

C. Scheifele<sup>1</sup> · H. Schlechte<sup>2</sup> · G. Bethke<sup>1</sup> · P. A. Reichart<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Abteilung für Oralchirurgie und zahnärztliche Röntgenologie, Zentrum für Zahnmedizin, Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

<sup>2</sup>Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

## Nachweis von *TP53*-Mutationen mittels Exfoliativzytologie (brush biopsy) oraler Leukoplakien

### Zusammenfassung

**Fragestellung:** Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Prävalenz von Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* in oralen Leukoplakien zu bestimmen.

**Material und Methode:** Durch Abstrich (brush biopsy) wurden Proben von 43 Leukoplakien, 26 Mundhöhlenkarzinomen als Referenz und 4 klinisch gesunden Kontrollen gewonnen. Die Analyse der kritischen Exons 5–8 erfolgte durch Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE).

**Ergebnisse:** Die Mutationsfrequenz betrug 57,7% für Karzinome, 39,5% für Leukoplakien und 0% für die Kontrollen. Die häufigsten Mutationen lagen bei Karzinomen in Exon 5 mit 46,2%, bei Leukoplakien in Exon 6 mit 23,3%. Mehr als eine Mutation fanden sich in 26,9% der Karzinome und 7% der Leukoplakien. T<sub>1</sub>-Karzinome zeigten in 37,5%, T<sub>4</sub>-Karzinome in 100%, L<sub>1</sub>-Leukoplakien in 37,1% und L<sub>3</sub>-Leukoplakien ebenfalls in 100% mindestens eine Mutation.

**Schlussfolgerungen:** Der Nachweis von *TP53*-Mutationen stellt hinsichtlich der malignen Transformation von Leukoplakien einen prognostischen Faktor dar, der mit dem verwendeten Verfahren klinisch einfach zu bestimmen ist, aber in seiner Aussagekraft weiterer Untersuchungen bedarf.

### Schlüsselwörter

Mundhöhlenkarzinom · Leukoplakie · *TP53* · p53 · Brush biopsy

Nach heutigem Wissen stellen Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* die häufigsten bekannten genetischen Veränderungen bei Mundhöhlenkarzinomen dar. *TP53* kodiert für ein phosphoryliertes 53-Kilodalton-Protein innerhalb des Zellkerns mit der Bezeichnung p53. Wesentliche, bislang beschriebene Funktionen dieses Proteins sind zum einen die Arretierung des Zellzyklus am G<sub>1</sub>/S-Übergang, wenn die Synthese einer beschädigten DNA verhindert oder diese repariert werden soll. Zum anderen ist das Genprodukt in der Lage, bei irreversibler Schädigung die Apoptose der betreffenden Zelle einzuleiten. Eine Reihe weiterer Effekte wird diskutiert, Begriffe wie „gatekeeper“, „caretaker“ oder, zu einem frühen Zeitpunkt, „guardian of the genome“ wurden für *TP53* postuliert [12, 18]. Mutationen des Gens betreffen zu 75–90% die Exons 5–8, die 4 der 5 bekannten Hot-spot-Genorte beinhalten, an denen Mutationen am häufigsten auftreten. Bei relativer Unkenntnis der spezifischen Wirkungsmechanismen muss ein großer Teil der klinischen Bedeutung der *TP53*-Mutationen nach wie vor in ihrer hohen Prävalenz gesehen werden. Für Mundhöhlenkarzinome wurden von 1999–2002 zwischen 5,4 und 64% [2, 11], nach einer Übersicht bei Scully et al. für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches zwischen 12 und 100% Mutationen berichtet [28].

In der gleichen Übersichtsarbeit wurden für orale Dysplasien Prävalenzraten von *TP53*-Mutationen zwischen 27 und 60% beschrieben. Die Angaben der insgesamt 16 dort zitierten Arbeiten

sind differenziert zu betrachten: Zunächst wurde in der Mehrzahl die Expression des p53-Genproduktes in der Immunhistochemie als Indiz für eine Mutation des Gens gewertet. Diese Auffassung lässt sich, auch nach Scully, nicht halten. Es gibt demnach keine Hinweise für eine zwingende Korrelation zwischen der immunhistochemisch nachweisbaren p53-Expression und Mutationen des Gens [5, 22, 28, 31]. Des Weiteren ist die Subsumption unter den Begriff „orale Dysplasien“ geeignet, sehr heterogene Zustände zusammenzufassen, auch wenn die Zunahme von Mutationen mit dem Grad der Dysplasie in Zusammenhang gebracht werden kann [28]. Angaben für die Prävalenzrate von *TP53*-Mutationen bei Leukoplakien, die die häufigste präkanzeröse Veränderung der Mundschleimhaut darstellen, wurden bislang nur sehr vereinzelt veröffentlicht. So fanden Ries et al. 13,3% Mutationen bei Leukoplakien in Deutschland, während Ralhan et al. in Indien 17% ermittelten [20, 22].

Nichtinvasive Methoden zur Diagnostik präkanzeröser Läsionen haben in

Online publiziert: 13 September 2002  
© Springer-Verlag 2002

Dr. Christian Scheifele  
Abteilung für Oralchirurgie  
und zahnärztliche Röntgenologie,  
Zentrum für Zahnmedizin,  
Universitätsklinikum Charité  
der Humboldt-Universität,  
Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin,  
E-mail: christian.scheifele@charite.de,  
Phone: 030-450562602

C. Scheifele · H. Schlechte · G. Bethke ·  
P.A. Reichart

## Detection of *TP53*-mutations in brush biopsies from oral leukoplakias

### Abstract

**Objective:** The aim of this study was to determine the prevalence of mutations of the tumour suppressor gene *TP53* in oral leukoplakias.

**Material and method:** Brush biopsy specimens of 43 oral leukoplakias, 26 oral squamous cell carcinomas (OSCC) for reference, and the oral mucosa of 4 clinically normal volunteers were collected. DNA of the critical exons 5–8 was analysed by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE).

**Results:** The prevalence of mutations was 57.7% in OSCC, 39.5% in leukoplakias and 0% in controls. The highest frequency of mutations was found in exon 5 (46.2%) in OSCC and in exon 6 (23.3%) in leukoplakia. More than one mutation was detected in 26.9% of OSCC and 7% of leukoplakia specimens. At least one mutation was found in 37.5% of T1 OSCC and 100% of T4 OSCC specimens and in 37.1% of the L1 leukoplakia and 100% of L3 leukoplakia specimens.

**Conclusions:** *TP53* mutations could be a useful prognostic indicator in precancerous oral lesions. Although the brush biopsy technique appears simple clinically, further investigations are necessary to specify the implications of genetic analysis.

### Keywords

OSCC · Leukoplakia · *TP53* · p53 ·  
Brush biopsy

manchen Teilgebieten der Medizin, so in der Gynäkologie, lange Tradition. Auch in der Oralmedizin sind aktuell Ansätze zum Screening wie Cytobrush®-Exfoliativzytologie in der Diskussion [21]. Im Gegensatz zur klassischen Exfoliativzytologie ermittelt die genetische Analyse keine zytologischen, sondern molekularbiologische Äquivalente einer Transformation. Deshalb beschreiben die Begriffe „Abstrich“ und „brush biopsy“ den Vorgang der Probenentnahme zu diesem Zweck besser. Giese et al. haben vor kurzem berichtet, dass jeweils identische *TP53*-Mutationen in 44% von 32 Mundhöhlenkarzinomen im Abstrich und im entsprechenden Biopat nachweisbar waren [6].

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Prävalenz von *TP53*-Mutationen in Abstrichpräparaten oraler Leukoplakien zu ermitteln. Abstriche von histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle dienen dabei als Referenz, solche von klinisch gesunder Mundschleimhaut als Kontrolle.

## Material und Methoden

### Abstrichpräparate

Untersucht wurden 73 zwischen Dezember 1999 und Juni 2001 gewonnene Abstrichpräparate von 63 Patienten und 4 Kontrollen. Von diesen Abstrichen stammten 26 von primären Plattenepithelkarzinomen (35,6%), 43 von Leukoplakien (58,9%) und 4 von klinisch gesunder Mundschleimhaut (5,5%). Die Klassifikation der Leukoplakien erfolgte nach dem von van der Waal et al. vorgeschlagenen Schema [33]. Die für den Mutationsnachweis erforderlichen Arbeitsschritte waren Probengewinnung, DNA-Isolation, Amplifikation der *TP53*-Exons 5–8 sowie Nachweis der Mutationen mittels Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE).

Jede zur Abstrichnahme verwendeten Bürste (Omnibrush Nr. 88963, Omnident, 63110 Rodgau) wurde vor Gebrauch zusammen mit je einem Eppendorf-Gefäß sterilisiert und in der Sterilgutverpackung als Kit zur Probenentnahme bereitgehalten. Nach dem Abstrich in üblicher Weise wurden die Bürstenköpfe mit einem sterilen Seitenschneider so abgetrennt, dass die ca. 1 cm langen Kopfabschnitte in das Safe-Lock-Gefäß fielen und dort sicher zu

verschließen waren. Nach sofortiger Tiefkühlung erfolgten Lagerung und Transport bei –20°C.

### DNA-Präparation

Die DNA-Präparation erfolgte mittels eines konfektionierten Verfahrens (High Pure PCR Template Preparation Kit Nr. 1796828, Roche, 68305 Mannheim) und wurde durch eine Alkoholfällung abgeschlossen. Für die Alkoholfällung wurden die aus dem Kit resultierenden 200 µl Elutionspuffer mit 20 µl NH<sub>4</sub>-Acetat (3 M) und 460 µl vorgekühltem reinem Ethanol vermischt, auf unter 0°C gekühlt, erneut gemischt und 10 min bei –9°C und 14.000 U/min zentrifugiert. Nach Auslaufen des Überstandes erfolgte Zugabe von 340 µl vorgekühltem 70% Ethanol und Vorgehen in gleicher Weise. Die so isolierte DNA wurde getrocknet und in 50 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, beide pH 8,0) gelöst.

### Amplifizierung

Je 5 µl dieser DNA-Lösung wurden in 4 separaten Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) mit GC-Klammer-Primern eingesetzt und die kritischen Exons 5, 6, 7 und 8 amplifiziert. Je 5 µl der Amplifikate wurden darauf in wiederum getrennten Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophoresen (TGGE, Qiagen, 40724 Hilden) analysiert. Ein typisches Vierbandenmuster nach Silberfärbung wurde als Mutation gewertet, Kontaminationen über DNA-freie negative und archivierte positive Kontrollen ausgeschlossen. Die Vorgehensweise dieses Mutantenscreenings durch TGGE und die verwendeten Modifikationen sind in früheren Arbeiten detailliert beschrieben [6, 14, 23, 26, 27]. Soweit gängige statistische Vergleichsverfahren ( $\chi^2$ -Test, Mann-Whitney-U-Test) benutzt wurden, erfolgte die Berechnung mit SPSS 10 und einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

## Ergebnisse

Der Altersmedian von Patienten mit Plattenepithelkarzinom unterschied sich mit 57,4 Jahren nicht signifikant von dem der Patienten mit Leukoplakie mit 60,2 Jahren. Gleiches war für die Geschlechtsverteilung festzustellen (Karzinome: Männer 23-mal, Frauen 3-mal,

Tabelle 1  
Prävalenz von (TP53-Mutationen in Abstrichpräparaten

|                             | Karzinome |      | Leukoplakien |      |
|-----------------------------|-----------|------|--------------|------|
|                             | [n = 26]  | %    | [n = 43]     | %    |
| TP53-Mutationen             | 15        | 57,7 | 17           | 39,5 |
| Exon 5                      | 12        | 46,2 | 6            | 14,0 |
| Exon 6                      | 6         | 23,1 | 10           | 23,3 |
| Exon 7                      | 2         | 7,7  | 3            | 7,0  |
| Exon 8                      | 3         | 11,5 | 1            | 2,3  |
| Anzahl der Mutationen/Probe |           |      |              |      |
| 1                           | 8         | 30,8 | 14           | 32,6 |
| 2                           | 6         | 23,1 | 3            | 7,0  |
| 3                           | 1         | 3,8  | 0            | 0,0  |

88,5/11,5%; Leukoplakien: Männer 34-mal, Frauen 9-mal, 79,1/20,9%). In der Gruppe mit Karzinom fanden sich 15 Proben (57,7%), in der Gruppe mit Leukoplakie 17 Proben mit TP53-Mutation (39,5%). Die Verteilung auf die Exons 5–8 ist Tabelle 1 zu entnehmen. Mutationen in Exon 5 wurden bei Karzinomen mit 46,2% signifikant häufiger gefunden als bei Leukoplakien mit 14,0% ( $p = 0,005$ ). Bei Karzinomen waren dies auch absolut die häufigsten Mutationen, während bei Leukoplakien Mutationen in Exon 6 mit 23,3% am häufigsten auftraten. Proben mit mehr als einer Mutation fanden sich bei 7 Karzinomen (26,9%) und 3 Leukoplakien (7,0%), wobei dieser Verteilungsunterschied nicht signifikant war.

Das Auftreten von Mutationen zeigte keine Korrelation zum Alter oder Geschlecht der Patienten. Deskriptiv auffällig waren dagegen die Korrelationen zur Größe der Veränderungen (Tabelle 2). So fanden sich Mutationen bei 37,5% der T<sub>1</sub>-Karzinome, verglichen mit 100% der T<sub>4</sub>-Karzinome und bei 37,1% der L<sub>1</sub>-Leukoplakien (<2 cm), verglichen mit 100% der L<sub>3</sub>-Leukoplakien (>4 cm). Derart ausgeprägte Verteilungsunterschiede der Mutationen waren nicht zu finden bzgl. der Lage (S<sub>2</sub> Mundboden oder Zunge, S<sub>1</sub> restliche Mundhöhle) oder Beschaffenheit (C<sub>2</sub> inhomogen, C<sub>1</sub> homogen) der Leukoplakien [33]. Eine Patientin mit T<sub>1</sub>-Karzinom und 3 Patienten mit Leukoplakien wurden zeitlich getrennt 2- oder 3fach untersucht. Dabei zeigte eine inhomogene Leukoplakie über einen Zeitraum von 9 Monaten Mutationen in den Exons 5 und 6, ehe die bis zu diesem Zeitpunkt auf Dys-

plasie lautenden histologischen Diagnosen ein invasives Karzinom ergaben.

## Diskussion

### Methodik

Vergleichbarkeit der Ergebnisse setzt Vergleichbarkeit der Methodik voraus. Im vorliegenden Fall beruhte dies zunächst auf der Annahme, dass die in Abstrichpräparaten detektierten Mutationen auch tatsächlich den im Gewebe vorliegenden Veränderungen entsprachen. Dies konnte früher bereits bestä-

tigt werden [5, 6]. Keine der Proben wies einen so niedrigen DNA-Gehalt auf, dass eine Auswertung nicht möglich gewesen wäre. Bei vergleichbaren Untersuchungen in der Urologie ergaben selbst weit aus weniger zelluläre Bestandteile enthaltende Proben wie Urinsedimente ein auswertbares Signal [24]. Die Form der zum Abstrich verwendeten Bürste ist demnach nur von nachgeordneter Bedeutung für die Probenentnahme für DNA-Untersuchungen, wie auch Arbeiten aus der forensischen Medizin zeigten [30]. Die zum Nachweis der Mutationen eingesetzte TGGE-Technik wurde als äquivalent zu einer vergleichbaren Technik wie SSCP (single strand conformation polymorphism), und in der Sensitivität als bessere Methodik bewertet [27].

### Karzinome

Mit diesen Informationen lässt sich die als Referenz ermittelte Prävalenz von TP53-Mutationen von 57,7% bei Karzinomen beurteilen. Sie lag im Mittel der von Scully et al. genannten Spannbreite zwischen 12 und 100% [28]. Der Vergleich mit der Literatur der letzten 3 Jahre zeigte ebenfalls gute Konkordanz (Tabelle 3). Hinzuweisen ist auf die bislang nicht ausreichend erklärte Divergenz zwischen sich entwickelnden Ländern, v. a. in Südostasien und Indien, und den Ländern der ersten Welt [28]. Die Art des Tabak- und/oder Betelkonsums allein kann dies nicht begründen, wie der direkte Vergleich der Werte von Kuo et al. mit 5,4% und Hsieh et al. mit 49%, die beide auf Betel-assoziierte Karzinome Bezug nehmen, zeigt [9, 11].

### Leukoplakien

Der Vergleich der ermittelten Prävalenz von 39,5% TP53-Mutationen in oralen Leukoplakien mit der Literatur ist problematisch. So verwendeten Ralhan et al. für den Nachweis von 17% Mutationen bei 30 Leukoplakien die Technik der direkten Sequenzierung, Ries et al. eine Kombination von SSCP und Sequenzierung und ermittelten 9,6% bei 73 Karzinomen und 13,3% bei 60 Leukoplakien [20, 22]. Die direkte Sequenzierung allein kann in der PCR-Reaktion den Nachteil haben, dass geringe Mengen mutierter DNA im Verhältnis zu großen Mengen des Wildtyps nicht ausreichend

Tabelle 2  
Korrelation zwischen Mutationshäufigkeit und Progression

| TP53-Mutationen     | Nein |          | Ja  |          |
|---------------------|------|----------|-----|----------|
|                     | [n]  | Zeilen-% | [n] | Zeilen-% |
| <b>Karzinome</b>    |      |          |     |          |
| T <sub>1</sub>      | 5    | 62,5     | 3   | 37,5     |
| T <sub>2</sub>      | 3    | 60,0     | 2   | 40,0     |
| T <sub>3</sub>      | 3    | 42,9     | 4   | 57,1     |
| T <sub>4</sub>      | 0    | 0,0      | 6   | 100,0    |
| <b>Leukoplakien</b> |      |          |     |          |
| L <sub>1</sub>      | 22   | 62,9     | 13  | 37,1     |
| L <sub>2</sub>      | 4    | 80,0     | 1   | 20,0     |
| L <sub>3</sub>      | 0    | 0,0      | 3   | 100,0    |
| S <sub>1</sub>      | 20   | 57,1     | 15  | 42,9     |
| S <sub>2</sub>      | 6    | 75,0     | 2   | 25,0     |
| C <sub>1</sub>      | 19   | 59,4     | 13  | 40,6     |
| C <sub>2</sub>      | 7    | 63,6     | 4   | 36,4     |

Für Leukoplakien: L<sub>1</sub> <2 cm, L<sub>2</sub> 2–4 cm, L<sub>3</sub> >4 cm, S<sub>2</sub> Mundboden oder Zunge, S<sub>1</sub> restliche Mundhöhle, C<sub>2</sub> inhomogen, C<sub>1</sub> homogen

Tabelle 3

**Aktuelle Prävalenzangaben in absteigender Reihenfolge für TP53-Mutationen in oralen Karzinomen**

| Autor               | Jahr | Land        | [n] | Methode    | TP53-Mutationen [%] |
|---------------------|------|-------------|-----|------------|---------------------|
| Bradley et al. [2]  | 2001 | Kanada      | 25  | n.a.       | 64                  |
| Hogmo et al. [8]    | 1999 | Schweden    | 34  | CDGE/Sequ. | 59                  |
| Scheifele et al.    | 2002 | Deutschland | 43  | TGGE       | 58                  |
| Hsieh et al. [9]    | 2001 | Taiwan      | 187 | SSCP/Sequ. | 49                  |
| Giese et al. [6]    | 2000 | Deutschland | 32  | TGGE       | 44                  |
| Shima et al. [29]   | 2000 | Japan       | 46  | SSCP       | 43                  |
| Alsner et al. [1]   | 2001 | Dänemark    | 114 | DGGE/Sequ. | 39                  |
| Ostwald et al. [17] | 2000 | Deutschland | 60  | TGGE/Sequ. | 38                  |
| Ralhan et al. [20]  | 2001 | Indien      | 30  | Sequ.      | 23                  |
| Kannan et al. [10]  | 2000 | Indien      | 72  | SSCP/Sequ. | 21                  |
| Kuo et al. [11]     | 1999 | Taiwan      | 37  | SSCP/Sequ. | 5                   |

CDGE Constant denaturant gel electrophoresis; TGGE Temperature gradient gel electrophoresis; SSCP Single-strand conformation polymorphism; DGGE Denaturing gradient gel electrophoresis; Sequ. Sequenzierung)

amplifiziert und damit nicht detektiert werden [26]. Im Gegensatz zu diesen Werten stehen 46% Mutationen bei 24 Erythroplakien, die Qin et al. in den USA mit SSCP und Sequenzierung ermittelten [19]. Insgesamt fehlt damit eine brauchbare Datenbasis für den Vergleich von Mutationen bei Leukoplakien.

Der relativ hohe Wert von 39,5% kann nicht mit den insgesamt 4 Mehrfachuntersuchungen von Leukoplakien erklärt werden. Bei 2 positiven und 2 negativen Ergebnissen beträgt die Zunahme gerade 1%. Eine größere Rolle könnte dagegen auch der Anteil an Silentmutationen spielen. Diese Mutationen, die durch die Redundanz des Basencodes nicht zu Veränderungen des Genproduktes führen, werden ab einer Prävalenz von 1% auch als Polymorphismus bezeichnet. Typisches Beispiel ist die Silentmutation CGA→CGG (Codon 213, 13399) in Exon 6, das in der vorliegenden Arbeit bei Leukoplakien die häufigsten Mutationen aufwies [4]. Hier bleibt das Ergebnis der laufenden Sequenzierung abzuwarten. Es gibt allerdings gute Gründe, auch Silentmutationen als Anzeichen einer Transformation zu werten: Einerseits sind sie als Ausdruck einer genetischen Instabilität zu werten, die weiteren Mutationen vorangehen kann, so zum Beispiel bei benignen Hyperplasien der Prostata [25]. Andererseits fehlen sie bei den Kontrollen. Die höchste beschriebene Prävalenz der genannten

Silentmutation liegt bei 6% [13], sodass hier keine wesentliche Veränderung der Prävalenzrate zu erwarten ist, wenn diese nicht gewertet wird. Anzumerken ist, dass die Rate von 39,5% Mutationen bei Leukoplakien ebenfalls in der Mitte der von Scully dafür angegebenen, eingangsdiskutierten Spannweite liegt [28].

### Bewertung

Ist die Interpretation zulässig, dass TP53-Mutationen in oralen Leukoplakien einer histologisch gesicherten Transformation vorausgehen? Dafür sprechen ihre unterschiedlichen Prävalenzraten und ihre deutliche Assoziation zur Größe der Veränderung bei Leukoplakien und Karzinomen. Zu nennen ist der Fall der Patientin, in deren Leukoplakie mit Mutation noch während des Untersuchungszeitraums ein Karzinom entstand. Dagegen stehen die fehlenden Korrelationen zur Lage und zum klinischen Aspekt. Die Lage einer Veränderung wird in letzter Zeit sowohl bei Karzinomen als auch bei Leukoplakien nicht mehr als prognoserelevant betrachtet [16, 32]. Dagegen spricht auch, dass die Frage, ob die Mutationen von TP53 ein frühes oder spätes Ereignis in der Karzinogenese darstellen, noch nicht ausreichend beantwortet werden kann. Die Mehrheit der bislang veröffentlichten Arbeiten weisen auf einen frühen Zeitpunkt hin [28]. Es sind jedoch Modelle entwickelt worden, die ne-

ben einer sequentiellen Abfolge alternativ eine Akkumulation der letztlich die Transformation verursachenden Ereignisse postulieren [3, 28]. Wenn, wie die eigenen Ergebnisse zeigten, die TP53-Mutationen nicht bei allen Karzinomen zu finden sind, wäre unter dieser Annahme zu schließen, dass sie einen fakultativen, jedoch keineswegs obligaten Befund bei Mundhöhlenkarzinomen darstellen. Die Assoziationen mit der Progredienz, auch bei Leukoplakien, deuten darauf hin, dass es sich bei TP53-Mutationen um einen prognostischen Faktor und nicht um einen beweisenden Tumormarker in Präkanzerosen der Mundschleimhaut handelt.

Der klinische und ggf. kommerzielle Einsatz von Exfoliativzytologie wie auch molekularbiologischen Techniken haben eine Diskussion ausgelöst, die im Wesentlichen den Vorteilen dieser Methoden eine wünschenswerte Verbesserung der konventionellen Diagnostik und der Prävention gegenüberstellt [7, 15, 34]. Deshalb sei festgehalten, dass es sich bei der Diagnostik von TP53-Mutationen aus Abstrichpräparaten um ein klinisch einfaches, technisch effektives, aber bislang rein experimentelles Verfahren handelt, das weiterer Untersuchung bedarf.

**Danksagung** • Die Autoren möchten sich für hervorragende klinische Arbeit bei Frau Doreen Köhn und ebenso hervorragende, noch weit umfangreichere Arbeit im Labor bei Frau Cornelia Stelzer sehr herzlich bedanken.

### Literatur

1. Alsner J, Sorensen SB, Overgaard J (2001) TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 59:179–185
2. Bradley G, Irish J, MacMillan C, Mancer K, Witterick I, Hartwick W, Gullane P, Kamel-Reid S, Benchimol S (2001) Abnormalities of the ARF-p53 pathway in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 20:654–658
3. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D (1996) Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56:2488–2492
4. Carbone D, Chiba I, Mitsudomi T (1991) Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 6:1691–1692

5. Friedrich RE, Giese M, Riethdorf S, Loning T (2000) P53-mutation in smears of oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 20:4927–4930
6. Giese M, Friedrich RE, Riethdorf S, Loning T (2001) p53-Mutationsnachweis in Abstrichen der Mundschleimhaut von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom. *Mund Kiefer Gesichtschir* 5:37–43
7. Greenberg MAE, Oral Medicine Section (2002) The „brush“ controversy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93:217–218
8. Hogmo A, Borresen-Dale AL, Blegen H, Lindholm J, Kuylenstierna R, Auer G, Munck-Wikland E (1999) TP53 mutations do not correlate with locoregional recurrence in stage I tongue carcinomas. *Anticancer Res* 19:3433–3438
9. Hsieh LL, Wang PF, Chen IH, Liao CT, Wang HM, Chen MC, Chang JT, Cheng AJ (2001) Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwan. *Carcinogenesis* 22:1497–1503
10. Kannan K, Munirajan AK, Krishnamurthy J, Bhuvaramurthy V, Mohanprasad BK, Panishankar KH, Tsuchida N, Shanmugam G (1999) Low incidence of p53 mutations in betel quid and tobacco chewing-associated oral squamous carcinoma from India. *Int J Oncol* 15: 1133–1136
11. Kuo MY, Huang JS, Hsu HC, Chiang CP, Kok SH, Kuo YS, Hong CY (1999) Infrequent p53 mutations in patients with areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 28:221–225
12. Lane DP (1992) Cancer, p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15–16
13. Mazars GR, Jeanteur P, Lynch HT, Lenoir G, Theillet C (1992) Nucleotide sequence polymorphism in a hotspot mutation region of the p53 gene. *Oncogene* 7:781–782
14. Metzger AK, Sheffield VC, Duyk G, Daneshvar L, Edwards MS, Cogen PH (1991) Identification of a germ-line mutation in the p53 gene in a patient with an intracranial ependymoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7825–7829
15. Mignogna MD, Fedele S, Ruoppo E, Russo LL (2002) The role of molecular techniques in preventing oral cancer and improving its poor prognosis: an illusion? *J Oral Pathol Med* 31: 246–248
16. Mohr C (1998) Der heutige Stellenwert adjuvanter Verfahren im Behandlungskonzept des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle und/oder des Oropharynx. In: Esser E (Hrsg) *Mundhöhlen-Oropharynx-Karzinom. Prognose und Radikalität*. DÖSAK, Osnabrück, S 107–134
17. Ostwald C, Gogacz P, Hillmann T, Schweder J, Gundlach K, Kundt G, Barten M (2000) p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. *Int J Cancer* 88:82–86
18. Prime SS, Thakker NS, Pring M, Guest PG, Pateron IC (2001) A review of inherited cancer syndromes and their relevance to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 37:1–16
19. Qin GZ, Park JY, Chen SY, Lazarus P (1999) A high prevalence of p53 mutations in pre-malignant oral erythroplakia. *Int J Cancer* 80:345–348
20. Ralhan R, Agarwal S, Nath N, Mathur M, Waslyk B, Srivastava A (2001) Correlation between p53 gene mutations and circulating antibodies in betel- and tobacco-consuming North Indian population. *Oral Oncol* 37:243–250
21. Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, Bocking A (2001) Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol* 22: 211–221
22. Ries JC, Schreiner D, Steininger H, Girod SC (1998) p53 mutation and detection of p53 protein expression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 18: 2031–2036
23. Riesner D, Steger G, Wiese U, Wulfert M, Heibey M, Henco K (1992) Temperature-gradient gel electrophoresis for the detection of polymorphic DNA and for quantitative polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 13:632–636
24. Sachs MD, Schlechte H, Lenk VS, Brenner S, Schnorr D, Fleige B, Ditscherlein G, Loening SA (2000) Genetic analysis of Tp53 from urine sediment as a tool for diagnosing recurrence and residual of bladder carcinoma. *Eur Urol* 38:426–433
25. Schlechte H, Lenk SV, Loning T, Schnorr D, Rudolph BD, Ditscherlein G, Loening SA (1998) p53 tumour suppressor gene mutations in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Eur Urol* 34:433–440
26. Schlechte HH, Schnorr D, Loning T, Rudolph BD, Pohrt UM, Loening SA (1997) Mutation of the tumor suppressor gene p53 in human prostate and bladder cancers – investigation by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *J Urol* 157:1049–1053
27. Scholz RB, Milde-Langosch K, Jung R, Schlechte H, Kabisch H, Wagener C, Loning T (1993) Rapid screening for Tp53 mutations by temperature gradient gel electrophoresis: a comparison with SSCP analysis. *Hum Mol Genet* 2:2155–2158
28. Scully C, Field JK, Tanzawa H (2000) Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 36:311–327
29. Shima K, Kobayashi I, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, Ohishi M, Sakai H (2000) Incidence of human papillomavirus 16 and 18 infection and p53 mutation in patients with oral squamous cell carcinoma in Japan. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38:445–450
30. Tanaka M, Yoshimoto T, Nozawa H, Ohtaki H, Kato Y, Sato K, Yamamoto T, Tamaki K, Katsumata Y (2000) Usefulness of a toothbrush as a source of evidential DNA for typing. *J Forensic Sci* 45: 674–676
31. Taylor D, Koch WM, Zahurak M, Shah K, Sidransky D, Westra WH (1999) Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. *Hum Pathol* 30:1221–1225
32. Van der Waal I, Axell T (2002) Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol* 38:521
33. Van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH (2000) A modified classification and staging system for oral leukoplakia. *Oral Oncol* 36: 264–266
34. Zhang L, Rosin MP (2002) Two sides of a prevention „coin“: adequate screening and better tools. *J Oral Pathol Med* 31:249–251