

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

– Plastische Operationen –

der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

*(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. B. Al-Nawas)*

Einfluss von *Candida albicans* auf die maligne Transformation von  
Plattenepithel, ein Mausmodell

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der

Zahnmedizin der Universitätsmedizin der

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Dr. med. Philipp Günther Norbert Matheis

aus Berlin

Mainz, 2023

---

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Promotionsdatum: 15. Mai 2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>II</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion</b>	<b>2</b>
2.1 Die Mundhöhle und das orale Mikrobiom	2
2.2 Chronische Infektionen der Mundhöhle	4
2.2.1 Karies, Parodontitis und Periimplantitis	4
2.2.2 Humane Papillomviren	6
2.2.3 Orale Candidiasis	6
2.3 Vorläuferläsionen	8
2.3.1 Oraler Lichen planus	8
2.3.2 Orale Leukoplakie	10
2.3.3 Graft-versus-host-disease	11
2.4 Das orale Plattenepithelkarzinom	12
2.5 Orale Infektionen und Karzinogenese	13
2.6 Biomarker in der Diagnostik des OSCC	14
2.7 Zusammenfassung und Fragestellung/Hypothese	16
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1 Tierversuchsmodell und Gewinnung der Gewebeproben	18
3.2 Versuchstiere, Geräte, Lösungen und Reagenzien	20
3.3 Aufbereitung der Gewebeproben	22
3.4 Histologische Auswertung	24
3.5 Statistische Auswertung	25
3.6 Histologische Beurteilung der HE-Färbung	25

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>26</b>
4.1 Histologische Auswertung	26
4.2 Auswertung der Candida-Kolonisierung	30
<b>5 Diskussion</b>	<b>31</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>36</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>37</b>
<b>Danksagung</b>	<b>49</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>50</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<i>C. albicans</i>	Candida albicans
<i>C. dubliniensis</i>	Candida dubliniensis
<i>C. famata</i>	Candida famata
<i>C. glabrata</i>	Candida glabrata
<i>C. parapsilosis</i>	Candida parapsilosis
<i>C. tropicalis</i>	Candida tropicalis
<i>P. aeruginosa</i>	Pseudomonas aeruginosa
<i>P. gingivalis</i>	Pophyromonas gingivalis
4NQO	4-Nitroquinolon-1-Oxid
Als	Agglutinin-like sequence
APC	Antigen-präsentierenden Zellen
aqua dest	Destilliertes Wasser
°C	Grad Celsius
ca	circa
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DMBA	7,12-Dimethylbenzo(1)anthracen
DAN/DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-mesenchymale Transkription
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
g	Gramm
GLOBOCAN	The Global Cancer Observatory
GVHD	Graft-versus-host disease
GKS3b	Glykogensynthase-Kinase-3-beta
h	Stunde
HE	Hämatotoxylin
HPV	Humanes Papillomvirus
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
IARC	International Agency for Research on Cancer
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NF- κB	Nukleärer Faktor κB
MALDI-MS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry
mg	Milligramm
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
OL	orale Leukoplakie
OLL	orale lichenoidale Läsion
OLP	oraler Lichen planus

OSCC	orales Plattenepithelkarzinom (oral squamous cell carcinoma)
PA	chronische Parodontitis
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PP	positive population
pH	pH-Wert
PVL	proliferative verruköse Leukoplakie
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
SI	staining intensity
SIN	intraepitheliale Neoplasie (squamous intraepithelial neoplasia)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 HE Färbung SIN 0	29
Abbildung 2 HE Färbung SIN I	29
Abbildung 3 HE Färbung SIN II	30
Abbildung 4 HE Färbung SIN III	30
Abbildung 5 HE Färbung OSCC	30
Abbildung 6: Verdünnungsreihe auf Chromagar zum Nachweis der Besiedlung (qualitativ)	31
Abbildung 7: Verdünnungsreihe auf Chromagar zum Nachweis der Höhe der Besiedlung (quantitativ)	31

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung verschiedener Biomarker	16
Tabelle 2: Darstellung der Versuchsgruppen und Therapie	19
Tabelle 3: Auflistung der Versuchstiere	20
Tabelle 4: Auflistung der Laborgeräte	21
Tabelle 5: Auflistung der Lösungen und Reagenzien	22
Tabelle 6: Histologische Auswertung der Wangen-Präparate nach Untersuchungszeitraum U1-U4	26
Tabelle 7: Histologische Auswertung der Wangen-Präparate nach Gruppenzugehörigkeit G1-G4	27
Tabelle 8: Histologische Auswertung der Wangen-Präparate nach Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit	27
Tabelle 9: Histologische Auswertung der Zungen-Präparate nach Untersuchungszeitraum U1-U4	28
Tabelle 10: Histologische Auswertung der Zungen-Präparate nach Gruppenzugehörigkeit G1-G5	28
Tabelle 11: Histologische Auswertung der Zungen-Präparate nach Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit	29
Tabelle 12: Quantitative Auswertung der Candida-Kolonisierung	31
Tabelle 13: Quantitative Auswertung der Candida-Kolonisierung in Gruppe	31



# Einleitung

Das Mundhöhlenkarzinom rangiert auf Platz 6 der weltweit häufigsten Krebsarten (2). Aufgrund dieser Häufigkeit bedarf es einer Verbesserung der Diagnostik, der Therapie und somit des Verständnisses dieser Erkrankung. Das orale Plattenepithelkarzinom und seine Vorläuferläsionen sind mit einer Reihe von Risikofaktoren wie Nikotinkonsum, chronischem Alkoholabusus und reduzierter Mundhygiene vergesellschaftet. Eine mikrobielle Infektion kann ebenfalls einen Risikofaktor zur Entwicklung eines oralen Plattenepithelkarzinoms darstellen (3). In einigen Studien konnte bereits erfolgreich der Einfluss von *Candida albicans* (*C. albicans*) auf die Entstehung von oralen Plattenepithelkarzinomen gezeigt werden (4, 5). Der Einfluss einer Infektion mit *C. albicans* auf die Mundhöhle zeigt sich unter anderem durch eine Aktivierung von Proto-Onkogenen, einer Induktion von DNA Schäden und der vermehrten Expression von inflammatorischen Signalwegen (6). Diese Mechanismen können schließlich zur Entwicklung einer Atrophie, Hyperplasie oder zu intraepithelialen Neoplasien führen (7). Es existieren eine Reihe von Mundschleimhauterkrankungen, die einen Bezug zu einer oralen Candida-Besiedelung besitzen. Hierzu zählen der orale Lichen planus, die orale Leukoplakie und die Graft-versus-Host Disease (8). Ob eine beginnende Besiedelung mit Hefepilzen bereits ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms darstellt ist derzeit Gegenstand der Forschung (9). Der genaue Mechanismus und die zugrunde liegende Stoffwechselveränderung auf Zellebene ist nach aktuellem Stand nicht vollständig geklärt (10). Als Biomarker werden molekulare Signaturen und Indikatoren von normalen biologischen Prozessen, pathologischen Prozessen oder pharmakologischen Antworten bezeichnet, die wertvolle Informationen über Diagnose, Verlauf und Prognose einer Erkrankung enthalten können (11). In der vorliegenden Dissertation wurde anhand eines Mausmodells der Einfluss einer chronischen Infektion auf die maligne Transformation von oralem Plattenepithel untersucht. Aus den gewonnenen Ergebnissen können neue Erkenntnisse der Rolle von *C. albicans* bei der malignen Transformation von Vorläuferläsion gewonnen werden und somit zu einer Verbesserung der Diagnostik und der Therapie des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle beitragen.

# Literaturdiskussion

## 2.1 Die Mundhöhle und das orale Mikrobiom

Die Mundhöhle nimmt im Verdauungstrakt eine besondere Rolle ein. Zum einen finden sich dort Zähne und Hartgewebe, zum anderen imponiert die orale Mukosa durch eine große Vielfalt. Es findet sich auskleidende (Mundboden, Wange, Weichgaumen), mastikatorische (Gingiva, Hartgaumen) und spezialisierte Mundschleimhaut (Zunge) (12). Obwohl die gesamte orale Mukosa von einer Schicht Plattenepithel überzogen ist, existieren Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen. Auskleidende Mundschleimhaut ist von nicht-keratinisiertem Epithel bedeckt, während die mastikatorische Mundschleimhaut von keratinisiertem Epithel bedeckt wird. Die Oberfläche der spezialisierten Mukosa enthält eine Vielzahl von Papillen und ist daher als komplex anzusehen (13).

Als Mikrobiom wird eine Zusammensetzung von Bakterien, Viren, Bakteriophagen, Pilzen und Archaeen bezeichnet, welche die menschliche Haut und Mukosa des Gastrointestinal, Respirations- und Urogenitaltraktes kolonisieren (14). Das orale Mikrobiom ist mit einer Anzahl von 50 bis 100 Milliarden Mikroorganismen ein komplexes Gebilde. Bereits im 17. Jahrhundert konnte der Niederländer Antoni van Leeuwenhoek in seinem eigenen Zahnbelag Mikroorganismen lichtmikroskopisch nachweisen. Seither haben sich eine Vielzahl von Mikroorganismen aus verschiedenen Bereichen der Mundhöhle erfolgreich isolieren und charakterisieren lassen (15). Bevorzugte Regionen der mikrobakteriellen Kolonisation sind der Hart- und Weichgaumen, die Zähne, die Lippe, die Wangen und die Tonsillen (16). Darüber hinaus lassen sich Mikroorganismen in hoher Zahl im menschlichen Speichel nachweisen. Insgesamt lassen sich etwa 700 verschiedene kommensale und opportunistische Bakterien, Viren und Pilze in der menschlichen Mundhöhle nachweisen (17, 18). Wobei der größte Teil dieser Mikroorganismen kein Pathogen darstellt und zur natürlichen Mikroflora der Mundhöhle gezählt werden kann. Das Gleichgewicht dieser Mikroflora kann durch bestimmte Einwirkungen oder Ereignisse, wie medikamentöse Therapien oder Eingriffe in der Mundhöhle, aus dem Gleichgewicht gebracht werden und so die typische Zusammensetzung verändert werden. Eine Kolonisation der Mundhöhle mit bestimmten Bakterien ist mit oraler

Gesundheit oder bestimmten Erkrankungen vergesellschaftet. Hierzu gehören Karies, Parodontitis, endodontische Läsionen, Halitosis oder odontogene Infektionen (19) .

Ein wichtiger Bestandteil des oralen Mikrobioms stellt das orale Mykobiom zur Repräsentation verschiedener Pilzgattungen dar (20). Verglichen mit der bakteriellen Komponente des oralen Mikrobioms machen Pilze nur einen geringen Anteil (< 0,1%) aus (21). Obwohl in den letzten Jahren eine große Anzahl an Studien zur Untersuchung von Pilzinfektion und der Pathogenese dieser Erkrankungen stattgefunden hat, gibt es nur eine unzureichende Datenlage über die Funktion und Biologie dieser Spezies als Teil der kommensalen Mikroflora. Genetisches Material von Pilzen ist oft schwierig zu isolieren und eine Kultivierung aufwendig oder nicht möglich (22). So findet sich beispielsweise in Wildtyp-Mäusen unter Laborbedingungen kein *C. albicans* in der transienten oder residenten Mundflora (23). Trotz allem konnten bisher mehr als 75 verschiedene Pilzspezies, mit *Candida*, *Cladosporien* und *Aspergillen* als häufigste Spezies, in 25-75% der Individuen innerhalb der Mundhöhle nachgewiesen werden (24). Findet sich in gesunden Individuen vornehmlich *C. albicans*, so können in Patienten mit einer Immunsuppression auch andere non-*albicans* *Candida* Spezies wie *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*), *Candida famata* (*C. famata*), *Candida glabrata* (*C. glabrata*), *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*) oder *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) nachgewiesen werden (25, 26). Obgleich der Anteil am oralen Mikrobiom gering sein mag, ist der Anteil der Zellmasse bei Pilzen verhältnismäßig hoch. Dies liegt unter anderem an der Zellgröße und der Fähigkeit der Hyphenbildung. Zusätzlich stimulieren Pilze als Eukaryonten das Immunsystem des Wirtes stärker als prokaryontische Bakterien (22). Die aktuelle Datenlage legt eine entscheidende Bedeutung von Pilzen auf die Entwicklung eines gesunden Immunsystems nahe (27). Dieser relativ große Einfluss einer verhältnismäßig kleinen Anzahl von Pilzen betont das immunologische Potential dieser Lebewesen (28).

## 2.2 Chronische Infektionen der Mundhöhle

### 2.2.1 Karies, Parodontitis und Periimplantitis

Als Karies wird eine Biofilm-vermittelte, kohlenhydrat-gesteuerte und dynamische Erkrankung bezeichnet, die zu einer phasischen Demineralisierung und Remineralisierung des dentalen Hartgewebes führt (29). Der Ursprung ist multifaktoriell. Hierbei spielen das Vorkommen acidogener Bakterien, die Speichelzusammensetzung und ein Konsum kurzkettiger Kohlenhydrate eine entscheidende Rolle (30). Karies ist eine chronische Erkrankung des Kindes- und Erwachsenenalters mit einer hohen Prävalenz von etwa 2,4 Milliarden Patienten weltweit (31). Unbehandelt führt die Infektion zu einer Zerstörung von Zahnhartsubstanz mit der möglichen Folge einer Pulpabeteiligung und schweren entzündlichen Prozessen der gesamten Mundhöhle. Dies kann in funktionalen, ästhetischen und psychologischen Problemen der betroffenen Patienten münden (32). Dem Entstehungsmechanismus liegt eine Fermentierung von Kohlenhydraten durch endogene Bakterien zugrunde. Hier sind vor allem die Gruppe der Streptokokken (*Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus*) und der Laktobazillen zu nennen (33). Die Kolonisation der Mundhöhle mit diesen Bakterien erfolgt dabei in den meisten Fällen im Kindesalter durch eine Übertragung im Rahmen sozialer Kontakte (34).

Die chronische Parodontitis (PA) geht mit einer chronischen Inflammation des Zahnhalteapparates einher und gehört zu den Krankheiten mit der weltweit häufigsten Prävalenz (35). Zu den prädisponierenden Faktoren gehören Plaqueanreicherung, ungünstiger Zahnstand, Nikotinabusus, Ernährungsgewohnheiten, Diabetes Mellitus, Alter sowie genetische Alterationen (36). Es besteht eine Assoziation zwischen der PA und einem erhöhtem Risiko der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und verschiedenen Karzinomen (37, 38). Ein Zusammenhang von PA und der Entwicklung eines oralen Plattenepithelkarzinoms (Oral Squamous cell carcinoma = OSCC) wird derzeit kontrovers diskutiert. Einige Studien konnten in der Vergangenheit bereits einen Bezug der beiden Erkrankungen zeigen (39, 40). Das erhöhte Aufkommen von Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) und *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) im Rahmen einer PA führen zu einer erhöhten Aktivierung von Signaltransduktionen die eine Zelltransformation induzieren (41, 42). Hierzu gehört

unter anderem eine Aktivierung des Nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und Matrix-Metalloproteasen (MMP), die bei der Karzinogenese und Metastasierung eine wichtige Rolle einnehmen (43, 44). *P. gingivalis* steigert darüber hinaus die unkontrollierte Aktivität der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Glykogensynthase-Kinase-3-beta (GSK3b), MMP-9 oder Vimentin (45). Für *F. nucleatum* könnte dieser Zusammenhang bereits in Darmepithelzellen erfolgreich dargestellt werden (46). Stellt die EMT physiologischerweise einen Teil der Wundheilung dar, kann eine unkontrollierte Aktivität zu einer malignen Transformation beitragen (47). Eine systemische Ausbreitung von Parodontitis-assoziierten Bakterien findet in den meisten Fällen polymikrobiell statt. Während ein synergistischer Effekt auf die Ätiologie der Parodontitis bereits hinreichend in der Literatur beschrieben ist, findet sich im Falle der malignen Entartung des Epithels der Mundschleimhaut nur eine unzureichende Datenlage (48).

Die Periimplantitis beschreibt einen inflammatorischen Prozess im Bereich von dentalen Implantaten, der sowohl Weich- als auch Hartgewebe betrifft und mit einem progressiven Knochenverlust vergesellschaftet ist (49). Die Ätiologie der Periimplantitis ist als multifaktoriell anzusehen. So spielen neben mikrobiellen Faktoren auch chirurgische, prothetische und genetische Faktoren ebenso wie werkstoffkundliche Einflüsse eine wichtige Rolle in der Entstehung dieser Erkrankung. Auch wenn die Periimplantitis Ähnlichkeiten zur Parodontitis aufweist, scheinen die Entitäten der Erkrankungen teilweise unterschiedlicher Natur zu sein (50). So zeigen Studien eine unterschiedliche Zusammensetzung des dentalen Biofilmes bei der Parodontitis im Vergleich zum dentalen Biofilm der Periimplantitis (51, 52). Während die Parodontitis ein erhöhtes Aufkommen enterischer Mikroorganismen zeigt, konnte bei der Periimplantitis ein vermehrtes Aufkommen von *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) und *C.albicans* nachgewiesen werden (53).

Die chronische Entzündung der weichgeweblichen Umgebung eines Implantates führt nach initialer Mukositis zu einer chronisch inflammatorischen Reaktion, welche in einer Reabsorption des Knochens mündet (54). Eine Persistenz dieser Inflammation kann zu einer Induktion der Zellproliferation und schlussendlich zu einer Aktivierung von Onkogenen und einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen (55). Diese genetische Instabilität erhöht das Risiko einer malignen Entartung (56). Die Frage nach

einer spezifischen periimplantären Karzinogenese scheint zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt (57).

### **2.2.2 Humane Papillomviren**

Humane Papillomviren sind kleine unbehüllte DNA-Viren, die für Infektionen des oralen Plattenepithels und der Entwicklung von Läsionen verantwortlich sind (58). Es sind mehr als 150 verschiedene Subtypen dieser Virusfamilie bekannt. Allerdings werden nur einige dieser Viren als "high-risk HPV" klassifiziert. Diese Hochrisikoviren können nachweislich maligne Läsionen auslösen (59). Bereits 1983 gelang der Nachweis einer Infektion mit HPV in Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen (60). Die Übertragung erfolgt dabei durch sexuellen Kontakt. Die Prävalenz von HPV in der Mundhöhle in der adulten Bevölkerung beträgt zwischen 2-8%, wobei der Subtyp HPV-16 der am häufigsten detektierte Typ ist (61). Eine Immunschwäche und ein Nikotinabusus erhöhen die Wahrscheinlichkeit und die Persistenz einer HPV-Infektion (62).

HPV-16 ist stark mit oropharyngealen Karzinomen vergesellschaftet, wobei sich die größere Anzahl der HPV-assoziierten Karzinome im Bereich des Pharynx befindet (63). Die Prävalenz von HPV-16 in oropharyngealen Karzinomen reicht in der aktuellen Literatur von 10-25%, wobei die Tendenz steigend ist (64, 65). Die HPV-Onkogene E6 und E7 spielen in der Karzinogenese eine große Rolle, da sie für eine Inhibierung des Proteins p53 sowie des Retinoblastom-Proteins verantwortlich sind und somit eine Tumorsuppression verhindern (66). Eine immunhistochemische Färbung zur Bestimmung von p16 wird derzeit als Marker für eine HPV-Infektion in Mundhöhlenkarzinomen verwendet, da HPV-assoziierte Karzinome p16 verstärkt exprimieren (67).

### **2.2.3 Orale Candidiasis**

Candidaspezies, allen voran *C. albicans*, stellen mit 70% den größten Teil des menschlichen Mykobioms dar (68). Als Pathobionten besitzen sie die Fähigkeit pathogen zu werden, sobald eine Veränderung der lokalen Umweltbedingungen stattfindet (69). Dies kann ein verändertes Immunsystem des Wirtes, ein dysbiotisches Mikrobiom oder eine Veränderung der Ernährungsgewohnheiten sein. *C. albicans* ist

für den größten Teil der Kolonisationen aber auch der Infektionen verantwortlich. Eine stärkere Besiedelung geht mit einem höheren Risiko einher, dass aus einer asymptomatischen Infektion eine symptomatische Infektion entsteht (70). In gesunden Patienten führt eine Infektion mit *C. albicans* in der Regel zur Ausbildung oberflächlicher Infektion der Mundschleimhaut mit geringer Morbidität. Diese oberflächlichen Infektionen können in seltenen Fällen zu einer systemischen Candidiasis führen. Hiervon sind vor allem Patienten mit medizinisch komplexen und invasiven Eingriffen wie Katheterisierung der zentralen Gefäße oder Transplantationen betroffen. Diese systemischen Candidainfektionen gehören zu den häufigsten nosokomialen Infektionen und besitzen eine erhöhte Mortalität von 45-75% (71).

Physischer Kontakt und Adhäsion sind essentiell für eine Interaktion von *C. albicans* mit dem Epithel des Wirts. Dieser Prozess wird durch pilzeigene Adhäsine wie der Agglutinin-like sequence (Als) Familie in Interaktion mit unterschiedlichen Rezeptoren [epidermal growth factor receptor (EGFR) und E-Cadherin] der Wirtszelle vermittelt (72). Nach erfolgter Adhäsion von *C. albicans* kommt es zu einer Detektion von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) durch die Epithelzellen und so zu einer zellulären Antwort (73). Anschließend bildet *C. albicans* Hyphen, die zur weiteren Invasion des Epithels dienen. Die Fähigkeit von *C. albicans* zwischen unterschiedlichen Morphologien zu wechseln stellt einen wichtigen Virulenzfaktor dar und wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht (74). Vor allem die Hyphenbildung scheint eine wichtige Rolle bei der Pathogenese zu spielen. Die Invasion geschieht auf zwei unterschiedlichen Wegen. Bei der induzierten Endozystose kommt es zu einer Interaktion zwischen pilzeigenen Proteinen und Cadherinen sowie EGFR (75). Die aktive Penetration ist eine Folge des Hyphenwachstums, welche die Zellen der Epithelmembran verdrängen, und zu einer möglichen Verletzung der Zellmembran führt (76). Obwohl die Zellen des oralen Epithels zwischen einer Kolonisation und Invasion durch *C. albicans* unterscheiden können und die inflammatorische Immunantwort stärker oder schwächer ausfällt, ist nur wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen bekannt (77).

Eine Einteilung der oralen Candidainfektion erfolgt nach Axell et al. in primäre und sekundäre Formen (78). Zu den vier primären oralen Candidainfektionen gehören die akute erythematöse Candidiasis, die chronische erythematöse Candidiasis, die chronisch hyperplastische Candidiasis, die akute pseudomembranöse Candidiasis, die akute pseudomembranöse Candidiasis und die chronische pseudomembranöse

Candidiasis (79). Ferner werden die Candida-assoziierten Läsion (Cheilitis angularis, mediane rhomboide Glossitis und Prothesenstomatits) zu den primären oralen Candidainfektionen gezählt. Die sekundären oralen Candidainfektion umfassen Infektionen auf dem Boden einer systemischen Candidiasis.

## **2.3 Vorläuferläsionen**

### **2.3.1 Oraler Lichen planus**

Der orale Lichen planus (OLP) ist eine chronisch, inflammatorische Erkrankungen der Mundschleimhaut mit charakteristischen Rückfall- und Remissionsphasen (80). Die geschätzte Prävalenz in der adulten Bevölkerung beträgt 0,5 bis 2%, wobei Frauen mittleren und höheren Alters am häufigsten betroffen sind (81). Genitaler und kutaner Lichen planus treten in ca. 20 und 15% der Patienten mit OLP auf (82). Während kutane Läsionen des Lichen planus oftmals selbstlimitierend sind, stellen sich orale Läsionen oft chronisch und als Morbiditätsquelle dar (83). Die Diagnose eines OLP wird in der Regel durch eine klinische und histopathologische Diagnostik ggf. in Kombination mit einer Immunfluoreszenz gestellt. In seltenen Fällen ist bei einem charakteristischen Verteilungsmuster der Läsionen eine rein klinische Diagnose möglich (84). Die Diagnose eines OLP kann allerdings durch eine Vielzahl oraler lichenoider Läsion (OLL) mit ähnlichem Erscheinungsbild erschwert sein. Zu diesen OLL gehören die lichenoiden Kontaktreaktionen, lichenoiden Arzneimittelreaktionen und die lichenoiden Graft-versus-host-disease (85). So können bestimmte systemisch wirksame Medikamente wie einzelne Antihypertensiva, orale Antidiabetika oder nichtsteroidale Antiphlogistika die Entwicklung lichenoider Reaktion begünstigen (86). Darüber hinaus spielen dentale Restaurationsmaterialien wie Amalgam, Gold oder Nickel bei der Entwicklung eine Rolle (87). Die Pathophysiologie dieser Erkrankung ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Es wird von einer theoretischen Interaktion CD8-zytotoxischen T-Lymphozyten und CD4-T-Helferzellen ausgegangen. Vermittelt wird diese Interaktion durch ein spezielles Oberflächenmolekül auf den CD8-zytotoxischen T-Lymphozyten (88). Hierdurch kommt es zu einer Zerstörung der epithelialen Basalmembran, die über weitere Destruktion bis zur Apoptose reichen kann (89).



Die häufigste Lokalisation des OLP ist die bukkale Mukosa. Als typisch gilt ein bilaterales, symmetrisches Verteilungsmuster der Wangenschleimhaut. Eine Lokalisation im Bereich des restlichen Mukosa ist ebenfalls möglich. Zu den weiteren Lokalisationen des OLP gehören die Zunge, die Gingiva, und die labiale Mukosa (90). Nach Andreasen werden sechs Subtypen des OLP unterschieden. Zu ihnen gehören die retikuläre, die papuläre, die plaqueförmige, die atrophische, die erosive und die bullöse Form des OLP (91). Die retikuläre sowie die erosive Form zeigen dabei die größte Häufigkeit (82). Die klinischen Zeichen und Symptome des OLP können stark variieren. Die Patienten berichten über Mundtrockenheit, erhöhte Sensibilität der Mukosa gegenüber scharfem Essen, rötliche und weiße Flecken sowie Ulzerationen der Mundschleimhaut (84). Der OLP ist durch Perioden von Remission und Wiederaufflammen gekennzeichnet. In Perioden der Exazerbation stellt sich eine Verstärkung der Symptome und klinischen Zeichen ein, während die Symptome in Ruhephasen der Erkrankung in deutlich abgeschwächter Form gefunden werden. Die Studie von Karbach et al. konnte zeigen, dass Patienten mit einer symptomatischen Form des OLP eine deutliche Reduzierung der Lebensqualität aufweisen (92). Das histopathologische Erscheinungsbild zeigt eine Degeneration der Basalzellen, mit Lymphozyteninfiltraten und Histiocyten in bandförmiger Anordnung im Bereich der superfiziellen Lamina propria. Dies führt im Bereich des Epithels zu einer sägezahnartigen Ausfransung der Papillen und einer Hyperkeratose. Zusätzlich finden sich Erosionen und Ulzerationen (89).

Die Therapie des OLP richtet sich nach Form und Ausprägung der Symptome. Die Therapie sollte mit dem Ziel einer Behandlung erosiver und ulzerierender Läsion, einer Linderung der Begleitsymptome und der Reduzierung des Risikos einer malignen Transformation durchgeführt werden (93). Eine Optimierung der Mundhygiene mittels professioneller Zahnreinigung und ggf. Parodontitistherapie kann zu einer Besserung der Symptomatik führen. Topische und systemische Glukokortikoide sowie topische Calcineurin-Inhibitoren können je nach Symptomatik ebenfalls zum Einsatz kommen (94). Das Risiko einer malignen Transformation liegt im Bereich von 1,5%, wobei die erosive Form des OLP das größte Potential einer malignen Entartung zeigt (84). Zu den Risikofaktoren eines erhöhten Nikotin- und Alkoholkonsums wird eine mögliche Rolle von *C. albicans* in Zusammenhang mit maligner Transformation diskutiert (95).

### 2.3.2. Orale Leukoplakie

Als orale Leukoplakie (OL) wird nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) "eine weißliche Veränderung der Mundschleimhaut mit fraglichem Entartungsrisiko nach Ausschluss anderer Krankheiten oder Störungen, die ein erhöhtes Risiko einer malignen Entartung besitzen" definiert (96). Leukoplakie ist ein klinischer Begriff der typischerweise nach histologischen Untersuchungen modifiziert wird. Die OL ist differentialdiagnostisch gegen andere Erkrankungen wie den OLP, Lupus erythematoses, lichenoiden Reaktionen, orale Candidiasis oder Morsicatio buccarum abzugrenzen (96). Die Prävalenz der OL liegt zwischen 1,5 und 2,6% bei einer Gleichverteilung auf beide Geschlechter (97). Die Ätiologie der OL ist nicht vollständig geklärt. Allerdings bestehen ähnliche Risikofaktoren zur Entwicklung einer OL wie bei der Entwicklung eines Mundhöhlenkarzinoms. Hierzu zählen Nikotinabusus, Alkoholkonsum, Betelnusskonsum, ein erhöhtes Alter und ultraviolette Strahlung (98). Klinisch erfolgt eine Unterscheidung der OL in zwei Formen. Bei der homogenen OL finden sich flache, einheitlich weiße Veränderung mit gut abgrenzbaren Rändern. Die inhomogene Form der OL zeichnet sich durch Erytheme in möglicher Kombination mit Knoten oder verrukösen Arealen aus (99). Eine spezielle Form der inhomogenen OL ist die proliferative verruköse Leukoplakie (PVL), welche Frauen ohne positive Nikotinanamnese häufiger betrifft (100). Die Diagnose einer OL erfolgt auf der Grundlage einer klinischen Untersuchung zum Ausschluss anderer Mundschleimhauterkrankungen. Eine histologische Untersuchung sollte zur erweiterten Diagnostik durchgeführt werden, wobei an großflächigen Leukoplakien oder PVL mehrere Biopsien zur Beurteilung der unterschiedlichen Dysplasiegrade erfolgen sollten (101).

Das Risiko einer malignen Entartung unterscheidet sich auf Basis der zugrundeliegenden OL. Homogene Formen haben ein Risiko von 1 bis 5% der malignen Transformation während inhomogene Formen ein erhöhtes Risiko von 20 bis 25% besitzen (102). Die PVL hat aufgrund ihres aggressiven Verlaufs ein Entartungsrisiko von über 50% (103). Die maligne Transformation des Epithels führt von einer Hyperkeratose oder Hyperplasie über verschiedene Grade der Dysplasie schließlich zu einem Carcinoma in situ oder einem OSCC (96). Nach der Ljubljana-Klassifikation der epithelialen Vorläuferläsion werden squamöse, gering-, mittel- und hochgradige Dysplasien sowie das Carcinoma in situ unterschieden. Die

Vorläuferläsion des OSCC werden nach WHO-Klassifikation in drei unterschiedliche Grade squamöser intraepithelialer Neoplasien (SIN) zusammengefasst.

### **2.3.3 Graft-versus-host-disease**

Die Graft-versus-host disease (GVHD) ist eine Komplikation der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) und die führende Ursache von Morbidität und nicht rezidivbezogener Mortalität nach einer HSCT (104). Die Erkrankung kann in akute und chronische Verläufe unterteilt werden. Die chronische GVHD betrifft ca. 50% der adulten Patienten mit einer HSCT in der Anamnese (105). Die GVHD kann als alloimmuner Zustand beschrieben werden. Die T-Zellen des Spenders reagieren dabei gegen Antigene, die auf Gewebe des Empfängers präsentiert werden (106). Eine Unterteilung in vier Schweregrad erfolgt dabei aufgrund von Symptomen und klinischen Zeichen, wobei ein erhöhter Schweregrad prognostisch ungünstig ist (107). Patienten mit einer chronischen GVHD zeigen eine orale Beteiligung mit einer Prävalenz von 44-83% (108). Klinisch erfolgt die Diagnose aufgrund der speziellen Anamnese und der klinischen Einschätzung des behandelnden Arztes (109). Dabei zeigen Patienten mit einer oralen GVHD lichenoiden, erythematöse oder ulzerierende Veränderungen der Mundschleimhaut (110). Papillenathropie, Sklerosierungen der Lippen und Xerostomie sind mögliche Symptome der oralen Manifestation einer GVHD und ähneln dem Bild eines OLP oder einer OL (111). Eine basale Therapie der GVHD existiert derzeit nicht. Vielmehr zielt die Therapie auf eine Reduzierung der immunbasierten Schäden an Endorganen und symptombezogene Behandlung ab. Therapie der oralen GVHD umfasst in den meisten Fällen die topische Anwendung hochdosierter Kortikosteroide und Calcineurininhibitoren (112). Das histopathologische Erscheinungsbild zeigt Hyperkeratosen, submuköse lymphozytäre Infiltrationen und basale Zellapoptosen und Degeneration (113). Hierbei spielt die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) durch allogene Stammzellen eine entscheidende Rolle (114). APC führen ihrerseits zu einer Aktivierung von CD8-zytotoxischen T-Lymphozyten und CD4-T-Helferzellen mit der Folge einer inflammatorischen Reaktion, die zum oben beschriebenen klinischen und histologischen Erscheinungsbild führt (115).

Aufgrund der genetischen Instabilität der Mukosazellen besteht bei Patienten mit einer GVHD ein 2-4fach erhöhtes Risiko einer malignen Transformation (116). Dabei erhöht sich das Risiko je länger die HSCT zurückliegt. Das Risiko einer Malignomentwicklung beträgt 1% nach 10 Jahren und 2,2% nach 15 Jahren (117). Dabei stellen Plattenepithelkarzinome der Haut und der Mundhöhle etwa ein Drittel aller Sekundärtumore dar. Von diesen Fällen sind etwa 50% OSCC (118). Grundsätzlich kann die gesamte Mundhöhle betroffen sein, wobei sich die häufigsten Tumore im Bereich der bukkalen Mukosa und der Zunge befinden (119).

## **2.4 Das orale Plattenepithelkarzinom**

Das Mundhöhlenkarzinom ist eines der am weltweit häufigsten vorkommenden Karzinome (2). Aktuellen Statistiken zufolge ist es geschlechterübergreifend das sechshäufigste Karzinom, wobei es bei Männern das elft- und bei Frauen das neunzehnthäufigste Karzinom darstellt (11). Daten der Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) aus dem Jahr 2018 zufolge liegt die Inzidenz von Neuerkrankungen von Lippen-, Mundhöhlen- und Pharynxkarzinomen bei 354,864 gemeldeten Fällen mit einer Todesfallzahl von 177,384 (120). Nach Analyse der Daten vergangener Jahre zeigte sich eine globale Inzidenz (auf 100.000 Personen) von 5.5 beim männlichen und 2.5 beim weiblichen Geschlecht (121). Allerdings findet aufgrund eines zunehmenden Konsums von Alkohol und Tabak bei Frauen eine Annäherung dieser Inzidenz statt (122). Die Mortalitätsrate für Lippen- und Mundhöhlenkarzinome ist in Entwicklungsländern höher als in Industrienationen. Hiervon sind vor allem Frauen betroffen (123). In Europa findet es sich an elfter Position der Krebs-bezogenen Todesfälle (124). Die geschätzte Mortalitätsrate lag bei 5.1 in Mittel- und Osteuropa wohingegen die Mortalitätsrate in Nordeuropa bei 1.6 lag. Diesem Unterschied liegen sozioökonomische Faktoren auf der einen, aber auch limitierte Versorgungsmöglichkeiten und Komorbiditäten auf der anderen Seite zugrunde (121, 125). Obwohl in den letzten Jahren eine kontinuierliche Verbesserung der chirurgischen Techniken und Möglichkeiten sowie Alternativtherapien wie Radio- und Chemotherapie stattgefunden hat, welche die Lebensqualität der Patienten verbessert hat, bleibt die Mortalität dieser Erkrankung konstant (2).

Das orale Plattenepithelkarzinom ist das häufigste Mundhöhlenkarzinom, da es mit über 90% den größten Anteil an Malignomen der Mundhöhle stellt (126). Das

Mundhöhlenkarzinom ist eine vermeidbare Krankheit. Bei über 90% der Fälle findet sich ein Nikotin- oder Alkoholkonsum als Risikofaktor in der Anamnese (127). Durch Nikotinkonsum steigt das Risiko der Entwicklung eines Mundhöhlenkarzinoms um das Dreifache (128). Zigarettenrauch schwächt die Immunität der Mundhöhle und führt durch Entstehung verschiedener Kanzerogene zu einer Störung der DNA-Synthese und somit zu Mutationen (129). Alkoholkonsum führt über eine Erhöhung der Permeabilität sowie einer Atrophie der Mukosa ebenfalls zu einer gestörten DNA-Synthese. Hinzu kommt ein systemischer Effekt, der über eine Hepatotoxizität zu einer verminderten Immunität gegen Infektionen und Neoplasien führt (130). Ein simultaner Abusus von Nikotin und Ethanol führt zu einer Synergie der beschriebenen Karzinogenese (131).

Als Goldstandard in der Therapie des OSCC gilt weiterhin ein chirurgisches Vorgehen, welches ggf. mit einer adjuvanten Radiatio oder Chemotherapie kombiniert werden kann (132). Aufgrund dieser komplexen therapeutischen Ansätze ist die Therapie des OSCC mit hohen ökonomischen Kosten auf der einen und einer tiefgreifenden, oft radikalen, Therapie auf der anderen Seite verbunden (133). Die Symptome eines Mundhöhlenkarzinoms können nachhaltige Sprach- und Schluckstörungen, Störungen der Kaufunktion, B-Symptomatik und Schmerzen beinhalten (134). Ein Großteil der Patienten wird erst in einem fortgeschrittenen Stadium (III-IV) der Erkrankung diagnostiziert (135). Dies hat Auswirkungen auf die 5-Jahresüberlebensrate, die in einem höheren Stadium bei unter 50% liegt (136). Die lymphogene Metastasierung spielt neben der Tumorgröße eine entscheidende Rolle für die Überlebensrate. Demnach kommt der Früherkennung und somit der rechtzeitigen Kontrolle möglicher Vorläuferläsion eine wichtige Rolle zu (137).

## **2.5 Orale Infektionen und Karzinogenese**

Eine Infektion mit dem Humanen Papillomvirus (HPV) wird als Risikofaktor zur Entwicklung eines Mundhöhlenkarzinoms beschrieben (138). Die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) klassifiziert HPV16 als Auslöser für die Entwicklung eines Mundhöhlen – oder Pharynxkarzinoms und HPV18 als möglichen Auslöser für die Entwicklung eines Mundhöhlenkarzinoms. Eine HPV-Diagnostik hat sich als prognostischer Biomarker in der Therapie des Mundhöhlen- und Pharynxkarzinoms etabliert (139). Bakterielle Infektionen gehören zu den häufigsten

Ursachen einer chronischen Inflammation, die über eine Zellproliferation, Aktivierung von Onkogenen und Angiogenese zur Entwicklung eines Karzinoms führen kann (140). Die Rolle von *C.albicans* als unabhängiger Risikofaktor zur Entwicklung eines OSCC wurde bereits in der Vergangenheit untersucht (4). Es besteht ein Zusammenhang zwischen *C.albicans* und der Entstehung von OL als präkanzeröse Läsion (141). Die Mehrheit der inhomogenen Leukoplakien, die durch *C. albicans* besiedelt werden, besitzen ein höheres Entartungspotential als die homogenen Leukoplakien (142). Diese Besiedelung findet auf dem Boden eines Ungleichgewichts von Virulenzfaktoren der Hefepilze und der Abwehrmechanismen des Wirtes statt (143). Es findet sich eine höhere Kolonisation von *C. albicans* der Mundhöhle in Patienten mit einem OSCC als in Patienten ohne Karzinom (4, 144). Eine höhere Dichte von *C.albicans* könnte demnach zu einer malignen Transformation von Leukoplakien zu epithelialen Dysplasien führen (145).

## **2.6 Biomarker in der Diagnostik des OSCC**

Veränderungen im Bereich der Gensequenz, der Expression oder der Proteinstruktur sind mit nahezu jeder Art von Karzinom vergesellschaftet. Das Verständnis der komplexen Vorgänge auf zellulärer und molekularer Ebene ist gegenwärtiger Teil der Forschung. Als Biomarker können unterschiedliche Moleküle oder Kombinationen von Molekülen fungieren. Dies beinhaltet DNA, RNA, Peptide, Proteine, Kohlenhydrate und verschiedene Metaboliten (146). Diese Biomarker können in Flüssigkeiten, Geweben oder Zelllinien detektiert werden (147). Biomarker können bei der Diagnostik und Therapie von Patienten in unterschiedlichen klinischen Settings verwendet werden. Sie können zur Einschätzung eines Krankheitsrisikos, zum Screening okkulten Primärkarzinome, der Differenzierung von malignen und benignen Läsionen, als prognostischer Faktor und zur Einschätzung von Therapieerfolgen genutzt werden (148). So haben sich eine Vielzahl von Biomarkern im Therapieregime vieler maligner Erkrankungen als Standarddiagnostik durchgesetzt (149). Verschiedene Methoden der Genomik und Proteomik haben die Anzahl der Biomarker in den letzten Jahren beträchtlich erhöht. Eine multiparallele Analyse von Genen und Proteinen spielt eine entscheidende Rolle bei der Suche neuer potentieller Biomarker (147). So könnten beispielsweise Proteine, die von Tumoren und deren Mikroumgebung sezerniert oder

exprimiert werden, in das Kreislaufsystem gelangen und diese Expression dann detektiert werden (150).

Die Differenzierung der verschiedenen Expressionsprofile von Tumorgewebe und präkanzerösen Läsionen mit unterschiedlichen Dysplasiegraden sind ein Gebiet aktueller Forschung. Der zugrundeliegende Prozess, der einer Transformation von einer Vorläuferläsion zu einem OSCC vorausgeht, könnte durch verschiedene Biomarker verstanden und ggf. detektiert werden (151). Tumorgewebe ist eine verlässliche Quelle für Tumor-Biomarker. Eine Fixierung durch Formalin und die anschließende Einbettung Paraffin (FFPE) hat sich im klinischen Alltag für die histologische Analyse und andere Gewebediagnostik bewährt, da diese Art der Fixierung die zelluläre Integrität meist unberührt lässt (152). Hierdurch bietet FFPE-Gewebe die Möglichkeit einer Zuführung zu weiteren diagnostischen Verfahren wie der Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry (MALDI-MS), die eine Detektion zahlreicher Biomoleküle direkt am Gewebe ermöglicht (153). In den letzten Jahren wurden so eine große Zahl möglicher Biomarker untersucht. Einige mit geringem, andere mit größerem Erfolg (154).

Tatsächlich können histologisch ähnliche Tumore einen klinisch unterschiedlichen Verlauf nehmen und sprechen divers auf die durchgeführten Therapien an. Dies könnte an einer molekularen Heterogenität von Tumoren liegen (155). Im Folgenden findet sich eine tabellarische Auflistung einiger relevanter Biomarker und ihrer Rolle in der Entstehung von Neoplasien:

Biomarker	Biologischer Prozess	Zusammenhang mit Neoplasien
ALDH1A1	Ethanol Oxidation	Schlüsselrolle in der Regulation von Stammzellen (156)
AMFR	Bewegung von Zell- und Subzellularkomponenten	Tumorstimulation, wird durch Tumorzellen exprimiert (157)
CCND1	Zellzyklus	Deregulierung in Krebszellen, Marker zur Progression (158)
CDH1	Zelladhäsion	Ein Verlust führt zu einer Progression maligner Entartung (157)
CRP	Inflammatorische Antwort	Patienten mit einer erhöhten CRP Baseline haben ein größeres Risiko zu versterben (159)
CXCL8	Angiogenese	Stimuliert eine Neoangiogenese im Bereich der Tumorumgebung (160)

CYR61	Wachstumsregulation und Zelladhäsion	Mögliche Funktion als Onkogen oder Suppressor, je nach Karzinom (161)
EGFR	Positive Regulation der Zellproliferation	Signifikante Überexpression in Karzinom des Kopf-Halsbereiches (162)
FAS	Apoptose	Ein Expression fördert Tumorwachstum und die Entstehung von Metastasen (163)
HIF1A	Angiogenese,	Hochregulation von Proteinen die Angiogenese und anaeroben Metabolismus stimulieren (164)
HPV16	Hochrisiko HPV	Wichtiger diagnostischer Faktor bei Entwicklung von oropharyngealen Tumoren in der Gruppe der Nichtraucher (165)
IL4R	Immunsystem und Zellproliferation	Signalweg mit verstärkter Expression in epithelialen Neoplasien (166)
Ki67	Zellzyklus, Zellproliferation	Marker für die Wachstumsfraktion (167)
MYC	Positive Regulation der Zellproliferation	Für die Genomstabilität durch Regulation entarteter Zellen verantwortlich (168)
(T)p53	Zellzyklus	Tumorsuppression, Mutation kommen in einer Vielzahl von Karzinomen vor (157)
PDPN	Lymphangiogenese	Wichtiger Marker zur Identifizierung von vaskulären endothelialen Neoplasien (169)
PTK2	Angiogenese	Induziert eine Tumorprogression (170)
pRB	Zellzyklus	Tumorsuppression, Defekte führen zu einer Vielzahl an Karzinomen (157)
VEGF	Regulation der Angiogenese	Überexpression in Karzinom des Kopf-Halsbereiches (171)
Vimentin	Bewegung von Zell- und Subzellularkomponenten	Marker epithelial-mesenchymale Übergang. Wird von Krebszellen oder umgebenden Zellen exprimiert (172)

Tabelle 1: Darstellung verschiedener Biomarker

## 2.7 Zusammenfassung und Fragestellung/Hypothese

Das orale Mikrobiom spielt eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Normflora der Mundhöhle (173). Eine Störung dieser Mikroflora kann zu Veränderung im Bereich der Mukosa führen. Eine Besiedelung mit fakultativ pathologischen Mikroorganismen kann die Integrität der oralen Mukosa so stark beeinträchtigen, dass es zu akuten und chronischen Infektionen kommt, die zu Neoplasien oder malignen Transformationen des Epithels führen können. Der OLP



und die OL werden als prämaligene Läsionen bezeichnet. Diese sind aufgrund ihres klinisch ähnlichen Erscheinungsbildes nur schwer von der GVHD abzugrenzen. Die Wahrscheinlichkeit einer malignen Transformation ist abhängig von Verlauf und Schweregrad der zugrundeliegenden Erkrankungen. Trotz Weiterentwicklung von Therapie und Diagnostik des OSCC hat sich die Mortalitätsrate dieser Erkrankung in den letzten Jahren kaum verändert. Eine rechtzeitige Früherkennung spielt demnach eine entscheidende Rolle um die Mortalitätsrate zu senken und die Prognose der betroffenen Patienten zu verbessern. Aktuelle Forschungsergebnisse stützen die These, dass Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze an der malignen Transformation auf dem zum OSCC beteiligt sein könnten (174). Es existieren nur wenige Daten zur Rolle von Candidainfektion in malignen Entartungsprozessen. Zur Analyse der komplexen Stoffwechselfvorgänge stehen eine Vielzahl von diagnostischen Verfahren auf biochemischer oder molekular-genetischer Ebene zur Verfügung, die neue Erkenntnisse über die Beteiligung verschiedener Taxa an der Karzinogenese beisteuern könnten.

Diese Arbeit untersucht die Fragestellung, ob eine Besiedlung der oralen Mukosa mit *C. albicans* die maligne Transformation einer intraepithelialen Neoplasie zum Plattenepithelkarzinom im Mausmodell beeinflusst.

# Material und Methoden

## 3.1 Tierversuchsmodell und Gewinnung der Gewebeproben

Um ein aussagekräftiges Urteil über den Einfluss oraler Candidasiedelung auf eine mögliche Tumorentstehung des OSCC zu erhalten erfolgte zunächst die Implementierung eines Modells zur Karzinogenese sowie eines Modells zur Candidainfektion. Vor der Durchführung wurde zunächst ein positives Votum des Tierschutzbeauftragten des Landes Rheinland-Pfalz nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes eingeholt (G 16-1-014). Der Pilotversuch auf deren Grundlage die folgende Arbeit durchgeführt wurde, ist in der Habilitation von Frau Priv.-Doz. Dr. Dr. Julia Heider beschrieben. Zur Auslösung einer Dysplasie bis hin zum Karzinom der Mundschleimhaut wurden die Versuchstiere über einen Zeitraum von 16 Wochen einer oralen Applikation von 7,12-Dimethylbenzo(1)anthracen (DMBA) durch Bepinselung der Mundschleimhaut ausgesetzt. Eine entsprechende karzinogene Wirkung von DMBA auf das orale Plattenepithel konnte bereits erfolgreich in anderen Studien gezeigt werden (175). Es wurde ein Intervall von jeweils drei Applikation von 40µg DMBA (0,5%) pro Woche festgelegt. Als Lösungsmittel des DMBA wurde Sonnenblumenöl verwendet.

Eine orale Besiedlung mit *Candida* sollte mittels einem modifiziertem Protokoll nach Takakura et al. (176) erreicht werden. Hierzu erfolgte eine Immunsuppression der Versuchstiere mit Dexamethason. Den Tieren wurde zweimal wöchentlich die Dosis von 37,5 µg Dexamethason intraperitoneal injiziert. Um die orale bakterielle Normalflora der Mäuse zu reduzieren wurde dem Trinkwasser der Tiere Tetrazyklin beigemischt. Die Dosierung lag bei 0,83 mg/ml. Die angebotene Wassermenge wurde hierbei auf 150ml pro 24h pro Tier festgesetzt. Wobei ein Wechsel des Wassers dreimal wöchentlich stattfand. Um eine möglichst hohe Rate an Candidabesiedelung zu erreichen wurde zu Beginn des Versuchs eine Inkubation der Mundhöhle mit *Candida* vorgenommen. Hierzu wurden die Versuchstiere in einer 20 bis 30-minütigen Kurznarkose mittels Ketamin /Xylazin und 160µl Rompun 2% sediert und anschließend mit *C. albicans* inkubiert (DSMZ Nr. 70014, 10<sup>7</sup> KBE). Anschließend sah das Protokoll

## Material und Methoden

---

dreimal wöchentlich eine Bepinselung der Mundschleimhaut mit der Candidasuspension (DSMZ Nr. 70014,  $10^7$  KBE) vor.

Der Tierversuch wurde mit sechs bis acht Wochen alten weiblichen Balb/c Mäusen durchgeführt. Das Gesamtkollektiv betrug 160 Tiere wobei die Stärke der einzelnen Versuchsgruppen jeweils 40 Tiere betrug. Die Tiere der einzelnen Versuchsgruppen wurden in Untergruppen zu jeweils 4 Tieren unterteilt und entsprechend ihrer Untergruppe zusammen in einem Käfig gehalten. Um das Risiko einer Kontaktkontamination zu verringern erfolgten die oben beschriebenen Abläufe unter besonderen Schutzmaßnahmen. So wurden Atemschutzmasken und Nitril Handschuhe verwendet. Die Opferung der Versuchstiere wurde nach 4,8,12 und 16 Wochen durchgeführt. Hier wurden pro Gruppe 10 Tiere geopfert. Die Versuchsgruppen teilten sich wie folgt auf: in der Kontrollgruppe (G1) erhielten die Tiere keinerlei Therapie. Die Tiere der Gruppe 2 (G2) erhielten wie weiter oben beschrieben eine Bepinselung der Mundschleimhaut mit Candida sowie die intraperitoneale Injektion von Dexamethason und die Gabe von Tetrazyklintrinkwasser. Die Gruppe 3 (G3) erhielt dreimal wöchentlich eine Bepinselung der Mundschleimhaut mit DMBA sowie die intraperitoneale Injektion von Dexamethason und die Gabe von Tetrazyklintrinkwasser. In der Gruppe 4 (G4) erfolgte eine Bepinselung mit Candidasuspension und DMBA sowie die Gabe von Dexamethason und Tetrazyklintrinkwasser. In wöchentlichen Intervallen wurden die Versuchstiere gewogen. Hierbei zeigte sich über gesamte Versuchszeit ein stabiles Gewicht von 18-21g.

Gruppe	Therapieform
G1 (Kontrollgruppe)	Keine Therapie
G2 (Candida)	Candidasuspension 3x wöchentlich + Dexamethason 2x wöchentlich + Tetrazyklintrinkwasser
G3 (DMBA)	DMBA 3x wöchentlich + Dexamethason 2x wöchentlich + Tetrazyklintrinkwasser
G4 (DMBA + Candida)	DMBA 3x wöchentlich Candidasuspension 3x wöchentlich + Dexamethason 2x wöchentlich + Tetrazyklintrinkwasser

**Tabelle 2: Darstellung der Versuchsgruppen und Therapie**

Die Opferung der Tiere wurde unter Kurznarkose mit 120mg/kg Ketamin + 16mg/kg KG Xylazin auf 10ml NaCl verdünnt durchgeführt. Hierbei wurde initial durch eine Punktion des Herzens ein Ausbluten herbeigeführt und anschließend eine

Durchtrennung des zervikalen Rückenmarks mittels Luxation der Halswirbelkörper durch ein kräftiges Strecken des Körpers bei fixiertem Kopf vorgenommen. Den Versuchstieren wurden Proben aus der Mundschleimhaut, der Zunge, der Speicheldrüsen, des Herzens, der Lunge, des Darms, der Milz und den Nieren entnommen. Die erste Probe wurde zur histologischen Aufbereitung fixiert, während eine zweite Probe in einem Kryoröhrchen durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde.

### 3.2 Versuchstiere, Geräte, Lösungen und Reagenzien

Versuchstier / Spezies	Art / Anbieter
Maus	Balb/c Maus weiblich, Janvier Lab, Frankreich

Tabelle 3: Auflistung der Versuchstiere

Gerät	Hersteller / Modell
Atenschutzmasken	High risk Maske HiSY, Niosh, Taiwan
Bildanalyse Software	BZ-II Analyser (Keyence BZ-9000, Keyence Corporation, New Jersey, USA)
Einbettkassette	Einbettkassette, Kabe Labortechnik, Deutschland
Homogenisator	SpeedMill plus analytikjena, Jena, Deutschland
Homogenisierungsröhrchen	innuSPEED Lysis Tube E Röhrchen, analytikjena, Jena, Deutschland
Käfig	Einmalkäfige PES 2/14, Zoonlab, Deutschland
Kryoröhrchen	Kryoröhrchen Thermo, Fisher Scientific, USA
Mikroskop	Keyence BZ-9000, Keyence Corporation, New Jersey, USA

## Material und Methoden

Mikrotom	Reichert-Jung Mikrotom 2030 Biocut Microtome, Leica Deutschland
Nitril Handschuhe	Supremo Nitril, Microflex, Niederlande
Objektträger	Superfrost® Objektträger, Menzel- Gläser, Deutschland
Photospektrometer	Nanodrop 1000 peclab, Deutschland
RT-PCR Maschine	CFX 96® Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad GmbH, Deutschland

Tabelle 4: Auflistung der Laborgeräte

Lösung / Reagenz	Hersteller / Inhaltsstoffe
Antikörper Verdünnlösung	Antibody Diluent DAKO Diagnostics, Hamburg, Deutschland
cDNA Synthese Kit	iScript cDNA synthesis Kit, BioRad Laboratories GmbH, Deutschland
DAB	3,3´-Diaminobezidin DAKO Diagnostics, Hamburg, Deutschland
Dexamethason	Dexa-ratiopharm 8mg 10 Ampullen in jeweils 2ml Injektionslösung Ratiopharm, Deutschland
Eindeckmedium	Eukitt® Flukar analytical, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Ethanol 70% vergällt, Carl Roth, Deutschland
Formalin	Roti®-Histofix 4,5% (säurefrei pH7, phosphatgepuffert) Carl Roth, Deutschland
Hämalaun	Hämalaun Merck, Deutschland
Ketamin	200µl Ketanest (100mg/ml), zoetis, Deutschland
Monoklonaler E-Cadherin-Antikörper	Clone number M168, Isotype IgG1, abcam® plc, Cambridge UK

## Material und Methoden

Monoklonaler Vimentin-Antikörper	Clone number EPR3776, Isotype IgG, abcam® plc, Cambridge UK
NaCl	NaCl 0,9% Fresenius, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Peroxidase	EnVision Detection POD/DAB-Kit, DAKO Diagnostics, Hamburg, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung	Apotheker der Universitätsmedizin Mainz, Deutschland
Polyklonaler Ki67 Antikörper	Ab15580, Isotype IgG, abcam® plc, Cambridge UK
Qiagenkit	Total RNA Kit, Hilden, Köln, Deutschland
Sekundärintikörper	HRP anti-Rabbit markiertes Polymer EnVision® + System-HRP (DAB) Kit, k4010, DAKO Diagnostics, Hamburg, Deutschland
Tetrazyklin	Tetracyclin Hydrochlorid, Calbiochem, USA
Xylazin	Rompun 2% Bayer Vital GmbH, Deutschland
Xylol	Roti®-Histol, Carl Roth, Deutschland

Tabelle 5: Auflistung der Lösungen und Reagenzien

### 3.3 Aufbereitung der Gewebeprobe

Die Fixierung der Organproben erfolgte mittels Formalin in einer speziellen Einbettkassette. Die Einbettkassetten wurden entsprechend der Gruppe, des Tieres und der enthaltenden Organprobe beschriftet. Die Einbettung in Paraffin wurde durch einen Einbettautomaten durchgeführt. Die Einbettung verlief hierbei nach einem festgelegten Programm:

- Entwässerung unter Raumlufttemperatur:
  - 1 x Formaldehyd 4,5% für 40 min.
  - 1 x Ethanol 70% für 60 min.
  - 2 x Ethanol 96% für 60 min.
  - 1 x Ethanol 100% für 60 min.
  - 3 x Ethanol 100% für 90 min.
- Intermedium:
  - 1x Xylol für 60 min. bei Raumtemperatur
  - 1x Xylol für 90 min. bei 45°C
- Einbettung:
  - 1 x Paraffin für 3x 60 min. bei 65 °C
  - 1 x Paraffin für 30 min. bei 65°C

Nach der Einbettung wurden mit einem Mikrotom Schnitte in einer Schichtdicke von 3-4µm erstellt, anschließend luftgetrocknet und aufbewahrt. Es folgte eine Einfärbung der Schnitte mittels Hämatoxylinfärbung (HE) sowie eine Einfärbung mittels Periodic acid-Schiff reaction (PAS) zur verbesserten Möglichkeit der Auswertung. Die Arbeitsschritte lauteten wie folgt:

- Entparaffinierung:
  - 3 x Xylol für 5 min.
  - 2 x 100% Alkohol für 5 min.
  - 1 x 96% Alkohol für 5 min.
  - 1 x 70 % Alkohol für 5 min.
  - 1 x 50% Alkohol für 5 min.
  - 1 x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) für 20 min.

Anschließend folgten die speziellen Färbungen:

- HE-Färbung:
  - 1 x Hämalan 1:10 für 5 min.

- 1 x Leitungswasser fließend für 10 min.
  - 1 x Eosin für 2min.
  - 1 x Aqua dest.
  - 1 x 70% Alkohol
  - 1 x 96 % Alkohol
  - 1x Alkohol 100% für mind. 5 min.
  - 1x Xylol für 10 min.
  - Eindeckung Eukitt
- 
- PAS-Färbung:
    - 1 x Perjodsäure 1% für 10 min.
    - 1 x Leitungswasser fließend für 10 min.
    - 2 x Aqua dest. Für 2 min.
    - 1 x Schiffs Reagenz für 15 min.
    - 1 x Leitungswasser fließend warm für 5 min.
    - 1 x Aqua dest.
    - 1 x Hämalan für 5 min.
    - 1x Leitungswasser fließend für 10 min.
    - 1 x aufsteigende Alkoholreihe 70%, 96%, 100%
    - 1 x Xylol für 10 min.
    - Eindecken Eukitt

### **3.4 Histologische Auswertung**

Die Begutachtung der angefertigten in Paraffin eingebetteten Schnitte erfolgte durch einen unabhängigen Pathologen (Prof. Dr. T. Hansen, Institut für Pathologie, Klinikum Lippe). Hierbei wurden die Schnitte lichtmikroskopisch untersucht und anhand der vorliegenden Dysplasiegrade eingeteilt. Die Einteilung wurde auf der Grundlage der WHO Einteilung von 2005 (177) in SIN I-III vorgenommen. Im Falle eines manifesten OSCC erfolgte die weitere histopathologische Differenzierung anhand des Gratings in die Grade 1-4. Das Grading des Tumors hat einen klaren Einfluss auf die Prognose. Mit steigendem Grading nimmt die Prognose ab. Als G1 werden gut differenzierte Karzinome bezeichnet. Die Stufen G2 und G3 bezeichnen mäßig bzw.



schlecht differenzierte Karzinome. Ein Grading der Stufe 4 ist durch eine fehlende Differenzierung gekennzeichnet. Darüber hinaus wurde der Befall der Lymphgefäße (L0 = ohne Befall; L1 mit Befall), der Venen (V0 = ohne Befall; V1 = mit Befall) sowie der Perineuralscheide (P0 = kein Befall; P1 = mit Befall) untersucht.

### **3.5 Statistische Auswertung**

Eine erste Erhebung der Daten wurde mittels Excel (Microsoft Office) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine deskriptive Auswertung der erhobenen Daten.

### **3.6 Histologische Beurteilung der HE-Färbung**

Die Beurteilung durch einen unabhängigen Pathologen erfolgte mittels Fisher-Test nach Untersuchungszeitpunkt (U1-U4) sowie der Gruppenzugehörigkeit (G1-G5). Die Beurteilung erfolgte rein deskriptiv.

### **3.7 Auswertung der Candida-Kolonisierung**

Die Beurteilung einer möglichen Candida Kolonisierung bis hin zu einer Infektion erfolgte mittels quantitativer Bestimmung. Hierzu wurde mittels sterilem Wattetupfer eine Speichelprobe der Versuchstiere gewonnen und eine Verdünnungsreihe mit Kochsalzlösung erstellt. Nach Applikation auf eine Agarplatte und einer Bebrütung für 24 bis 48 Stunden erfolgte eine Auszählung (Colycounterm E count, Heathrow scientific, Großbritannien).

# Ergebnisse

## 4.1. Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung der HE-gefärbten Gewebeproben der Wangenschleimhaut zeigte neben unveränderter Mundschleimhaut, Dysplasien verschiedener Grade sowie invasive Karzinome. In Summe zeigten sich unabhängig von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit bei 22 Tieren (13%) keine Dysplasie, bei 73 Tieren (45%) eine SIN I, bei 43 Tieren (27%) eine SIN II, bei 5 Tieren (3%) eine SIN III und bei 5 Tieren (3%) ein invasives Karzinom. 6 (3%) Präparate zeigten in der histologischen Analyse der Schnitte kein Mundschleimhautepithel.

Die histologische Auswertung der Gewebeproben im Hinblick auf den Untersuchungszeitpunkt zeigte eine Verschiebung von dysplasiefreier Mundschleimhaut hin zu intraepithelialen Neoplasien bei voranschreitender Versuchsdauer. Fanden sich in den frühen Untersuchungszeitpunkten U1 und U2 noch Mundschleimhautpräparate ohne nachweisbare Dysplasien, so konnten diese zum spätesten Untersuchungszeitpunkt nicht mehr festgestellt werden. Hier zeigten sich dem gegenüber vermehrt höhergradige intraepitheliale Dysplasien und invasive Karzinome (Tabelle 6).

Untersuchungszeitpunkt	Keine SIN	SIN I	SIN II	SIN III	OSCC	Keine MSH
U1 (39 Tiere)	12 (30%)	23 (57%)	3 (7%)	-	-	1 (2%)
U2 (40 Tiere)	7 (17%)	23 (57%)	7 (17%)	-	-	3 (7%)
U3 (37 Tiere)	3 (7%)	13 (32%)	16 (40%)	4 (10%)	-	1 (2%)
U4 (37 Tiere)	-	14 (35%)	17 (42%)	1 (2%)	5 (12%)	-

**Tabelle 6: Histologische Auswertung der Wangen-Präparate nach Untersuchungszeitraum U1-U4**

Bei der histologischen Auswertung anhand der Gruppenzugehörigkeit zeigten sich Dysplasien bis SIN II in allen Gruppen. Dysplasien Grad SIN III und invasive

## Ergebnisse

Karzinome zeigten sich allerdings nur in den Gruppen G3 (DMBA-Applikation) und G4 (DMBA- und Candida-Applikation).

Gruppe	Keine SIN	SIN I	SIN II	SIN III	OSCC	Keine MSH
G1 (40 Tiere)	8 (20%)	21 (52%)	10 (25%)	-	-	1 (2%)
G2 (40 Tiere)	5 (12%)	19 (47%)	13 (32%)	2 (5%)	-	1 (2%)
G3 (36 Tiere)	3 (7%)	13 (32%)	15 (37%)	1 (2%)	3 (7%)	1 (2%)
G4 (38 Tiere)	4 (10%)	10 (25%)	17 (42%)	3 (7%)	2 (5%)	2 (5%)

**Tabelle 7: Histologische Auswertung der Wangen-Präparate nach Gruppenzugehörigkeit G1-G4**

Die Auswertung bezogen auf Gruppenzugehörigkeit und Untersuchungszeitpunkt zeigte, dass sich höhere Dysplasiegrade und invasive Karzinome zu späteren Untersuchungszeitpunkten und vermehrt in den Gruppen G3 und G4 nachweisen ließen (Tabelle 8).

Untersuchungszeitpunkt	Gruppe	Keine SIN	SIN I	SIN II	SIN III	OSCC	Keine MSH
U1 (40 Tiere)	G1	5 (50%)	5 (50%)	-	-	-	-
	G2	4 (40%)	5 (50%)	1 (10%)	-	-	-
	G3	2 (20%)	7 (70%)	1 (10%)	-	-	-
	G4	1 (10%)	6 (60%)	2 (20%)	-	-	1 (10%)
U2 (40 Tiere)	G1	3 (30%)	6 (60%)	-	-	-	1 (10%)
	G2	1 (10%)	8 (80%)	-	-	-	1 (10%)
	G3	1 (10%)	5 (50%)	4 (40%)	-	-	-
	G4	2 (20%)	4 (40%)	3 (30%)	-	-	1 (10%)
U3 (37 Tiere)	G1	-	5 (50%)	5 (50%)	-	-	-
	G2	2 (20%)	7 (70%)	1 (10%)	-	-	-
	G3	-	1 (10%)	5 (50%)	1 (10%)	-	1 (10%)
	G4	1 (10%)	-	5 (50%)	3 (30%)	-	-
U4 (37 Tiere)	G1	-	5 (50%)	5 (50%)	-	-	-
	G2	-	4 (40%)	5 (50%)	1 (10%)	-	-
	G3	-	-	5 (50%)	-	3 (30%)	-
	G4	-	-	7 (70%)	-	2 (20%)	-

**Tabelle 8: Histologische Auswertung der Wangen-Präparate nach Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit**

Die histologische Auswertung der Schnitte aus den Proben der Zunge zeigte neben unveränderter Mundschleimhaut auch Dysplasien verschiedener Grade. In Summe zeigten sich unabhängig von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit bei 42 Tieren (26%) keine Dysplasie, bei 71 Tieren (44%) eine SIN I und bei 24 Tieren (15%) eine SIN II. Eine SIN III oder ein invasives Karzinom wurden nicht

## Ergebnisse

---

nachgewiesen. 1 (> 1%) Präparat zeigte in der histologischen Analyse der Schnitte kein Oberflächenepithel.

Unter dem Gesichtspunkt des Untersuchungszeitpunktes zeigte sich eine Verschiebung des Dysplasiegrades von einer fehlenden intraepithelialen Neoplasie hin zu höhergradigen Dysplasien SIN II (Tabelle 9).

Untersuchungszeitpunkt	Keine SIN	SIN I	SIN II	SIN III	OSCC	Keine MSH
U1 (32 Tiere)	16 (40%)	16 (40%)	-	-	-	-
U2 (39 Tiere)	17 (42%)	22 (55%)	-	-	-	-
U3 (38 Tiere)	14 (35%)	19 (47%)	4 (10%)	-	-	1 (2%)
U4 (439Tiere)	5 (12%)	14 (35%)	20 (50%)			

**Tabelle 9: Histologische Auswertung der Zungen-Präparate nach Untersuchungszeitraum U1-U4**

In sämtlichen Gruppen wurden sowohl dysplasiefreie Proben als auch Proben mit höhergradigen Dysplasien bis SIN II gefunden. Es bestand kein Einfluss auf die Gruppenzugehörigkeit und histologische Beurteilung der Gewebeproben (Tabelle 10).

Gruppe	Keine SIN	SIN I	SIN II	SIN III	OSCC	Keine MSH
G1 (38 Tiere)	17 (42%)	16 (40%)	5 (12%)	-	-	-
G2 (38 Tiere)	9 (22%)	22 (55%)	6 (15%)	-	-	1 (2%)
G3 (34 Tiere)	9 (22%)	17 (42%)	8 (20%)	-	-	-
G4 (38 Tiere)	17 (42%)	16 (40%)	5 (12%)	-	-	-

**Tabelle 10: Histologische Auswertung der Zungen-Präparate nach Gruppenzugehörigkeit G1-G5**

## Ergebnisse

In Bezug auf Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit zeigten sich höhergradige Dysplasien erst zu einem späteren Zeitpunkt. Hier jedoch unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit (Tabelle 11).

Untersuchungszeitpunkt	Gruppe	Keine SIN	SIN I	SIN II	SIN III	OSCC	Keine MSH
U1 (32 Tiere)	G1	5 (50%)	3 (30%)	-	-	-	-
	G2	3 (30%)	5 (50%)	-	-	-	-
	G3	3 (30%)	5 (50%)	--	-	-	-
	G4	5 (50%)	3 (30%)	-	-	-	-
U2 (39 Tiere)	G1	5 (50%)	5 (50%)	-	-	-	-
	G2	4 (40%)	6 (60%)	-	-	-	-
	G3	3 (30%)	6 (60%)	-	-	-	-
	G4	5 (50%)	5 (50%)	-	-	-	-
U3 (38 Tiere)	G1	6 (60%)	3 (30%)	1 (10%)	-	-	-
	G2	1 (10%)	7 (70%)	1 (10%)	-	-	1 (10%)
	G3	1 (10%)	6 (60%)	1 (10%)	-	-	-
	G4	6 (60%)	3 (30%)	1 (10%)	-	-	-
U4 (39 Tiere)	G1	1 (10%)	5 (50%)	4 (40%)	-	-	-
	G2	1 (10%)	4 (40%)	5 (50%)	-	-	-
	G3	2 (20%)	-	7 (70%)	-	-	-
	G4	1 (10%)	5 (50%)	4 (40%)	-	-	-

Tabelle 11: Histologische Auswertung der Zungen-Präparate nach Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit

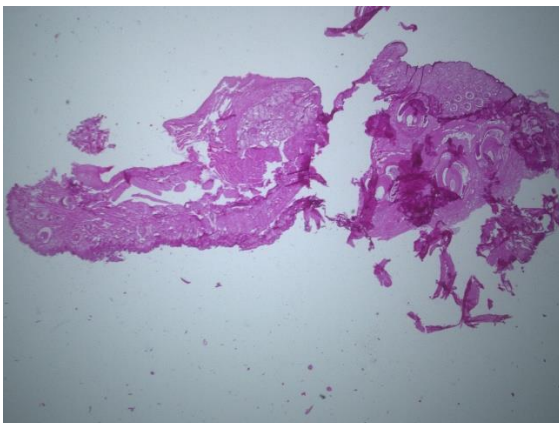


Abbildung 1: HE Färbung SIN 0  
(Wange 20-fache Vergrößerung)

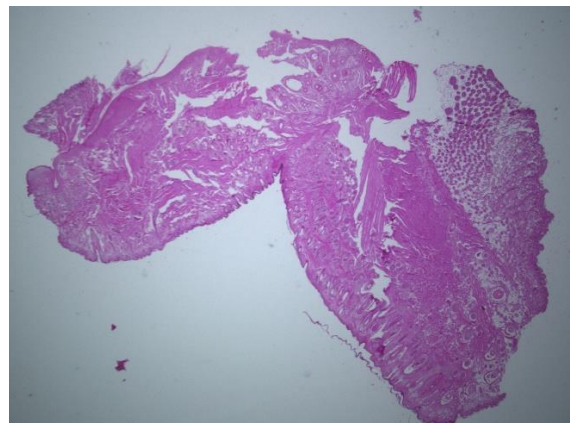


Abbildung 2: HE Färbung SIN I  
(Wange 20-fache Vergrößerung)

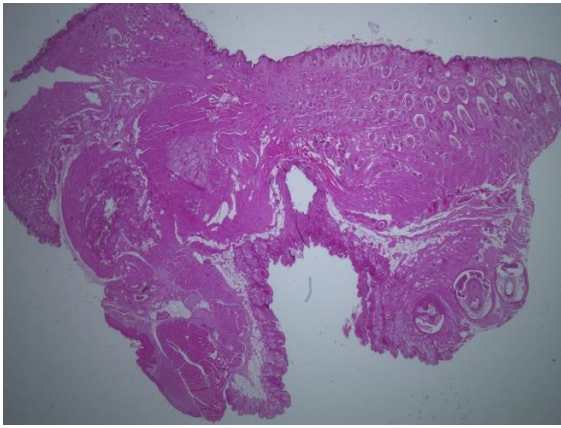


Abbildung 3: HE Färbung SIN II  
(Wange 20-fache Vergrößerung)

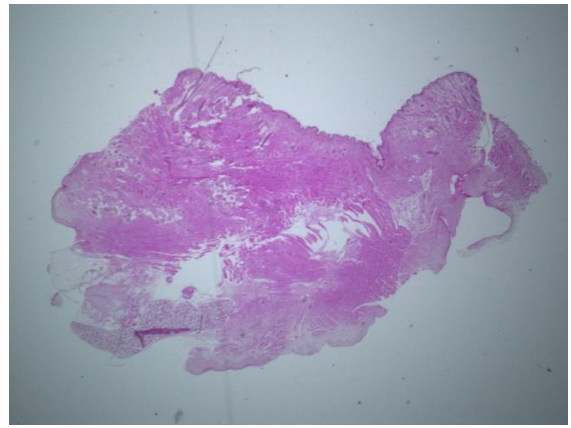


Abbildung 4: HE Färbung SIN III  
(Wange 20-fache Vergrößerung)

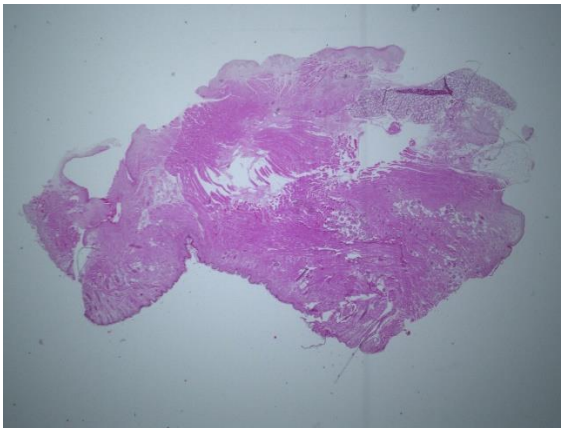


Abbildung 5: HE Färbung OSCC  
(Wange 20-fache Vergrößerung)

### 4.1. Auswertung der Candida-Kolonisierung

Die Auswertung der Candida-Kolonisierung zeigte sich eine zunehmende Kolonisierung der Versuchstiere mit steigender Versuchsdauer. So zeigte sich in am ersten Untersuchungszeitpunkt eine positive Kolonisierung bei 32 von 40 Tieren in der Gruppe 2. Während am letzten Untersuchungszeitpunkt alle zehn verbliebenen Tiere eine positive Kolonisierung aufwiesen. Mit steigender Versuchsdauer zeigte sich darüber hinaus eine Steigerung der Kolonien pro Maus. Dies spricht für einen starken Zusammenhang zwischen Expositionsdauer und Entwicklung einer ausgeprägten Kolonisation (Tabelle 12). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Gruppe der Versuchstiere, die zusätzlich zu DMBA auch eine Candidasuspension erhielten (Gruppe 4). Zwar war die Zahl der positiven Tiere im Vergleich zur Gruppe 2 geringer. Allerdings zeigten die Tiere im Schnitt eine höhere Anzahl der Kolonien pro Maus (Tabelle 13).

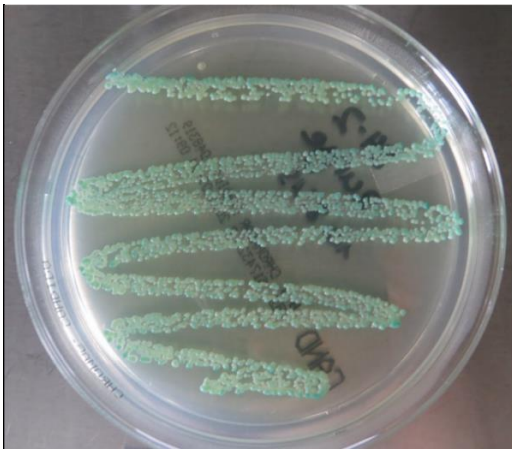
## Ergebnisse

Untersuchungszeitpunkt	U1	U2	U3	U4
Positive Tiere	32/40	27/30	20/20	10/10
Kolonien pro Maus	23	30	70	120

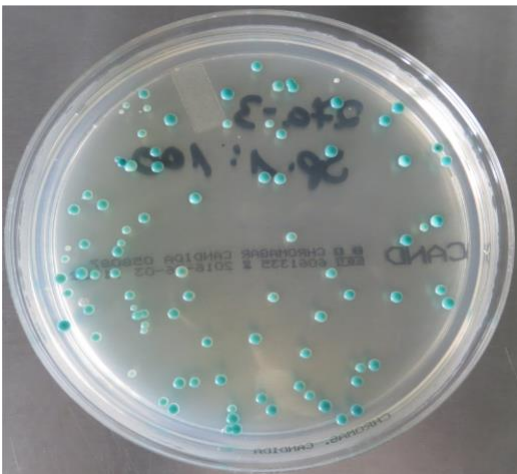
**Tabelle 12: Quantitative Auswertung der Candida-Kolonisierung in Gruppe 2**

Untersuchungszeitpunkt	U1	U2	U3	U4
Positive Tiere	23/40	26/30	16/20	8/10
Kolonien pro Maus	75	91	144	135

**Tabelle 13: Quantitative Auswertung der Candida-Kolonisierung in Gruppe 4**



**Abbildung 6: Verdünnungsreihe auf Chromagar zum Nachweis der Besiedlung (qualitativ)**



**Abbildung 7: Verdünnungsreihe auf Chromagar zum Nachweis der Höhe der Besiedlung (quantitativ)**

## Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines Zusammenhanges von einer oralen Candidabesiedlung und der Entwicklung verschiedener intraepithelialer Dysplasien der Mundschleimhaut. Die Karzinogenese ist ein komplexer Vorgang. Die Ätiologie ist wie bereits im vorangegangenen Teil beschrieben multifaktoriell. Eine dauerhafte Kolonisation der oralen Mukosa von verschiedenen Mikroben führt über verschiedene Mechanismen wie der Aktivierung von Signaltransduktionen oder einer Hochregulierung von Tumor-Promotern zu einer Entstehung von Tumoren (178). Ein Zusammenhang zwischen einer Pilzbesiedelung, speziell *C.albicans*, und der Entwicklung eines OSCC ist in jüngerer Vergangenheit immer wieder Gegenstand der Forschung. Der genaue Anteil und Mechanismus an der Karzinogenese ist letztendlich nicht geklärt und bedarf weiterer Forschungsarbeit. Eine detaillierte Beurteilbarkeit der Auswirkung einer Candidabesiedelung auf den Entartungsprozess epithelialer Zellen ist in einer *in vitro*-Analyse nur erschwert zu realisieren. Zu diesem Zweck wurde sich in dieser Forschungsarbeit für einen Ansatz *in vivo* mittels Tiermodell entschieden. Die Ähnlichkeit zu humanen Krankheitsprozessen und Immunantworten machen Nagetiere, speziell Mäuse, zu den wichtigsten Versuchstieren um die Pathogenese verschiedener Erkrankungen zu verstehen (179). Darüber hinaus besteht ein weiterer Vorteil des Mausmodells in der Möglichkeit genetischer Manipulationen und der Entwicklung von Tieren mit Immundefekten (180). Es finden sich eine Reihe von beschriebenen Modellen zur Auslösung von Neoplasien und OSCC in der Literatur. Die Grundlage der Induktion einer malignen Transformation bildet dabei ein wiederholter Kontakt der Mukosa mit kanzerogenen Substanzen über mehrere Wochen. Diese Stoffe umfassen unter anderem 4-Nitroquinolon-1-Oxid (4NQO) und 7,12-Dimethylbenzo(1)anthracen (DMBA), welche bereits erfolgreich eine SIN oder OSCC in Mäusen, Ratten oder Hamstern in Studien auslösen konnten (181-184). Die Applikationsform der Substanzen erfolgte dabei in einigen Studien über das Trinkwasser, in anderen Studien über eine Bepinselung der Mundschleimhaut. Hierbei wurde eine häufigere Transformation des Epithels in Studien mit DMBA beobachtet. Der mittlere Zeitraum zur Entwicklung einer Neoplasie betrug in der Literatur 6 Wochen (185). Als Versuchstiere wurden in dieser Arbeit 6 Wochen alte weibliche Mäuse der



Gattung *alb/c* gewählt, die über einen Zeitraum von 12-16 Wochen gehalten wurden. Aufgrund der Kombination mit einem Infektionsmodell wurde sich gegen eine Trinkwasserapplikation und für eine DMBA-Bepinselung entschieden. Als Grundlage wurde das modifizierte Studienmodell von Ampatipudi *et al.* (2013) gewählt (186).

Da *C.albicans* nicht zur natürlichen Mikroflora von immunkompetenten Mäusen gehört, kann eine Kolonisation oftmals nur in Kombination mit einer Immunsuppression und einer Antibiotikagabe erfolgen (187). Vielmehr führt eine Inkubation der oralen Mukosa von immunkompetenten Mäusen mit *C.albicans* zu einer transienten oropharyngealen Kolonisation ohne Entwicklung einer manifesten Candidiasis (187). Zur Induktion einer oropharyngealen Candidiasis hat sich die Behandlung der Versuchstiere mit Kortikosteroiden bewährt (188). In der vorliegenden Studie wurde ein Infektionsmodell auf der Grundlage des Modells von Takakura *et al.* (2003) gewählt und modifiziert (176).

Auf der Basis des oben beschriebenen Modells konnten in der Versuchsreihe SIN verschiedener Dysplasiegrade und manifeste OSCC ausgelöst werden. Die histologische Aufbereitung der Wangenschleimhautpräparate zeigte hierbei sowohl in der Gruppe der Versuchstiere mit DMBA-Bepinselung als auch in der Candidagruppe Epithelzellen mit unterschiedlichen SIN. Der Untersuchungszeitpunkt der Tiere spielte beim Grad der festgestellten Dysplasie eine signifikante Rolle. So fanden sich sowohl in Tieren der früh geopferten Gruppen wie auch in den später geopferten Gruppen Dysplasien. Höhergradige Dysplasien vom Typ SIN III und invasive Karzinome fanden sich allerdings nur zu späteren Untersuchungszeitpunkten U3 und U4. Dies legt den Verdacht nahe, dass ein Zusammenhang zwischen der zeitlich verlängerten Exposition des Mundschleimhautepithels gegenüber Kanzerogenen wie DMBA bzw. der Exposition gegenüber *C. albicans* und der Entwicklung einer höhergradigen Dysplasie besteht. In einem Versuchsmodell zur Induktion eines OSCC mittels DMBA in Hamster konnte ein ähnlicher zeitlicher Zusammenhang beobachtet werden (183). In der beschriebenen Versuchsreihe mit einer Dauer von 15 Wochen zeigte sich bei den Tieren ab der neunten Woche eine deutliche Zunahme der Entwicklung von Ulzerationen und Tumoren. Ein synergetischer Effekt durch eine simultane *C. albicans* Besiedelung wurde in dieser Studie allerdings nicht untersucht.

Ein Zusammenhang zwischen eine Candidabesiedelung der oralen Mukosa und der Entwicklung einer mukosalen Transformation bis hin zur Neoplasie konnte bereits

1992 von O'Grady *et al.* erfolgreich dargestellt werden (189). In diesem murinen Modell fand allerdings 4NQO als karzinogene Substanz unter einem prolongierten Versuchszeitraum von 34 Wochen Verwendung. In einer ähnlichen Studie konnte ebenfalls erfolgreich eine Korrelation zwischen einer malignen Transformation und einer induzierten Candidabesiedelung der oralen Mukosa nachgewiesen werden. Die Gruppen der Mäuse mit einer Behandlung mit 4NQO und einer induzierten Besiedelung durch *C. albicans* zeigten hierbei den größten Anteil an Dysplasien (190). Unter der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) versteht man einen Mechanismus der Zell-Zell-Interaktion. Sie beschreibt eine reversible phänotypische Transformation von epithelialen zu mesenchymalen Zellen (191). Diese Transformation umfasst auch den Verlust von epithelialen Zellmarkern. E-Cadherin und Vimentin haben sich als Biomarker für die EMT etabliert. Dabei führt eine verstärkte Expression von Vimentin zu einer Veränderung von Zellform und Adhäsion der epithelialen Zellen zu einem mesenchymalen Phänotypen mit Fähigkeit zur Migration (192). Dem gegenüber steht die Expression von E-Cadherin für einen verstärkten Zell-Zell-Kontakt, der wiederum für die Morphologie und Struktur verschiedener Gewebe eine entscheidende Rolle spielt (193). Folglich lässt sich über diese Biomarker eine Aussage über die Aktivität der EMT geben (194). Beeinflusst wird die Aktivität der EMT zum einen durch entzündliche Prozesse, zum anderen aber auch durch Prozesse maligner Entartung wie bei der Entstehung von Dysplasien oder Karzinomen (195).

Aktuelle Forschungsergebnisse legen nahe, dass bestimmte orale pathogene Erreger über einen chronischen Inflammationsprozess zu einer Veränderung der Expression von E-Cadherin und Vimentin führen (196, 197). In Biopsien von Patienten mit einem histologisch gesicherten OSCC konnten Wang *et al.* bereits 2009 zeigen, dass die Expression von E-Cadherin in invasiven Tumorformation deutlich geringer nachweisbar ist als weniger invasiven Bereichen der Tumoren (198). Eine verminderte Expression von E-Cadherin in Patienten mit einem OSCC ist folglich mit einer erhöhten Invasivität und einer verminderten Prognose vergesellschaftet (199). Jedoch findet sich bereits in histologischen Proben von Patienten mit geringgradigen Dysplasien eine beginnende Verminderung von E-Cadherin auf der Zelloberfläche (200).

In einigen Studien konnte bereits erfolgreich gezeigt werden, dass eine Besiedelung durch *C. albicans* sowohl in in-vitro als auch in in-vitro Versuchsmodellen zu einer

deutlichen Reduktion der Expression E-Cadherin führte (201, 202). In der Folge dieser Reduktion kommt es zu einer epithelialen Beschädigung mit einer anschließenden Translokation von *C.albicans* in das Epithel (203). Während vor allem die intestinale Mukosa für die Entstehung einer systemische Candidose von großer Bedeutung ist, so könnte die Fähigkeit der Herabregulierung von E-Cadherin und anderen Zelladhäsionsproteinen wie Occludin von *C.albicans* vor allem bei der Entstehung von oralen Neoplasien eine Rolle spielen (204). Einige periodontale Krankheitsbilder zeigen eine deutliche Vergesellschaftung mit dem Verlust von E-Cadherin und der daraus resultierenden erhöhten Permeabilität des Epithels (205). Diese These wird durch eine Studie gestützt die zeigen konnte, dass eine Erhöhung der Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche zu einem verbesserten Outcome der Patienten mit einer intestinalen Barrierestörung führten (206). Freilich lässt sich in diesem Kontext die orale Mukosa nicht mit der intestinalen gleichsetzen. Es zeigt aber Notwendigkeit weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

Vimentin gilt als wesentlicher Bestandteil der Gruppe der intermediären Filamentproteine. Typischerweise wird findet es sich auf mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten oder Gliazellen (207). Eine Vimentinexpression von malignen epithelialen Tumorzellen ist mit einer erhöhten Invasivität vergesellschaftet (208). Darüber hinaus zeigen Tumore mit verstärkter Vimentinexpression eine höhere Rezidivrate sowie eine geringere Überlebenszeit der Patienten (209). Paccione *et al.* konnten in einer in-vitro-Studie zeigen, dass eine Inhibierung der Vimentinexpression in OSCC-Zelllinien zu einer Revision des mesenchymalen Phänotypes mit verminderter Migration führt (210).

Sowohl E-Cadherin als auch Vimentin können als prognostischer Marker für Patienten mit einem OSCC verwendet werden. Schlussendlich lässt sich eine detaillierte Aussage über die Aktivität der EMT eines Gewebes eher mit einer Analyse der Expression von E-Cadherin in Kombination mit einer Analyse der Expression von Vimentin treffen als mit einer Untersuchung der Aktivität eines einzelnen der beiden Proteine. Tumore mit einer erhöhten Aktivität der EMT sind als aggressiver einzuschätzen als Tumore mit einer erniedrigten Aktivität der EMT. So zeigten in einer Studie von Nijkamp *et al.* Patienten mit einem OSCC mit erhöhter E-Cadherinexpression und verringerter Vimentinexpression eine höhere Metastasierungsrate als Patienten mit einem OSCC mit höherer E-Cadherinexpression und geringer Vimentinexpression (211). Die

immunohistochemische Auswertung der Versuchsproben dieser Arbeit erfolgt in einem nächsten Schritt.

Die Aufrechterhaltung der richtigen Balance und Kinetik der Immunantwort im Bereich der Mukosa ist entscheidend für das Fortbestehen der kommensalen Mikroflora auf der einen und der Eradikation von Pathogenen auf der anderen Seite. Epithelzellen spielen in diesem Prozess eine wichtige Rolle. Sie sind weit mehr als nur physische Barrieren. Die Möglichkeit zwischen pathogenen und kommensalen Mikroben zu unterscheiden und eine entsprechende Immunantwort einzuleiten zeigt, dass die epitheliale Zellschicht eine Schlüsselrolle bei der Besiedelung und Infektion mit Mikroorganismen besetzt. Murine Versuchsmodelle der oralen Candidabesiedelung haben hierbei eine wichtige Stellung zum Verständnis der Pathogenese und der Interferenz der prädisponierenden Faktoren dieser Erkrankung und ihrem Entstehungsprozess (179).

Der Fakt, dass sich die Mortalitätsrate des OSCC trotz der zahlreichen Neuerungen und Weiterentwicklungen im Bereich Diagnostik und Therapie in den letzten Jahren kaum verändert hat, unterstreicht noch einmal die Notwendigkeit der Forschung nach weiteren diagnostischen und therapeutischen Mitteln (2). Die Suche nach potentiellen Biomarker für diese Erkrankung sollte nicht vernachlässigt werden. Vielmehr sollten wissenschaftliche Arbeiten in der Zukunft darauf abzielen das komplexe Gebiet der verschiedenen ätiologischen Faktoren und deren Interaktion genauer zu definieren um den Ursprung genetisch instabiler Keratinozyten zu erkennen und bestenfalls zu verhindern. Die maligne Transformation von Epithelzellen hin zum OSCC ist durch ein progressives und unkontrolliertes Wachstum von Tumorzellen charakterisiert. Eine mögliche Vorhersagbarkeit über die Wahrscheinlichkeit einer malignen Transformation von Vorläuferläsion spielt eine entscheidende Rolle bei Findung der richtigen Therapie sowie des richtigen Therapiezeitpunktes. Der derzeitige Forschungsstand an Biomarkern umfasst nur einen geringen Teil der Möglichkeiten, die in Zukunft durch Biomarker möglich wären. So könnten Biomarker in Zukunft Teil einer personalisierten Diagnostik mit anschließender personalisierter Therapie im Bereich der Onkologie sein. Dies könnte die Heilungschancen von Patienten verbessern.

# Zusammenfassung

Das orale Plattenepithelkarzinom ist der sechshäufigste Tumor weltweit. Fortgeschrittene Stadien mit einer ausgedehnten lymphogenen Metastasierung dieser Tumorentität gehen mit einer schlechten Prognose und einer hohen Rezidivrate einher. Einer rechtzeitigen Identifizierung von Dysplasien und ihren prognostischen Faktoren kommt demnach eine wichtige Rolle zu. Neben bereits gut beschriebenen Biomarkern sind in jüngster Vergangenheit auch immer wieder neue Biomarker Teil der Forschung. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines murinen Modelles zum Zweck der Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges zwischen einer oralen Candidabesiedelung und der Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms. Die Auswertung der Gewebeproben erfolgte hierbei sowohl histologisch als auch immunhistologisch. Der Versuchsaufbau gestaltete sich hierbei über einen Zeitraum von 16 Wochen. Es konnte sowohl eine orale Candidabesiedelung der Versuchstiere, als auch die Entstehung von intraepithelialen Neoplasien bis hin zu manifesten Karzinomen im Bereich der Mundhöhle erreicht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Induktion einer malignen Transformation durch eine DMBA-Exposition über einen längeren Zeitraum in einem murinen Modell möglich ist. Hierbei entwickelten sich in dieser Arbeit Dysplasien verschiedener Grade sowie manifeste Plattenepithelkarzinome im Bereich der oralen Mukosa. Höhergradige Dysplasiegrade entwickelten sich hierbei erst zu späteren Zeitpunkten, sodass es ein Zusammenhang zwischen Expositionszeitraum und maligner Transformation besteht.

Zum genauen Verständnis der Ätiologie dieser Erkrankung bedarf es weiterer Forschungsarbeit auf diesem Gebiet.

# Literaturverzeichnis

1. Fotis V, Melsen B, Williams S. Posttreatment changes of skeletal morphology following treatment aimed at restriction of maxillary growth. *Am J Orthod.* 1985;88(4):288-96.
2. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11884-94.
3. La Rosa GRM, Gattuso G, Pedulla E, Rapisarda E, Nicolosi D, Salmeri M. Association of oral dysbiosis with oral cancer development. *Oncol Lett.* 2020;19(4):3045-58.
4. Alnuaimi AD, Wiesenfeld D, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, McCullough MJ. Oral Candida colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: a matched case-control study. *Oral Oncol.* 2015;51(2):139-45.
5. Hafed L, Farag H, El-Rouby D, Shaker O, Shabaan HA. Candida Albicans Alcohol Dehydrogenase 1 gene in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Pol J Pathol.* 2019;70(3):210-6.
6. Nasrullah Satiman E, Ahmad H, Ramzi AB, Abdul Wahab R, Kaderi MA, Harun W, et al. The role of Candida albicans candidalysin ECE1 gene in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2020.
7. Sanjaya PR, Gokul S, Gururaj Patil B, Raju R. Candida in oral pre-cancer and oral cancer. *Med Hypotheses.* 2011;77(6):1125-8.
8. Zollner-Schwetz I, Auner HW, Paulitsch A, Buzina W, Staber PB, Ofner-Kopeinig P, et al. Oral and intestinal Candida colonization in patients undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *J Infect Dis.* 2008;198(1):150-3.
9. Baker JL, Bor B, Agnello M, Shi W, He X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol.* 2017;25(5):362-74.
10. Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. Candida and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. *J Dent Res.* 2014;93(5):445-51.
11. Khurshid Z, Zafar MS, Khan RS, Najeeb S, Slowey PD, Rehman IU. Role of Salivary Biomarkers in Oral Cancer Detection. *Adv Clin Chem.* 2018;86:23-70.
12. Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, et al. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* 2012;13(6):R42.
13. Yamashita Y, Takeshita T. The oral microbiome and human health. *J Oral Sci.* 2017;59(2):201-6.
14. Kilian M. The oral microbiome - friend or foe? *Eur J Oral Sci.* 2018;126 Suppl 1:5-12.
15. Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* 2016;221(10):657-66.
16. Verma, D., Garg, P.K. & Dubey, A.K. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol* 200, 525–540 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>
17. Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis.* 2017;23(3):276-86.
18. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol.* 2018;200(4):525-40.
19. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-17.
20. Bandara H, Panduwawala CP, Samaranyake LP. Biodiversity of the human oral mycobiome in health and disease. *Oral Dis.* 2019;25(2):363-71.

21. Seed PC. The human mycobiome. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;5(5):a019810.
22. Cui L, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. *Genome Med*. 2013;5(7):63.
23. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med*. 2009;206(2):299-311.
24. Dupuy AK, David MS, Li L, Heider TN, Peterson JD, Montano EA, et al. Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS One*. 2014;9(3):e90899.
25. Shrestha M, Boaz K, Srikant N, Shakya A. An assessment of candidal colonization and species differentiation in head and neck cancer patients receiving radiation. *J Nepal Health Res Counc*. 2014;12(28):156-61.
26. Karbach J, Walter C, Al-Nawas B. Evaluation of saliva flow rates, *Candida* colonization and susceptibility of *Candida* strains after head and neck radiation. *Clin Oral Investig*. 2012;16(4):1305-12.
27. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. Underhill DM, Iliev ID *Nat Rev Immunol*. 2014 Jun; 14(6):405-16.
28. Janus MM, Willems HM, Krom BP. *Candida albicans* in Multispecies Oral Communities; A Keystone Commensal? *Adv Exp Med Biol*. 2016;931:13-20.
29. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17030.
30. Hernandez-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martinez-Gutierrez F, Martinez AE, Guillen Ade J, et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine*. 2008;4(3):237-40.
31. World Health Organization. World Oral Health Report. Published 2018. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>.
32. Ladewig NM, Camargo LB, Tedesco TK, Floriano I, Gimenez T, Imperato JCP, et al. Management of dental caries among children: a look at the cost-effectiveness. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2018;18(2):127-34.
33. Caufield PW, Li Y, Dasanayake A. Dental caries: an infectious and transmissible disease. *Compend Contin Educ Dent*. 2005;26(5 Suppl 1):10-6.
34. Berkowitz RJ. *Mutans streptococci*: acquisition and transmission. *Pediatr Dent*. 2006;28(2):106-9; discussion 92-8.
35. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol*. 2017;44(5):456-62.
36. Knight ET, Liu J, Seymour GJ, et al. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontology* 2016;71:22-51
37. Correa JD, Fernandes GR, Calderaro DC, Mendonca SMS, Silva JM, Albiero ML, et al. Oral microbial dysbiosis linked to worsened periodontal condition in rheumatoid arthritis patients. *Sci Rep*. 2019;9(1):8379.
38. Jensen A, Ladegaard Gronkjaer L, Holmstrup P, Vilstrup H, Kilian M. Unique subgingival microbiota associated with periodontitis in cirrhosis patients. *Sci Rep*. 2018;8(1):10718.
39. Moergel M, Kammerer P, Kasaj A, Armouti E, Alshihri A, Weyer V, et al. Chronic periodontitis and its possible association with oral squamous cell carcinoma - a retrospective case control study. *Head Face Med*. 2013;9:39.

40. Laprise C, Shahul HP, Madathil SA, Thekkepurakkal AS, Castonguay G, Varghese I, et al. Periodontal diseases and risk of oral cancer in Southern India: Results from the HeNCe Life study. *Int J Cancer*. 2016;139(7):1512-9.
41. Gholizadeh P, Eslami H, Kafil HS. Carcinogenesis mechanisms of *Fusobacterium nucleatum*. *Biomed Pharmacother*. 2017;89:918-25.
42. Atanasova KR, Yilmaz O. Looking in the *Porphyromonas gingivalis* cabinet of curiosities: the microbium, the host and cancer association. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29(2):55-66.
43. Inaba H, Amano A, Lamont RJ, Murakami Y. Involvement of protease-activated receptor 4 in over-expression of matrix metalloproteinase 9 induced by *Porphyromonas gingivalis*. *Med Microbiol Immunol*. 2015;204(5):605-12.
44. Nishio K, Motozawa K, Omagari D, Gojoubori T, Ikeda T, Asano M, et al. Comparison of MMP2 and MMP9 expression levels between primary and metastatic regions of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci*. 2016;58(1):59-65.
45. Lee J, Roberts JS, Atanasova KR, Chowdhury N, Han K, Yilmaz O. Human Primary Epithelial Cells Acquire an Epithelial-Mesenchymal-Transition Phenotype during Long-Term Infection by the Oral Opportunistic Pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:493.
46. Ma CT, Luo HS, Gao F, Tang QC, Chen W. *Fusobacterium nucleatum* promotes the progression of colorectal cancer by interacting with E-cadherin. *Oncol Lett*. 2018;16(2):2606-12.
47. Geng F, Liu J, Guo Y, Li C, Wang H, Wang H, et al. Persistent Exposure to *Porphyromonas gingivalis* Promotes Proliferative and Invasion Capabilities, and Tumorigenic Properties of Human Immortalized Oral Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:57.
48. Hoare A, Soto C, Rojas-Celis V, Bravo D. Chronic Inflammation as a Link between Periodontitis and Carcinogenesis. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:1029857.
49. Tonetti M, Palmer R, Working Group 2 of the VEWoP. Clinical research in implant dentistry: study design, reporting and outcome measurements: consensus report of Working Group 2 of the VIII European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2012;39 Suppl 12:73-80.
50. Lang NP, Berglundh T, Working Group 4 of Seventh European Workshop on P. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011;38 Suppl 11:178-81.
51. Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *J Clin Periodontol*. 2011;38 Suppl 11:188-202.
52. Cortelli SC, Cortelli JR, Romeiro RL, Costa FO, Aquino DR, Orzechowski PR, et al. Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. *Arch Oral Biol*. 2013;58(1):67-74.
53. Albertini M, Lopez-Cerero L, O'Sullivan MG, Chereguini CF, Ballesta S, Rios V, et al. Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(8):937-41.
54. Marini E, Spink MJ, Messina AM. Peri-implant primary squamous cell carcinoma: a case report with 5 years' follow-up. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013;71(2):322-6.
55. Agha-Hosseini F, Rohani B. Evaluation of the Effects of Dental Implants on Oral Lesions. *J Contemp Dent Pract*. 2015;16(5):400-6.



56. Jeelani S, Rajkumar E, Mary GG, Khan PA, Gopal H, Roy S, et al. Squamous cell carcinoma and dental implants: A systematic review of case reports. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015;7(Suppl 2):S378-80.
57. Moergel M, Karbach J, Kunkel M, Wagner W. Oral squamous cell carcinoma in the vicinity of dental implants. *Clin Oral Investig.* 2014;18(1):277-84.
58. Rampias T, Sasaki C, Psyrris A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncol.* 2014;50(5):356-63.
59. Klingelutz AJ, Roman A. Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology.* 2012;424(2):77-98.
60. G.P. Agrawal, P.S. Joshi, A. Agrawal, Role of HPV-16 in pathogenesis of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma and correlation of p16INK4A expression in HPV-16 positive cases: an immunohistochemical study, *ISRN Pathology*, 2013 (2013)
61. Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, et al. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(1):172-82.
62. Beachler DC, D'Souza G. Oral human papillomavirus infection and head and neck cancers in HIV-infected individuals. *Curr Opin Oncol.* 2013;25(5):503-10.
63. Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Nelson HH, Peters ES, et al. Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2007;120(11):2386-92.
64. Reuschenbach M, Kansy K, Garbe K, Vinokurova S, Flechtenmacher C, Toth C, et al. Lack of evidence of human papillomavirus-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity in southern Germany. *Oral Oncol.* 2013;49(9):937-42.
65. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467-75.
66. Smeets SJ, van der Plas M, Schaij-Visser TB, van Veen EA, van Meerloo J, Braakhuis BJ, et al. Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways. *Int J Cancer.* 2011;128(7):1596-605.
67. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer.* 2010;116(9):2166-73.
68. Witherden EA, Shoaie S, Hall RA, Moyes DL. The Human Mucosal Mycobiome and Fungal Community Interactions. *J Fungi (Basel).* 2017;3(4).
69. Nikou SA, Kichik N, Brown R, Ponde NO, Ho J, Naglik JR, et al. Candida albicans Interactions with Mucosal Surfaces during Health and Disease. *Pathogens.* 2019;8(2).
70. Billings M, Dye BA, Iafolla T, Grisius M, Alevizos I. Elucidating the role of hyposalivation and autoimmunity in oral candidiasis. *Oral Dis.* 2017;23(3):387-94.
71. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med.* 2012;4(165):165rv13.
72. Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. Candida albicans-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence.* 2015;6(4):338-46.
73. Swidergall M. Candida albicans at Host Barrier Sites: Pattern Recognition Receptors and Beyond. *Pathogens.* 2019;8(1).
74. Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. Candida albicans dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(1):85-93.
75. Sun JN, Solis NV, Phan QT, Bajwa JS, Kashleva H, Thompson A, et al. Host cell invasion and virulence mediated by Candida albicans Ssa1. *PLoS Pathog.* 2010;6(11):e1001181.

76. Wachtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Forster S, Dalle F, Schaller M, et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One*. 2012;7(5):e36952.
77. Tang SX, Moyes DL, Richardson JP, Blagojevic M, Naglik JR. Epithelial discrimination of commensal and pathogenic *Candida albicans*. *Oral Dis*. 2016;22 Suppl 1:114-9.
78. Axell T, Samaranayake LP, Reichart PA, Olsen I. A proposal for reclassification of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;84(2):111-2.
79. Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Head Neck Pathol*. 2019;13(1):25-32.
80. Eisen D, Carrozzo M, Bagan Sebastian JV, Thongprasom K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis*. 2005;11(6):338-49.
81. Splieth CH, Sumnig W, Bessel F, John U, Kocher T. Prevalence of oral mucosal lesions in a representative population. *Quintessence Int*. 2007;38(1):23-9.
82. Farhi D, Dupin N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2010;28(1):100-8.
83. Parashar P. Oral lichen planus. *Otolaryngol Clin North Am*. 2011;44(1):89-107, vi.
84. Ismail SB, Kumar SK, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci*. 2007;49(2):89-106.
85. Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(1):86-122.
86. Rimkevicius A, Aleksejuniene J, Puriene A, Seinina D, Rasteniene R. Oral lichen planus: a 4-year clinical follow-up study. *Turk J Med Sci*. 2017;47(2):514-22.
87. Epstein JB, Wan LS, Gorsky M, Zhang L. Oral lichen planus: progress in understanding its malignant potential and the implications for clinical management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;96(1):32-7.
88. Nogueira PA, Carneiro S, Ramos-e-Silva M. Oral lichen planus: an update on its pathogenesis. *Int J Dermatol*. 2015;54(9):1005-10.
89. Walsh LJ, Savage NW, Ishii T, Seymour GJ. Immunopathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 1990;19(9):389-96.
90. Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA, et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103 Suppl:S25 e1-12.
91. Andreasen JO. Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1968;25(1):31-42.
92. Karbach J, Al-Nawas B, Moergel M, Daublander M. Oral health-related quality of life of patients with oral lichen planus, oral leukoplakia, or oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(8):1517-22.
93. Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008;46(1):15-21.
94. Thongprasom K, Luengvisut P, Wongwatanakij A, Boonjatturus C. Clinical evaluation in treatment of oral lichen planus with topical fluocinolone acetonide: a 2-year follow-up. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(6):315-22.
95. van der Meij EH, Mast H, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncol*. 2007;43(8):742-8.
96. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(10):575-80.

97. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003;39(8):770-80.
98. Arduino PG, Bagan J, El-Naggar AK, Carrozzo M. Urban legends series: oral leukoplakia. *Oral Dis.* 2013;19(7):642-59.
99. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010;46(6):423-5.
100. Pentenero M, Meleti M, Vescovi P, Gandolfo S. Oral proliferative verrucous leucoplakia: are there particular features for such an ambiguous entity? A systematic review. *Br J Dermatol.* 2014;170(5):1039-47.
101. Villa A, Woo SB. Leukoplakia-A Diagnostic and Management Algorithm. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017;75(4):723-34.
102. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(1):1-10.
103. Abadie WM, Partington EJ, Fowler CB, Schmalbach CE. Optimal Management of Proliferative Verrucous Leukoplakia: A Systematic Review of the Literature. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;153(4):504-11.
104. Mays JW, Fassil H, Edwards DA, Pavletic SZ, Bassim CW. Oral chronic graft-versus-host disease: current pathogenesis, therapy, and research. *Oral Dis.* 2013;19(4):327-46.
105. Shlomchik WD, Lee SJ, Couriel D, Pavletic SZ. Transplantation's greatest challenges: advances in chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(1 Suppl 1):2-10.
106. Patey-Mariaud de Serre N, Reijasse D, Verkarre V, Canioni D, Colomb V, Haddad E, et al. Chronic intestinal graft-versus-host disease: clinical, histological and immunohistochemical analysis of 17 children. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29(3):223-30.
107. Lee SJ, Wolff D, Kitko C, Koreth J, Inamoto Y, Jagasia M, et al. Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host disease. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: IV. The 2014 Response Criteria Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(6):984-99.
108. Treister NS, Woo SB, O'Holleran EW, Lehmann LE, Parsons SK, Guinan EC. Oral chronic graft-versus-host disease in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(9):721-31.
109. Treister N, Schubert MS, Fall-Dickson JM. Oral chronic graft vs host disease. In: Vogelsang GB, Pavletic SZ, eds. *Chronic Graft-Versus-Host Disease: Interdisciplinary Management.* New York: Cambridge University; 2009:182–198
110. Fall-Dickson JM, Pavletic SZ, Mays JW, Schubert MM. Oral Complications of Chronic Graft-Versus-Host Disease. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2019;2019(53).
111. Bassim CW, Fassil H, Mays JW, Edwards D, Baird K, Steinberg SM, et al. Oral disease profiles in chronic graft versus host disease. *J Dent Res.* 2015;94(4):547-54.
112. Fall-Dickson JM, Cordes S, Berger AM. Oral complications. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* 11th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019:2094–2108.
113. Santos PS, Coracin FL, Barros JC, Gallottini MH. Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease of the oral mucosa according to the National Institutes of Health Consensus. *Einstein (Sao Paulo).* 2014;12(2):204-10.
114. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(6):443-58.

115. Imanguli MM, Swaim WD, League SC, Gress RE, Pavletic SZ, Hakim FT. Increased T-bet+ cytotoxic effectors and type I interferon-mediated processes in chronic graft-versus-host disease of the oral mucosa. *Blood*. 2009;113(15):3620-30.
116. Kruse AL, Gratz KW. Oral carcinoma after hematopoietic stem cell transplantation--a new classification based on a literature review over 30 years. *Head Neck Oncol*. 2009;1:29.
117. Atsuta Y, Suzuki R, Yamashita T, Fukuda T, Miyamura K, Taniguchi S, et al. Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults in association with chronic graft-versus-host disease. *Ann Oncol*. 2014;25(2):435-41.
118. Mawardi H, Elad S, Correa ME, Stevenson K, Woo SB, Almazrooa S, et al. Oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: clinical presentation and treatment outcomes. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46(6):884-91.
119. Imanguli MM, Alevizos I, Brown R, Pavletic SZ, Atkinson JC. Oral graft-versus-host disease. *Oral Dis*. 2008;14(5):396-412.
120. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
121. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403.
122. Diz P, Meleti M, Diniz-Freitas M, Vescovi P, Warnakulasuriya S, Johnson NW, Kerr AR. Oral and pharyngeal cancer in Europe: Incidence, mortality and trends as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Trans Res Oral Oncol* 2017; 2:2057178X17701517
123. García-Martín JM, Varela-Centelles P, González M, Seoane-Romero JM, Seoane J, García-Pola MJ. Epidemiology of Oral Cancer. In *Oral Cancer Detection* Springer, Cham. 2019. 81-93 p.
124. Bonifazi M, Malvezzi M, Bertuccio P, Edefonti V, Garavello W, Levi F, et al. Age-period-cohort analysis of oral cancer mortality in Europe: the end of an epidemic? *Oral Oncol*. 2011;47(5):400-7.
125. Johnson NW, Warnakulasuriya S, Gupta PC, Dimba E, Chindia M, Otoh EC, et al. Global oral health inequalities in incidence and outcomes for oral cancer: causes and solutions. *Adv Dent Res*. 2011;23(2):237-46.
126. Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology*. 2016;91(1):13-23.
127. Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PV, Liyanage RL, Dias KD, Tilakaratne WM. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;113(4):518-25.
128. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008;122(1):155-64.
129. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res*. 2012;91(2):142-9.
130. Reidy J, McHugh E, Stassen LF. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon*. 2011;9(5):278-83.
131. Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*. 2013;4(1):66-83.

132. Chu PY, Hsu NC, Tai HC, Yeh CM, Lin SH, Hou MF, et al. High nuclear protein kinase C $\theta$  expression may correlate with disease recurrence and poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2012;43(2):276-81.
133. Rivera C. The challenge of the state of susceptibility to oral cancer. *J Oral Res*. 2015;4:8-9
134. Viet CT, Schmidt BL. Biologic mechanisms of oral cancer pain and implications for clinical therapy. *J Dent Res*. 2012;91(5):447-53.
135. Kowalski LP, Carvalho AL. Natural history of untreated head and neck cancer. *Eur J Cancer*. 2000;36(8):1032-7.
136. Mehrotra R, Gupta DK. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. *Head Neck Oncol*. 2011;3:33.
137. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002;52(4):195-215.
138. Dalianis T. Human papillomavirus (HPV) and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Presse Med*. 2014;43(12 Pt 2):e429-34.
139. Kang H, Kiess A, Chung CH. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(1):11-26.
140. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol*. 2011;2:98.
141. Abidullah M, Kiran G, Gaddikeri K, Raghoji S, Ravishankar TS. Leukoplakia - review of a potentially malignant disorder. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(8):ZE01-4.
142. Lature ML, Burde K. Case report on oral leukoplakia with superadded fungal infection. *J Adv Clin Res*. 2019;6:60-62
143. Hirai H, Tomioka H, Mochizuki Y, Oikawa Y, Tsushima F, Harada H. Clinical Course of Oral Squamous Cell Carcinoma in Patients on Immunosuppressant and Glucocorticoid Therapy. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017;75(9):1980-6.
144. Berkovits C, Toth A, Szenzenstein J, Deak T, Urban E, Gacser A, et al. Analysis of oral yeast microflora in patients with oral squamous cell carcinoma. *Springerplus*. 2016;5(1):1257.
145. McCullough M, Jaber M, Barrett AW, Bain L, Speight PM, Porter SR. Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol*. 2002;38(4):391-3.
146. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Jr., Kemeny NE, Jessup JM, et al. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(20):1456-66.
147. Ni YH, Ding L, Hu QG, Hua ZC. Potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma: proteomics discovery and clinical validation. *Proteomics Clin Appl*. 2015;9(1-2):86-97.
148. Santosh AB, Jones T, Harvey J. A review on oral cancer biomarkers: Understanding the past and learning from the present. *J Cancer Res Ther*. 2016;12(2):486-92.
149. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(11):845-56.
150. Garbis SD, Tyritzis SI, Roumeliotis T, Zerefos P, Giannopoulou EG, Vlahou A, et al. Search for potential markers for prostate cancer diagnosis, prognosis and treatment in clinical tissue specimens using amine-specific isobaric tagging (iTRAQ) with two-dimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2008;7(8):3146-58.
151. Wang Z, Feng X, Liu X, Jiang L, Zeng X, Ji N, et al. Involvement of potential pathways in malignant transformation from oral leukoplakia to oral squamous cell carcinoma revealed by proteomic analysis. *BMC Genomics*. 2009;10:383.

152. Patel V, Hood BL, Molinolo AA, Lee NH, Conrads TP, Braisted JC, et al. Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2008;14(4):1002-14.
153. Hoffmann F, Umbreit C, Kruger T, Pelzel D, Ernst G, Kniemeyer O, et al. Identification of Proteomic Markers in Head and Neck Cancer Using MALDI-MS Imaging, LC-MS/MS, and Immunohistochemistry. *Proteomics Clin Appl.* 2019;13(1):e1700173.
154. Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). *Oral Oncol.* 2010;46(9):630-5.
155. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):9-22.
156. Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget.* 2016;7(10):11018-32.
157. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419.
158. E.A. Musgrove, C.E. Caldon, J. Barraclough, A. Stone, R.L. Sutherland Cyclin D as a therapeutic target in cancer *Nat Rev Cancer*, 11 (2011), pp. 558-572
159. Allin KH, Nordestgaard BG. Elevated C-reactive protein in the diagnosis, prognosis, and cause of cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2011;48(4):155-70.
160. Liu Q, Li A, Tian Y, Wu JD, Liu Y, Li T, et al. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;31:61-71.
161. Jeong D, Heo S, Sung Ahn T, Lee S, Park S, Kim H, et al. Cyr61 expression is associated with prognosis in patients with colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:164.
162. Oliveira-Silva RJ, Carolina de Carvalho A, de Souza Viana L, Carvalho AL, Reis RM. Anti-EGFR Therapy: Strategies in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2016;11(2):170-83.
163. Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ.* 2015;22(4):549-59.
164. Koh MY, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 $\alpha$  and cancer therapy. *Recent Results Cancer Res.* 2010;180:15-34.
165. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015;517(7536):576-82.
166. Bankaitis KV, Fingleton B. Targeting IL4/IL4R for the treatment of epithelial cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2015;32(8):847-56.
167. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
168. W.P. Tansey, Mammalian MYC proteins and cancer, *New J Sci*, 2014 (2014), p. 757534
169. N.G. Ordonez, Value of podoplanin as an immunohistochemical marker in tumor diagnosis: a review and update *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 22 (2014), pp. 331-347
170. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(9):598-610.
171. Johnstone S, Logan RM. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(3):263-6.
172. A. Satelli, S. Li, Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy *Cell Mol Life Sci*, 68 (2011), pp. 3033-3046
173. Meurman JH. Oral microbiota and cancer. *J Oral Microbiol.* 2010;2.

174. Gholizadeh P, Eslami H, Yousefi M, Asgharzadeh M, Aghazadeh M, Kafil HS. Role of oral microbiome on oral cancers, a review. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:552-8.
175. Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, et al. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol*. 2008;44(4):315-24.
176. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol*. 2003;47(5):321-6.
177. Gale N, Pilch B, Sidransky D, Westra W, Califano J. Epithelial precursor lesions. *World Health Classification of tumours, Pathology and genetics of head and neck tumours*. IARC Press, Lyon, 2005:140-3.
178. Meurman JH. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. *Oral Oncol*. 2010;46(6):411-3.
179. Costa AC, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence*. 2013;4(5):391-9.
180. de Repentigny L, Aumont F, Ripeau JS, Fiorillo M, Kay DG, Hanna Z, et al. Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*. 2002;185(8):1103-14.
181. Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2006;42(7):655-67.
182. Hasina R, Martin LE, Kasza K, Jones CL, Jalil A, Lingen MW. ABT-510 is an effective chemopreventive agent in the mouse 4-nitroquinoline 1-oxide model of oral carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2(4):385-93.
183. Martinez BD, Barato Gomez PA, Iregui Castro CA, Rosas Perez JE. DMBA-Induced Oral Carcinoma in Syrian Hamster: Increased Carcinogenic Effect by Dexamethasone Coexposition. *Biomed Res Int*. 2020;2020:1470868.
184. Ribeiro DR, Alves AV, dos Santos EP, Padilha FF, Gomes MZ, Rabelo AS, et al. Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015;117(2):85-95.
185. Kim TW, Chen Q, Shen X, Regezi JA, Ramos DM, Tanaka H, et al. Oral mucosal carcinogenesis in SENCAR mice. *Anticancer Res*. 2002;22(5):2733-40.
186. Ambatipudi S, Bhosale PG, Heath E, Pandey M, Kumar G, Kane S, et al. Downregulation of keratin 76 expression during oral carcinogenesis of human, hamster and mouse. *PLoS One*. 2013;8(7):e70688.
187. Solis NV, Filler SG. Mouse model of oropharyngeal candidiasis. *Nat Protoc*. 2012;7(4):637-42.
188. Dwivedi P, Thompson A, Xie Z, Kashleva H, Ganguly S, Mitchell AP, et al. Role of Bcr1-activated genes Hwp1 and Hyr1 in *Candida albicans* oral mucosal biofilms and neutrophil evasion. *PLoS One*. 2011;6(1):e16218.
189. O'Grady JF, Reade PC. *Candida albicans* as a promoter of oral mucosal neoplasia. *Carcinogenesis*. 1992;13(5):783-6.
190. Dwivedi PP, Mallya S, Dongari-Bagtzoglou A. A novel immunocompetent murine model for *Candida albicans*-promoted oral epithelial dysplasia. *Med Mycol*. 2009;47(2):157-67.
191. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
192. Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. 2010;24(6):1838-51.

193. Arzmi MH, Dashper S, McCullough M. Polymicrobial interactions of *Candida albicans* and its role in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2019;48(7):546-51.
194. Afrem MC, Margaritescu C, Craitoiu MM, Ciuca M, Sarla CG, Cotoi OS. The immunohistochemical investigations of cadherin "switch" during epithelial-mesenchymal transition of tongue squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2014;55(3 Suppl):1049-56.
195. Cho ES, Kang HE, Kim NH, Yook JI. Therapeutic implications of cancer epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Arch Pharm Res*. 2019;42(1):14-24.
196. Olsen I, Yilmaz O. Possible role of *Porphyromonas gingivalis* in orodigestive cancers. *J Oral Microbiol*. 2019;11(1):1563410.
197. Dzutsev A, Goldszmid RS, Viaud S, Zitvogel L, Trinchieri G. The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy. *Eur J Immunol*. 2015;45(1):17-31.
198. Wang X, Zhang J, Fan M, Zhou Q, Deng H, Aisharif MJ, et al. The expression of E-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(4):547-54.
199. Fan CC, Wang TY, Cheng YA, Jiang SS, Cheng CW, Lee AY, et al. Expression of E-cadherin, Twist, and p53 and their prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(10):1735-44.
200. Lopez-Verdin S, Martinez-Fierro ML, Garza-Veloz I, Zamora-Perez A, Grajeda-Cruz J, Gonzalez-Gonzalez R, et al. E-Cadherin gene expression in oral cancer: Clinical and prospective data. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019;24(4):e444-e51.
201. Rouabhia M, Semlali A, Audoy J, Chmielewski W. Antagonistic effect of *Candida albicans* and IFN $\gamma$  on E-cadherin expression and production by human primary gingival epithelial cells. *Cell Immunol*. 2012;280(1):61-7.
202. Xu H, Sobue T, Bertolini M, Thompson A, Dongari-Bagtzoglou A. *Streptococcus oralis* and *Candida albicans* Synergistically Activate  $\mu$ -Calpain to Degrade E-cadherin From Oral Epithelial Junctions. *J Infect Dis*. 2016;214(6):925-34.
203. Allert S, Forster TM, Svensson CM, Richardson JP, Pawlik T, Hebecker B, et al. *Candida albicans*-Induced Epithelial Damage Mediates Translocation through Intestinal Barriers. *mBio*. 2018;9(3).
204. Ho J, Camilli G, Griffiths JS, Richardson JP, Kichik N, Naglik JR. *Candida albicans* and candidalysin in inflammatory disorders and cancer. *Immunology*. 2021;162(1):11-6.
205. Abdulkareem AA, Shelton RM, Landini G, Cooper PR, Milward MR. Potential role of periodontal pathogens in compromising epithelial barrier function by inducing epithelial-mesenchymal transition. *J Periodontal Res*. 2018;53(4):565-74.
206. Terciolo C, Dobric A, Ouaisi M, Siret C, Breuzard G, Silvy F, et al. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 Restores intestinal Barrier Integrity by Regulation of E-cadherin Recycling. *J Crohns Colitis*. 2017;11(8):999-1010.
207. Wangmo C, Charoen N, Janthapattana K, Dechaphunkul A, Thongsuksai P. Epithelial-Mesenchymal Transition Predicts Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(3):1511-8.
208. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(18):3033-46.
209. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol*. 2010;23(2):213-24.



210. Paccione RJ, Miyazaki H, Patel V, Waseem A, Gutkind JS, Zehner ZE, et al. Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(9):2894-903.
211. Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol.* 2011;99(3):344-8.

# Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir in der schwierigen Zeit beigestanden haben und mich bedingungslos unterstützen. Ohne euch wäre ich nichts. Ich liebe euch über alles.

# Lebenslauf

## **Persönliche Daten**

Name: Dr. med. Philipp Günther Norbert Matheis  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Geburtsdatum: 09.05.1988, Berlin

## **Akademische Ausbildung**

2009 – 2015 Studium der Humanmedizin an der Johannes  
Gutenberg-Universität, Mainz  
2015 - 2019 Studium der Zahnmedizin an der Johannes  
Gutenberg-Universität, Mainz

## **Berufliche Qualifikation**

2016 – heute Assistenzarzt, Wissenschaftlicher Mitarbeiter an  
der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und  
Gesichtschirurgie, Plastische Operationen,

## **Wissenschaftliche Qualifikation**

2016 klinisch-experimentelle Promotion:  
„MALDI-TOF Imaging zur Differentialdiagnose von  
Gastritiden“; I. Medizinische Klinik und Poliklinik der  
Universitätsmedizin