gens und c-*MYC*-Überexpressionen aufwiesen. Normale Mundschleimhaut oder Läsionen ohne Progression zeigten keine erhöhte Kopienzahl des *MYC*-Gens aber immunhistochemisch nur eine geringe *MYC*-Überexpression.

4.4.2 Anzahl aneuploider Zellen

In der Studie wird die Anzahl aneuploider Zellen pro Präparat für die einzelnen Aneuploidiedefinitionen ermittelt. Idealerweise beinhalten die Präparate mit negativem Follow-up Referenzstandard keine oder nur wenig aneuploide Zellen und die Präparate mit positivem Follow-up-Referenzstandard eine deutlich von der negativen Gruppe abzugrenzende Anzahl an aneuploiden Zellen. Durch die Strenge der Aneuploidiedefinitionen weist D1 die meisten aneuploiden Zellen auf, gefolgt von D3, D4 und D2. Die Anzahl aneuploider Zellen liegt bei den Präparaten mit negativem Follow-up-

Referenzstandard zwar insgesamt unter der der positiven Gruppe, jedoch ist eine klare Abgrenzung nicht erkennbar. Das liegt vor allem an den zahlreichen Ausreißern mit einer hohen Anzahl aneuploider Zellen mit negativem Follow-up-Referenzstandard. Betrachtet man nur die zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparate sind die Überlappungen noch deutlicher erkennbar. Die unklare Abgrenzung erschwert die Ermittlung eines eindeutigen Cutoff-Wertes mit ausreichenden Treffsicherheiten. Die Ursache für die in manchen Fällen unzureichende Abgrenzbarkeit könnte in einer Zunahme der mit der Mehrfarben-FISH erfassten genetischen Veränderungen bereits bei (noch) nicht maligne transformierten Läsionen im Sinne eines genetischen Feldeffektes liegen. Dies wird im Abschnitt 4.4.4 weiter diskutiert.

4.4.3 Ermittlung des Cutoff-Werts und Treffsicherheiten

Für die Ermittlung des optimalen Cutoff-Wertes wurde der Youdenindex verwendet. Er wird häufig verwendet und ist eine einfache Methode mithilfe der ROC-Kurve den optimalen Cutoff-Wert zu ermitteln ohne weitere Informationen zu benötigen [103].

Die Auswertung der Mehrfarben- und 9p21-FISH erfolgte sowohl für alle Präparate als auch nur für die zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparate. Das hat den Hintergrund, dass die FISH eine im Vergleich zur konventionell mikroskopischen Untersuchung und DNA-Bildzytometrie eine sehr teure und zeitintensive Methode ist. In der klinischen Routine würde man sie daher eher an ausgewählten auffälligen Präparaten mit Restunsicherheit und nicht regelhaft an zytologisch negativen Präparaten verwenden.

Bei allen Präparaten erreicht die Aneuploidiedefinition 2 den höchsten Youdenindex (0,624) bei einem Cutoff-Wert von 2. Ein Cutoff-Wert von 2 ist jedoch für eine klinische Anwendung vor allem wegen der Spezifität von 75,2% zu niedrig und wird daher nicht ausgewählt. Den zweithöchsten Youdenindex (0,594) erreicht die Aneuploidiedefinition 4 bei einem Cutoff-Wert von 6 und einer Sensitivität von 71,8% und einer Spezifität von 87,6%.

Bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten erreicht den höchsten Youdenindex (0,436) die Aneuploidiedefinition 4 bei einem Cutoff-Wert von 7 mit einer Sensitivität von 71,1% und einer Spezifität von 72,5%. Auch bei der Aneuploidiedefinition 2 liegt der höchste Youdenindex (0,407) bei einem Cutoff-Wert von 7. Insgesamt ist für die Mehrfarben-FISH die Aneuploidiedefinition 4 mit einem Cutoff-Wert von 7 oder mehr aneuploiden Zellen am besten geeignet. Bei allen Präparaten ergibt sich ein höherer Youdenindex von 0,593 bei einer niedrigeren Sensitivität von 69,2% und einer höheren Spezifität von 90,1% als bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten. Die Werte der Spezifität sind bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten erwartungsgemäß niedriger, da die zytologisch negativen Mundschleimhautläsionen fehlen, welche meist ein negatives Follow-up haben. Auch tragen die falsch positiven FISH-Ergebnisse vor allem bei zytologisch zweifelhaften Präparaten hierzu bei (siehe Kapitel 4.4.4).

Die vorliegende Arbeit beschreibt als eine der wenigen die simultane Anwendung und Auswertung von DNA-Sonden mittels FISH in der oralen Zytologie im Sinne einer Mehrfarben-FISH. Für andere Organsysteme und Untersuchungsmaterialien wie

beispielsweise Gallenwegszytologie oder endobronchiale Zytologie ist sie bereits etabliert. Dies wird beispielhaft beschrieben:

Beispiele für die Anwendung der Mehrfarben-FISH in der diagnostischen Zytologie:

Zur Erkennung von Blasenkrebs in Urinproben hat die Firma Abbott, von der auch die FISH-Sonden für die vorliegende Studie stammen, eine Mehrfarben-FISH entwickelt mit dem Namen UroVysion. Sie beinhaltet die Zentromersonden der Chromosomen 3, 7 und 17 und die lokusspezifische Sonde der Region 9p21. Die Firma empfiehlt dabei für die Mehrfarben-FISH (CEP 3,7, 17) einen Cutoff-Wert von 4 oder mehr aneuploiden Zellen [104]. Als aneuploid gilt dabei eine Zelle, wenn mindestens 2 der FISH-Sonden mehr als 2 Signale ausweist. Das kommt der Aneuploidiedefinition D1 (mindestens 3 FISH-Sonden mit >2 Signalen) am nächsten. In meinen Ergebnissen erzielt D4 die besten Treffsicherheiten bei einem Cutoff-Wert von 7. Ein Cutoff-Wert von 7 befindet sich in einem zahlenmäßig ähnlichen Bereich wie bei der Mehrfarben-FISH für die Urinzytologie und ist vom diagnostischen Aufwand her für die diagnostische Anwendung geeignet.

In einer Studie von Levy et al. 2012 [105] wird die UroVysion-Sonde auch für andere Organsysteme verwendet. Die Mehrfarben-FISH wird dabei an 202 Aspiraten verschiedener Organe, wie Lymphknoten, Bauchspeicheldrüse und Leber verwendet und die Treffsicherheiten miteinander verglichen. Dabei wird jedoch ein Cutoff-Wert von 5 oder mehr aneuploiden Zellen für die CEP-Sonden verwendet. Die FISH allein erzielt dabei eine Sensitivität von 77% und eine Spezifität von 96% und ist damit etwas höher als in meinen Ergebnissen.

Eine weitere Mehrfarben-FISH der Firma Abbott war die LAVysion Sondenkombination. Sie beinhaltet DNA-Sonden für die chromosomalen Regionen 5p15.2, 6p11.1-q11 (Zentromersonde), 7p12 (*EGFR*) und 8q24.12-24.13 (*MYC*). In der Studie von Schramm et al. 2011 [100] wird diese Mehrfarben-FISH für bronchiale Proben zur Diagnostik von Lungenkarzinomen verwendet. Der verwendete Cutoff-Wert liegt dabei bei 6 und kommt meinem ermittelten Cutoff-Wert sehr nahe. Zudem wird ebenfalls der gleiche Algorithmus für die Tetrasomie berücksichtigt, um falsch positive FISH-Ergebnisse gering zu halten.

In den vorgenannten Anwendungen sind die Kriterien für ein positives FISH-Ergebnis weniger stringent als in meiner Studie. Hätten wir für orale Läsionen bei FA-Betroffenen ähnliche Kriterien für eine chromosomal aneuploide Zelle ab nur zwei Sonden mit mehr als zwei Fluoreszenzsignalen angewendet, wäre die ohnehin schon hohe Zahl der falsch positiven Ergebnisse (siehe Kapitel 4.4.4) noch höher ausgefallen. Urothelkarzinome, Gallenwegskarzinome oder auch pulmonale Karzinome in der Normalbevölkerung scheinen mittels FISH besser von nichtmalignen und reaktiven Zellveränderungen abgrenzbar zu sein als bei oralen Läsionen von FA-Betroffenen. Dies könnte, wie in Kapitel 4.4.4 ausgeführt, an einem genetisch veränderten Feld in noch nicht maligne transformierter Mundschleimhaut liegen, da es bei FA-Betroffenen aufgrund der zugrundeliegenden Störung der DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen zur Anreicherung genetischer Veränderungen und offensichtlich auch chromosomaler Aberrationen kommt. Letzteres wird an Untersuchungen oraler Plattenepithelkarzinome von Webster et al. 2021 [57] bestätigt.

Vergleich mit einigen Literaturdaten zu FISH-Untersuchungen oraler Läsionen:

FISH-Untersuchungen an oralen zytologischen Proben sind außerhalb der eigenen Arbeitsgruppe bisher nur an der Allgemeinbevölkerung und nicht an einem Kollektiv FA-Betroffener durchgeführt worden.

In einer Studie von Hirshberg et al. 2007 [106] wurden 30 (prä)-maligne orale Läsionen und 25 Kontrollläsionen mithilfe von FISH untersucht. Dabei wurde die Zentromersonde von Chromosom 2 verwendet und der Anteil an nicht-diploiden Zellen bestimmt. Als Schwellenwert wurde mithilfe der Kontrollgruppe ein Anteil von 2% bestimmt. Alle acht malignen Läsionen wiesen über 2% nicht-diploide Zellen auf. Damit konnten wie in der eigenen Studie alle positiven Präparate auch als richtig positiv eingeordnet werden (s. Kapitel 3.3.5). Bei den 22 prämaligen Läsionen hingegen wiesen 11 Läsionen einen Anteil von über 2% nicht-diploider Zellen auf. Von den 11 Läsionen mit über 2% nicht-diploiden Zellen hatten acht entweder eine epitheliale Hyperplasie oder leichte Dysplasie und drei aufgrund resezierter oder wiederkehrender Läsionen ein erhöhtes Risiko an OSCC zu erkranken. Wie in der eigenen Studie konnten damit auffällige orale Läsionen mit dem definierten Schwellenwert nicht immer richtig zugeordnet werden. Die Studie konnte jedoch insgesamt feststellen, dass der Anteil nicht-diploider Zellen mit dem Schweregrad der Dysplasie zunimmt.

In einer Studie von Martín-Ezquerria et al. 2010 [82] wurden Proben von OSCC, OSCC-Lymphknotenmetastasen, oralem Lichen planus, oraler Leukoplakie und normaler Mundschleimhaut mithilfe von FISH untersucht. Dabei wurden, wie in der eigenen Studie, unter anderem Sonden für *CCND1* und *MYC* verwendet. *CCND1*-Gewinne wurden in 73-84% der OSCC- und Lymphknotenproben ermittelt und *MYC*-Gewinne in 81-82% der OSCC- und Lymphknotenproben. Die Studie konnte insgesamt deutlich häufiger genetische Veränderungen in OSCC- und Lymphknotenproben feststellen als in Proben von oralem Lichen planus und oraler Leukoplakie (0-14%).

In einer Studie von Poh et al. 2012 [83] wurden 35 Proben mit oralen Dysplasien und 20 Proben mit normaler Mundschleimhaut mit bekanntem klinischem Verlauf mithilfe von FISH untersucht. Von den 35 oralen Dysplasien schritten 22 im Verlauf zu einem Carcinoma *in situ* oder invasivem Plattenepithelkarzinom voran. Als FISH-Sonde wurde dabei unter anderem *CCND1* verwendet wie in der eigenen Studie. Es konnte gezeigt werden, dass ein hoher Gengewinn von *CCND1* mit einem erhöhten Progressionsrisiko verbunden ist. *CCND1* zeigte dabei eine Sensitivität von 95% und eine Spezifität von 69%. Die Treffsicherheiten zeigen eine ähnliche Spezifität wie in der eigenen Arbeit mit einer höheren Sensitivität. Jedoch beziehen sich meine Treffsicherheiten nicht nur auf die *CCND1* Sonde.

Aus den verfügbaren Daten für die Allgemeinbevölkerung lässt sich schließen, dass eine FISH-Untersuchung auch bei FA-Betroffenen anwendbar ist und sich genetische Veränderungen häufiger in prämaligen und malignen Läsionen als in chronisch entzündlichen Erkrankungen wie dem Lichen Planus oder normaler Mundschleimhaut zeigen. Die diesbezügliche Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe mit Auswahl geeigneter FISH-Sonden und ersten Tests an zytologischen Präparaten ergab gute Anhaltspunkte dafür,

dass die dort ausgewählten FISH-Sonden für die Detektion einer chromosomalen Aneuploidie selbst in wenigen FA Plattenepithelkarzinomzellen geeignet sind [88].

Vergleich der eigenen Daten zur Cutoff-Berechnung mit der Validierungsstudie der eigenen Arbeitsgruppe:

Zur diagnostischen Anwendung des von mir berechneten Cutoff-Werts muss der Wert formal noch in einer retrospektiven Kohorte validiert und in einer prospektiven Studie bestätigt werden. Dies liegt für den von mir ermittelten optimalen Cutoff von 7 chromosomal aneuploiden Zellen nicht vor. Allerdings wurden meine Daten zur Bestimmung der Interobserver-Variabilität in der entsprechenden Validierungsstudie der eigenen Arbeitsgruppe verwendet [1]. Dort wird der Cutoff-Wert von 6 in einer Kohorte mit 152 Präparaten validiert. Vergleicht man meine Treffsicherheiten für D4 bei einem Cutoff-Wert von 6 mit der Validierungsstudie, fallen die Sensitivitätswerte in der Validierungsstudie höher und die Spezifitätswerte niedriger aus. Bei allen Präparaten bedeutet das in der Validierungsstudie eine Sensitivität von 87% und eine Spezifität von 82,9% und in meiner Arbeit eine Sensitivität von 71,8% und Spezifität von 87,6%. Bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten beträgt in der Validierungsstudie die Sensitivität 86,4% und die Spezifität 51,7%, und in meiner Arbeit beträgt die Sensitivität 73,7% und die Spezifität 65,0%.

Im Vergleich dazu liegen die Treffsicherheiten für D4 für die publizierten Daten [1] der Cutoff-Studie im Vergleich zur Validierungsstudie näher beieinander. Bei allen Präparaten beträgt in der Cutoff-Studie die Sensitivität 87,2% und die Spezifität 83,5%, bei den zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten beträgt die Sensitivität 89,5% und die Spezifität 52,5%.

Die Unterschiede bei der Cutoff-Studie in meinen Daten von den Daten des unabhängigen Untersuchers sind in erster Linie bedingt durch Auswahl anderer Zellen für die Auszählung der Fluoreszenzsignale in den Präparaten. Es wurden nicht alle suspekten Zellen in den Präparaten ausgezählt, sondern ca. 50. Dennoch ist die Interobserver-Variabilität, wie publiziert bei Cutoff 6 mit Kappa-Werten von 0,846 bis 0,476 je nach Aneuploidie-Definition moderat bis fast perfekt, was für die Reproduzierbarkeit des Auszählungsvorganges spricht. Da meine Daten in der Cutoff-Studie sich etwas von denen des unabhängigen Untersuchers wie oben beschrieben unterscheiden, trifft dies in gleicher Weise auch auf den Vergleich mit der Validierungsstudie zu. Bei Cutoff 7 ergeben sich Kappa-Werte von 0,856 (D1 alle Präparate) bis 0,517 (D4 nur zytologisch zweifelhafte, dringend verdächtige und positive Präparate). Der Grad der Übereinstimmung ist damit je nach Aneuploidiedefinition moderat bis fast perfekt mit höherer Übereinstimmung bei den Auswertungen aller Präparate als bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten. Eine mögliche Ursache läge wieder in der unterschiedlichen Wahl der ausgezählten Zellen in einem Präparat. Insbesondere die zytologisch unklaren Präparate sind aufgrund oft dichter Zelllagerung und Zellüberlagerungen sowie nicht eindeutiger Fluoreszenzsignale für die Auswertung herausfordernder.

4.4.4 Diskussion der falsch-positiven und falsch-negativen FISH-Befunde

Bei einem Cutoff-Wert von 7 und der Aneuploidiedefinition 4 ergibt sich für die zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparate eine Sensitivität von 71,1% und eine Spezifität von 72,5%. Damit fällt die Sensitivität höher und die Spezifität niedriger als bei allen Präparaten aus (Sensitivität 69,2%, Spezifität 90,1%).

Das liegt an den falschen FISH-Ergebnissen, denn die falschen FISH-Befunde stammen überwiegend von den zytologisch zweifelhaften Präparaten (siehe Tabelle 22) sowie dem Weglassen der meist richtigen FISH-Auswertungen an den zytologisch negativen Präparaten. Es gibt trotz Berücksichtigung der Tetrasomie und einer tolerierten erhöhten Anzahl an *MYC*-Signalen im Auswertungsalgorithmus eine hohe Anzahl an Präparaten mit falschem FISH-Ergebnis. Zytologisch verdächtige oder positive Präparate sind hingegen immer richtig negativ oder positiv in der FISH-Untersuchung.

Falsch positive Befunde: Feldeffekt und chromosomale Aneuploidie in der Mehrfarben-FISH:

Insgesamt gibt es in meiner Arbeit 12 von 160 Präparaten mit einem falsch positiven FISH-Ergebnis bei einem Cutoff-Wert von 7 und D4. In den publizierten Daten [1] wird bereits diskutiert, dass die falsch-positiven FISH-Ergebnisse zum Teil auf einen genetischen Feldeffekt (auch Feldeffekt oder Feldkanzerisierung genannt) zurückzuführen sein könnten und Frühdiagnosen darstellten. Es konnte von Tabor et al. 2002 [107] mittels p53 Mutationsanalyse und Bestimmung des Allelverlustes (loss of heterozygosity, LOH) von 19 Mikrosatelliten nachgewiesen werden, dass ein großer Teil der Lokalrezidive und Zweitumore von OSCCs einen gemeinsamen klonalen Ursprung mit dem Primärtumor aufweisen, auch wenn die Läsionen über 7cm voneinander entfernt sind. Dies wird mit der Entstehung der Tumoren aus einem gemeinsamen genetisch veränderten Feld erklärt. Der Feldeffekt beschreibt dabei die Entwicklung eines Feldes mit genetisch veränderten Zellen. Er beginnt mit einer genetisch veränderten Stammzelle, die eine klonale Einheit von veränderten Tochterzellen („Patch“) bildet. Sie können z.B. anhand von Mutationen in *TP53* erkannt werden [108]. Mithilfe zusätzlicher genetischer Veränderungen und eines Wachstumsvorteils verdrängt das Feld die normale Schleimhaut. Die Felder können mittels molekularer Analyse nachgewiesen werden, jedoch bleiben sie oft histologisch unauffällig [109]. So können mehrere Tumore innerhalb eines zusammenhängenden genetisch veränderten Feldes aus morphologisch scheinbar noch unauffälliger Schleimhaut entstehen [110]. Solche Krebsstammzellen konnten auch in OSCC von FA-Betroffenen nachgewiesen werden [111].

Damit kann es sich bei den falsch positiven FISH-Ergebnissen um Läsionen in einem genetisch veränderten Feld handeln, in dem sich im Laufe der Zeit ein OSCC oder eine hochgradige OED entwickeln kann, welche aber innerhalb des definitionsgemäß begrenzten Follow-up Zeitraums noch nicht vorlagen. In diesen Fällen würde es sich um sehr frühe Diagnosen handeln, deren klinischer Wert und die Bedeutung für eine therapeutische Intervention aber unklar ist, da die Zeitachse bis zu einer definitiven malignen Transformation unbekannt ist.

In den publizierten Daten der eigenen Arbeitsgruppe [1] werden von Silva et al. 2022 für die Cutoff- und die Validierungsstudie zusammen 24 falsch positive FISH-Ergebnisse angegeben. Es wurde versucht, im Nachgang der Auswertungen für die Studie weitere Informationen zu erhalten. In der klinischen Anamnese, zum Zeitpunkt des Bürstenabstriches oder in der erweiterten Nachbeobachtungszeit wies ein Teil der Läsionen (14/24) eine hochgradige OED oder ein Plattenepithelkarzinom auf, die entweder in der Nähe (9/24) oder auch nicht in der Nähe (5/24) der Läsion lagen. Eine Möglichkeit, die falsch positiven FISH-Ergebnisse zu reduzieren, bestünde also darin, das Follow-up zeitlich und lokalisationsbezogen zu erweitern [1].

Falsch negative FISH-Befunde: DNA-Degradation bei flüssigkeitsbasierten Proben:

In meiner Arbeit gibt es bei einem Cutoff-Wert von 7 und D4 12 von 160 Präparaten mit einem falsch-negativen FISH-Befund. Das könnte daran liegen, dass zu wenige oder zu wenig gut erkennbare Fluoreszenzsignale vorhanden waren oder ausgezählt werden konnten.

Die Firma Abbott gibt für die Mehrfarben-FISH UroVysion einige Auszählungshinweise, die auch für die eigene Auswertung beachtet wurden [104]. Bevorzugt sollen Zellen ausgewertet werden, die morphologisch auffällig sind. Dazu zählt eine verschobene Kern-Plasma-Relation, eine unregelmäßige Kernform, eine „fleckige“ DAPI-Färbung und Zellcluster. Bei den Zellclustern besteht das Problem, dass die Zellkerne häufig überlappend gelagert sind und daher nicht ausgewertet werden können. Damit könnte eine substanzielle Anzahl auffälliger Zellen für die Auswertung wegfallen. Dies war bei der eigenen Auswertung bei einigen Präparaten der Fall. Auch kann es vorkommen, dass die Fluoreszenzsignale scheinbar geteilt sind. Dies geschieht bei nicht mehr optimal erhaltener DNA oder dann, wenn die hybridisierte DNA-Sequenz über ein größeres Kernareal verteilt vorliegt. Es handelt sich bei der hier verwendeten Mehrfarben-FISH um eine Interphase-FISH und nicht um eine Untersuchung an kondensierten Chromosomen während der Metaphase. Zwei Signale, die durch eine sichtbare Verbindung verbunden sind, gelten als geteiltes Signal und sollten als ein Signal gezählt werden. Diese Verbindung ist manchmal nur sehr schwer sichtbar und es ergeben sich Spielräume für die Interpretation.

Ein Problem bei der Beachtung der Auszählungshinweise können schwache Fluoreszenzsignale sein. Mit zunehmender Archivierungsdauer und unter Lichteinfluss lässt die Stärke der Fluoreszenz nach der Hybridisierung nach. Die Präparate sollten daher innerhalb weniger Tage nach der Hybridisierung ausgewertet werden.

Die Präparate können jedoch auch bereits von Beginn an nach der Hybridisierung schwache Fluoreszenzsignale ausweisen, welche trotz einer erneuten Hybridisierung nicht stärker werden. Im Falle der vorliegenden retrospektiven Studie handelt es sich um mehrere Jahre alte archivierte Präparate aus den Jahren 2007 bis 2017, was zu den unten beschriebenen Problemen führen kann.

Beim Heraussuchen geeigneter Präparate aus dem Archiv gab es Schwierigkeiten gut erhaltene Präparate mit ausreichender Zahl der diagnostisch relevanten Zellen für die Studie zu finden. Am schwierigsten ist es, geeignete zweifelhafte, dringend verdächtige oder positive Präparate zu finden, da diese seltener im Archiv vorliegen als die zytologische

negativen. Bei einem nicht auswertbaren Präparat oder bei Problemen mit der Auswertung kann daher nicht beliebig auf andere Präparate ausgewichen werden.

Das Problem der schwachen oder fehlenden Signale könnte an einem DNA-Abbau in archivierten Präparaten liegen. So wurde nach eigenen unveröffentlichten Daten in der Arbeitsgruppe beobachtet, dass flüssigkeitsbasierte Proben schwächere Fluoreszenzsignale in der FISH zeigten als konventionelle zytologische Ausstrichpräparate. Diese Präparate waren überhaupt erst untersuchbar nach einer längeren Inkubation in Xylol vor dem FISH-Protokoll. Die vorher übliche Einstellzeit betrug 2 Stunden und wurde auf 72 Stunden erhöht. In einer Studie von Kim et al. 2016 [112] wurde der DNA-Abbau in flüssigkeitsbasierten zytologischen Proben untersucht und mit der konventionellen Zytologie verglichen. Dazu wurde an Aspiraten der Schilddrüse nach verschiedenen Zeitintervallen eine PCR durchgeführt. Nach neun Monaten wiesen dabei im Gegensatz zu den konventionellen Präparaten die flüssigkeitsbasierten Proben nicht mehr genügend DNA für die PCR auf. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die DNA in flüssigkeitsbasierten Proben langfristig schneller abgebaut wird als in alkoholfixierten konventionellen Präparaten. Als Grund wurden die Bestandteile der Konservierungslösung genannt, die Abbauenzyme nur unzureichend blockieren.

Um das Problem des DNA-Abbaus bei der Archivierung und der damit einhergehenden Schwierigkeiten bei der Signalauszahlung zu umgehen, sollte die FISH-Untersuchung optimalerweise an frischen Präparaten für die Diagnostik angewendet werden. Dies gilt es, in einer prospektiven Studie zu bestätigen.

4.5 Ergebnisse der 9p21-FISH im Literaturvergleich

4.5.1 Homozygote und relative Deletion

Bei der 9p21-FISH werden in der eigenen Auswertung ausschließlich relative Deletionen ermittelt und keine homozygote Deletion. Die homozygote Deletion hat damit keinen diagnostischen Wert bei Mundschleimhautläsionen von FA-Betroffenen. Die ROC-Kurve für die relative Deletion ist meist niedriger als die ROC-Kurve der Mehrfarben-FISH. Das spricht für einen geringeren diagnostischen Nutzen der 9p21-FISH im Vergleich zur Mehrfarben-FISH. In den publizierten Daten [1] kann die homozygote Deletion ebenfalls den klinischen Verlauf nicht vorhersagen. Auch die relative Deletion weist für die Diagnostik zu geringe Treffsicherheiten auf (siehe Kapitel 4.5.2).

Weitere Studien konnten einen LOH von 9p in ihren Untersuchungen im Kopf-Hals-Bereich nachweisen. In einer Studie von Smetsers et al. 2015 [113] wurden Mundschleimhautabstriche von FA-Betroffenen auf LOH an den Chromosomen 3p, 9p, 11q und 17p untersucht. Die transplantierten FA-Betroffenen zeigten dabei keinen LOH aufgrund einer Kontamination durch die Spender-DNA. Bei den nicht transplantierten FA-Betroffenen konnte jedoch bei 14 von 141 ein LOH nachgewiesen werden. Die meisten LOH (13/14) betrafen die Chromosomen 9p und/oder 3p und damit auch eine der Regionen (9p), die in der vorliegenden Studie untersucht wurden.

Schwarz et al. 2008 [87] untersuchte mithilfe von FISH 67 orale Leukoplakien in der Allgemeinbevölkerung auf Verluste von 3p14 und 9p21. Unter den Leukoplakien waren einfache Keratosen, Dysplasien, invasive Karzinome und morphologisch normale Schleimhaut von OSCC-Patienten. Bereits bei der Mehrheit der einfachen Keratosen konnten Verluste von 3p14 und 9p21 festgestellt werden. Die Autoren kommen daher zu dem Schluss, dass diese Verluste früh in der Tumorentstehung von OSCC auftreten. Das frühe Auftreten kann eine eindeutige Diagnostik wie in der eigenen Studie erschweren.

Graveland et al. 2011 [114] untersuchte an 35 HNSCC-Patienten unter anderem LOH an den Chromosomen 3p, 9p und 17p. 16 Patienten entwickelten im Verlauf ein lokales Rezidiv, davon wiesen 11 LOH an den Operationsrändern auf. Dabei war LOH am Chromosom 9p ein wichtiger Prognosefaktor und wies eine für eine klinische Anwendung allerdings fragliche Sensitivität von 62% und eine Spezifität von 74% auf.

Zhang et al. 2012 [115] untersuchte unter anderem 40 Mundschleimhautläsionen auf LOH, die von einer leichten oder mittelschweren Dysplasie zu schwerer Dysplasie, einem Carcinoma in situ oder Plattenepithelkarzinom innerhalb einer medianen Nachbeobachtungszeit von 44,6 Monaten fortgeschritten sind. Als LOH-Marker wurden unter anderem 3p und 9p verwendet. LOH auf 3p und/oder 9p war dabei bei fast allen (39/40) progredienten Läsionen vorhanden. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass 9p eine treibende Kraft bei der Progression von prämaligen Läsionen ist.

Diese Studien an FA-Betroffenen und in der Allgemeinbevölkerung legen die Untersuchung eines Allelverlustes zumindest von 9p als prognostisch relevantem Biomarker nahe. Dies ließ sich aber in den eigenen Untersuchungen nicht mit für eine klinische Anwendung ausreichender Treffsicherheit bestätigen.

4.5.2 Ermittlung des Cutoff-Werts und Treffsicherheiten

Für die 9p21-FISH wird in der eigenen Arbeit bei allen Präparaten mithilfe des höchsten Youdenindex ein Cutoff-Wert von 12 für eine relative 9p21 Deletion ermittelt. Die Sensitivität liegt dabei bei 88,9% und die Spezifität bei 67,2%. Bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten ergibt der höchste Youdenindex einen Cutoff-Wert von 30 mit einer Sensitivität von 62,9% und einer Spezifität von 57,9%. Insgesamt sind die Werte der Spezifität zu niedrig für eine sinnvolle diagnostische Anwendung.

In den publizierten Daten der eigenen Arbeitsgruppe [1] wurde für alle Präparate ein höherer Cutoff-Wert von 16 Zellen für eine relative 9p21 Deletion bei einer geringeren Sensitivität von 63,9% und einer höheren Spezifität von 77,3% ermittelt. Bei den zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparaten wurde der höchste Youdenindex bei einem Cutoff-Wert von 16 und einer höheren Sensitivität von 65,7% und einer niedrigeren Spezifität von 55,3% ermittelt. Die Werte insbesondere für die Spezifität wurden auch hier als zu niedrig für eine diagnostische Anwendung erachtet und die 9p21-FISH für die anschließende Validierungsstudie nicht weiter verfolgt.

In der Pilotstudie der eigenen Arbeitsgruppe wiesen fünf von sechs OSCC Proben von FA-Betroffenen eine relative Deletion auf [88], weshalb die 9p21-FISH in der hier vorliegenden Cutoff-Studie mit untersucht wurde. Nach der Festlegung, welche FISH-Sonden für die Studien unserer Arbeitsgruppe verwendet werden sollten, wurde eine Studie von Webster et al. 2021 [57] veröffentlicht, die Deletionen von *CDKN2A* in Plattenepithelkarzinomen von FA-Betroffenen nachweist. Dazu wurden DNA-Sequenzierungen an 55 FA Plattenepithelkarzinomen und drei Adenokarzinomen durchgeführt und festgestellt, dass FA Plattenepithelkarzinome eine erhöhte Anzahl an Kopienzahlveränderungen aufweisen. Zu den deletierten Regionen gehörte in 55% der untersuchten Proben *CDKN2A*. Insgesamt traten Strukturveränderungen wie Duplikationen, Translokationen und Deletionen häufig in Regionen der Chromosomen 3, 7, 8, 9 und 11 auf.

Beide Studien sprechen für die Untersuchung der 9p21-FISH im Rahmen einer größeren Fallserie. Auch vor diesem Hintergrund sind die in der Cutoff-Studie ermittelten Treffsicherheiten der 9p21-FISH überraschend niedrig. Möglicherweise lässt sich dies auf die zusätzliche Untersuchung von nicht malignen Läsionen in den Fallserien zurückführen, welche aber bereits einen Verlust von *CDKN2A* zeigen.

Die UroVysion Mehrfarben-FISH beinhaltet auch eine Sonde für 9p21. Die Herstellerfirma Abbott empfiehlt bei der Auswertung zur Detektion auffälliger Blasenkrebszellen einen Cutoff-Wert von 12 für eine homozygote Deletion [104]. Der Wert stimmt mit meinem ermittelten Cutoff-Wert überein, jedoch für eine relative Deletion. Die Höhe des Wertes ist damit für eine diagnostische Anwendung vergleichbar geeignet, allerdings ist die Spezifität mit 67,2% niedrig.

Ziel der 9p21-FISH aufgrund der vielversprechenden Literaturlage und der guten Ergebnisse der Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe war bei Planung der Studie, die Mehrfarben-FISH zu ergänzen, um möglichst keine relevanten Befunde zu verpassen. Insgesamt bringt sie jedoch keinen zusätzlichen diagnostischen Nutzen, da sie nur unzureichend zwischen Läsionen mit positivem und negativem Follow-up abgrenzt. Als Ursache insbesondere der falsch positiven Befunde kommt hier, ebenfalls wie bei der Mehrfarben-FISH, die Ausprägung eines genetisch veränderten Feldes in der Mundschleimhaut in Betracht, welches ein erhöhtes Risiko für eine maligne Transformation darstellt, aber eine maligne Transformation noch nicht notwendigerweise zeigt. So fanden Smetzers et al. 2015 [113] LOH bei 10 von 110 Mundschleimhautläsionen von FA-Betroffenen mit verfügbaren Follow-up Daten. Fünf Betroffene entwickelten ein HNSCC im Verlauf von bis zu 93,7 Monaten oder zeigten zum Zeitpunkt der LOH-Untersuchung bereits ein HNSCC, davon vier mit und einer ohne vorher detektiertem LOH. Die Autoren halten deshalb eine regelmäßige Untersuchung der Mundschleimhaut durch einen erfahrenen Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen für erforderlich.

4.6 Anwendung der Mehrfarben-FISH in der Mundschleimhautzytologie der Allgemeinbevölkerung und ggf. Austausch einzelner Sonden

Die FISH-Sonden für die Etablierung einer Mehrfarben-FISH wurden auf der Grundlage der am häufigsten auftretenden genetischen Veränderungen in der Allgemeinbevölkerung ausgewählt und die entsprechenden Sonden in der Pilotstudie [88] auf Eignung an OSCCs von FA-Betroffenen überprüft. Die ausgewählten FISH-Sonden müssten daher grundsätzlich für die Abklärung sichtbarer Mundschleimhautveränderungen in der Allgemeinbevölkerung geeignet sein. Änderungen des Sondenpanels könnten die Untersuchung jedoch noch verbessern.

Viele OSCCs sind HPV negativ und weisen eine chromosomale Instabilität mit einer hohen Zahl von Genkopienzahlveränderungen auf. Unter den häufigen Veränderungen sind 3q-Amplifikationen und *PIK3CA*-Mutationen und -amplifikationen [44]. Darüber hinaus findet sich häufig eine Amplifikation des Onkogens *CCND1* und eine Deletion des *CDKN2A* Gens. HPV-positive oropharyngeale OSCCs sind in der Allgemeinbevölkerung, anders als bei FA-Betroffenen relevant. Diese Tumoren zeigen neben einer durch die viralen Proteine E6 und E7 induzierten Störung des Zellzyklus mit konsekutiver Inaktivierung von p53 und dem Retinoblastomgenprodukt (RB) ebenso wie die chromosomal instabile Tumorgruppe Amplifikationen von 3q und Mutationen/ Amplifikationen in *PIK3CA*. Eine Möglichkeit für eine Anwendung der Mehrfarben-FISH in der Allgemeinbevölkerung wäre es, die *TERC*-Sonde durch eine *PIK3CA*-Sonde auszutauschen, um die HPV-positiven OSCCs miteinzuschließen. Auch der Einbezug der in der FA-Gruppe nicht effektiven Sonde für 9p21 wäre zu diskutieren. Die *PIK3CA*-Sonde kann ebenso in der Anwendung bei FA-Betroffenen sinnvoll sein. Webster et al. 2021 [57] detektierten eine Amplifikation von *PIK3CA* bei 76% der FA-assoziierten OSCC.

Neben den HPV positiven und HPV negativen OSCCs mit Kopienzahlveränderungen gibt es auch HPV negative OSCCs, welche genetisch stabil sind und keine hohe Zahl von Genkopienzahlveränderungen sowie einen p53-Wildtyp und keine Deletion von 3q aufweisen [44, 57]. Diese Tumoren zeigen aktivierende *HRAS* und inaktivierende *CASP8*-Mutationen und sind chromosomal diploid. Diese Mutationen sind mittels der FISH-Untersuchung nicht detektierbar. (Prä-)maligne Veränderungen dieser letzteren Läsionen können mithilfe der FISH-Untersuchung nicht erkannt werden, da sie keine chromosomale Aneuploidie aufweisen.

4.7 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wird mithilfe des Youdenindex ein Cutoff-Wert von 7 für die Mehrfarben-FISH von oralen Läsionen bei FA-Betroffenen ermittelt. Die Höhe des Cutoff-Wertes ist für die diagnostische Routine geeignet. Die mäßige Sensitivität und Spezifität insbesondere in der untersuchten Gruppe der zytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Läsionen und die damit verbundenen falsch positiven und falsch negativen FISH-Ergebnisse könnten jedoch die diagnostische Anwendung einschränken. Gründe für die mäßige diagnostische Treffsicherheit in der vorliegenden Studie könnten der DNA-Abbau

in archivierten Präparaten mit konsekutiven falsch negativen FISH-Ergebnissen oder die Detektion eines bereits genetisch veränderten Feldes ohne bereits vorliegende maligne Transformation mit konsekutiv falsch positiven FISH-Ergebnissen sein. Der Cutoff-Wert sollte daher formal vor einer klinischen Anwendung in einer retrospektiven Kohorte validiert und prospektiv überprüft werden. Die retrospektive Überprüfung ist in der Arbeitsgruppe für den Cutoff-Wert von 6 chromosomal aneuploiden Zellen bereits durchgeführt worden [1]. In einer prospektiven Studie kann die FISH dann an frischen Präparaten durchgeführt werden. Vermutlich sind auch Änderungen in der Sondenauswahl notwendig oder ein erweitertes Follow-up, um die Treffsicherheiten zu erhöhen. Insbesondere die *TERC*-Sonde könnte durch eine *PIK3CA*-Sonde ersetzt werden.

Die 9p21-FISH zeigt für die homozygote Deletion keine Möglichkeit für eine klinische Anwendung. Bei der relativen Deletion zeigen sich hohe Cutoff-Werte von 12 und 30 mit geringer Sensitivität und Spezifität. Die 9p21-FISH ist weniger gut geeignet für die Anwendung bei oralen Läsionen von FA-Betroffenen als die Mehrfarben-FISH und kann diese nicht sinnvoll ergänzen.

Bei unklarer Zytologie wird in Zusammenschau mit dem klinischen Verdacht eine Biopsie beim FA-Betroffenen entnommen. Bei einem positiven Biopsiebefund kann dann die weitere Therapie erfolgen. Bei einem negativen Biopsiebefund hingegen wurde eine invasive Maßnahme durchgeführt, die durch eine eindeutige Diagnostik im Vorfeld vermeidbar gewesen wäre.

Mithilfe der FISH-Untersuchung sollen unklare zytologische Befunde idealerweise eindeutig einem positiven oder negativen Befund zugeordnet werden.

Da die falsch positiven und falsch negativen FISH-Befunde in dieser Arbeit überwiegend zytologisch unklar sind, besteht das Problem der klinischen Anwendbarkeit. Da FISH eine kosten- und zeitintensive Methode ist, fände sie realistischerweise nur bei unklarer Zytologie Anwendung. Eindeutig negative und positive zytologisch Abstrichbefunde müssen nicht weiter am zytologischen Präparat abgeklärt werden. Die Treffsicherheiten der FISH sind jedoch noch niedrig für eine diagnostische Anwendung und verbesserungsbedürftig, z.B. durch Optimierung der Sondenauswahl und der Anwendung an frischen Präparaten. Die Gefahr besteht, dass über einen falsch-negativen FISH-Befund, Läsionen übersehen und weiter fortschreiten können.

Die FISH zeigt insgesamt das Potenzial, an oralen Läsionen von FA-Betroffenen diagnostisch Anwendung zu finden und die zytologische Diagnostik bei nur wenigen auffälligen Zellen zu ergänzen. Wahrscheinlich existieren schon Veränderungen in einem genetischen Feld, welche mit der FISH detektiert werden, aber mit der Methode nicht von high-grade OED oder OSCC zu unterscheiden sind. Hierzu bedarf es der Zusammenschau mit dem klinischen Bild.

5 Literaturverzeichnis

1. Silva de Araujo, B.E., et al., *A New Multi-Color FISH Assay for Brush Biopsy-Based Detection of Chromosomal Aneuploidy in Oral (Pre)Cancer in Patients with Fanconi Anemia*. *Cancers* (Basel), 2022. **14**(14): p. 3468.
2. Rosenberg, P.S., H. Tamary, and B.P. Alter, *How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel*. *American journal of medical genetics Part A*, 2011. **155**(8): p. 1877-1883.
3. Auerbach, A.D. and S.R. Wolman, *Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens*. *Nature*, 1976. **261**(5560): p. 494-496.
4. Sasaki, M.S. and A. Tonomura, *A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents*. *Cancer Res*, 1973. **33**(8): p. 1829-1836.
5. Taylor, A.M.R., et al., *Chromosome instability syndromes*. *Nat Rev Dis Primers*, 2019. **5**(1): p. 64.
6. Mehta, P.A. and C. Ebens. *Fanconi Anemia*. *GeneReviews*(®) [Internet] 2002 Feb 14 [Updated 2021 Jun 3] [cited 2024 May 11]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/>.
7. Stenson, P.D., et al., *The Human Gene Mutation Database (HGMD(®)): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting*. *Hum Genet*, 2020. **139**(10): p. 1197-1207.
8. Dokal, I., *The genetics of Fanconi's anaemia*. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 2000. **13**(3): p. 407-425.
9. Schifferli, A., *Fanconi-Anämie*, in *Kompodium Kinderhämatalogie*, T. Kühne and A. Schifferli, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 61-67.
10. Smogorzewska, A., *The Fanconi Anemia DNA Repair Pathway*, in *Fanconi Anemia Clinical Care Guidelines*, L. Frohnmayr, Ravenhorst, S.V., Wirkkula, L., Editor. 2020, Fanconi Anemia Research Fund: Eugene, OR, USA. p. 9-20.
11. Lipton, E., Alter, B., Fiesco-Roa, M., Hirsch, B., McIntyre, K., Olson, S., Tryon, R., Kennedy, J., *Diagnosis of Fanconi Anemia: Testing and Genetic Counseling*, in *Fanconi Anemia Clinical Care Guidelines*, L. Frohnmayr, Ravenhorst, S.V., Wirkkula, L., Editor. 2020, Fanconi Anemia Research Fund: Eugene, OR, USA. p. 21-52.
12. Liu, D., *Fanconi Anemia*, in *Handbook of Tumor Syndromes*. 2020, CRC Press. p. 589-595.
13. Bonfim, C., Cancio, M., Czechowicz, A. *Clinical Care of Fanconi Anemia Hematologic Issues (6th ed.)*. *Fanconi Anemia Clinical Care Guidelines* [Internet] 2023 [cited 2024 Oct 12]; Available from: https://fanconi.org/wp-content/uploads/2024/03/Chapter_3-Hematologic_Issues_July2023.pdf.
14. Kutler, D.I., et al., *A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)*. *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1249-1256.
15. Giulino, L., et al., *Sweet syndrome in patients with Fanconi anaemia: association with extracutaneous manifestations and progression of haematological disease*. *Br J Haematol*, 2011. **154**(2): p. 278-281.
16. Peffault de Latour, R., et al., *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Fanconi anemia: the European Group for Blood and Marrow Transplantation experience*. *Blood*, 2013. **122**(26): p. 4279-4286.
17. Rosenberg, P.S., B.P. Alter, and W. Ebell, *Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry*. *Haematologica*, 2008. **93**(4): p. 511-517.
18. Alter, B.P., *Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001*. *Cancer*, 2003. **97**(2): p. 425-440.
19. Alter, B.P., Fiesco-Roa, M., Rosenberg, P. S., *Non-HNSCC Solid Tumors in Patients with Fanconi Anemia (5th ed.)*, in *Fanconi Anemia Clinical Care Guidelines*, L. Frohnmayr, Ravenhorst, S.V., Wirkkula, L., Editor. 2020, Fanconi Anemia Research Fund: Eugene, OR, USA. p. 79-88.
20. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2019. **69**(1): p. 7-34.
21. Velleuer, E. and R. Dietrich, *Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma*. *Mol Cell Pediatr*, 2014. **1**(1): p. 9.
22. Alter, B.P., et al., *Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up*. *Haematologica*, 2018. **103**(1): p. 30-39.
23. Velleuer, E., et al., *Diagnostic accuracy of brush biopsy-based cytology for the early detection of oral cancer and precursors in Fanconi anemia*. *Cancer Cytopathol*, 2020. **128**(6): p. 403-413.
24. *WHO Classification of Tumours Editorial Board*. 5 ed. *Head and Neck tumours*. 2024, Lyon (France): International Agency for Research on Cancer.

25. Erdmann, F., et al., *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. Robert-Koch-Institut, 2021.
26. Guha, N., et al., *Betel quid chewing and the risk of oral and oropharyngeal cancers: a meta-analysis with implications for cancer control*. International journal of cancer, 2014. **135**(6): p. 1433-1443.
27. Nokovitch, L., et al., *Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma Risk Factors: State of the Art*. Journal of Clinical Medicine, 2023. **12**(9): p. 3264.
28. *Tobacco smoke and involuntary smoking*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2004. **83**: p. 1-1438.
29. Beynon, R.A., et al., *Tobacco smoking and alcohol drinking at diagnosis of head and neck cancer and all-cause mortality: Results from head and neck 5000, a prospective observational cohort of people with head and neck cancer*. International journal of cancer, 2018. **143**(5): p. 1114-1127.
30. Guo, Y., et al., *The relationships among individual and regional smoking, socioeconomic status, and oral and pharyngeal cancer survival: a mediation analysis*. Cancer medicine, 2015. **4**(10): p. 1612-1619.
31. Giraldi, L., et al., *Alcohol and cigarette consumption predict mortality in patients with head and neck cancer: a pooled analysis within the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium*. Annals of Oncology, 2017. **28**(11): p. 2843-2851.
32. Secretan, B., et al., *A review of human carcinogens—Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish*. The lancet oncology, 2009. **10**(11): p. 1033-1034.
33. Paget-Bailly, S., D. Cyr, and D. Luce, *Occupational exposures to asbestos, polycyclic aromatic hydrocarbons and solvents, and cancers of the oral cavity and pharynx: a quantitative literature review*. International archives of occupational and environmental health, 2012. **85**: p. 341-351.
34. Homann, N., et al., *Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer*. Carcinogenesis, 2000. **21**(4): p. 663-668.
35. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, *Human papillomaviruses*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1995. **64**: p. 1.
36. IARC, WHO, *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. 2005, Lyon, France: IARC.
37. Woo, S.-B., *Oral epithelial dysplasia and premalignancy*. Head and neck pathology, 2019. **13**(3): p. 423-439.
38. Warnakulasuriya, S., et al., *Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer*. Oral diseases, 2021. **27**(8): p. 1862-1880.
39. Mello, F.W., et al., *Prevalence of oral potentially malignant disorders: a systematic review and meta-analysis*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2018. **47**(7): p. 633-640.
40. Aguirre-Urizar, J.M., I. Lafuente-Ibáñez de Mendoza, and S. Warnakulasuriya, *Malignant transformation of oral leukoplakia: systematic review and meta-analysis of the last 5 years*. Oral Diseases, 2021. **27**(8): p. 1881-1895.
41. Iocca, O., et al., *Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype*. Head & neck, 2020. **42**(3): p. 539-555.
42. Holmstrup, P., *Oral erythroplakia—What is it?* Oral diseases, 2018. **24**(1-2): p. 138-143.
43. Hertrampf, K., Kunkel, M. *S2k-Leitlinie (Langversion), Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde*. 2010 Mar [updated 2019 Sep] [cited 2024 May 19]; Available from: <https://www.dgzmk.de/diagnostik-und-management-von-vorlaeuerlaesionen-des-oralen-plattenepithelkarzinoms-in-der-zahn-mund-und-kieferheilkunde>.
44. Leemans, C.R., P.J.F. Snijders, and R.H. Brakenhoff, *The molecular landscape of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(5): p. 269-282.
45. Tomasetti, C., L. Li, and B. Vogelstein, *Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention*. Science, 2017. **355**(6331): p. 1330-1334.
46. Tomasetti, C. and B. Vogelstein, *Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions*. Science, 2015. **347**(6217): p. 78-81.
47. Brierley, J.D., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. 8 ed. 2017: John Wiley & Sons.
48. Smeets, S., et al., *P215 TP53 mutations are associated with a particular pattern of genomic imbalances in head and neck squamous cell carcinoma*. Oral Oncology Supplement, 2007. **1**(2): p. 196.

49. *Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas.* Nature, 2015. **517**(7536): p. 576-582.
50. Tabor, M.P., et al., *Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications.* Clinical Cancer Research, 2001. **7**(6): p. 1523-1532.
51. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF). *S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0.* 2021 [cited 2024 Jun 20]; Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mundhoehlenkarzinom/>.
52. Kutler, D.I., et al., *High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2003. **129**(1): p. 106-112.
53. Bschorer, M., et al., *Quality of life and survival rate after primary surgical treatment of oral squamous cell carcinoma: A retrospective study with 18 years of follow-up.* Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 2022. **50**(2): p. 170-177.
54. Singh, B., Greenberger, J., Kutler, D., *Head and Neck Cancer in Patients with Fanconi Anemia (5th ed.)*, in *Fanconi Anemia Clinical Care Guidelines*, L. Frohnmayer, Ravenhorst, S.V., Wirkkula, L., Editor. 2020, Fanconi Anemia Research Fund: Eugene, OR, USA. p. 89-101.
55. Neveling, K., et al., *Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia.* Mutat Res, 2009. **668**(1-2): p. 73-91.
56. Rosenberg, P.S., et al., *Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants.* Blood, 2005. **105**(1): p. 67-73.
57. Webster, A.L., et al., *Fanconi anemia pathway deficiency drives copy number variation in squamous cell carcinomas.* Biorxiv, 2021: p. 2021.08. 14.456365.
58. Walsh, T., et al., *Diagnostic tests for oral cancer and potentially malignant disorders in patients presenting with clinically evident lesions.* Cochrane Database of Systematic Reviews, 2021(7).
59. Maraki, D., J. Becker, and A. Boecking, *Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer.* J Oral Pathol Med, 2004. **33**(7): p. 398-404.
60. Remmerbach, T.W., et al., *Liquid-based versus conventional cytology of oral brush biopsies: a split-sample pilot study.* Clin Oral Investig, 2017. **21**(8): p. 2493-2498.
61. Epstein, J.B., C. Scully, and J. Spinelli, *Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy.* Journal of oral pathology & medicine, 1992. **21**(4): p. 160-163.
62. Chainani-Wu, N., et al., *Toluidine blue aids in detection of dysplasia and carcinoma in suspicious oral lesions.* Oral diseases, 2015. **21**(7): p. 879-885.
63. Bocking, A., *Standardizing extragenital cytological findings.* Pathologe, 1998. **19**(3): p. 235-236.
64. Driemel, O., et al., *Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions.* J Dtsch Dermatol Ges, 2007. **5**(12): p. 1095-1100.
65. Remmerbach, T.W., et al., *[Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas].* Mund Kiefer Gesichtschir, 2004. **8**(4): p. 229-236.
66. Alaizari, N.A., et al., *Meta-analysis of the predictive value of DNA aneuploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders.* J Oral Pathol Med, 2018. **47**(2): p. 97-103.
67. Feulgen, R., Rossenbeck, H., *Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten.* Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, 1924. **135**: p. 203-248.
68. Haroske, G., et al., *Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry.* Anal Cell Pathol, 2001. **23**(2): p. 89-95.
69. Biesterfeld, S., et al., *Polyploidy in non-neoplastic tissues.* J Clin Pathol, 1994. **47**(1): p. 38-42.
70. Bocking, A., F. Giroud, and A. Reith, *Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry.* Anal Quant Cytol Histol, 1995. **17**(1): p. 1-7.
71. Haroske, G., et al., *1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation.* European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol, 1998. **17**(4): p. 189-200.

72. Giroud, F., et al., 1997 *ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance*. European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol, 1998. **17**(4): p. 201-208.
73. Deutsche-Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. *Add-on Screening, Mundkrebsvorsorge bei Patient*innen mit Fanconi-Anämie*. 2022 [cited 2024 May 18]; Available from: <https://fanconi.de/scc/>.
74. Hartmann, E., *Diagnostische Treffsicherheit der oralen Bürstenbiopsie makroskopisch auffälliger, insbesondere neoplasieverdächtiger Läsionen*, in Medizinische Fakultät. 2021, Heinrich-Heine-Universität: Düsseldorf. p. 81.
75. Halling, K.C. and B.R. Kipp, *Fluorescence in situ hybridization in diagnostic cytology*. Hum Pathol, 2007. **38**(8): p. 1137-1144.
76. Savic, S. and L. Bubendorf, *Common Fluorescence In Situ Hybridization Applications in Cytology*. Arch Pathol Lab Med, 2016. **140**(12): p. 1323-1330.
77. Albertson, D.G., et al., *Chromosome aberrations in solid tumors*. Nat Genet, 2003. **34**(4): p. 369-376.
78. Savic, S. and L. Bubendorf, *[Fluorescence in situ hybridization. A new diagnostic dimension in cytology]*. Pathologe, 2007. **28**(5): p. 384-392.
79. Sokolova, I.A., et al., *The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine*. J Mol Diagn, 2000. **2**(3): p. 116-123.
80. Dorji, T., et al., *Gain of hTERT: a genetic marker of malignancy in oral potentially malignant lesions*. Hum Pathol, 2015. **46**(9): p. 1275-1281.
81. Segura, S., et al., *Evaluation of MYC status in oral lichen planus in patients with progression to oral squamous cell carcinoma*. Br J Dermatol, 2013. **169**(1): p. 106-114.
82. Martin-Ezquerria, G., et al., *Multiple genetic copy number alterations in oral squamous cell carcinoma: study of MYC, TP53, CCDN1, EGFR and ERBB2 status in primary and metastatic tumours*. Br J Dermatol, 2010. **163**(5): p. 1028-1035.
83. Poh, C.F., et al., *Unique FISH patterns associated with cancer progression of oral dysplasia*. J Dent Res, 2012. **91**(1): p. 52-57.
84. Taoudi Benchekroun, M., et al., *Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in the risk of oral cancer*. Cancer Prev Res (Phila), 2010. **3**(7): p. 800-809.
85. Martín-Ezquerria, G., et al., *CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B (CKS1B) expression and genetic status analysis in oral squamous cell carcinoma*. Histol Histopathol, 2011. **26**(1): p. 71-77.
86. Woenckhaus, J., et al., *Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma*. J Pathol, 2002. **198**(3): p. 335-342.
87. Schwarz, S., et al., *Losses of 3p14 and 9p21 as shown by fluorescence in situ hybridization are early events in tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma and already occur in simple keratosis*. Cytometry Part A, 2008. **73a**(4): p. 305-311.
88. Silva de Araujo, B.E., et al., *Detection of cytogenetic changes and chromosomal aneuploidy with fluorescent in situ hybridization in cytological specimens of oral cancers in Fanconi anemia-Proof of concept*. Clin Exp Dent Res, 2022. **8**(1): p. 108-116.
89. orphanet. *CCND1 - cyclin D1*. 2024 [cited 2024 11 Oct]; Version 1.0.19:[Available from: <https://www.orpha.net/de/disease/gene/CCND1>].
90. Sherr, C.J., D. Beach, and G.I. Shapiro, *Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy*. Cancer Discov, 2016. **6**(4): p. 353-367.
91. Casimiro, M.C., et al., *Cyclins and cell cycle control in cancer and disease*. Genes Cancer, 2012. **3**(11-12): p. 649-657.
92. orphanet. *TERC - telomerase RNA component*. 2024 [cited 2024 11 Oct]; Version 1.0.19:[Available from: <https://www.orpha.net/de/disease/gene/TERC?name=&mode=name>].
93. Mu, J. and L.X. Wei, *Telomere and telomerase in oncology*. Cell Research, 2002. **12**(1): p. 1-7.
94. orphanet. *MYC - MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*. 2024 [cited 2024 11 Oct]; Version 1.0.19:[Available from: <https://www.orpha.net/de/disease/gene/MYC>].
95. Dang, C.V., A. Le, and P. Gao, *MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(21): p. 6479-6483.
96. Sokolova, I., et al., *Chromosomal biomarkers for detection of human papillomavirus associated genomic instability in epithelial cells of cervical cytology specimens*. J Mol Diagn, 2007. **9**(5): p. 604-611.

97. orphanet. *CDKN2A - cyclin dependent kinase inhibitor 2A*. 2024 [cited 2024 11 Oct]; Version 1.0.19; [Available from: <https://www.orpha.net/de/disease/gene/CDKN2A>].
98. Lim, A.M., et al., *Differential mechanisms of CDKN2A (p16) alteration in oral tongue squamous cell carcinomas and correlation with patient outcome*. *Int J Cancer*, 2014. **135**(4): p. 887-895.
99. Simoneau, M., et al., *Chromosome 9 deletions and recurrence of superficial bladder cancer: identification of four regions of prognostic interest*. *Oncogene*, 2000. **19**(54): p. 6317-6323.
100. Schramm, M., et al., *Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNA-image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis*. *Cancer Cytopathol*, 2011. **119**(3): p. 177-192.
101. DATAtab. *Boxplot*. 2025 [cited 2025 Jun 5]; Available from: <https://datatab.de/tutorial/boxplot>.
102. Landis, J.R. and G.G. Koch, *The measurement of observer agreement for categorical data*. *biometrics*, 1977: p. 159-174.
103. Fluss, R., D. Faraggi, and B. Reiser, *Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point*. *Biometrical Journal: Journal of Mathematical Methods in Biosciences*, 2005. **47**(4): p. 458-472.
104. Abbott Molecular Inc. *UroVysion Bladder Cancer Kit*. 2014 [cited 2024 Dec 22]; Available from: <https://www.molecular.abbott/content/dam/add/molecular/products/oncology/urovysion-bladder-cancer-kit/UroVysion-package-insert-R6---watermark.pdf>.
105. Levy, M.J., et al., *Comparison of methods to detect neoplasia in patients undergoing endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration*. *Gastroenterology*, 2012. **142**(5): p. 1112-1121. e2.
106. Hirshberg, A., et al., *Detection of non-diploid cells in premalignant and malignant oral lesions using combined morphological and FISH analysis—a new method for early detection of suspicious oral lesions*. *Cancer letters*, 2007. **253**(2): p. 282-290.
107. Tabor, M.P., et al., *Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion*. *The American journal of pathology*, 2002. **161**(3): p. 1051-1060.
108. van Houten, V.M., et al., *Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer*. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2002. **198**(4): p. 476-486.
109. Braakhuis, B.J., et al., *A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications*. *Cancer research*, 2003. **63**(8): p. 1727-1730.
110. Chai, H. and R.E. Brown, *Field effect in cancer—an update*. *Ann Clin Lab Sci*, 2009. **39**(4): p. 331-337.
111. Wu, J., et al., *Cancer stem cells are enriched in Fanconi anemia head and neck squamous cell carcinomas*. *Int J Oncol*, 2014. **45**(6): p. 2365-2372.
112. Kim, W.Y., et al., *DNA degradation in liquid-based cytology and its comparison with conventional smear*. *Diagn Cytopathol*, 2016. **44**(5): p. 450-458.
113. Smetzers, S.E., et al., *Noninvasive molecular screening for oral precancer in Fanconi anemia patients*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2015. **8**(11): p. 1102-11.
114. Graveland, A.P., et al., *Loss of heterozygosity at 9p and p53 immunopositivity in surgical margins predict local relapse in head and neck squamous cell carcinoma*. *International journal of cancer*, 2011. **128**(8): p. 1852-1859.
115. Zhang, L., et al., *Loss of heterozygosity (LOH) profiles—validated risk predictors for progression to oral cancer*. *Cancer prevention research*, 2012. **5**(9): p. 1081-1089.

Danksagung

In erster Linie danke ich meinem Erstbetreuer Prof. Biesterfeld und meinem Co-Betreuer Priv.-Doz. Dr. Felsberg, die mir die Dissertation erst ermöglichten und mich stets wohlwollend betreut und unterstützt haben.

Ich danke auch den Mitarbeitern der Cytopathologie und meinem wissenschaftlichen Kollegen Dr. Silva de Araujo für seine Geduld, die Zusammenarbeit und die Bereitschaft, sein Wissen weiterzugeben.

Im Besonderen möchte ich Dr. Schramm danken, der mich stets motivierte und an den Abschluss der Arbeit glaubte. Ich danke ihm für die ganze Zeit, die er sich für mich genommen hat, und für seine Betreuung und Unterstützung.

Ich danke der Deutschen-Fanconi-Hilfe e.V., die mir Einblicke in die Welt der FA-Betroffenen verschaffte und die wissenschaftliche Forschung durch ihren unermüdlichen Einsatz erst ermöglicht.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern und meinem Ehemann danken, die mich in meinem Vorhaben unterstützten, für mich da waren und mich zeitlich entbehrten.