

**Medizinische Fakultät Universität Rostock**

Aus der

**Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, und plastische Gesichtschirurgie**

Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr.h.c. K. Gundlach MSD, FDSRCS

**Eine Untersuchung zum Krankheitsverlauf von Patienten mit oralen Leukoplakien  
und/oder Plattenepithelkarzinomen unter Berücksichtigung des Rauchverhaltens und  
des HPV-Infektionsverlaufs**

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Gero Moshagen, geb. am 06. 07. 1977 in Hildesheim

aus Sandnes, Norwegen

**Rostock, 2008**

Meinen Eltern gewidmet.

**Dekan: Prof. Dr. med. Schareck**

**1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. K. Gundlach**

**2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Barten**

**3. Gutachter: Prof. Dr. Dr. J. Schubert**

**Datum der Einreichung: 05.02.2008**

**Datum der Verteidigung: 30.09.2008**

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VII
Diagrammverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung .....	1
2 Literaturübersicht .....	3
2.1.1 Definitionen und Nomenklatur.....	3
2.1.2 Epidemiologische Aspekte zur Leukoplakie.....	3
2.2 Ätiologie und Risikofaktoren .....	4
2.2.1 Rauchen und Alkoholkonsum .....	4
2.2.2 HPV-Infektionen .....	5
2.2.2.1 HPV-Infektionsrate in klinisch unauffälliger Mundschleimhaut und oralen Leukoplakien .....	6
2.2.2.2 Ansteckung und Infektionsverlauf .....	8
2.2.2.3 Aufbau des Virus und angenommener Pathomechanismus .....	10
2.2.2.4 Kopienzahl und Expression der HPV-DNA in oralen Läsionen.....	14
2.3 Prognose .....	15
2.3.1 Dysplasiegrad .....	15
2.3.2 Einfluss einer HPV-Infektion auf die Entartungsrate.....	15
3 Material und Methode .....	17
3.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs .....	17
3.2 Anamnestisch und klinisch erhobene Parameter.....	17
3.2.1 Gewinnung und Behandlung der Proben .....	19
3.2.2 Gewinnung und Behandlung der Mundspülflüssigkeit und DNA-Präparation ..	20
3.3 Untersuchungsparameter für das Paraffinmaterial von den acht Plattenepithelkazinomen und deren Vorläuferläsionen.....	21
3.3.1 Behandlung des Paraffinschnittmaterials .....	21
3.4 HPV-DNA Analyse für das gesamte Probenmaterial (Abstriche, aus Mundspülung präparierte DNA, Paraffinmaterial).....	22
3.4.1 House-Keeping Gen Amplifikation .....	22
3.4.2 HPV-DNA Amplifikation .....	22
3.4.3 Southern Blot Hybridisierung .....	24
3.5 Verwendete statistische Methoden.....	26

---

4	Ergebnisse .....	27
4.1	Ergebnisse aus den Virusnachweisen und den klinischen Untersuchungen .....	27
4.1.1	Zusammensetzung des Patientenkollektivs und Untersuchungszeitraum .....	27
4.1.2	HPV-Nachweis .....	30
4.1.2.1	Quantitative Untersuchung der HPV-Infektion .....	30
4.1.2.2	HPV-Infektion und Patientenalter .....	30
4.1.2.3	Virustypen .....	31
4.1.2.4	Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Infektion .....	32
4.1.3	Rauchverhalten .....	33
4.1.3.1	HPV-Infektion und Rauchen .....	34
4.1.4	Betrachtung der Anzahl von Leukoplakien und Rezidiven zum HPV-Status ....	35
4.1.4.1	Anzahl der Leukoplakien, Rezidive nicht mitgezählt .....	35
4.1.4.2	Anzahl der Rezidive .....	35
4.1.4.3	Gesamtanzahl der Leukoplakien .....	36
4.1.4.4	Gesamtanzahl der Leukoplakien und Infektionsstatus .....	36
4.1.4.5	Gesamtanzahl der Leukoplakien und Rauchverhalten .....	38
4.1.5	Lokalisation .....	39
4.1.5.1	HPV-Infektion und Lokalisation der Leukoplakien .....	39
4.1.5.2	Rauchverhalten und Lokalisation der Leukoplakien .....	40
4.1.6	Klinische Diagnose .....	41
4.1.6.1	Klinische Diagnosen unter Berücksichtigung des Rauchverhaltens .....	42
4.1.6.2	Klinische Diagnosen unter Berücksichtigung der HPV-Infektion .....	42
4.1.7	Dysplasiegrade .....	43
4.1.7.1	Dysplasiegrade in den einzelnen Altersklassen .....	44
4.1.7.2	Durchschnittliche Dysplasiegrade für Erstmanifestationen und Rezidive ....	44
4.1.7.3	Dysplasiegrade der Leukoplakien in den einzelnen Lokalisationen .....	45
4.1.7.4	Klinische Diagnosen und zugehörige Dysplasiegrade .....	45
4.1.7.5	Mittlere Dysplasiegrade in Abhängigkeit verschiedener Risikofaktoren .....	46
4.1.8	Durchschnittliche Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs .....	47
4.1.9	Durchschnittsgröße der Leukoplakien in der jetzigen Untersuchung .....	48
4.2	Ergebnisse aus den Untersuchungen oraler Plattenepithelkarzinome und ihrer Vorläuferläsionen .....	49
4.2.1	Beschreibung des Patientenkollektivs, Untersuchungszeitraum .....	49
4.2.2	Lokalisationen .....	49

---

4.2.3	Diagnosen der Vorläuferläsionen.....	49
4.2.4	Vergleich von HPV-positiven und HPV-negativen Vorläuferläsionen .....	50
4.2.5	Subepitheliales Infiltrat .....	50
5	Diskussion .....	52
5.1	Geschlechterverteilung.....	52
5.2	Alter.....	52
5.3	HPV-Infektion .....	52
5.3.1	Vergleich der HPV-Prävalenzen aus der Literatur mit den eigenen Ergebnissen .....	55
5.4	Einfluss des Rauchverhaltens auf die HPV-Infektion.....	57
5.5	Verlauf der HPV-Infektion.....	58
5.6	HPV-Prävalenz in Vorläuferläsionen oraler Plattenepithelkarzinome.....	60
5.7	Anzahl der Leukoplakien .....	63
5.8	Lokalisation und der Einfluss der Risikofaktoren Rauchen und HPV darauf.....	63
5.9	Klinisches Erscheinungsbild und der Einfluß von Rauchen und HPV-Infektion ....	66
5.10	Dysplasiegrad und die Risikofaktoren HPV und Rauchen .....	67
5.11	Dysplasiegrade in Erstmanifestationen und Rezidiven.....	69
5.12	Dauer bis zum Auftreten eines Rezidives für die verschiedenen Risikogruppen ....	70
5.13	Größe der Leukoplakien für die beiden Riskogruppen .....	70
6	Zusammenfassung .....	72
7	Thesen .....	74
8	Literaturverzeichnis:.....	75
9	Anhang .....	81
	Eigenständigkeitserklärung .....	81
	Danksagung.....	82

## Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Agarosegel nach Elektrophorese der PCR Nr. 61 (HPV 16) unter UV-Licht ...	24
Abbildung 2: Chemilumineszenzfilm PCR 61 (HPV 16) .....	25

## Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Zusammensetzung der HPV-PCR Ansätze .....	23
Tabelle 2: Primersequenzen .....	23
Tabelle 3: Temperaturprofil der HPV PCRs .....	23
Tabelle 4: Sequenzen der HPV Oligonukleotide .....	24
Tabelle 6: Durchschnittsalter bei der ersten klinischen Untersuchung .....	27
Tabelle 7: Klinischer Untersuchungszeitraum .....	28
Tabelle 8: Zeitlicher Abstand zwischen der klinischen Diagnosestellung und erster Virenanalyse .....	28
Tabelle 9: Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der ersten HPV-Analyse .....	28
Tabelle 10: Zeitlicher Abstand zwischen den beiden HPV-Analysen in Jahren .....	29
Tabelle 11: Durchschnittsalter der zweiten HPV-Analyse in Jahren .....	29
Tabelle 12: Durchschnittsalter von HPV-positiven und -negativen Patienten bei den HPV-Analysen in Jahren .....	30
Tabelle 13: Durchschnittliche Anzahl von Leukoplakien, Rezidiven und Gesamtanzahl für HPV-negative und HPV-positive Patienten .....	37
Tabelle 14: Gesamtanzahl von Leukoplakien in Abhängigkeit vom Rauchverhalten .....	38
Tabelle 15: Häufigkeiten der klinischen Diagnosen .....	41
Tabelle 16: Anzahl der verschiedenen klinischen Diagnosen unter Berücksichtigung des Rauchverhaltens .....	42
Tabelle 17: Anzahl der verschiedenen klinischen Diagnosen unter Berücksichtigung des Infektionsstatus .....	42
Tabelle 18: Errechneter durchschnittlicher Dysplasiegrad für Männer, Frauen und die Gesamtgruppe .....	43
Tabelle 19: Dysplasiegrade in den einzelnen Altersgruppen .....	44
Tabelle 20: Dysplasiegrad für Erstmanifestation und Rezidiv .....	44
Tabelle 21: Klinische Diagnosen und zugehöriger Dysplasiegrade .....	45
Tabelle 22: Durchschnittlicher Dysplasiegrad in Abhängigkeit vom Rauchverhalten .....	46
Tabelle 23: Durchschnittlicher Dysplasiegrad in Abhängigkeit vom Infektionsstatus .....	46

Tabelle 24: Mittlere Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs (in Monaten) .....	47
Tabelle 25: Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs bei HPV-positiven und –negativen..... Patienten (in Monaten) .....	47
Tabelle 26: Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs bei Rauchern und..... Nichtrauchern (in Monaten) .....	48
Tabelle 27: Durchschnittsgröße für die Gesamtgruppe und HPV-positive und..... HPV-negative Patienten (in cm <sup>2</sup> ) .....	48
Tabelle 28: Unterschied der Durchschnittsgröße zwischen aktiven Rauchern und..... Nichtrauchern (in cm <sup>2</sup> ) .....	48
Tabelle 29: Ergebnisse Paraffinschnittmaterialien.....	51
Tabelle 30: HPV-Prävalenz in Leukoplakien und Präkanzerosen .....	55
Tabelle 31: HPV-Prävalenz bei maligner Entartung.....	60

## Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Altersverteilung während der Nachuntersuchung und der 2. HPV- Untersuchung.....	29
Diagramm 2: HPV-Quantität für den 1. und 2. Nachweis.....	29
Diagramm 3: Nachweis der verschiedenen Virustypen im 1. und 2. Nachweis.....	31
Diagramm 4: Virustypen aufgeschlüsselt nach der Art der Probengewinnung.....	31
Diagramm 5: Zeitlicher Verlauf der Infektion.....	32
Diagramm 6: Rauchverhalten.....	33
Diagramm 7 (a und b): Korrelation zwischen Rauchverhalten und HPV-Infektionsrate beim 1. (a) und 2. Nachweis (b).....	34
Diagramm 8: Anzahl der gefundenen Leukoplakien, Rezidive nicht mitgezählt.....	35
Diagramm 9: Anzahl der Rezidive.....	35
Diagramm 10: Gesamtanzahl der Leukoplakien.....	36
Diagramm 11: Anzahl an Leukoplakien und Infektionsstatus des Patienten.....	36
Diagramm 12: Prozentualer Anteil von HPV-negativen und -positiven Patienten an der jeweiligen Gesamtanzahl von Leukoplakien.....	37
Diagramm 13: Gesamtanzahl der Leukoplakien bei Rauchern und Nichtrauchern.....	38
Diagramm 14: Lage der Leukoplakien.....	39

---

Diagramm 15: Lageverteilung der Leukoplakien bei HPV-positiven und bei HPV-negativen Patienten.....	39
Diagramm 16: Lageverteilung der Läsionen bei Nichtrauchern.....	40
Diagramm 17: Lageverteilung bei Rauchern.....	40
Diagramm 18: Lokalisation der Läsionen für die einzelnen Risikogruppen.....	41
Diagramm 19: Häufigkeiten der Dysplasiegrade.....	43
Diagramm 20: Dysplasiegrade in den einzelnen Lokalisationen.....	44
Diagramm 21: Dysplasiegrad und HPV-Status.....	46
Diagramm 22: Dysplasiegrade bei Infektion mit unterschiedlichen Virustypen.....	47

## 1 Einleitung

Seit langem wird das onkogene Potential von humanen Papilloma Viren (HPV) für die Entstehung anogenitaler Karzinome verantwortlich gemacht (Campion 1987; Morrison 1994; zur Hausen & de Villiers 1994; zur Hausen 1999a; zur Hausen 1999b; Duggan 2002; Peitsaro et al. 2002; zur Hausen 2002; Postma & Van Heerden 2003; Richardson et al. 2003; Sellors et al. 2003; Cuschieri et al. 2005; Nair & Pillai 2005). Aber auch in oralen Plattenepithelkarzinomen wurde HPV DNA nachgewiesen. Deshalb wurde an der Universität Rostock schon mehrfach die Prävalenz von verschiedenen HPV-Typen in der Mundhöhle untersucht (Ostwald et al. 1994; Luttmann 1995; Bräuer 1997; Schweder 2001; Ostwald et al. 2003). In diesen Untersuchungen wurde in Übereinstimmung mit der Literatur (Miller & Johnstone 2001) eine erhöhte HPV-Nachweisrate in oralen Leukoplakien gegenüber normaler Mundschleimhaut, sowie eine erhöhte HPV-Nachweisrate in oralen Plattenepithelkarzinomen gegenüber oralen Leukoplakien festgestellt. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass HPV auch eine ätiologische Rolle in der oralen Kanzerogenese spielt. Zusätzlich beobachteten Ostwald et al. (2003) HPV häufiger in dysplastischen Leukoplakien als in solchen ohne Dysplasie. Dennoch ist ungeklärt, ob die Virusinfektion tatsächlich ursächlich für die Krebsentstehung ist, oder ob das HP-Virus nur aufgrund der pathologischen Veränderungen des Gewebes häufiger nachzuweisen ist, ohne eine ätiologische Rolle zu spielen. Auch eine synergistische Wirkung mit den bekannten Risikofaktoren Rauchen und Alkohol wurde in Erwägung gezogen (Mao et al. 1996). Für eine eher passive Rolle von HPV in oralen Läsionen sprechen eine im Vergleich zu Läsionen des cervix uteri eher geringe DNA-Kopienzahl (Ha & Califano 2004) und eine geringe transkriptive Aktivität in oralen Plattenepithelkarzinomen (Wiest et al. 2002). Aus frauenheilkundlichen Untersuchungen ist bekannt, dass eine persistente HPV-Infektion einen besonders starken Risikofaktor für die Entstehung zervikaler Plattenepithelkarzinome darstellt (Sellors et al. 2003; Cuschieri et al. 2005). Dieser Risikofaktor wurde für orale Leukoplakien bis jetzt noch nicht untersucht.

Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel herauszufinden, ob es in Leukoplakien der Mundschleimhaut (analog zur zervikalen intraepithelialen Dys- und Neoplasie) persistente HPV-Infektionen gibt und wie sich eine auch immer geartete HPV-Infektion auf das klinische Erscheinungsbild und den Dysplasiegrad im weiteren Verlauf auswirkt. Dazu sollte auch das Rauchverhalten als einer der (neben dem Alkoholgenuss) bis jetzt wichtigsten bekannten Risikofaktoren mituntersucht werden, um beide Faktoren voneinander abgrenzen zu können.

Von besonderem Interesse ist der Einfluss einer HPV-Infektion auf die Entartungsrate der Leukoplakien.

Für diese Arbeit wurden zum einen 64 Leukoplakiepatienten, bei denen bereits früher eine HPV-Untersuchung durchgeführt wurde, erneut einbestellt. Sie sollten wiederum klinisch untersucht werden und eine erneute HPV-Analyse vorgenommen werden.

Zum anderen wurde, um eine größere Fallzahl von maligne entarteten Schleimhautveränderungen untersuchen zu können, im Archiv gezielt nach histopathologischen Präparaten von Plattenepithelkarzinomen gesucht, deren direkte Vorläuferläsionen ebenfalls archiviert worden waren. Diese Exzidate sollten ebenfalls auf das Vorhandensein von HPV-DNA getestet werden. An diesem zweiten Untersuchungsmaterial sollte sich der Einfluss der HP-Viren auf das Entartungsrisiko besonders gut darstellen lassen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1.1 Definitionen und Nomenklatur

Die sogenannten Präkanzerosen werden unterschieden von den sogenannten präkanzerösen Zuständen (precancerous conditions). Präkanzeröse Zustände sind Krankheiten, die mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert sind. Auf einem Treffen der Weltgesundheitsorganisation über Vorkrebs wurde ein präkanzeröser Zustand (condition) als „ein allgemeines Stadium“ definiert, „das man mit einem signifikant größerem Risiko zum Krebs“ in Verbindung bringen kann (Pindborg 1982). Beispiele für die präkanzerösen Zustände der Mundhöhle sind die sideropenische Dysphagie, oraler Lichen ruber erosivus, Lues III der Mundhöhle, Xeroderma pigmentosum, Lupus erythematodes, Epidermolysis bullosa dystrophicans und die submuköse Fibrose. Als Beispiele für echte Präkanzerosen dagegen sind bestimmte Formen der Leukoplakie und die Erythroplakie zu nennen (Seifert et al. 2000).

Durch die WHO wurde die Leukoplakie als ein weißer, nicht wegwischarer Fleck definiert, der weder klinisch oder pathologisch einer anderen Krankheit zuzuordnen ist. Es wird also keine Aussage über das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer Dysplasie gemacht (Kramer et al. 1978). Eine makroskopisch auffällige Leukoplakie muss durch eine Biopsie exakter untersucht werden, wobei auch andere weiße näher definierte Läsionen ausgeschlossen werden müssen. Besonders die Dignität (Hyperplasie, Epitheldysplasie oder gar maligne Transformation) muss dabei festgestellt werden (Seifert et al. 2000). Die Diagnose „Leukoplakie“ ist somit eine rein klinische Diagnose. Deshalb schlagen einige Autoren vor, dass der Begriff Leukoplakie nicht mehr verwendet werden sollte, sobald eine Biopsie eine andere Diagnose ergibt. Auch Hyperkeratosen zahnloser Alveolarkammabschnitte (aber auch durch morsicatio buccarum oder linguarum verursachte Hyperkeratosen) sollten als „frictional keratosis“ von der Leukoplakie abgegrenzt werden. Das gleiche gilt für die durch Tabak hervorgerufene Stomatitis nicotina oder Keratosis palati (Raucherhyperkeratose des Gaumens) und durch Kautabak verursachte Läsionen, da sie eine spezifische Ursache haben und sich in ihrer Prognose von der Leukoplakie unterscheiden (Neville & Day 2002; Reichert 2007).

### 2.1.2 Epidemiologische Aspekte zur Leukoplakie

Von allen potentiell malignen Läsionen und Bedingungen der Mundhöhle ist die Leukoplakie die Häufigste (van der Waal et al. 1997; Reichart 2001). Die Prävalenz in Deutschland, untersucht an etwa 1000 Berlinern betrug für Männer 2,3% und für Frauen 0,9%. Der Unterschied in der Prävalenz zwischen Männern und Frauen war statistisch signifikant (Reichart 2000). In Indien variiert sie zwischen 0.2% und 4.9% (Gupta et al. 1980).

Es gibt aber nur wenige Studien über die Inzidenz der Leukoplakie (Reichart 2001). Nach einer indischen Studie liegt das dortige jährliche altersangepasste Risiko, an einer Leukoplakie zu erkranken, zwischen 1,1 und 2,4 zu 1000 für Männer und 0,2 und 1,2 für Frauen (Gupta et al. 1980).

Eine Leukoplakie tritt normalerweise nicht vor dem 30. Lebensjahr auf. Die höchste Prävalenz findet sich bei Menschen in der fünften Dekade (van der Waal et al. 1997). Die Geschlechtsverteilung differiert abhängig von der geographisch unterschiedlichen Häufigkeit und der Art des Tabakkonsums. Während in Süd-Ost Asien hauptsächlich Männer betroffen sind, ist die Geschlechterverteilung in den westlichen Ländern weniger unterschiedlich (Pindborg 1997).

## 2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Für die Entstehung der oralen Leukoplakien werden die gleichen Faktoren und Noxen wie beim Oralkrebs vermutet. Es werden dabei eine Vielzahl von chemischen, physikalischen, viralen, geographischen, und klimatischen Einflüssen diskutiert, wobei oft nicht nur ein Risikofaktor vorliegt, sondern eine multifaktorielle Ätiologie vermutet wird (Seifert et al. 2000).

### 2.2.1 Rauchen und Alkoholkonsum

Die meisten (73-97%) Leukoplakien kommen bei Rauchern vor (Einhorn & Wersall 1967; Silverman et al. 1984; Bouquot et al. 1988). 36,8% der Männer und 21,7% der Frauen in Deutschland sind Raucher (Reichart 2001). Wird das Rauchen aufgegeben oder reduziert, kommt es in bis zu 78% der Fälle zu einer Regression der Leukoplakie (Roed-Petersen 1982). Ausschließlicher Tabakkonsum verursacht eher eine Epitheldysplasie als ausschließlicher Alkoholkonsum (Jaber et al. 1999).

Exzessiver Alkoholgenuss ist nach dem Tabakkonsum der zweitwichtigste Risikofaktor in der Kanzerogenese der Mundhöhle (Moreno-Lopez et al. 2000). Zwischen Leukoplakie und Alkoholkonsum gibt es aber keinen klaren Zusammenhang (Gupta 1984; Evstifeeva & Zaridze 1992). Hindle et al. (2000) vermuten, dass seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts der Alkoholkonsum enger mit der ansteigenden Krebsinzidenz verknüpft ist als das Rauchen. Trotzdem wurde nie bewiesen, dass Alkohol eine direkte kanzerogene Wirkung hat (Reichart 2001).

Alkohol und Tabak wirken synergistisch. So ist das Risiko an Mundkrebs zu erkranken für Raucher, die gleichzeitig stark trinken, um das 15-fache erhöht gegenüber Nichtrauchern und

-trinkern (Mashberg et al. 1993). Studien über die Permeabilität der Mundschleimhaut zeigten, dass chronischer Alkoholgenuss die Durchlässigkeit für Tabak-assoziierte Nitrosamine und polyzyklische Kohlenwasserstoffe erhöht (Squier et al. 1986).

### 2.2.2 HPV-Infektionen

Bereits 1933 beobachtete Shope, dass eine Infektion mit dem Baumwollschwanzkaninchenpapillomavirus zur Entwicklung von Hautläsionen führte, die sich zu invasiven epithelialen Neoplasien weiterentwickelten. Diese Beobachtung führte zur Entdeckung des ersten DNA-Virus, das Tumoren in Säugetieren auslösen kann (McKaig et al. 1998; Modrow et al. 2003). Die humanen Papillomaviren (HPV) gehören zur Familie der Papovaviridae (papillom-polyposis-vakuolisierende Virustypen). Alle Papovaviren induzieren in einem Wirt gut- oder bösartige Tumoren (Bienz et al. 1998). Nach intensiver Forschung wurden bestimmte humane Papillomaviren mit malignen und prämaligen Läsionen der Cervix uteri, der Vulva, des Penis, der Conjunctiva und des oberen Aerodigestivtrakts in Verbindung gebracht (Pfister et al. 1985; Snijders et al. 1994). Bis heute sind über 120 verschiedene HPV-Typen bekannt (Peitsaro et al. 2002; Modrow et al. 2003).

Phylogenetisch lassen sich die HPV in drei Gruppen unterteilen, A, B und E. Diese Unterteilung basiert auf dem Grad genetischer Ähnlichkeit. Das heißt, mindestens 10% der Nucleotidsequenzen der „open reading frames“ E6, E7 und L1 (siehe Abschnitt 2.2.2.3.) müssen sich von bereits beschriebenen Vertretern unterscheiden (zur Hausen & de Villiers 1994; Modrow et al. 2003). Die HPV-Typen 16 und 18 sind vor allem für ihr onkogenes Potential bei der Entstehung von Zervixkarzinomen bekannt.

Während sich in bis zu 99% der Zervixkarzinome HPV-DNA nachweisen lässt (Fields et al. 1995; Reichart 2001), ist über die ätiologische Rolle der HPV in extragenitalen Läsionen weniger bekannt. Einige Autoren stellen einen Zusammenhang zwischen HPV und der Entstehung oraler Plattenepithelkarzinome und Leukoplakien sogar in Frage (Scully 1996). In vitro Versuche haben aber gezeigt, dass HPV auch orale Keratinozyten immortalisieren kann (Barbosa & Schlegel 1989; Munger et al. 1989; zur Hausen 1991; Scheffner et al. 1993, Stoppler et al. 1994; Fields et al. 1995; Park et al. 1995; Steenbergen et al. 1995; Oda et al. 1996).

Miller & Johnstone stellten in ihrer Metaanalyse (2001) über die von 1982 bis 1997 publizierte Literatur eine HPV-Nachweisrate von 10% in normaler Mucosa, 22,2% in oralen Leukoplakien und 46,5% in oralen Plattenepithelkarzinomen fest. Präneoplastische Läsionen

und benigne orale Läsionen wurden nicht so intensiv untersucht wie orale Karzinome (Ostwald et al. 2003).

### 2.2.3 HPV-Infektionsrate in klinisch unauffälliger Mundschleimhaut und oralen Leukoplakien

Da Papillomaviren sich nicht züchten lassen, erfolgt der Nachweis über einen Virusgenomnachweis (Bienz et al. 1998). Die Infektion mit humanen „high risk“ Papillomaviren wird als unabhängiger Risikofaktor in der Kanzerogenese betrachtet, das heißt, Tabak und Alkoholkonsum haben keinen Einfluss auf die HPV-Prävalenz (Sand et al. 2000; Giovannelli et al. 2002). Aber auch dies wird kontrovers diskutiert (siehe Kapitel 5). Allerdings haben epidemiologische Studien ergeben, dass Männer über 60 Jahre häufiger mit HPV infiziert sind, (McKaig et al. 1998) bzw. dass es eine statistische Korrelation zwischen Alter und HPV-Detektionsrate gibt (Sugiyama et al. 2003). Andererseits fanden Nielsen et al. (1996) keinen Zusammenhang zwischen Geschlecht und Infektionsrate.

Um die Rolle des HPV in der Entwicklung oraler Plattenepithelkarzinome zu evaluieren, ist es wichtig, die HPV-Nachweisrate in unveränderter Schleimhaut zu kennen. Sie wird in der Literatur von 0 bis 81% angegeben (Terai et al. 1999; Bouda et al. 2000; Sand et al. 2000). Zwei 1997 und 2001 im Raum Rostock durchgeführte Studien an 46 bzw. 29 Patienten mit klinisch unveränderter Mundschleimhaut ergaben eine HPV-Infektionsrate von 15% (Bräuer 1997) bzw. 10% (Schweder 2001). In der o.g. Metaanalyse von Miller und Johnstone (2001), in der insgesamt 94 Studien auf HPV-Infektionsraten von unverändertem Gewebe der Mundhöhle, benignen Leukoplakien, intraepithelialen Neoplasien, verrucösen Karzinomen und von oralen Plattenepithelkarzinomen berücksichtigt wurden, betrug die Nachweisrate von HPV in normaler Schleimhaut 10% (Miller & Johnstone 2001).

Über die Nachweisrate von HPV bei Leukoplakiepatienten, die in der Mundschleimhautsprechstunde in der Rostocker Klinik für Mund-, Kiefer-, und plastische Gesichtschirurgie behandelt wurden, wurden mehrfach Angaben gemacht. Dabei wurde nach den Typen 6/11, 16 und 18 gesucht. Es wurden 1995 bei 27,9%, (Luttmann 1995), 2001 bei 17% (Schweder 2001) und 2003 bei 22,2% (Ostwald et al. 2003) der untersuchten Leukoplakiepatienten HPV-Infektionen nachgewiesen. Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass in den beiden erstgenannten Studien Abstriche und Mundspülungen als Probenmaterial dienten, während in der letztgenannten Studie schockgefrorene Gewebeproben untersucht wurden, da neben der Nachweismethode auch die Art des Probenmaterials maßgeblichen Einfluss auf die Detektionsrate haben (Miller & White 1996; McKaig et al. 1998; Miller & Johnstone 2001).

In der von Miller und Johnstone bearbeiteten Literatur wurden in „benignen“ Leukoplakien durchschnittlich in 22,2% der Fälle HPV nachgewiesen (Miller & Johnstone 2001).

Andere Autoren (Sugiyama et al. 2003) widersprechen den Ergebnissen von Miller und Johnstone. Unter Berufung auf Studien (Syrjänen et al. 1988; D'Costa et al. 1998), nach denen die HPV-Infektionsrate in Hyperkeratosen oder prämaligen Läsionen höher ist als in malignen Geschehen, stellten sie die These auf, dass HPV eine Rolle als Initiator epithelialer Proliferation spielen könnte. In den Untersuchungen von Sugiyama et al. (2003) lagen die HPV-Nachweisraten bei 36% (16/44 Fällen) in normaler Schleimhaut, 61% (31/51 Fällen) in epithelialen Dysplasien und 35% (30/86 Fällen) in Plattenepithelkarzinomen. Bei 22 der 31 HPV-positiven Fälle mit Epitheldysplasie entwickelte sich später ein orales Plattenepithelkarzinom. In diesen Tumoren war in 82% der Fälle HPV Typ 16 nachweisbar. Demgegenüber enthielten nur 45% der Epitheldysplasien, die sich nicht zu einem Karzinom entwickelten, HPV-DNA. Die HPV-Detektionsrate in Plattenepithelkarzinomen, die sich aus einer HPV-positiven Epitheldysplasie entwickelten, war statistisch signifikant höher als im Rest der Plattenepithelkarzinomfälle (Sugiyama et al. 2003). Auch D'Costa et al. (1998) vermuten als Ursache für eine höhere Nachweisrate von HPV in prämaligen Läsionen verglichen mit Plattenepithelkarzinomen eine Initiatorrolle von HPV bei der malignen Transformation. Durch die Virusinfektion könnten sich genetische Defekte anhäufen und die episomale Virus-DNA im Laufe der Zellreplikation verloren gehen. So ließ sich in mit HPV 18 transfizierten, immortalisierten Zelllinien, die in Mäuse ausgebracht wurden, in einigen Fällen später keine HPV-DNA mehr in den Tumoren nachweisen (Iwasaka et al. 1992). Dies könnte erklären, warum die HPV-Detektionsrate in oralen Plattenepithelkarzinomen in einigen Untersuchungen niedriger ist als in Präkanzerosen.

Untersucht man orale Leukoplakien auf die Infektionsraten der einzelnen Virustypen, zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse. Die von Ostwald et al. (2003) veröffentlichte Studie zeigte, dass 16,7% der Leukoplakien positiv für HPV 16 und 18 und 11,1% positiv für HPV 6/11 waren. Im Gegensatz dazu wurden in der Untersuchung von Schweder (2001) in allen HPV positiven Leukoplakien ausschließlich HPV 6/11 nachgewiesen. Insgesamt war in oralen Leukoplakien seltener HPV anzutreffen als in oralen Karzinomen und es handelte sich dann öfter um „low-risk“ Virustypen (Miller & Johnstone 2001).

Möglicherweise hat die Lokalisation der Läsion einen Einfluss auf die Infektionsrate. In einer dänischen Studie war die Mehrzahl der HPV-positiven Präkanzerosen (Leukoplakien und Erythroplakien) an der Wangenschleimhaut lokalisiert und imponierten überwiegend als

verrucöse Leukoplakie ohne oder mit geringer Dysplasie. Die Mehrzahl der HPV-negativen Läsionen befanden sich sublingual und stellten sich überwiegend als Erythroplakie oder noduläre Leukoplakie dar, ebenfalls ohne oder nur mit geringer Dysplasie (Nielsen et al. 1996). Miller und White fanden nennenswerte Unterschiede in der Infektionsrate nur in Leukoplakien, die an der Lippe (17,2% HPV-negativ zu 26,6% HPV-positiv) und am Gaumen (10,3% HPV-negativ zu 4,1% HPV-positiv Leukoplakien) lokalisiert waren. Andere Untersuchungen beobachteten allerdings ein Ansteigen der Häufigkeit einer HPV-Infektion in Verbindung mit einem Ansteigen des Dysplasiegrades (Gassenmaier & Hornstein 1988; Miller & Johnstone 2001; Ostwald et al. 2003; Sugiyama et al. 2003).

#### 2.2.4 Ansteckung und Infektionsverlauf

Es ist nur wenig über die Ansteckungswege und den Infektionsverlauf, d.h. Persistenz oder Transienz der HPV-Infektion in oraler Mucosa bekannt. Deshalb soll zunächst über das Verhalten von HPV-Infektionen in zervikaler Schleimhaut berichtet werden.

Bei genitalen HPV-Infektionen wird HPV vermutlich vorwiegend sexuell übertragen. Es muss aber noch andere Übertragungswege geben, da HPV selten auch bei Frauen ohne bisherige Sexualkontakte nachgewiesen wird. Hier wird eine vertikale Übertragung, eine Ansteckung an infektiösen Gegenständen oder Hautkontakt vermutet (Scully 2005). Genitale HPV-Läsionen stellen aber kein Risiko für orale HPV-Läsionen dar. Die Prävalenz von HPV in oralen Abstrichen betrug bei Frauen mit gegenwärtiger oder vorausgegangener zervikaler HPV-Infektion ca. 4% (Kellokoski et al. 1990). Ob das Risiko an einem oralen Plattenepithelkarzinom zu erkranken mit der Anzahl der Sexualpartner oder mit dem Praktizieren von oralem Geschlechtsverkehr ansteigt, ist umstritten, wird aber vermutet (Scully 2005).

Die höchste Inzidenz findet sich bei 15 bis 19 jährigen Frauen und ist unter anderem abhängig von der Anzahl der Partner oder einer Immunsuppression z.B. bei einer HIV-Infektion. Sie nimmt aber ab dem 24. Lebensjahr spürbar ab (Sellors et al. 2003). Die Inzidenz betrug in einer Studie an 608 jungen Frauen kumulativ über drei Jahre etwa 60%. Nach 12 Monaten hatten allerdings 70% dieser Frauen ihre Infektion geklärt, nach 24 Monaten waren nur noch 9% der Frauen HPV-positiv (Ho et al. 1998). In der Studie von Sellors et al. (2003) konnte bei 28 (52%) von 54 HPV-positiven Probandinnen ohne zytologische Veränderungen der Schleimhaut das Virus nach einem Jahr nicht mehr nachgewiesen werden. Dies wurde mit einer Klärung oder eines latent werdens der Infektion begründet. Von den in der ersten Untersuchung negativ getesteten Frauen wiesen 11% eine neu erworbene Infektion auf.

---

Eine finnische Untersuchung (Rintala et al. 2005) befasste sich mit dem Verhalten der HPV-Infektion bei Neugeborenen und ihren Eltern. Sie wurden über zwei Jahre nachuntersucht. Dabei konnte keine persistente HPV-Infektion bei Kindern nachgewiesen werden. Der stärkste Risikofaktor für einen positiven HPV-Nachweis in oralen Proben bei den Kindern war eine persistente HPV-Infektion der Mutter zwei Jahre nach der Geburt. Auch korrelierte ein positiver HPV-Nachweis in oralen Proben der Väter vor der Geburt mit einem positiven HPV-Nachweis in oralen Proben der Babys sechs Monate nach der Geburt. Die Inzidenz des Virus war sechs Monate nach der Geburt am höchsten, vermutlich da dann die plazentagängigen Antikörper der Mutter durch kindeseigene ersetzt werden. Die Ansteckungsmechanismen des HPV-Virus in Familien werden noch immer schlecht verstanden und sind wohl auch von der Entwicklung des Immunsystems des Säuglings abhängig.

Nach einer britischen Studie (Mant et al. 2003) sind HPV 16-Infektionen bei 4-9 Jährigen häufig und transient. Die HPV Prävalenz lag in einer Gruppe von 20 HPV 16 positiv getesteten Kindern nach 30 Monaten bei nur noch 50%. Umgekehrt erwarben in einer Gruppe von 19 HPV-negativ getesteten Kindern 63% die Infektion. Auch Geschwister und Eltern wurden auf HPV getestet. Da alle Eltern HPV-negativ waren, erschien den Autoren ein horizontaler Infektionsweg als wahrscheinlich. Sie stellten außerdem die interessante These auf, dass eine frühe HPV 16-Infektion zur immunologischen Toleranz von HPV 16 führe und daraus eine Persistenz der Infektion resultieren könne.

Auch bei Erwachsenen sind HPV-Infektionen der Mundhöhle zum Teil transient. In einer japanischen Studie (Kurose et al. 2004) wurde die HPV-Prävalenz von 662 gesunden Probanden erforscht. Nur vier Probanden erwiesen sich als HPV-positiv. Es wurden die HPV-Typen 16, 71, 53 und der kutane Typ 12 festgestellt. Bei den HPV-positiven Probanden wurde zwei Jahre später wiederum eine HPV-Untersuchung durchgeführt. Nur die Probanden, die mit HPV-Typ 12 und 71 infiziert waren, waren erneut positiv. Die Autoren vermuten, dass die HPV-Infektion mit den Typen 16 und 53 bei den anderen zwei Probanden nur einen transienten Charakter hatte.

Leider gibt es keine Untersuchungen zur Persistenz oder Transienz von HPV bei Patienten mit oralen Leukoplakien. Schweder (2001) untersuchte die HPV-Prävalenz in oralen Plattenepithelkarzinomen vor und nach der Therapie. Dabei war die HPV-Nachweisrate bei nur chirurgisch therapierten Patienten ähnlich der der noch unbehandelten Patienten. Im Gegensatz dazu war die HPV-Nachweisrate bei Patienten, die eine Polychemotherapie

und/oder eine radiatio erhalten hatten, erhöht. Letzteres wurde mit einer durch die Therapie verursachten lokalen und systemischen Immunsuppression begründet.

### 2.2.5 Aufbau des Virus und angenommener Pathomechanismus

Das humane Papillomavirus ist 55 nm groß und besitzt keine Hülle. Das Erbgut umfasst etwa 8000 Basenpaare. Die doppelsträngigen, kovalent zu einem Ring geschlossene DNA (Bienz et al. 1998; McKaig et al. 1998) bildet mit zellulären Histonen einen Komplex, der von einem Proteinmantel umschlossen ist.

Das Genom lässt sich in drei Abschnitte einteilen. Die „early region“ (die Expression erfolgt früh nach der Infektion), die „late region“ (die Expression erfolgt spät nach der Infektion) und die „long control region“ (LCR). Letztere umfasst etwa 10% des Genoms und reguliert die Expression der viralen Gene, denn sie enthält die meisten cis-wirksamen Kontrollelemente wie Promotoren, Enhancer und den Replikationsursprung (Sugerman & Shillitoe 1997; Modrow et al. 2003).

Innerhalb der „early“ und der „late“ Regionen lassen sich weitere DNA-Abschnitte unterteilen. Diese als „open reading frames“ (ORF) bezeichneten Bereiche können zu Proteinen translatiert werden (Heilman et al. 1982; McBride et al. 1991; Fuchs & Pfister 1994).

Die „late region“ umfasst 40% des Genoms (McKaig et al. 1998; Modrow et al. 2003) und enthält die L1- („Late gene 1“) und L2-ORF, die das Struktur- und das Kapsidprotein des Virus kodieren. Sie werden nur in ausdifferenzierten Plattenepithelzellen exprimiert (Garlick & Taichman 1991; McKaig et al. 1998; Moscicki 1999; Modrow et al. 2003).

Die „early region“ umfasst 50% des Genoms und enthält die ORF E1 („early gene 1“) bis E7. Sie codieren nichtstrukturelle Proteine, die für die Kontrolle (Induktion und Regulation) der DNA-Replikation und Transformation (Onkogenität) zuständig sind (Heilman et al. 1982; McKaig et al. 1998).

Während bei den meisten Papillomaviren die ORFs E4, E5, und E7 ein einziges Polypeptid codieren, können aus den Genen E1, E2 und E6 durch unterschiedliches Spleißen mehrere einander ähnliche Polypeptide exprimiert werden (Fuchs & Pfister 1994; McKaig et al. 1998; Modrow et al. 2003).

Der E1 ORF codiert Polypeptide von 68 und 85 kDa und ist für die Replikation des viralen Genoms verantwortlich (Modrow et al. 2003). Ihnen werden drei verschiedene Funktionen zugeschrieben, ATPase- und Helikaseaktivität, sowie die Fähigkeit an adenosin- und thymidinreiche Regionen der DNA im Bereich des Replikationsursprungs zu binden (Clertant

& Seif 1984; Seo et al. 1993; Modrow et al. 2003), wobei E2 die Bindung an den Replikationsursprung vermittelt und stabilisiert. In phosphorylierter (aktiver) Form bildet E1 Hexamere, die mit DNA-Polymerase  $\alpha$ , Primase und anderen Proteinen wechselwirken. In undifferenzierten Epithelzellen, die noch nicht zur Lyse vorgesehen sind, kontrolliert E1 eine begrenzte Replikation des viralen Genoms (50-400 Kopien pro Zelle) und steuert die Weitergabe der Genomkopien bei der Zellteilung. Eine weitere Funktion tritt in ausdifferenzierten Epithelzellen zu Tage, die einen lytischen Infektionsablauf erlauben. Dort findet ein Umschalten der Replikation des vorher weitgehend konstant gehaltenen Kopienstatus zur produktiven Virusvermehrung statt (Modrow et al. 2003).

Vom E2 ORF können mehrere verschiedene dimere Proteine synthetisiert werden, die DNA binden können. Sie spielen bei Transkription und Replikation eine wichtige Rolle. Das E2 Protein bindet im Bereich verschiedener Promotorsequenzen in der „long control region“ (LCR) und des Replikationsursprungs. Im Bereich des Replikationsursprungs unterstützt es die Bindung von E1. Ein 48 kDa schwerer Vertreter des E2 besitzt zwei funktionelle Domänen: Mit der am carboxyterminalen Ende gelegenen Domäne bindet es an DNA. Dazu muss das Protein allerdings als Dimer vorliegen. Die am aminoterminalen Ende gelegene Domäne wirkt transaktivierend, indem sie sich an konditionelle Enhancer (verstärkt/ermöglicht die DNA Transkription) in der LCR bindet und mit anderen E2 Polypeptiden die Transkription der E6 und E7 ORF reguliert. Bei den onkogenen HPV16 und HPV18 unterdrückt E2 die Transkription von E6 und E7 in Zervixkeratinozyten. Allerdings wird der E2 ORF bei der Integration der viralen DNA ins Wirtsgenom häufig zerstört, so dass es zu einer Aktivierung der E6-, E7 Expression kommen soll. Beim bovinen Papillomvirus existieren noch zwei weitere Produkte des E2 ORF, die beide transreprimierend wirken. Es ist aber unklar, ob humane Papillomaviren ähnlich wirkende E2 Produkte besitzen (Modrow et al. 2003).

Das Produkt des E5 ORFs bildet einen Komplex mit verschiedenen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (epidermal growth factor receptor, platelet derived growth factor receptor, colony stimulating factor-1 receptor) und stimuliert so das Zellwachstum. Es scheint nur in der frühen Phase der Infektion eine wichtige Rolle zu spielen. Bei der Integration in das Wirtsgenom wird es aber häufig zerstört (zur Hausen 2002). In den meisten HPV positiven Tumoren wird es nicht exprimiert (McKaig et al. 1998).

Das im ORF E6 codierte Protein trägt in den onkogenen Virustypen zur Transformation bei, kann jedoch diesen Prozess nicht alleine induzieren (Munger et al. 1989; Modrow et al. 2003). Bei HPV 16 hat das E6-Protein eine Länge von 151 Aminosäuren und enthält zwei Zinkfingerdomänen (mehrere cytosinreiche Sequenzen innerhalb eines Proteins, die Zink-Ionen koordinativ binden, ein Zeichen dafür, dass dieses Protein an DNA binden kann). Das E6 der „high risk“ HPV (HPV 16 & 18) kann mit Produkten zellulärer Tumorsuppressorgene interagieren, unter anderem mit p53, Produkt eines Tumorsuppressorgens (s.u.). Durch diese Wechselwirkung wird der vorzeitige Abbau des p53 provoziert und sein Transport in den Zellkern verhindert (Hubbert et al. 1992; Klingelhutz et al. 1996; Modrow et al. 2003). Bei dem den Abbau einleitenden Enzym handelt es sich um das E6-assoziierte Protein (E6-AP), eine Ubiquitin Ligase, die das p53 mit Ubiquitin unter ATP-Spaltung verknüpft. Durch die Bindung mit Ubiquitin wird das p53 dem körpereigenen Weg des Proteinabbaus zugeführt und kann seiner Funktion nicht mehr nachkommen (Scheffner et al. 1990; Modrow et al. 2003). Die physiologische Funktion des p53 liegt in der Aktivierung der Expression von Genen, deren Produkte der Arretierung des Zellzyklus in der G1- und G2-Phase des Zellteilungszyklus und der Einleitung der Apoptose dienen. Die „Pausen“ im Zellzyklus werden normalerweise zur DNA-Reparatur genutzt. Geht die Zelle ohne Reparatur in die S-Phase über, kann das zur Akkumulierung von Mutationen führen (McKaig et al. 1998, Modrow et al. 2003). Der Funktionsverlust von p53 führt also zur Deregulation des Zellzyklus und so zu chromosomaler Instabilität (Werness et al. 1990; Havre et al. 1995) .

Auch das proapoptotische Protein Bak, das physiologischerweise in den oberen, differenzierten Hautschichten in großen Mengen gebildet wird, wird ebenfalls durch Anlagerung von E6-AP dem vorzeitigen Abbau zugeführt. Dadurch wird die Einleitung der Apoptose verhindert (Modrow et al. 2003). Bei HPV 16 können durch Spleißvorgänge noch zwei weitere kleine E6 Varianten gebildet werden, die an der Regulation des p97 (ein weiterer Tumorsuppressor) Promotors in der LCR-Region beteiligt sind (McKaig et al. 1998).

Neben der Fehlsteuerung des Abbaus von Regulatorproteinen liegt ein weiterer Mechanismus in der Aktivierung der zellulären Telomerase. Dabei handelt es sich um ein Enzym, bestehend aus einem Ribonukleotidkomplex, der die telomeren Wiederholungssequenzen am Ende der Chromosomen synthetisiert. Normalerweise verkürzen sich die Telomere nach jeder Teilung und spiegeln so die Zellalterung wider (Modrow et al. 2003). Eine Verlängerung der Telomere stellt also einen Schritt zur Immortalisierung der Zelle dar (Klingelhutz et al. 1996).

Das im E7 ORF codierte Protein mit einer Länge von 98 Aminosäuren wird als die Hauptursache für das transformierende Potential bestimmter HPV angesehen (Modrow et al. 2003). Wichtiger Bestandteil dieses Proteins ist ein aus Cys-X-X-Cys Wiederholungseinheiten bestehendes Zinkfingermotiv im carboxyterminalen Bereich des Proteins, das in Aminosäuresequenz und Funktion ähnlich der CR3-Domäne des E1A-Proteins der Adenoviren ist. Hierüber interagiert das E7 mit dem zellulären Transkriptionsfaktor TFIID, der an eine TATA-Box, eine thymin- und adenosinreiche Teilsequenz innerhalb der DNA binden kann. Diese ist dem Transkriptionsstart vorgelagert und dient der RNA-Polymerase zur Anlagerung an die DNA.

Daneben befähigen die ersten 37 Aminosäuren am aminoterminalen Ende das E7 zur Bindung an die zellulären Tumorsuppressorproteine Rb105 und Rb107 (aus der Retinoblastoma Genfamilie synthetisierte Proteine). Physiologisch bindet Rb 105 in seiner aktivierten (dephosphorylierten) Form an den Transkriptionsfaktor EF2 (einen Transkriptionsaktivator) und inaktiviert ihn so. In seiner freien Form bindet EF2 an von ihm abhängige Promotoren und aktiviert so die Expression von Proliferationsfaktoren. E7 ist in der Lage, den Komplex von EF2 und Rb 105 zu lösen und selbst einen Komplex mit Rb105/107 einzugehen. E7 aktiviert so EF2. Die Folge ist eine unregelmäßige Zellteilung (Modrow et al. 2003).

Interessant dabei ist, dass die E7 Gene der „low risk“ HPV 6/11 keine so hohe Affinität zu Rb 107/105 besitzen und diese auch nur selten mit Tumorerkrankungen in Verbindung stehen (Modrow et al. 2003).

Davies et al. (1993) berichten über Wechselwirkungen von E7 mit weiteren Mitgliedern der Retinoblastomgenfamilie, Rb1, p107 und p130. Während die Interaktion von E7 mit Rb1 wie mit Rb105/107 eine Aktivierung von EF2 zur Folge hat, verhindert das Binden von E7 an p130 und p107 wiederum deren Bindung an Cyclin A und Cyclin B, wodurch diese ihre normale Aufgabe nicht wahrnehmen können (Zhu et al. 1993; Claudio et al. 1994). Cycline binden als regulatorische Untereinheit an eine cyclinabhängige Proteinkinase. Dieser Komplex wird MPF (maturation promoting factor, eine Serin/Threonin Proteinkinase) genannt und phosphoryliert verschiedene für die Mitose wichtige Proteine, nachdem er selbst phosphoryliert wurde (weitere Steuerungsmechanismen), und löst so die Mitose aus (Koolman 1994).

Auch in potentiell prä-malignen Läsionen wird eine ätiologische Rolle von HPV 16 vermutet (Palefsky et al. 1995; Fornatora et al. 1996).

### 2.2.6 Kopienzahl und Expression der HPV-DNA in oralen Läsionen

Quantitative Untersuchungen haben ergeben, dass die HPV-DNA Kopienzahl in oralen Läsionen verglichen mit zervikalen Läsionen geringer ist. In einer italienischen Studie (Giovannelli et al. 2002) wurden 59 Patienten mit potentiell malignen Läsionen (35 Patienten mit Leukoplakien und 24 Patienten mit oralem Lichen planus) mit einem PCR-System untersucht, das in zwei unterschiedlich sensitiven Stufen funktionierte. Die erste Stufe wies 200-500 Kopien des HPV-Genoms nach, mit ihr wurden aber nur 7% der positiven Fälle nachgewiesen. Die anderen 93% wurden mit der sensitiveren Stufe nachgewiesen, die bereits 2-10 HPV-Genome nachwies. Diese Tatsache wurde von den Autoren so interpretiert, dass orale HPV-Infektionen verglichen mit zervikalen HPV-Infektionen nur schwach produktiv sind. Ha et al. (2002) untersuchten die HPV-Prävalenz in 102 prämaligen, oralen Läsionen mit einer quantitativen PCR, die ihnen erlaubte, die Kopienanzahl von HPV 16 und HPV 18 DNA in den Proben zu bestimmen. Nur in einem Prozent der Proben wurde eine Kopie HPV-Erbgut auf zehn Wirtszellen nachgewiesen. Nach Ansicht der Autoren müsse HPV in dieser Konzentration vorhanden sein, um eine ätiologische Rolle in der malignen Entartung spielen zu können. Sie schlossen daraus, dass HPV-DNA nur in einer kleinen Minderheit von prämaligen Läsionen in ausreichender Menge vorhanden ist, um eine maligne Entartung des Epithels zu provozieren.

Auch wenn es detaillierte Vorstellungen zum Pathomechanismus gibt, herrscht insbesondere bei oralen Karzinomen nur wenig Klarheit über die Expression der onkogenen viralen Gene. In den wenigen Untersuchungen (Al-Bakkal et al. 1999; Wiest et al. 2002) zur Expression der Onkogene E6 und E7 konnte gezeigt werden, dass diese zum Teil auch transkribiert wurden. Wiest et al. (2002) zeigten in ihrer Arbeit, dass bei 12 von 28 HPV 16 infizierten Karzinomen im Kopf-Halsbereich E6 und E7 transkribiert wurde. Bei fast allen diesen Tumoren lag der p53 Wildtyp vor (10 von 12), während in den Tumoren ohne E6/E7 Expression p53 mutiert war (12 von 16). In den meisten der Tumoren mit E6/E7 Expression war die Expression von pRb stark erniedrigt (10 von 12), p16 wurde aber überexprimiert (8 von 10). In den Tumoren, in denen E6/E7 nicht exprimiert wurde, ließ sich das E6/E7 Gen nur in zwei von 13 Fällen nachweisen, d.h. in 11 Fällen war es gelöscht worden. Die meisten Tumoren mit E6/E7 Expression dieser Untersuchung stammten aus dem Oropharynx, nur einer aus der Mundhöhle. Zwei weitere Tumoren aus der Mundhöhle zeigten keine E6/E7 Expression und p53 war mutiert. Van Houten et al. (2001) konnten zwar in 20 von 84 Kopf- und Halsplattenepithelkarzinomen HPV-DNA nachweisen, in aber nur neun Fällen wurde eine E6 m-RNA transkribiert. Der oben beschriebene Pathomechanismus scheint also zwar

für einige Kopf- und Halsplattenepithelkarzinome wirksam zu sein, aber gerade für orale Plattenepithelkarzinome ließ sich dies nur für einen Bruchteil der Fälle feststellen.

### 2.3 Prognose

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Leukoplakie entartet, wird in der Literatur unterschiedlich bemessen. Dabei haben das klinische Erscheinungsbild, der Dysplasiegrad, sowie das Vorhandensein von verschiedenen Biomarkern (Verlust der Heterozygotie, chromosomale Polysomie) sowie insbesondere die Ploidität (Sudbø et al., 2001) des Chromosomensatzes Einfluss auf die Prognose.

Neben dem klinischen Erscheinungsbild (homogene/plane, oder inhomogene mit den Unterformen verrukös, nodular, ulzeriert, oder Erythroleukoplakie, entsprechend der Klassifikation nach Axell et al. 1996) nehmen auch der Durchmesser, die Dicke, die Dauer des Bestehens, das Bestehen von weiteren Risikofaktoren, die Lokalisation, Besiedlung mit *Candida albicans* und der Dysplasiegrad Einfluss auf die Prognose (van der Waal et al. 1997; Seifert et al. 2000)

#### 2.3.1 Dysplasiegrad

Dem Dysplasiegrad kommt von den oben genannten Faktoren die größte Bedeutung zu. Das Risiko zu entarten ist bei einer Leukoplakie mit Dysplasie fünfmal höher als bei einer Leukoplakie ohne Dysplasie (Seifert et al. 2000). Es scheint unklar, ob ein Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und Dysplasiegrad besteht. Sand et al. (2000) fanden in ihrer Untersuchung keinen Zusammenhang, während Nielsen et al. (1996) feststellten, dass der Anteil der HPV-positiven Leukoplakien mit steigendem Dysplasiegrad zunimmt.

#### 2.3.2 Einfluss einer HPV-Infektion auf die Entartungsrate

In anogenitalen HPV-Infektionen hatten Frauen mit einer persistierenden HPV-Infektion verglichen mit nie HPV-positiven Frauen ein 10-fach höheres Risiko, eine zervikale intraepitheliale Neoplasie zu entwickeln (Sellors et al. 2003). Es gibt leider keine Studien, die die HPV-Persistenz oder Transienz in oralen Leukoplakien untersuchten. Einige wenige Studien untersuchten aber den Einfluss einer HPV-Infektion auf die Entartungsrate.

In einer dänischen Studie wurden 49 Patienten mit Präkanzerosen über durchschnittlich 6.3 Jahre nachuntersucht. Drei der 49 (zwei mit der klinischen Diagnose einer Erythroplakie und einmal eine verruköse Leukoplakie) entwickelten ein orales Plattenepithelkarzinom. Alle drei Patienten waren HPV positiv (Nielsen et al. 1996).

Sugiyama et al. (2003) untersuchten 51 Gewebeproben mit Epitheldysplasie auf das Vorhandensein von HPV. Von ihnen entwickelten sich 22 zu einem oralen Plattenepithelkarzinom. In 18 der 22 Fälle (82%) wurde HPV 16 DNA nachgewiesen. In Epitheldysplasien, die kein Plattenepithelkarzinom entwickelten, lag die Infektionsrate bei nur 45% (13 von 29 Dysplasien). Die unterschiedliche HPV-Infektionsrate dieser beiden Gruppen war statistisch signifikant.

### 3 Material und Methode

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen bei einer Gruppe von 24 Patienten, die bereits einmal auf HPV untersucht worden waren, zum zweiten Mal eine HPV-Analyse durchgeführt. Die Patienten wurden erneut klinisch untersucht sowie der Krankheitsverlauf retrospektiv aufgearbeitet (unter A). Zum anderen wurde von acht Patienten, die aus einer histologisch untersuchten Vorläuferläsion an gleicher Stelle ein Plattenepithelkarzinom entwickelten, Paraffinmaterial auf HP-Viren hin untersucht (unter B). Die Untersuchungen werden im Folgenden getrennt dargestellt.

#### A:

##### 3.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Für die Studie wurden 64 Patienten aus der Poliklinik für Mund-, Kiefer-, und plastische Gesichtschirurgie der Universität Rostock einbestellt, bei denen eine Leukoplakie der Mundschleimhaut diagnostiziert worden war und bei denen zu einem früheren Zeitpunkt eine Untersuchung auf HP-Viren (Typ 6/11, 16, 18) im molekular-pathologischen Labor des Institutes für Pathologie erfolgt war. 30 dieser 64 Patienten erschienen. Sechs Patienten mussten im Nachhinein von der Studie ausgeschlossen werden, da bei vier von ihnen anamnestisch ein Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle bereits vor dem ersten Auftreten einer Leukoplakie vorgelegen hatte, in einem weiteren Fall der histologische Befund nicht eindeutig von einem oralen Lichen planus abzugrenzen war und im sechsten Fall die zehnjährige Aufbewahrungspflicht der klinischen Akte verstrichen war.

##### 3.2 Anamnestisch und klinisch erhobene Parameter

Im Rahmen der jetzigen Arbeit wurde erneut eine HPV-Analyse (für die Typen HPV 6/11, 16 und 18) durchgeführt und gleichzeitig klinische Parameter zum jetzigen Untersuchungszeitpunkt sowie retrospektiv untersucht. Dazu wurde eine Rauchanamnese und der klinische Befund erhoben. Im klinischen Befund wurde die Lokalisation und Größe der Läsion festgehalten und das klinische Erscheinungsbild klassifiziert (s.u.). Die Raucher wurden nach Stärke ihres Rauchverhaltens in Untergruppen eingeteilt, wie in einer Arbeit von Mashberg et al., (1993) vorgeschlagen. Es wurde unterschieden zwischen:

- seit über zwei Jahre Nichtraucher
- 6-15 Zigaretten am Tag

- 16-25 Zigaretten am Tag
- und 26-35 Zigaretten am Tag

Die Größe der Läsion wurde in cm<sup>2</sup> festgehalten. Dabei wurden die Größe eher runder Leukoplakien nach der Formel  $A=\pi r^2$ , für eher ovale/rechteckige Leukoplakien nach der Formel  $A=ab$  bestimmt.

Die Einteilung der Lage orientierte sich an einem Vorschlag von Rød-Petersen 1969, (zitiert aus Pindborg „Krebs und Vorkrebs der Mundhöhle“, 1982). Da bei einem kleinen Patientenkollektiv eine sehr differenzierte Einteilung nicht zweckmäßig ist, wurden einige Lokalisationen zusammengefasst (z.B. Alveolarkamm Oberkiefer vestibulär und Alveolarkamm Oberkiefer palatinal in „Alveolarkamm Oberkiefer“). An anderen als den hier genannten Lokalisationen kamen keine Leukoplakien vor.

- dorsale Zungenoberfläche
- Zungenrand
- Mundboden, ventrale Zungenoberfläche
- harter Gaumen
- Alveolarkamm Oberkiefer
- Alveolarkamm Unterkiefer
- Retromolarraum
- Planum buccale
- Retroangulär
- äußere Lippe

Die klinische Einteilung erfolgte in:

- plane Leukoplakie
- noduläre Leukoplakie
- verruköse Leukoplakie
- ulzerierte Leukoplakie
- und Erythroleukoplakie

und folgte damit der Einteilung durch die Weltgesundheitsorganisation, wie sie im Kapitel „Erkrankungen der Mundschleimhaut“ (Schwenzer & Schmelzle 2001) im Buch „Zahnärztliche Chirurgie“ von Schwenzer und Ehrenfeld (2001) beschrieben ist (dort nach Axell et al. 1996).

Retrospektiv wurde anhand der Akten das erste Auftreten der Läsion, das klinische Erscheinungsbild, die bisherige Behandlung und ggf. der Dysplasiegrad festgestellt. Die Einteilung des Dysplasiegrades erfolgte in die Klassen nach Seifert et al. (2000):

- ohne Dysplasie
- geringgradige Dysplasie: Basalzellhyperplasie, Störung der Basalzellpolarität
- mittelgradige Dysplasie: mäßige Zellkernpolymorphie, Verlust der Basalzellpolarität erhöhte Mitosefrequenz in Parabasalzellen
- hochgradige Dysplasie: deutliche Zellkernpolymorphie mit vermehrten Mitosen auch suprabasal, Störung der Epithelschichtung, zahlreiche Dyskeratosen, Verminderung der zellulären Kohäsion
- Carcinoma in situ: Merkmale der hochgradigen Dysplasie und Verlust der Epithelschichtung, noch kein invasives Wachstum
- invasives Karzinom: wie beim Carcinoma in situ, aber Basalmembran durchbrochen

Auch Rezidive wurden in gleicher Art erfasst.

### 3.2.1 Gewinnung und Behandlung der Proben

Für die HPV-Analyse der nachuntersuchten Leukoplakiepatienten wurden von jedem der 24 Patienten drei Proben gewonnen:

- ein Abstrich mit einem sterilen „scharfen chirurgischen Löffel“ direkt von der Läsion,
- ein Abstrich mit einem sterilen „scharfen chirurgischen Löffel“ von unveränderter Schleimhaut,
- anschließend wurde eine Mundspülung zur Gewinnung weiterer Epithelzellen vorgenommen.

Die Abstriche von der Schleimhaut wurden gewonnen, indem mit dem Instrument über die Läsion oder den Ort der ehemaligen Läsion und über unveränderte Schleimhaut im Bereich der Wange, der Zunge und des harten Gaumens „gekratzt“ wurde. Die so gewonnenen Zellen wurden separat in je 1 ml TE 8 (50 mM Tris HCL; pH: 8,0; 1mM EDTA) überführt.

Anschließend wurden die Proben bei 2000 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut 200µm TE 8 zugegeben. Daraufhin wurde etwas alkalisches, komplexbildendes Harz (Chelating resin<sup>®</sup> Fa. Sigma, St. Louis, U.S.A.) zugesetzt, mit einem Rüttler untergemischt und 1 min bei 2000 U/min anzentrifugiert. Diese Suspension wurde anschließend im Wasserbad für 10 min auf 95°C erhitzt und die Proben im Kühlschrank gelagert. Vor ihrer Verwendung für die PCR wurden die Proben jeweils erneut zentrifugiert und 1-5 µl entnommen.

### 3.2.2 Gewinnung und Behandlung der Mundspülflüssigkeit und DNA-Präparation

Nachdem die beiden Abstriche erfolgt waren, spülten die Patienten für 30 sec mit 3% Sucrose- (=Saccharose-)lösung. Die aufgefangene Spülflüssigkeit wurde für 10 min mit 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 ml TE8 gewaschen, anschließend zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Nun wurden entsprechend der Anleitung eines DNA-Präparationssets (NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue-Kit, Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland; die Bezeichnungen der Puffer entsprechen den im Set angegebenen Namen) 360µl Digestionspuffer T1 zugegeben und die Probe nach Durchmischung zu gleichen Teilen aufgeteilt, da sich makroskopisch sehr viel Sediment darstellte. Diese Proben wurden bis zur DNA-Präparation bei -20°C gelagert.

Für die DNA Präparation aus der Mundspülflüssigkeit wurde zu 180µl der im Lysispuffer T1 aufgenommenen Probe 25 µl Proteinase K (20 mg/l, Fa. Roche, Mannheim) zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden nach kurzem anzentrifugieren 200 µl eines Puffers B3, der chaotop Salz enthält, zugegeben und die Proben für 10 min bei 70°C inkubiert. Um die DNA-Bindungsbedingungen anzupassen, wurden 210 µl 100%igen Ethanol hinzugefügt und durch etwa zehnmaliges auf- und wieder abgeben der Flüssigkeit mit der Pipette gemischt.

In ein 2 ml Sammelröhrchen wurde ein Plastikröhrchen mit Siliciamembran (im o.g. Kit enthalten) platziert, die Probe auf das Säulchen gegeben und bei 10000 U/min für 1 min zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen.

Zum Waschen der nun auf der Siliciamembran gebundenen DNA wurde 500 µl BW Puffer (Waschpuffer) auf das Säulchen gegeben und erneut 1 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde wiederum verworfen. In einem zweiten Waschvorgang wurden 600 µl B5 Puffer auf das Säulchen gegeben und bei 10000 U/min für eine Minute zentrifugiert.

Anschließend wurde das Säulchen auf ein neues Sammelröhrchen gesteckt und bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert, um Reste von Alkohol zu entfernen.

Zur Eluation der DNA wurden auf jede Säule 100  $\mu$ l von 70°C warmen Eluationspuffer BE pipettiert und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert, und das Zentrifugat bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank gelagert.

## **B:**

### 3.3 Untersuchungsparameter für das Paraffinmaterial von den acht Plattenepithelkazinomen und deren Vorläuferläsionen

Im zweiten Teil der Untersuchung wurde Paraffinschnittmaterial exzidierter und histologisch untersuchter Vorläuferläsionen von weiteren acht Patienten, die später an gleicher Stelle ein orales Plattenepithelkarzinom entwickelt hatten, auf die HPV-Typen 6/11, 16 und 18 untersucht. Die Plattenepithelkarzinome wurden ebenfalls auf diese HPV-Typen hin untersucht. Lagen mehrere Leukoplakien als Vorbefunde vor, wurde jene Leukoplakie untersucht, die als letztes vor der Entstehung des Karzinoms eingeschickt worden war. Es wurde das erste bei einem solchen Patienten aufgetretene Plattenepithelkarzinom untersucht. Dabei wurden neben der HPV-Analyse auch das Patientenalter, das Geschlecht, die klinische Diagnose, die histologische Diagnose, die Lokalisation, der Dysplasiegrad, bzw. das Tumor Staging und das evtl. Vorhandensein eines subepithelialen Infiltrats erfasst.

#### 3.3.1 Behandlung des Paraffinschnittmaterials

Von den entsprechenden Paraffinblöcken wurden je nach Gewebsgroe 2-20 Schnitte von 10  $\mu$ m Stärke in einem Microtube gesammelt und zunächst mit 1 ml Xylol versetzt, um das Paraffin zu extrahieren. Die Proben wurden auf einem Rüttler gemischt (vortexen), bis sich alles Paraffin gelöst hatte und anschließend 5 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und 1ml absolutes Ethanol zugegeben. Nach vorsichtigem Vortexen und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vollständig abpipettiert und verworfen. Dieser Waschvorgang in Ethanol wurde noch einmal wiederholt und die entparaffinisierten Gewebeschnitte bei 56°C für 15 min an der Luft getrocknet. Für die folgende enzymatische Proteolyse wurde zu den Proben 100 $\mu$ l Digestionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 0,1 mM EDTA pH 8,0 und 0,5% Tween 20) und 20  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ $\mu$ l) (Fa.Roche, Mannheim) zugegeben und über Nacht bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Die Proteinase K wurde dann durch 15 minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert und die Proben wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.4 HPV-DNA Analyse für das gesamte Probenmaterial (Abstriche, aus Mundspülung präparierte DNA, Paraffinmaterial)

Es wurden von jeder Probe (Abstrich lokal, Abstrich allgemein, Mundspülung, Paraffinmaterial) insgesamt vier PCRs (polymerase chain reaction) durchgeführt. Dabei wurde zuerst ein Fragment eines sogenannten house-keeping gene (in unserem Falle das in menschlichen Zellen ubiquitär vorkommende Gen der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase) amplifiziert, um nachzuweisen, ob sich überhaupt eine ausreichende Menge unzerstörter DNA in der Probe befand oder nicht. Die Proben, die nach Amplifikation in der Agarosegelelektrophorese ein Produkt spezifischer Größe zeigten, wurden anschließend auf das Vorhandensein viraler DNA mittels PCR und anschließender Southern Blot Hybridisierung untersucht.

#### 3.4.1 House-Keeping Gen Amplifikation

Die PCR wurde in einem Reaktionsgemisch durchgeführt, das 1x PCR-Puffer, 1,5 mmol/l  $MgCl_2$ , 200  $\mu\text{mol/l}$  dNTP (Fa. Biozyme, Oldendorf, BRD), 0,4  $\mu\text{mol/l}$  von jedem Primer, 1U Taq-Polymerase (Fa. Eppendorf, Hamburg) und 2-8  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung (5  $\mu\text{l}$  DNA Lösung von den Mundspülungen bzw. 2-8  $\mu\text{l}$  der Abstriche) enthielten. In jedem PCR Ansatz wurde eine Positivkontrolle (Probe, in der das zu amplifizierende Gen bereits positiv nachgewiesen worden war) und eine Negativkontrolle ( $H_2O$  anstatt DNA) mitgeführt. Die Proben für das house-keeping Gen durchliefen nach einmaligem Erhitzen auf 95°C (Denaturieren der Doppelstränge) für 5 min 35 Amplifikationszyklen mit folgendem Profil: Denaturieren der Doppelstränge (30 sec bei 95°C), Anlagern der Primer (30 sec bei 51°C), Polymerisation des komplementären DNA Strangs (1 min bei 72°C).

#### 3.4.2 HPV-DNA Amplifikation

Die Zusammensetzung und Konzentrationen der einzelnen Bestandteile des Reaktionsgemisches variiert etwas für die verschiedenen Virustypen (siehe Tabelle 1).

Die Analyse von HPV 16 wurde mit 2 verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. Dabei ergab die Amplifikation mit den Primern 16s<sub>2</sub> und 16as<sub>2</sub> ein fast 300 Basenpaare kleineres Produkt als mit den Primern 16s<sub>1</sub> und 16as<sub>1</sub>. Dies könnte insbesondere bei Verwendung von Paraffinschnittmaterial von Vorteil sein, da es hier infolge der Fixierungs- und Einbettungsprozedur zur Degradation der DNA hätte kommen können.

Tabelle 1: Zusammensetzung der HPV-PCR Ansätze

Bestandteile	HPV 6/11	HPV 16 <sub>(1)</sub>	HPV Typ 16 <sub>(2)</sub>	HPV 18
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mmol/l	1,5 mmol/l	2,5mmol/l	1,5 mmol/l
dNTP	200µmol/l	200 µmol/l	200µmol/l	200 µmol/l
Primer	6/11s: 0,5 µmol/l 6/11as: 0,5 µmol/l	16s <sub>1</sub> : 0,4 µmol/l 16as <sub>1</sub> : 0,4 µmol/l	16 s <sub>2</sub> : 1µmol/l 14as <sub>2</sub> : 1µmol/l	18s: 0,4 µmol/l 18as: 0,4 µmol/l
Taq Polymerase	1U Taq-Polymerase Gold <sup>1</sup>	1U hot start Polymerase <sup>2</sup>	1U Taq-Polymerase <sup>1</sup>	1U Taq-Polymerase <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Fa. Applied Biosystems, Forster City, U.S.A.

<sup>2</sup> Fa. Quiagen, Hilden, Deutschland

<sup>3</sup> Fa. Biozyme, Oldendorf, Deutschland

Die HPV-Amplifikationen wurden in 50 µl Reaktionsansätzen durchgeführt, die 2-10 µl der DNA-Lösung enthielten. Die Sequenzen der verwendeten Primer aus dem E6-ORF sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Primersequenzen

Virustyp	Sequenzen	Lokalisation	Produkte (bp)
6/11s 6/11as	5'ATGCCTCCACGTCTGCAAC 5'CTCTGCCGGTGGTCAGTGCAT	115-133 227-208	113
16s <sub>1</sub> 16as <sub>1</sub>	5'CAGGACCCACAGGAGCGACC 5'CAGGACCCACAGGAGCGACC	110-129 507-488	398
16s <sub>2</sub> 16as <sub>2</sub>	5'ATTAGTGAGTATAGACATTA 5'GGCTTTTGACAGTTAATACA	320-339 429-410	109
18s 18as	5'ATTAGAGAATTAAGACATTA 5'GGTTTCTGGCACCCGCAGGCA	327-346 436-417	111

Nach einer initialen Inkubation bei 95°C für 10 min für HPV 6/11 und HPV 16<sub>(1)</sub> beziehungsweise 3 min für HPV 16<sub>(2)</sub> und 18 folgten 40 Amplifikationszyklen nach dem in Tabelle 3 dargestellten Profil. Als Positivkontrolle dienten Fälle aus anderen Untersuchungen, in denen das zu amplifizierende Gen schon einmal erfolgreich nachgewiesen worden war, oder um Plasmide.

Tabelle 3: Temperaturprofil der HPV PCRs

Virustyp	Vorlauf	Denaturieren der DNA	Anlagern der Primer	Polymerisation
HPV 6/11	94°C für 10min	94°C für 30 sec	60°C für 30sec	72°C für 1 min
HPV 16 <sub>(1)</sub>	94° für 10 min	94°C für 1 min	64°C für 1 min	72° C für 1 min
HPV 16 <sub>(2)</sub>	93° für 3min	94 °C für 30sec	50°C für 1 min	72 ° C für 1 min
HPV 18	94°C für 3min	94°C für 1 min	50°C für 30 sec	72°C für 1 min

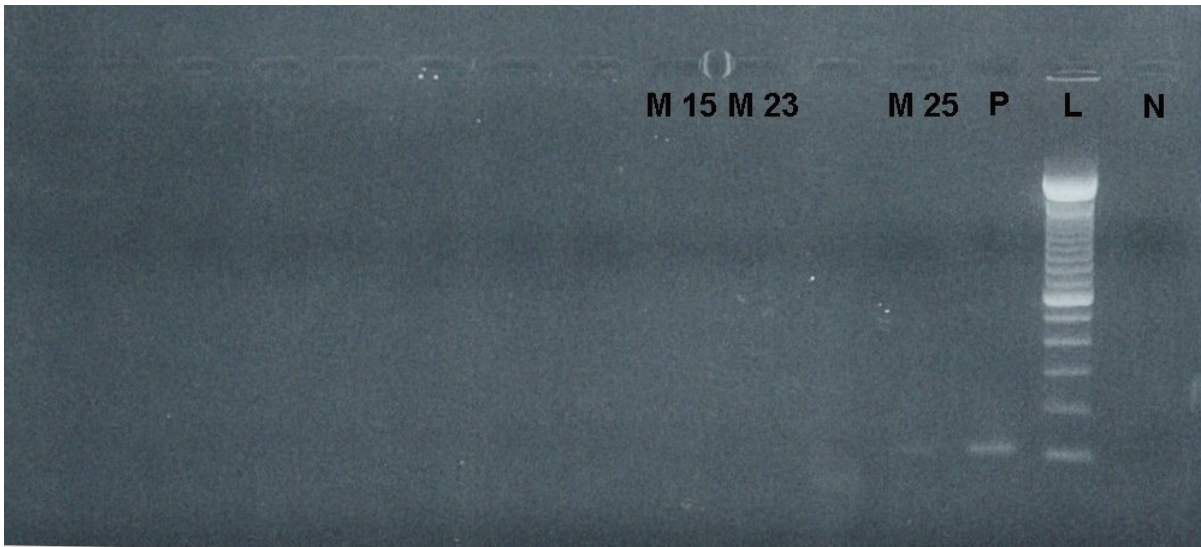


Abbildung 1: Agarosegel nach Elektrophorese der PCR Nr. 61 (HPV 16) unter UV-Licht

### 3.4.3 Southern Blot Hybridisierung

Die PCR Produkte wurden in einem 2% Agarosegel, das 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, in Tris-Azetatpuffer (TAE, 40mM Trisacetat, 1mM EDTA pH 7,8) elektrophoretisch getrennt. Eine repräsentative Darstellung ist in der Abbildung 1 wiedergegeben. Auf der Bahn N lief die Negativkontrolle, auf Bahn L die DNA-Leiter zur Größenbestimmung des PCR-Produkts, auf Bahn P die Positivkontrolle und auf Bahn M25 DNA aus Mundspülflüssigkeit von Patient Nr. 25 usw.

Der Southern Transfer, bei dem mit 0,5 NaOH, 1,5 NaCl (20 min) denaturierter DNA aus dem Elektrophoresegel auf eine Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) transferiert wurde, erfolgte mittels 20x SSC (175,3g NaCl, 88,2g Na-Citrat in 800ml H<sub>2</sub>O). Die DNA wurde durch Erhitzen auf 120°C für 30 min. auf der Membran fixiert.

Tabelle 4: Sequenzen der HPV Oligonukleotide

Virustyp	Basensequenz
6/11	5'GCAAGACGTTTAATCT
16 <sub>(1)</sub>	5'GCACAGAGCTGCAAACAACT
16 <sub>(2)</sub>	5'CAACAAACCGTTGTGTGATTTG
18	5'ATGGAGACACATTGGAAAACTAACTAACACTGGGTTATA

Die anschließende Hybridisierung wurde in rotierenden Glasröhren bei 50° C durchgeführt. Dazu wurden die Membranen zunächst in 10 ml Prähybridisierungslösung (5x SSC, 1% Blockierungslösung, 0,1% N- Lauroylsarkosin, 0,02% SDS (3,0 M NaCl, 0,3M Natriumacetat und 10% Natriumdodecylsulfat)) für 1h prähybridisiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung gegen 10 ml Hybridisierungslösung ausgetauscht, die die HPV typenspezifischen Oligonucleotidsonde (Fa. Roche, Mannheim; Sequenzen siehe Tab.A) in einer

Konzentration von 0,8 pmol/ml enthielt, und über Nacht inkubiert. Die Membranen wurden danach insgesamt viermal mit auf 50°C vorgewärmter Hybridisierungswaschlösung (0,5x SSC und 0,2% SDS) für jeweils 10 min gewaschen.

Der immunologische Nachweis der Hybridisierungsprodukte erfolgte mit Hilfe eines enzymkonjugierten Digoxigeninantikörpers (Fa. Roche, Mannheim). Die Reaktionen fanden bei Raumtemperatur statt. Zunächst wurden die Membranen für 5 min mit einem Maleinsäurewaschpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, (pH 7,5); 3<sup>0</sup>/<sub>100</sub> Tween 20) gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Reaktionen der Membran mit Puffer II (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl), der zusätzlich 1% Blockierungsreagenz (Boehringer, Mannheim) enthielt, blockiert .

Im Folgenden wurden die Membranen 30 min mit einer 1:20 000 verdünnten Lösung von Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) in Puffer II inkubiert. Daraufhin schlossen sich zwei Waschschrte für je 15 min mit Puffer II an. Die Membranen wurden kurz in Puffer III (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl, pH 9,5) äquilibriert und für 5 min mit etwa 2 ml einer 1:100 verdünnten Lösung des Chemilumineszenzsubstrates CSPD (Roche Diagnostics, Mannheim) in Puffer III inkubiert. Auf die in Haushaltsfolie eingewickelten Membranen wurden in der Dunkelkammer Chemilumineszenzfilme (Hyperfilm, Fa. Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) aufgelegt und 10 min exponiert. Die Probe galt als positiv, wenn der entwickelte Film eine deutliche Bande zeigte.

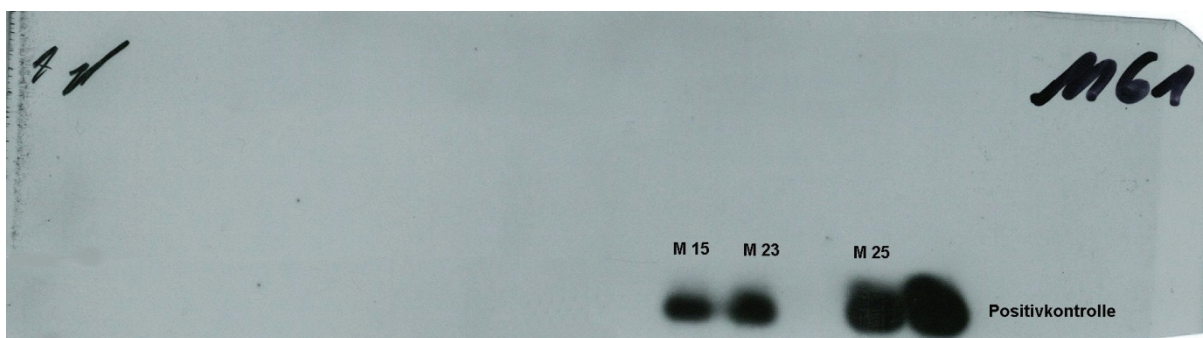


Abbildung 2: Chemilumineszenzfilm PCR 61 (HPV 16)

Abbildung 2 zeigt den belichteten Chemilumineszenzfilm der PCR 61 (HPV 16). Die Positivkontrolle zeigt eine deutliche Bande. Während auf dem Gel lediglich bei Probe M 25 eine schwache Bande zu sehen war (Abb.1), sind nach Southern Blot und Hybridisierung auch die Proben M 15 und M 23 deutlich als positiv erkennbar. Wie auch im Gel, ist die Negativkontrolle nicht zu sehen.

### 3.5 Verwendete statistische Methoden

Die statistische Untersuchung der Ergebnisse erfolgte unter Anleitung von Frau Dipl.-Math. Helga Krentz aus dem Institut für Medizinische Informatik und Biometrie der Universität Rostock. Die Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms SPSS ausgewertet (SPSS GmbH Software, München). In der schließenden Statistik wurden der  $\chi^2$ -Test für unabhängige qualitative Merkmale und der U-Test nach Mann und Whitney für nicht normalverteilte, unabhängige, quantitative Merkmale verwendet.

## 4 Ergebnisse

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Verhalten der HPV-Infektion der Mundhöhle bei Patienten mit oralen Leukoplakien und begleitenden klinischen und histopathologischen Parameter werden zuerst dargestellt (A). Danach werden getrennt davon unter (B) die Ergebnisse zur Untersuchung zur HPV-Prävalenz in oralen Plattenepithelkarzinomen und ihren Vorläuferläsionen besprochen.

### A:

#### 4.1 Ergebnisse aus den Virusnachweisen und den klinischen Untersuchungen

##### 4.1.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs und Untersuchungszeitraum

Insgesamt wurden 30 Patientinnen und Patienten untersucht. Sechs Patienten mussten von der Studie ausgeschlossen werden (s.o.). Von den in die Studie aufgenommenen 24 Patienten waren 15 Männer und 9 Frauen

Tabelle 5: Geschlechterverteilung

Geschlecht		
	Anzahl (n)	Prozent
männlich	15	62,5%
weiblich	9	37,5%
gesamt	24	100,0%

(Tabelle 5). Bei 23 Patienten wurde auch bei der Zweituntersuchung eine orale Leukoplakie diagnostiziert, lediglich bei einem Patienten wurde keine Läsion mehr festgestellt.

Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose „Leukoplakie“ betrug 53 Jahre (für Frauen 60 Jahre, für Männer 49 Jahre; Tabelle 6).

Tabelle 6: Durchschnittsalter bei der ersten klinischen Untersuchung

	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
gesamt	24	18	75	53,3	13,5
männlich	15	18	75	49,4	13,3
weiblich	9	33	70	59,9	11,7

Der Zeitraum von der ersten in dieser Klinik vorgenommenen Untersuchung bis zur Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit im Frühjahr 2004 betrug durchschnittlich 9,5 Jahre (8,8 Jahre für die Frauen und 10,0 Jahre für die Männer; Tabelle 7).

Tabelle 7: Klinischer Untersuchungszeitraum

	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
gesamt	24	3,3	26,0	9,5	4,9
männlich	15	4,8	26,0	10,0	5,4
weiblich	9	3,3	16,2	8,8	4,1

Die Zeitspanne von der ersten klinischen Diagnosestellung „Leukoplakie“ in diesem Hause bis zum Zeitpunkt der ersten HPV-Analyse betrug durchschnittlich 1,5 Jahre. Die Standardabweichung betrug für die Gesamtgruppe 3 Jahre (Tabelle 8).

Tabelle 8: Zeitlicher Abstand zwischen der klinischen Diagnosestellung und erster Virenanalyse

	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
gesamt	24	0,0	14,0	1,5	3,0
Männer	15	0,0	14,0	1,7	3,6
Frauen	9	0,0	5,0	1,1	2,0

Für die erste HPV-Untersuchung lag kein einheitlicher Nachweiszeitpunkt vor, die Proben des ersten Nachweises wurden zwischen den Jahren 1990 und 2000 entnommen und untersucht. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt dieser ersten HPV-Untersuchung betrug 55 Jahre, das Durchschnittsalter für die weiblichen Patienten lag bei 61 Jahren, das für männliche Patienten bei 51 Jahren. Die jüngsten Patienten waren zu diesem Zeitpunkt 32 Jahre alt, der Älteste 75 Jahre. Die Standardabweichung betrug für die Gesamtgruppe 12,4 Jahre (Tabelle 9).

Tabelle 9: Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der ersten HPV-Analyse

Durchschnittsalter 1. HPV-Nachweis	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
gesamt	24	32	75	54,8	12,4
männlich	15	32	75	51,1	11,2
weiblich	9	33	74	61	12,3

Der durchschnittliche Zeitraum zwischen den Virusnachweisen, d.h. vom Zeitpunkt des ersten HPV-Nachweises bis zur jetzigen, zweiten Untersuchung auf HPV-Viren, betrug 8 Jahre (Frauen 7,7 Jahre; Männer 8,3 Jahre). Die Standardabweichung betrug für die Gesamtgruppe 3,1 Jahre (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zeitlicher Abstand zwischen den beiden HPV-Analysen in Jahren

Untersuchungszeitraum HPV	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
gesamt	24	3,3	12,3	8,1	3,1
männlich	15	4,2	12,3	8,3	3,0
weiblich	9	3,3	12,1	7,7	3,3

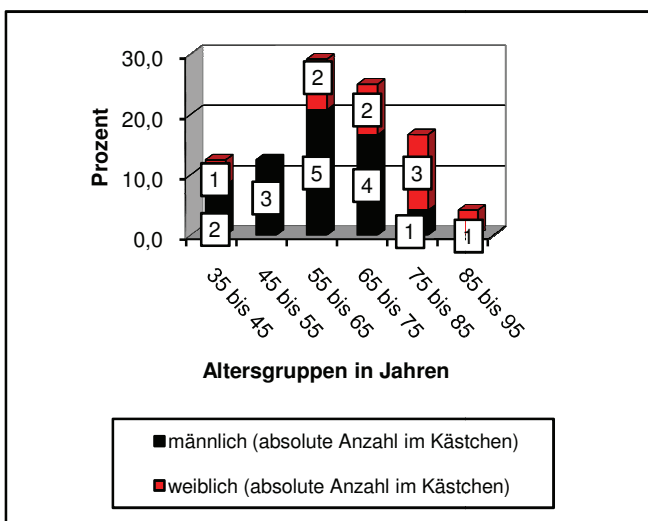
Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der zweiten HPV-Untersuchung und der klinischen Nachuntersuchung (beides erfolgte zusammen) lag bei 63 Jahren (Frauen: 69 Jahre; Männer 59 Jahre). Die jüngste Patientin war 41,5 Jahre, die älteste Patientin 85,2 Jahre. Die Standardabweichung für die Gesamtgruppe betrug 12,4 Jahre (Tabelle 11).

Tabelle 11: Durchschnittsalter der zweiten HPV-Analyse in Jahren

Durchschnittsalter 2. HPV Nachweis	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
Gesamt	24	41,5	85,2	62,9	12,4
Männlich	15	44,0	80,2	59,4	11,0
Weiblich	9	41,5	85,2	68,7	13,1

Diagramm 1 zeigt die Altersstruktur der Patienten in Altersklassen (Dekaden; zum Zeitpunkt der zweiten HPV-Untersuchung). Die meisten Patienten waren mittleren oder älteren Lebensalters. 54% der Patienten waren zwischen 55 und 75 Jahren alt.

Diagramm 1: Altersverteilung während der Nachuntersuchung und der zweiten HPV-Untersuchung

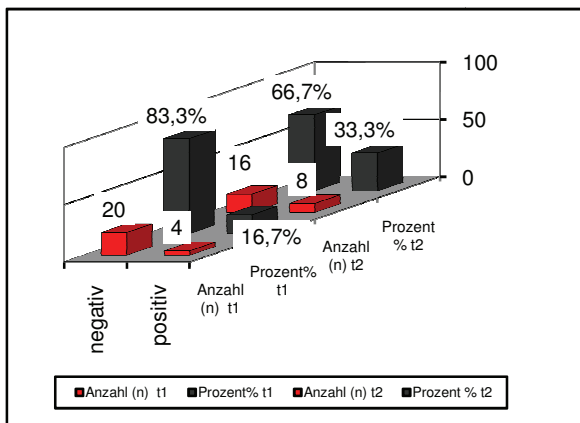


## 4.1.2 HPV-Nachweis

### 4.1.2.1 Quantitative Untersuchung der HPV-Infektion

Es waren zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten Untersuchungen zum Vorkommen von HPV

Diagramm 2: HPV-Quantität für den 1. und 2. Nachweis



durchgeführt worden. Bei der ersten Untersuchung waren vier Patienten HPV-positiv gewesen. Beim zweiten Nachweis, im Durchschnitt 8 Jahre später, waren acht der Patienten HPV-positiv: Die Zahl der HPV-positiven Fälle hatte sich verdoppelt (Diagramm 2). Jedoch war kein einziger dieser acht Patienten bereits bei der Erstuntersuchung positiv auf HPV untersucht worden (siehe unter 4.1.2.4).

### 4.1.2.2 HPV-Infektion und Patientenalter

Zum Zeitpunkt der ersten HPV-Untersuchung betrug das Durchschnittsalter der HPV-negativen Patienten 53,9 Jahre (n=20), das der HPV-positiven Patienten 59,5 Jahre (n=4). Im Schnitt waren HPV-positive Patienten also etwas (5,6 Jahre) älter als die HPV-negativen Patienten. Beim zweiten Virusnachweis betrug das Durchschnittsalter der HPV-negativen Patienten 63,1 Jahre (n=16), das der HPV-positiven Patienten 62,4 Jahre (n=8). Hier waren die HPV-positiven Patienten durchschnittlich (0,7 Jahre) jünger als die HPV-negativen. Die Standardabweichungen dokumentieren aber die große Streuung (Tabelle 12).

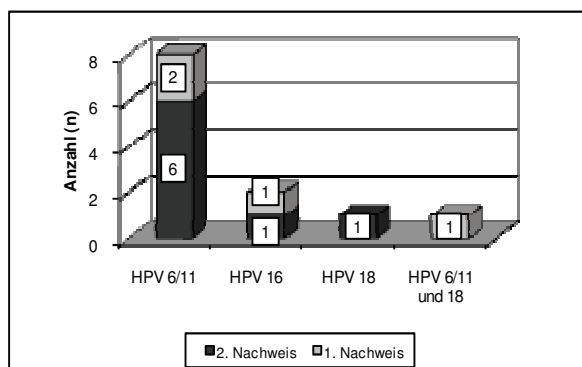
Tabelle 12: Durchschnittsalter von HPV-positiven und -negativen Patienten bei den HPV-Analysen in Jahren

		n	Minimum	Maximum	Durchschnittsalter	Std. Abweichung
Patientenalter 1. Untersuchung	HPV negativ	20	32,0	75,0	53,9	12,7
	HPV positiv	4	46,0	70,0	59,5	10,2
Patientenalter 2. Untersuchung	HPV negativ	16	44,0	80,8	63,1	11,9
	HPV positiv	8	41,5	85,2	62,4	14,3

### 4.1.2.3 Virustypen

Einen Überblick über das Auftreten der unterschiedlichen Virustypen liefert das Diagramm 3. Die Ergebnisse beider Untersuchungen sollen zunächst zusammen betrachtet werden. Acht der Patienten waren mit dem „low risk“ Typ 6/11 infiziert, zwei mit HPV 16 und jeweils nur ein Patient mit HPV 18 bzw. einer mit HPV 6/11 und HPV 18. Das Verhältnis von „low risk“

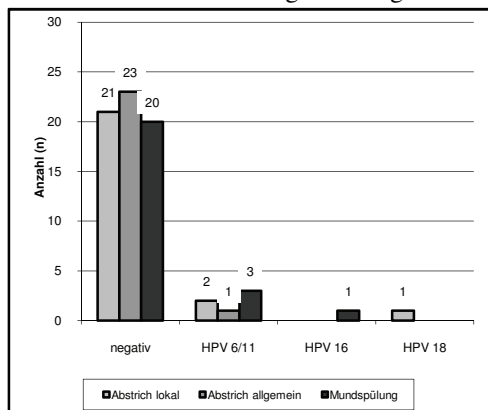
Diagramm 3: Nachweis der verschiedenen Virustypen im 1. und im 2. Nachweis



Virus-Typen zu „high risk“ Virus-Typen betrug also zwei zu ein. Während des ersten Nachweises wurde das „low risk“ Virus 6/11 nur zweimal entdeckt. Beim zweiten Nachweis wurde es aber dreimal häufiger nachgewiesen. Die „high risk“ Viren HPV 16 und 18 wurden hingegen in identischer Häufigkeit festgestellt (je einmal).

Mit der Probengewinnung durch Mundspülung wurden am häufigsten Viren nachgewiesen,

Diagramm 4: Virustypen aufgeschlüsselt nach der Art der Probengewinnung



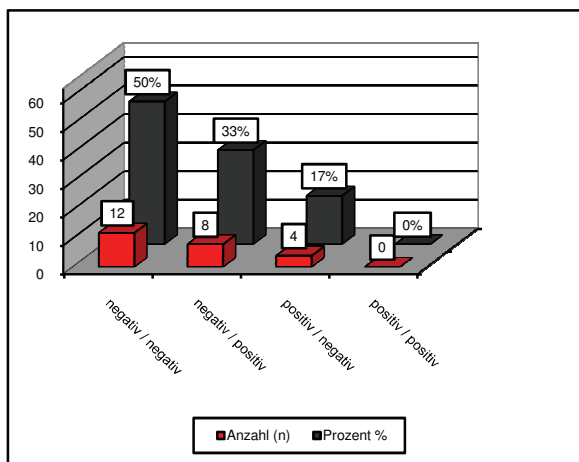
nämlich dreimal HPV 6/11 und einmal HPV 16. Aus Proben, die mit dem scharfen Löffel direkt von der Leukoplakie gewonnen wurden, konnten nur zweimal HPV 6/11 und einmal HPV 18 nachgewiesen werden, in Proben von Zellen unveränderter Mundschleimhaut wurde einmal HPV 6/11 entdeckt (Diagramm 4). Es ist erwähnenswert, dass bei positivem Virusnachweis immer nur eine der drei pro Patient entnommenen Proben das jeweilige Virus enthielt. In den anderen beiden Proben ließ sich das Virus nicht nachweisen.

#### 4.1.2.4 Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Infektion

Zur Betrachtung des zeitlichen Verlaufes der Infektion wurden vier Gruppen (Diagramm 5). In der ersten Gruppe befanden sich Patienten, bei denen zu keinem Zeitpunkt Viren nachgewiesen werden konnten (negativ/negativ). In der zweiten Gruppe befanden sich Patienten, bei denen zuerst kein Virus nachgewiesen werden konnte, es wurde zum zweiten Mal nachgewiesen (negativ/positiv). In der dritten Gruppe wurde zum ersten Mal Viren nachgewiesen, bei der zweiten Untersuchung aber nicht (positiv/negativ). In der vierten Gruppe waren Patienten, bei denen das Virus zum ersten Mal nachgewiesen werden konnte (positiv/positiv).

Nur 50% der Patienten hatten nie eine HPV-Infektion durchgemacht. Auffällig

Diagramm 5: Zeitlicher Verlauf der Infektion



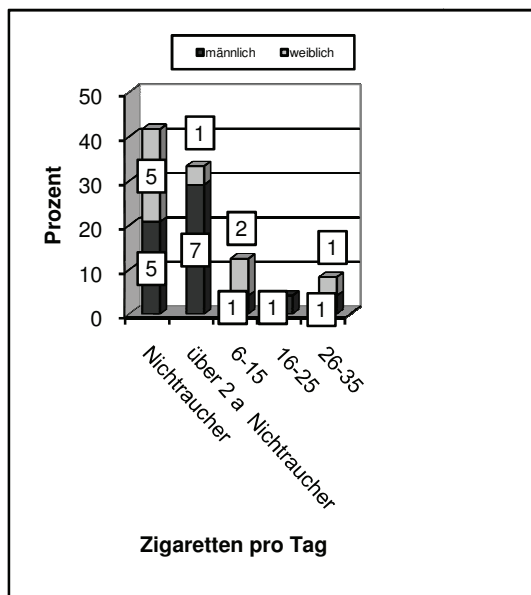
war bei beiden Untersuchungen positiv. Bei den vier Patienten der Gruppe „negativ/negativ“ war die Infektion also transient. „negativ/positiv“ war mit 33 doppelt so groß wie die „positiv/negativen“ mit 17%. Die Unterschiede dieser zwei Ergebnisse sind aber statistisch nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test).

#### 4.1.3 Rauchverhalten

Für den jetzigen Teil der Untersuchung wurden die Patienten anfangs in zwei Gruppen unterteilt. Zum einen in aktive Raucher (Durchschnittsalter 60,4 Jahre), zum anderen in Nichtraucher und die ehemaligen Raucher (Durchschnittsalter 63,6 Jahre).

Für den retrospektiven Teil der Untersuchung war es aber sinnvoller, die ehemaligen Raucher und die aktiven Raucher zusammenzufassen. Das Durchschnittsalter aller Raucher (inkl. ehemaliger Raucher) und das der Nichtraucher lagen zum Zeitpunkt der ersten HPV-Analyse bei 54,4 Jahren für die Raucher und bei 55,4 Jahren für die Nichtraucher.

Diagramm 6: Rauchverhalten



Die Klassifizierung des Rauchverhaltens wurde bereits unter 3.2 beschrieben. Zum jetzigen Untersuchungszeitpunkt waren 41,7% der Patienten Nichtraucher und weitere 33,3% ehemalige Raucher, so dass sich jetzt ein Nichtraucheranteil von 75% ergab. Hervorzuheben ist die große Zahl an ehemaligen Rauchern (33%; n= 8). 12,5% der Patienten rauchten 6-15 Zigaretten pro Tag, nochmals 12,5% rauchten 16-35 Zigaretten am Tag. Von den Rauchern waren drei Frauen und drei Männer. Auch bei den Nichtrauchern war die Geschlechterverteilung gleich. Nur bei den ehemaligen Rauchern überwog die Anzahl der Männer (87,5% gegenüber 12,5% Frauen; Diagramm 6).

#### 4.1.3.1 HPV-Infektion und Rauchen

Zum Zeitpunkt der ersten HPV-Analyse (Diagramm 7a) waren zwei von vier der HPV-positiven Patienten Nichtraucher, einer rauchte und ein weiterer Patient hatte das Rauchen zum jetzigen Untersuchungszeitpunkt eingestellt. Dieser muss isoliert betrachtet werden, da heute keine Aussage mehr darüber getroffen werden kann, ob der Betreffende zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung rauchte oder nicht. Im ersten HPV-Nachweis zeigte sich keine Korrelation zwischen der Infektionsrate und dem Rauchverhalten.

Diagramm 7 a und b: Korrelation zwischen Rauchverhalten und HPV-Infektionsrate beim 1. (a) und 2. (b) Nachweis

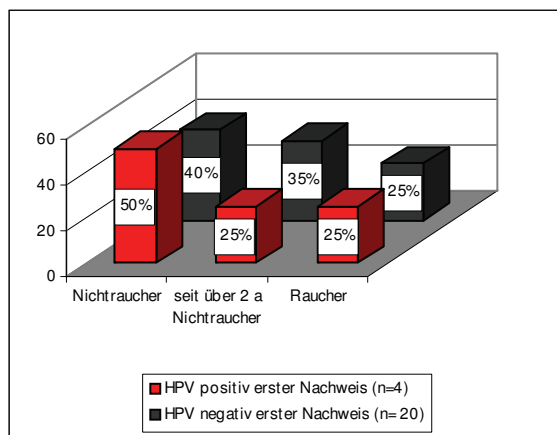


Diagramm 7a

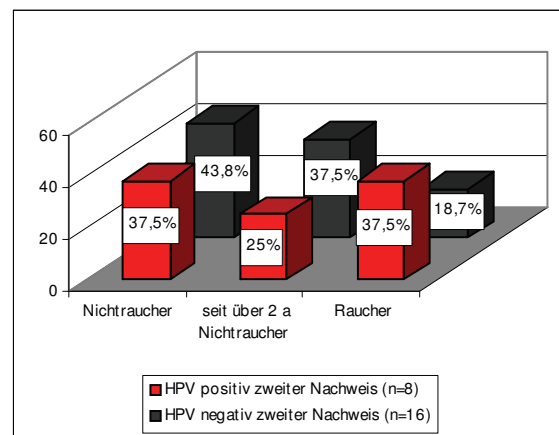


Diagramm 7b

Beim zweiten Nachweis (Diagramm 7b) änderte sich das Bild insofern, als dass es hier einen Zusammenhang zwischen Rauchen und HPV-Infektion zu geben schien. Die Gruppe der HPV-positiven Raucher ( $n=3$ ) war prozentual gesehen doppelt so groß wie die der HPV-negativen Raucher ( $n=3$ ). Dementsprechend war auch die Gruppe der HPV-positiven Nichtraucher 6% kleiner als die der HPV-negativen Nichtraucher (37,5% zu 43,8%). Unterschiede bestanden außerdem bei den ehemaligen Rauchern (sie hatten das Rauchen mindestens zwei Jahre vor der jetzigen Untersuchung aufgegeben). Hier fand sich der geringste Anteil von HPV-positiven Patienten (25% der HPV-positiven zu 37,5% der HPV-negativen Patienten). Das geringste Risiko einer HPV-Infektion in dieser Untersuchung schien also die Gruppe der „Nichtraucher über zwei Jahre“ zu haben, das höchste Risiko die Gruppe der Raucher.

Fasst man die beiden Virusnachweise zusammen, gab es in der Gruppe der HPV-positiven Patienten fünf Raucher und sieben Nichtraucher. In der Gruppe der HPV-negativen Patienten gab es ebenfalls fünf Raucher und sieben Nichtraucher. Deshalb kann man beide Gruppen im Folgenden trotz der Inhomogenität der Gruppen (die Gruppen der HPV-positiven und der

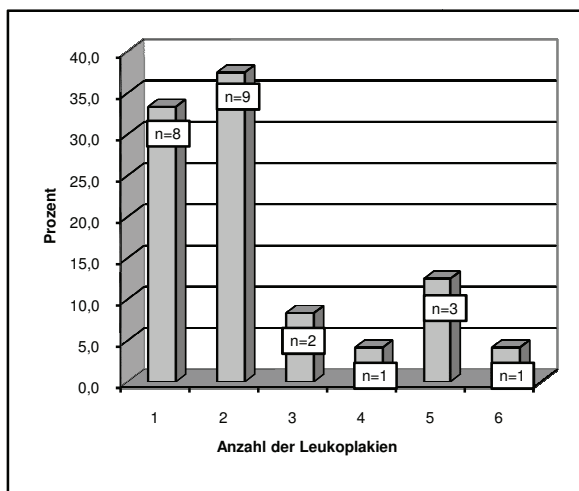
HPV-negativen Patienten setzt sich aus Rauchern und Nichtrauchern zusammen) gut miteinander vergleichen.

#### 4.1.4 Betrachtung der Anzahl von Leukoplakien und Rezidiven zum HPV-Status

##### 4.1.4.1 Anzahl der Leukoplakien, Rezidive nicht mitgezählt

Im Diagramm 8 ist die Anzahl von Leukoplakien (ohne Rezidive) pro Patient aufgeführt, die

Diagramm 8: Anzahl der Leukoplakien ohne Rezidive

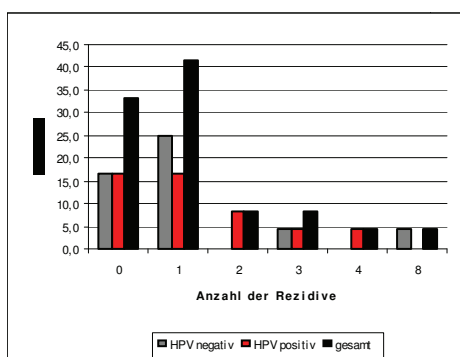


die Patienten während des gesamten klinischen Untersuchungszeitraums von im Schnitt 10 Jahren entwickelt hatten. Diese konnten zeitlich nebeneinander und hintereinander auftreten. Etwa zwei Drittel der Patienten hatten nur an ein oder zwei Stellen in der Mundhöhle eine Leukoplakie entwickelt. Beim verbleibenden Drittel wurden bis zu sechs Leukoplakien diagnostiziert.

##### 4.1.4.2 Anzahl der Rezidive

Insgesamt traten 32 Rezidive auf, durchschnittlich 1,3 Rezidive pro Patient. 24 (14 bei HPV-

Diagramm 9: Anzahl der Rezidive



negativen Patienten und 10 bei HPV-positiven Patienten) der vorher bestehenden Leukoplakien waren mit einem CO<sub>2</sub>-Laser entfernt worden, fünf (drei bei HPV-negativen und zwei bei HPV-positiven Patienten) wurden mit einem Skalpell exzidiert und bei weiteren drei Leukoplakien ließ sich die Art der Exzision nicht mehr feststellen. Im Laufe der Untersuchung entwickelten zwei Drittel der Patienten mindestens einmal ein Rezidiv.

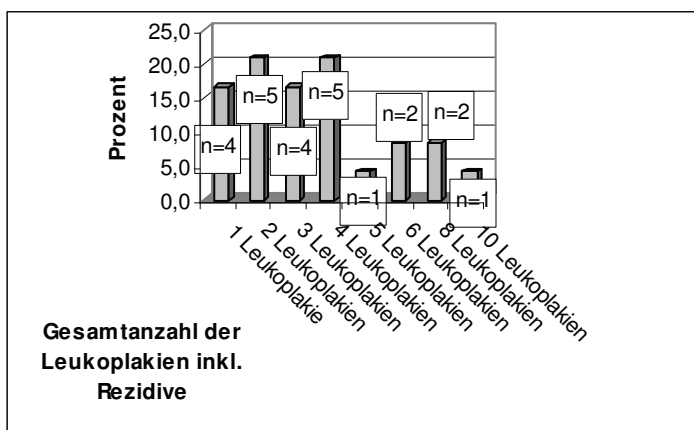
Allerdings trat bei den Patienten mit Rezidiven in 62,5% der Fälle (n=10) nur eines auf. Weitere 25% (n=4) der Patienten mit Rezidiven hatten zwei oder drei Rezidive. Bei zwei weiteren Patienten (12,5%) traten vier bzw. acht Rezidive auf.

Unterteilt nach dem Infektionsstatus betrug die durchschnittliche Anzahl der Rezidive bei den HPV-negativen Patienten 1,4, bei den HPV-positiven Patienten 1,3. Diagramm 9 stellt die Anzahl der Rezidive getrennt für HPV-positive und -negative Patienten dar und zeigt daneben die Gesamtanzahl an.

#### 4.1.4.3 Gesamtanzahl der Leukoplakien

Unter der „Gesamtanzahl der Leukoplakien“ sind Leukoplakien und Rezidive zusammen

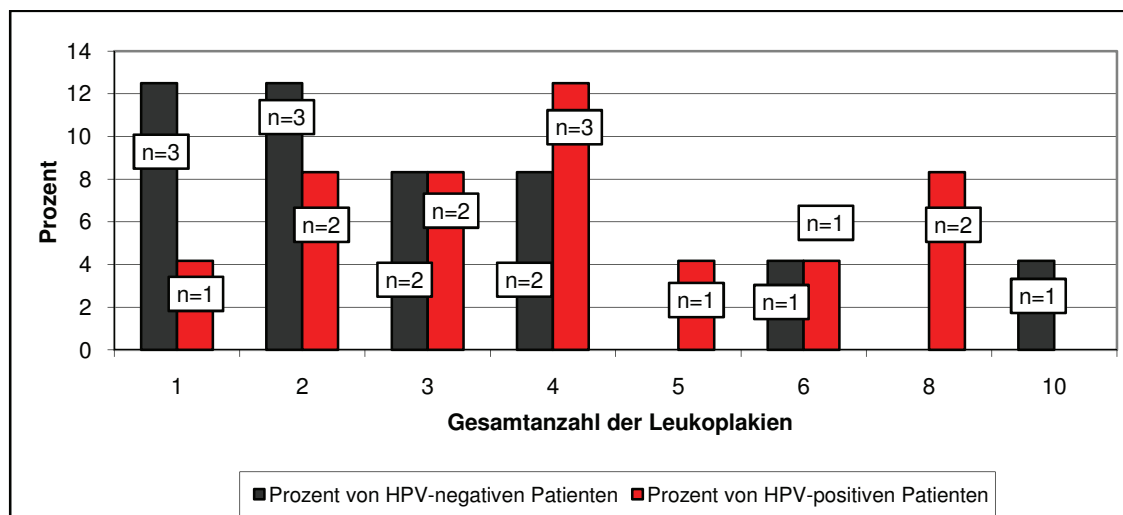
Diagramm 10: Gesamtanzahl der Leukoplakien inkl. Rezidive



erfasst (Diagramm 10), insgesamt 89. Die durchschnittliche Anzahl der Leukoplakien pro Patient lag bei 3,7. Die Standardabweichung betrug 2,4. 75% der Patienten hatten bis zu vier Leukoplakien, 25% der Patienten hatten fünf bis maximal zehn Leukoplakien. Nur 16% der Patienten (n=4) hatten nur eine einzige Leukoplakie.

#### 4.1.4.4 Gesamtanzahl der Leukoplakien und Infektionsstatus

Diagramm 11: Gesamtanzahl an Leukoplakien und Infektionsstatus des Patienten

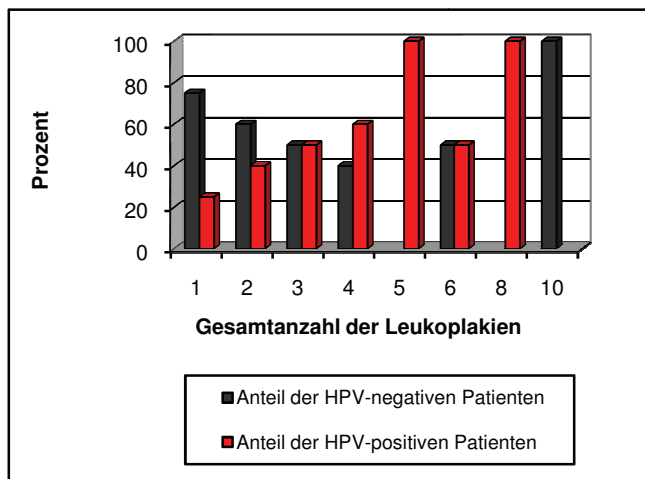


Von den sechs Patienten, die fünf oder mehr Leukoplakien hatten, waren vier HPV-positiv, und zwei HPV-negativ. Auf der anderen Seite überwogen bei den Patienten mit einer oder zwei Leukoplakien die HPV-negativen Patienten (sechs zu drei; Diagramm 11). Bei den HPV-negativen Patienten (n=12) wurden insgesamt 39 Leukoplakien festgestellt (entspricht

44% aller Leukoplakien), bei den HPV-positiven Patienten (n=12) 50 Leukoplakien (entspricht 56% aller Leukoplakien). HPV-negative Patienten hatten im Durchschnitt weniger Leukoplakien (3,3 Leukoplakien pro Patient) als HPV-positive Patienten (im Durchschnitt 4,2 Leukoplakien pro Patient) entwickelt.

Im Diagramm 12 wird die prozentuale Verteilung der Gesamtanzahl an Leukoplakien separat

Diagramm 12: Prozentualer Anteil von HPV-negativen und -positiven Patienten an der jeweiligen Gesamtanzahl von Leukoplakien



für HPV-positive und -negative Patienten dargestellt. Dies verdeutlicht den Sachverhalt noch einmal graphisch.

Tabelle 13: Durchschnittliche Anzahl von Leukoplakien, Rezidiven und Gesamtanzahl für HPV-negative und HPV-positive Patienten

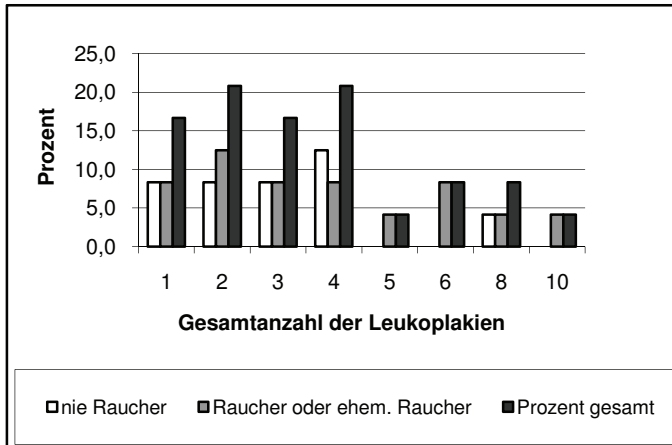
		Kleinste Anzahl gefundener Leukoplakien	Größte Anzahl gefundener Leukoplakien	Durchschnitt	Std. Abweichung
HPV-negativ (n=12)	Rezidive	0,0	8,0	1,4	2,2
	Leukoplakien	1,0	5,0	1,8	1,2
	Gesamtanzahl	1,0	10,0	3,3	2,6
HPV-positiv (n=12)	Rezidive	0,0	4,0	1,3	1,3
	Leukoplakien	1,0	6,0	2,9	1,7
	Gesamtanzahl	1,0	8,0	4,2	2,2

HPV-positive Patienten entwickelten eher mehrere Leukoplakien als HPV-negative Patienten. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren mit dem U-Test nach Mann-Whitney statistisch nicht signifikant ( $p=0,078$ ). Die durchschnittliche Anzahl von Rezidiven war aber für beide Gruppen annähernd gleich (Tabelle 13).

#### 4.1.4.5 Gesamtanzahl der Leukoplakien und Rauchverhalten

Wie bei den HPV-positiven Patienten, fanden sich auch bei den Rauchern vermehrt Leukoplakien (inkl. Rezidive; Diagramm 13). Lediglich ein Nichtraucher hatte acht Leukoplakien,

Diagramm 13: Gesamtanzahl der Leukoplakien bei Rauchern und Nichtrauchern



alle übrigen Nichtraucher hatten maximal vier Leukoplakien. Die durchschnittliche Anzahl von Leukoplakien lag für die Nichtraucher bei 3,2 pro Patient und bei Rauchern und ehemaligen Rauchern bei 4,1 pro Patient. Im Schnitt wurden bei Rauchern und ehemaligen Rauchern also 0,9 Leukoplakien mehr diagnostiziert als bei Nichtrauchern (Tabelle 14).

Tabelle 14: Gesamtanzahl von Leukoplakien in Abhängigkeit vom Rauchverhalten

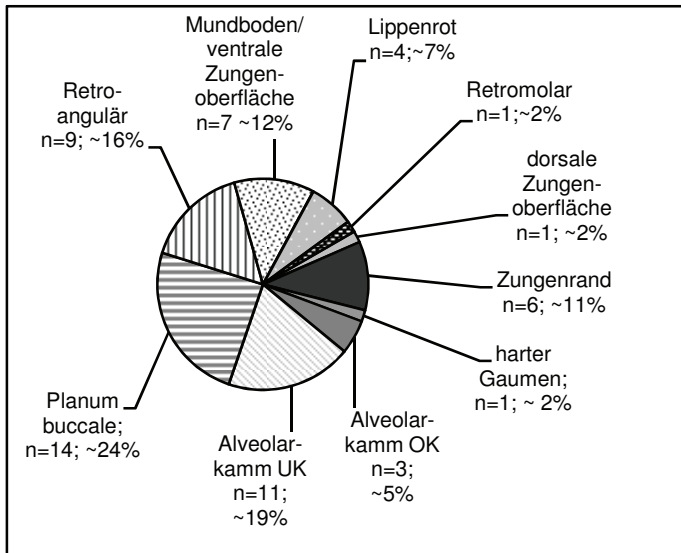
	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
Nichtraucher	10	1	8,0	3,2	2,0
Raucher oder ehem. Raucher	14	1	10,0	4,1	2,7

Auch die durchschnittliche Anzahl der Rezidive pro Patient war bei Rauchern oder ehemaligen Rauchern mit 1,5 höher als bei Nichtrauchern mit 1,1. Die genannten Unterschiede waren allerdings weder für die Leukoplakien noch für die Rezidive noch für die Gesamtanzahl an Leukoplakien statistisch signifikant. Die durchschnittliche Anzahl an Leukoplakien war bei Rauchern und HPV-positiven Patienten ähnlich hoch (4,1 bei Rauchern und 4,2 bei HPV-positiven Patienten).

#### 4.1.5 Lokalisation

Die Einteilung der Lage orientiert sich an einem Vorschlag von Rød-Petersen von 1969 (siehe

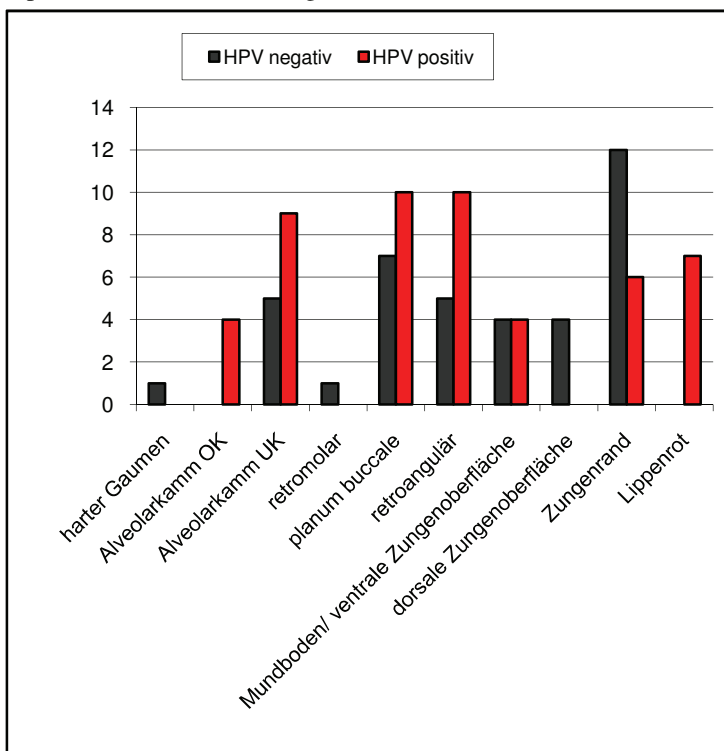
Diagramm 14: Lage der Leukoplakien; (n)= Anzahl der Leukoplakien



Abschnitt 3.2). Rezidive sind in der folgenden Aufstellung nicht berücksichtigt. Die Lage der Leukoplakien (siehe Diagramm 14) war am häufigsten (24%) im Planum buccale beobachtet worden, die nächst häufige Lokalisation war der Alveolarkamm des Unterkiefers mit 19%, weitere 16% lagen retroangulär, d.h. an der Mucosa dorsal des Mundwinkels. 12% waren im Mundboden bzw. an der ventralen Zungenoberfläche lokalisiert, weitere 11% am Zungenrand, 7% am

##### 4.1.5.1 HPV-Infektion und Lokalisation der Leukoplakien

Diagramm 15: Lageverteilung der Leukoplakien bei HPV-positiven und bei HPV-negativen Patienten

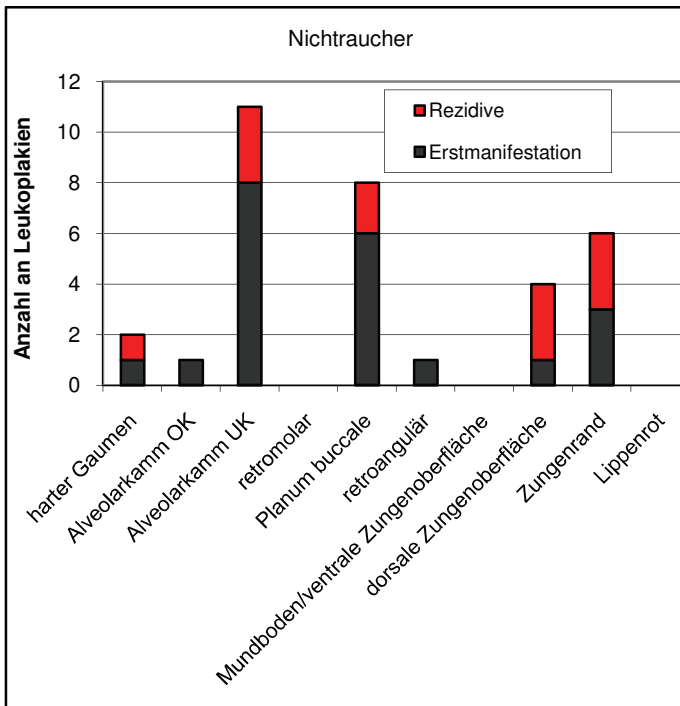


Das Diagramm 15 zeigt die Lageverteilung und Zahl der Leukoplakien und ihrer Rezidive unterteilt für HPV-positive und für HPV-negative Patienten. Läsionen am Alveolarkamm des Oberkiefers, am Lippenrot fanden sich ausschließlich bei HPV-positiven Patienten. Nur am Zungenrücken und am Zungenrand überwogen klar Läsionen von HPV-negativen Patienten. Bei den Läsionen am Zungenrand wurde dies allerdings im Wesentlichen durch einen einzigen HPV-negativen Patienten hervorgerufen, der hier ungewöhnlich viele Rezidive gehabt hatte.

#### 4.1.5.2 Rauchverhalten und Lokalisation der Leukoplakien

Im Diagramm 16 und 17 wird die Lageverteilung und Zahl der Leukoplakien (und der

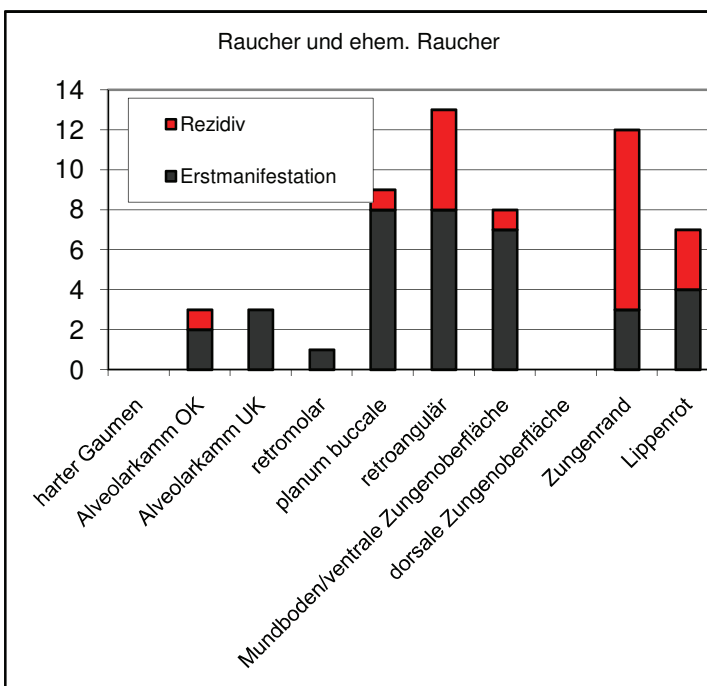
Diagramm 16: Lageverteilung bei Nichtrauchern



Rezidive) in Abhängigkeit vom Rauchverhalten dargestellt. Unterschieden wurde in Nichtraucher sowie Raucher plus ehemalige Raucher. Es zeigte sich, dass bei Nichtrauchern vor allem im Planum buccale, am Alveolarkamm des Unterkiefers sowie am Zungenrand und auf dem Zungenrücken die Mehrzahl der Läsionen zu finden war. Die Läsionen am Zungenrand und Zungenrücken rezidierten häufig. Bei Nichtrauchern wurden keine Läsionen am Mundboden, Lippenrot oder retromolar gefunden.

Bei Rauchern und ehemaligen Rauchern fanden sich dagegen die Läsionen vor allem am Zungenrand, direkt hinter dem Mundwinkel (retroangulär), am Mundboden und am Lippen-

Diagramm 17: Lageverteilung bei Rauchern

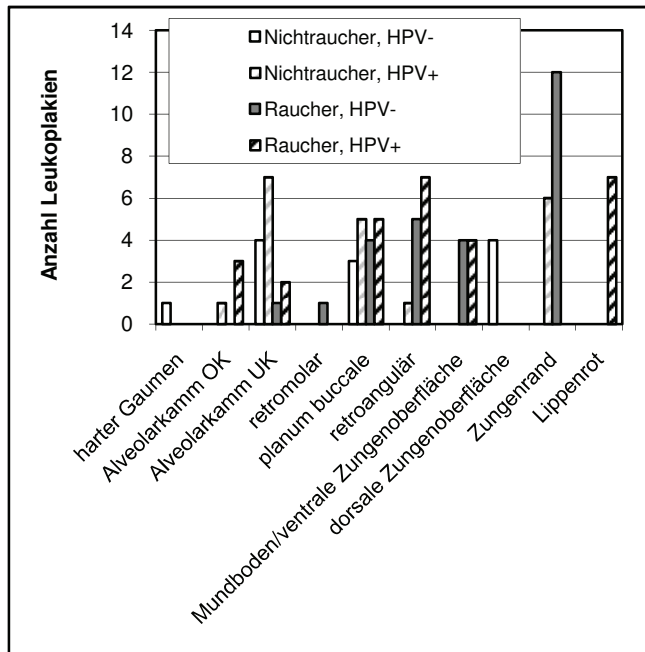


rot. Am Zungenrand, retroangulär, am Mundboden, und am Lippenrot kamen die Läsionen bei Rauchern häufiger vor als bei Nichtrauchern. Andererseits kamen bei Nichtrauchern Läsionen am Alveolarkamm des Unterkiefers und am Zungenrücken häufiger als bei Rauchern vor (Diagramm 17). Auffällig war hier, dass bei Nichtrauchern am Mundboden und auch retroangulär keine, bzw. wenige Leukoplakien festgestellt wurden, während bei Rauchern acht am Mundboden und 12 retroangulär gefunden

worden waren. Auch am Lippenrot fanden sich nur bei den Rauchern Läsionen (sieben).

Versucht man die Lageverteilung und Anzahl der Leukoplakien für die einzelnen Risikofaktoren darzustellen (Diagramm 18), überwiegen im Alveolarkamm des Unterkiefers Leukoplakien von HPV-positiven Nichtrauchern. Am Planum buccale wurden bei allen Untergruppen

Diagramm 18: Lageverteilung der Läsionen für die Untergruppen



etwa gleich viele Leukoplakien gefunden. Retroangulär und am Mundboden wurden die meisten Leukoplakien bei Rauchern gefunden, wobei HPV-positive und -negative Patienten etwa gleich viele Läsionen entwickelten. Läsionen am dorsalen Zungenrücken wurden nur bei Patienten gefunden, bei denen keiner der untersuchten Risikofaktoren nachgewiesen werden konnte. Leukoplakien am Lippenrot wurden nur bei HPV-positiven Rauchern gefunden.

#### 4.1.6 Klinische Diagnose

In 28 Fällen war in den Akten keine differenzierte klinische Diagnose genannt worden. Klinisch wurden 65% der als Leukoplakien (inkl. der Rezidive) näher bezeichneten Veränderungen als homogene (plane) Form diagnostiziert. Die inhomogenen Leukoplakien unterteilten sich dann in noduläre (8%), verrucöse (14%), ulzerierte (10%) und zu 2% in Erythroleukoplakien (Tabelle 15).

Tabelle 15: Häufigkeiten der klinischen Diagnosen

	Anzahl
homogen	40
nodular	5
verrucös	9
ulzeriert	6
Erythroleukoplakie	1
Teilmenge bekannte klinische Diagnose	61
unbekannte klinische Diagnose	28
Gesamtanzahl	89

#### 4.1.6.1 Klinische Diagnosen unter Berücksichtigung des Rauchverhaltens

Tabelle 16: Anzahl der verschiedenen klinischen Diagnosen unter Berücksichtigung des Rauchverhaltens

	Patienten (n)	homogene Leukoplakien	noduläre Leukoplakien	verrucöse Leukoplakien	ulzerierte Leukoplakien	Erythro- leukoplakie	gesamt
Nichtraucher	10	16		3	2		21
Raucher	14	24	5	6	4	1	40
gesamt	24	40	5	9	6	1	61

Tabelle 16 gibt die Häufigkeit der Untergruppen und der näher klinisch beschriebenen Leukoplakien für Raucher und Nichtraucher wieder. Bei Nichtrauchern (n=10) wurden 16 homogene Leukoplakien, drei verrucöse und zwei ulzerierte Leukoplakien diagnostiziert. Bei Rauchern bzw. ehemaligen Rauchern (n=14) wurden 24 homogene, fünf noduläre, sechs verrucöse, vier ulzerierte Leukoplakien und eine Erythroleukoplakie diagnostiziert. Vergleicht man die beiden Gruppen miteinander, war die durchschnittliche Anzahl von homogenen Leukoplakien pro Patient bei beiden Gruppen etwa gleich (1,6 bzw. bei 1,7). Bei den Rauchern und ehemaligen Rauchern wurden aber doppelt so häufig inhomogene Leukoplakien als bei Nichtrauchern diagnostiziert (0,5 zu 1). Dabei darf nicht vergessen werden, dass nur zwei Drittel der Leukoplakien klinisch klassifiziert worden sind.

#### 4.1.6.2 Klinische Diagnosen unter Berücksichtigung der HPV-Infektion

Tabelle 17: Anzahl der verschiedenen klinischen Diagnosen unter Berücksichtigung des Infektionsstatus

	Patienten (n)	homogene Leukoplakien	noduläre Leukoplakien	verrucöse Leukoplakien	ulzerierte Leukoplakien	Erythroleukoplakie	gesamt
HPV negativ	12	16		4	4	1	25
HPV positiv	12	24	5	5	2		36
gesamt	24	40	5	9	6	1	61

Bei den HPV-negativen Patienten (n=12) wurden 16 homogene, vier verrucöse und vier ulzerierte Leukoplakien sowie eine Erythroleukoplakie diagnostiziert. Bei den HPV-positiven Patienten wurden 24 homogene, fünf noduläre, fünf verrucöse und zwei ulzerierte Leukoplakien diagnostiziert (Tabelle 17). Die durchschnittliche Anzahl pro HPV-positiven Patienten betrug zwei homogene und eine inhomogene Leukoplakie. Für die HPV-negativen Patienten ergab sich eine durchschnittliche Anzahl von 1,3 homogenen und 0,75 inhomogenen Leukoplakien. Bei den HPV-positiven Patienten wurden also sowohl inhomogene (eine pro Patient) als auch homogene Leukoplakien häufiger (zwei pro Patient) festgestellt. Das Verhältnis von homogenen zu inhomogenen Leukoplakien bleibt aber bei den HPV-positiven und -negativen Patienten etwa gleich (etwa zwei Drittel der Leukoplakien

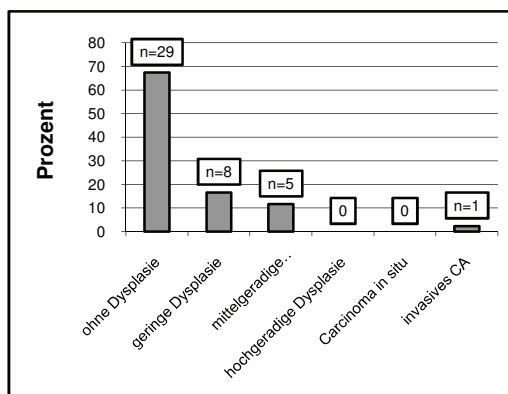
waren homogen, ein Drittel inhomogen). Aber auch hier muss berücksichtigt werden, dass insgesamt 28 Leukoplakien nicht klinisch klassifiziert worden waren.

#### 4.1.7 Dysplasiegrade

Von den insgesamt 89 diagnostizierten Leukoplakien (inkl. der Rezidive) wurden nur 43 histologisch untersucht. 68% dieser Leukoplakien waren ohne Dysplasie. 17% hatten einen geringen Dysplasiegrad, 11% einen mittleren Dysplasiegrad. Ein hochgradiger Dysplasiegrad sowie ein Carcinoma in situ wurden nicht festgestellt. In einem Fall wurde ein invasives

Karzinom diagnostiziert (Diagramm 19).

Diagramm 19: Häufigkeiten der Dysplasiegrade



Der rechnerisch durchschnittliche Dysplasiegrad für alle Patienten und alle Leukoplakien inklusive der Rezidive betrug 0,5; die Standardabweichung betrug eins (0=ohne Dysplasie; 1=geringe Dysplasie; 2=mäßige Dysplasie; 3=starke Dysplasie; 4=Carcinoma in situ; 5=invasives Karzinom).

Tabelle 18 enthält den Mittelwert und die Standardabweichung des rechnerisch durchschnittlichen Dysplasiegrades für die Gesamtgruppe und separat für beide Geschlechter.

Tabelle 18: Errechneter durchschnittlicher Dysplasiegrad für Männer, Frauen und die Gesamtgruppe

Geschlecht	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
gesamt	43	0	5	0,5	1,0
männlich	34	0	5	0,6	1,0
weiblich	9	0	2	0,3	0,7

Zwischen Männern und Frauen existierte ein Unterschied in der Höhe des rechnerischen mittleren Dysplasiegrades, er betrug für Männer 0,6 und für Frauen 0,3.

#### 4.1.7.1 Dysplasiegrade in den einzelnen Altersklassen

Die Tabelle 19 zeigt die Häufigkeiten der Dysplasiegrade der Leukoplakien in Abhängigkeit des Patientenalters während der ersten Untersuchung. Die Leukoplakien wurden aber über den gesamten Untersuchungszeitraum entnommen, so dass das in der Tabelle angegebene Alter nur als sehr grober Anhaltspunkt gesehen werden darf (der klinische Untersuchungszeitraum betrug durchschnittlich 9,5 Jahre). In der ersten Zeile ist zusätzlich die Anzahl der Patienten der jeweiligen Gruppe angegeben. Rezidive sind hier unberücksichtigt geblieben.

Tabelle 19: Dysplasiegrade in den einzelnen Altersgruppen

Alter (Jahre)	35-45	45-55	55-65	65-75	75-85	Summe
Anzahl Patienten (n)	3	3	7	6	4	
Leukoplakien ohne Dysplasie	2	6	9	3		20
Leukoplakien mit geringer Dysplasie	1	1	1			3
Leukoplakien mit mittelgradiger Dysplasie	1			1	1	3
Summe	4	7	10	4	1	26

Leukoplakien mit Dysplasie fanden sich bei jüngeren Patienten (35-55 Jahre) im Schnitt häufiger (0,5 Leukoplakien mit Dysplasie pro Patient) als bei älteren Patienten (etwa 0,2 Leukoplakien mit Dysplasie pro Patient).

#### 4.1.7.2 Durchschnittliche Dysplasiegrade für Erstmanifestationen und Rezidive

Betrachtet man Erstmanifestationen und Rezidive getrennt, betrug der durchschnittliche Dysplasiegrad für die Rezidive 0,9, für die Erstmanifestationen 0,4. Der durchschnittliche Dysplasiegrad war also für die Rezidive mehr als doppelt so groß wie für die Erstmanifestationen (Tabelle 20).

Tabelle 20: Dysplasiegrad für Erstmanifestation und Rezidiv

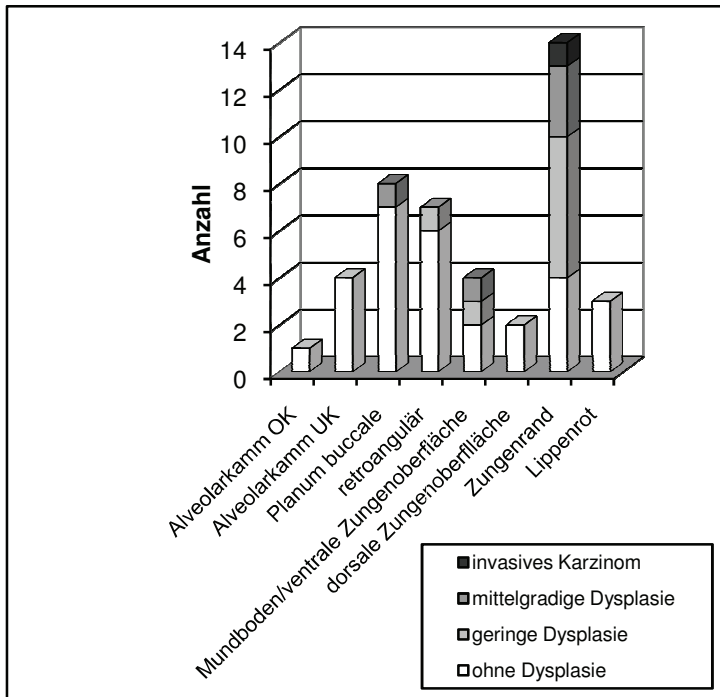
	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweichung
Erstmanifestation	28	0	2	0,36	0,68
Rezidiv	15	0	5	0,87	1,36

Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war aber statistisch nicht signifikant (U-Test nach Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

#### 4.1.7.3 Dysplasiegrade der Leukoplakien in den einzelnen Lokalisationen

Leukoplakien mit Dysplasie wurden vor allem am Zungenrand und am Mundboden gefunden

Diagramm 20: Dysplasiegrade in den einzelnen Lokalisationen



(Diagramm 20). In Einzelfällen wurden auch im Planum buccale und retroangulär Leukoplakien mit Dysplasie entdeckt. Am Alveolarkamm des Ober- und Unterkiefers, des Lippenrots und der dorsalen Zungenoberfläche waren alle untersuchten Leukoplakien ohne Dysplasie.

#### 4.1.7.4 Klinische Diagnosen und zugehörige Dysplasiegrade

Tabelle 21: Klinische Diagnosen und zugehörige Dysplasiegrade

	homogen	nodular	verrucös	ulzeriert	Erythroleuko plakie	klinisch nicht klassifiziert	Summe
ohne Dysplasie	12	3	6	2		6	29
geringe Dysplasie	2		2		1	3	8
mittelgradige Dysplasie	1			1		3	5
invasives Karzinom				1			1
Summe	15	3	8	4	1	12	43

Nur die Hälfte der klinisch näher klassifizierten Leukoplakien ohne Dysplasie erschienen als homogene Form, die andere Hälfte war entweder verrucös, nodular oder ulzeriert. Trotzdem wurden häufiger Dysplasien in den 16 Leukoplakien der inhomogenen Form (fünfmal, entspricht 33% der klinisch klassifizierten Leukoplakien) gefunden, als in den 15 der homogenen Form (dreimal, entspricht 20% der klinisch klassifizierten Leukoplakien). Bemerkenswert ist das häufige Vorkommen von Dysplasien in den nicht näher klassifizierten Leukoplakien (50%; Tabelle 21).

#### 4.1.7.5 Mittlere Dysplasiegrade in Abhängigkeit verschiedener Risikofaktoren

##### 4.1.7.5.1 Dysplasiegrad und Rauchverhalten

Tabelle 22: Durchschnittlicher Dysplasiegrad in Abhängigkeit vom Rauchverhalten

	n <sup>1</sup>	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
Histologisch untersuchte Leukoplakien Nichtraucher (10 Patienten)	12	0	2	0,33	0,65
Histologisch untersuchte Leukoplakien Raucher und ehemalige Raucher (14 Patienten)	31	0	5	0,61	1,09

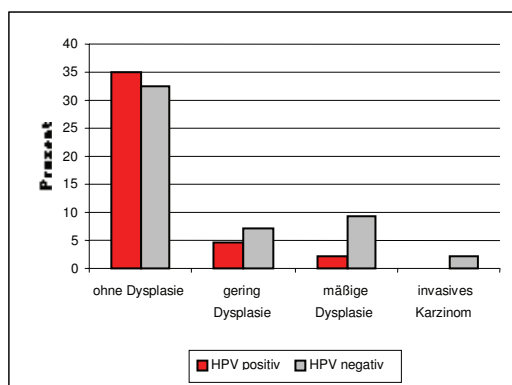
<sup>1</sup>: Anzahl an Leukoplakien

Der rechnerische durchschnittliche Dysplasiegrad betrug für Nichtraucher 0,33, für Raucher und ehemalige Raucher 0,61. Tabelle 22 gibt zudem Aufschluss über die Anzahl der untersuchten Leukoplakien.

##### 4.1.7.5.2 Dysplasiegrad und HPV-Infektion

Teilte man die Leukoplakien nach Dysplasiegraden geordnet getrennt für HPV-positive und -negative Patienten auf, ergab sich für die Leukoplakien ohne Dysplasie nur ein geringer

Diagramm 21: Dysplasiegrad und HPV-Status



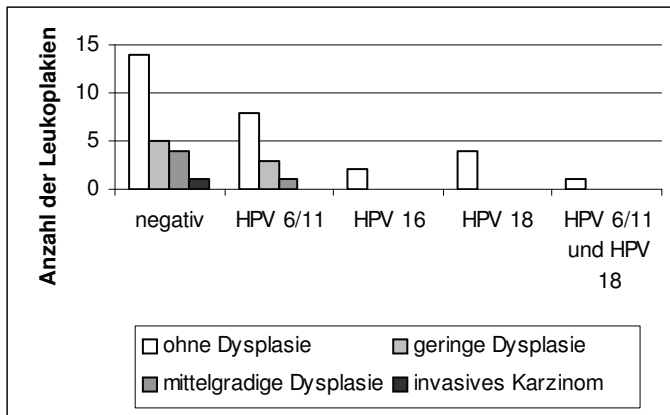
Unterschied. Allerdings war bei Leukoplakien mit Dysplasie der Anteil HPV-negativer Patienten höher als der Anteil der HPV-positiven Patienten (Diagramm 21). Der durchschnittliche rechnerische Dysplasiegrad war für die HPV-negativen Patienten 0,75, für die HPV-positiven Patienten nur ein Drittel dessen, 0,26 (Tabelle 23). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war allerdings statistisch nicht signifikant.

Tabelle 23: Durchschnittlicher Dysplasiegrad in Abhängigkeit vom Infektionsstatus

	Patienten	Leukoplakien	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
HPV negativ	12	24	0	5	0,75	1,19
HPV positiv	12	19	0	2	0,26	0,56

Bei HPV-negativen Patienten zeigten sich häufiger Leukoplakien mit Dysplasie als bei HPV-positiven Patienten (Diagramm 22). Das Verhältnis von Leukoplakien mit Dysplasie zu Leukoplakien ohne Dysplasie betrug bei HPV-negativen Patienten eins zu 1,5. Bei den so genannten „low risk“-Typen betrug das Verhältnis eins zu zwei. In den sieben Leukoplakien von Patienten, die mit einem „high risk“-Typ infiziert waren, wurde keine Dysplasie nachgewiesen. Die Aufschlüsselung der Dysplasiegrade nach den einzelnen Virustypen zeigte also keine Korrelation zwischen „high risk“-Virustypen und einem höheren Dysplasiegrad.

Diagramm 22: Dysplasiegrade bei Infektion mit unterschiedlichen Virustypen



Bei HPV-negativen Patienten zeigten sich häufiger Leukoplakien mit Dysplasie als bei HPV-positiven Patienten (Diagramm 22). Das Verhältnis von Leukoplakien mit Dysplasie zu Leukoplakien ohne Dysplasie betrug bei HPV-negativen Patienten eins zu 1,5. Bei den so genannten „low risk“-Typen betrug das Verhältnis eins zu zwei. In den sieben Leukoplakien von Patienten, die mit einem „high risk“-Typ infiziert waren, wurde keine Dysplasie nachgewiesen. Die Aufschlüsselung der Dysplasiegrade nach den einzelnen Virustypen zeigte also keine Korrelation zwischen „high risk“-Virustypen und einem höheren Dysplasiegrad.

#### 4.1.8 Durchschnittliche Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs

Bei 28 Rezidiven konnte der Zeitraum zwischen Exzision und Auftreten des Rezidivs erfasst werden. Die durchschnittliche Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs betrug für das Gesamtkollektiv 21,9 Monate. Die Standardabweichung betrug 27,9 Monate (n= Anzahl der Rezidive mit bekannten Zeitpunkt des Auftretens; Tabelle 24).

Tabelle 24: Mittlere Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs (in Monaten)

	n	Mittelwert	Std. Abweichung	Minimum	Maximum
Angabe in Monaten	28	21,9	27,9	1	97

In den nachfolgenden Tabellen wird die durchschnittliche Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs in Abhängigkeit der Risikofaktoren HPV-Infektion (Tabelle 25) und Rauchen (Tabelle 26) untersucht.

Tabelle 25: Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs bei HPV-positiven und -negativen Patienten (in Monaten)

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweichung
HPV negative Patienten	15	1	97	16,9	24,5
HPV positive Patienten	13	1	96	24,5	30,1

Bei HPV-negativen Patienten traten Rezidive im Schnitt 7,6 Monate eher auf als bei HPV-positiven Patienten (Tabelle 25). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war mit dem Mann Whitney Test statistisch nicht signifikant.

Tabelle 26: Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs bei Rauchern und Nichtrauchern (in Monaten)

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweichung
Nichtraucher	9	1	97	17,5	30,7
Raucher und ehemalige Raucher	19	1	96	21,8	25,9

Auch zwischen Rauchern und Nichtrauchern gab es einen Unterschied (Tabelle 26), der allerdings weniger stark ausgeprägt war. Auch dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

#### 4.1.9 Durchschnittsgröße der Leukoplakien in der jetzigen Untersuchung

In der jetzigen Untersuchung wurde auch die Durchschnittsgröße erfasst. Für Leukoplakien mit eher rundem Durchmesser wurde die Fläche nach der Formel  $A=\pi r^2$ , für langgezogene Leukoplakien nach der Formel  $A=ab$  in  $\text{cm}^2$  berechnet. Die Durchschnittsgrößen sind in Tabelle 27 wiedergegeben.

Tabelle 27: Durchschnittsgröße für die Gesamtgruppe und HPV-positive und HPV-negative Patienten (in  $\text{cm}^2$ )

	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
Gesamtgruppe	39	0,03	3,50	0,53	0,69
HPV-positiv 2. Nachweis	17	0,03	1,54	0,30	0,41
HPV-negativ 2. Nachweis	22	0,03	3,50	0,70	0,81

(n) gibt die Anzahl der Leukoplakien an. Die Durchschnittsgröße der Leukoplakien in der jetzigen Untersuchung war für HPV-positive Patienten  $0,3 \text{ cm}^2$  und für HPV-negative Patienten  $0,7 \text{ cm}^2$ . Der Unterschied in der Durchschnittsgröße zwischen den im zweiten Nachweis negativen und im zweiten Nachweis positiven Patienten war statistisch nicht signifikant (U-Test nach Mann-Whitney  $p=0,077$ ).

Zur Untersuchung des Einflusses des Rauchverhaltens wurden die Gruppen aktive Raucher und Nichtraucher zusammen mit den ehemaligen Rauchern verglichen (Tabelle 28).

Tabelle 28: Unterschied der Durchschnittsgröße zwischen aktiven Rauchern und Nichtrauchern (in  $\text{cm}^2$ )

	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Std. Abweichung
Nichtraucher, ehemalige Raucher	24	0,03	3,5	0,6	0,8
aktive Raucher	15	0,03	1,5	0,4	0,5

Hier zeigte sich nur ein geringer Unterschied in der Durchschnittsgröße (für Nichtraucher und ehemalige Raucher  $0,6 \text{ cm}^2$ , für aktive Raucher  $0,4 \text{ cm}^2$ ).

## **B:**

### 4.2 Ergebnisse aus den Untersuchungen oraler Plattenepithelkarzinome und ihrer Vorläuferläsionen

#### 4.2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs, Untersuchungszeitraum

Anhand des elektronischen Archivs der Pathologie wurden alle 201 unter dem Begriff „orale Leukoplakie“ gespeicherten Läsionen aus dem Zeitraum 01.01.1991 bis 31.12.2003 auf die Existenz von Vorbefunden hin durchgesehen. Dabei wurden acht Patienten gefunden, bei denen sich aus einer histologisch untersuchten Läsion an gleicher Stelle ein Plattenepithelkarzinom entwickelt hatte. Das entspricht ziemlich genau 4% der Fälle. Zwei der Patienten waren Frauen, sechs Männer. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Exzision der Vorläuferläsion 53,5 Jahre. Zum Zeitpunkt der Tumorexzision betrug es 55 Jahre. Der zeitliche Abstand zwischen den Exzisionen betrug also durchschnittlich 1,5 Jahre. Alle Schnitte wurden durch Herrn Prof. Barten erneut histologisch beurteilt. An dieser Stelle sei erneut darauf hingewiesen, dass für diesen Teil der Untersuchung lediglich Paraffinschnittmaterial zur Verfügung stand.

#### 4.2.2 Lokalisationen

Fünf der Läsionen waren am Zungenrand lokalisiert, zwei an der Wange und eine im Mundboden.

#### 4.2.3 Diagnosen der Vorläuferläsionen

Die klinischen Diagnosen der Vorläuferläsionen waren in drei Fällen Lichen ruber planus, in den anderen fünf Fällen lauteten sie Leukoplakie. Sie wurden in vier Fällen durch die Pathologen widerlegt. Eine als Leukoplakie eingesandte Läsion war lediglich eine Hyperkeratose, eine als Lichen ruber planus eingesandte Läsion war in Wirklichkeit eine Leukoplakie. In zwei weiteren Fällen wurde eine unspezifische Entzündung diagnostiziert, die sich klinisch als Leukoplakie dargestellt hatten.

Die klinische Diagnose der Karzinome hatte zweimal erosive Leukoplakie, einmal flächenhaftes Schleimhautulkus und dreimal Leukoplakie ohne nähere Angaben gelautet. In drei Fällen war keine klinische Diagnose angegeben, bzw. die Fragestellung des Überweisers lautete „Verdacht auf Plattenepithelkarzinom“. Einen Überblick über die Diagnosen, die Dysplasiegrade und den Infektionsstatus liefert die Tabelle 29. Mikroskopisch ließ sich in allen

Schnitten der Karzinome am Rand der Läsion zumindest stellenweise eine Hyperkeratose nachweisen.

#### 4.2.4 Vergleich von HPV-positiven und HPV-negativen Vorläuferläsionen

Insgesamt wurde bei diesen acht Patienten viermal HPV nachgewiesen. Einmal Typ 6/11 in einem Karzinom, zweimal Typ 16 und einmal Typ 18 in den Vorläuferläsionen. Insgesamt waren also 37,5% der Vorläuferläsionen HPV-positiv. Bei keinem Patienten ließ sich das Virus in Vorläuferläsion und Tumor nachweisen. Die HPV-positiven Vorläuferläsionen erschienen zweimal als Leukoplakie (HPV 16) und einmal als chronische, unspezifische Entzündung (HPV 18). Der Dysplasiegrad der HPV-positiven Vorläuferläsionen wurde zweimal mit „ohne Dysplasie“ angegeben (Leukoplakie und chron. unspezifische Entzündung) und einmal mit „mittlerer Dysplasie“ (Leukoplakie) angegeben. Bei den HPV-negativen Läsionen wurde der Dysplasiegrad zweimal mit „ohne Dysplasie“, einmal mit „leichter Dysplasie“, einmal mit „mäßiger Dysplasie“ sowie einmal mit „hoher Dysplasie“ beurteilt. Bei HPV-negativen Läsionen lag in 60% der Fälle eine Dysplasie vor, während bei HPV-positiven Läsionen nur in 30% der Fälle eine Dysplasie festgestellt wurde. Der zeitliche Abstand zwischen Exzision/PE der Vorläuferläsion und Tumorexzision betrug bei den HPV-positiven Patienten 0,75, 2 und 4,5 Jahre, durchschnittlich also 2,4 Jahre. Bei den HPV-negativen Vorläuferläsionen betrug die Dauer zwischen Exzision der Vorläuferläsion und maligner Entartung durchschnittlich nur 0,75 Jahre.

#### 4.2.5 Subepitheliales Infiltrat

In allen Läsionen wurde ein geringes bis starkes Rundzellinfiltrat festgestellt.

ialien

Diagnose	histologische Diagnose	Lokalisation	Dysplasiegrad	subepitheliales Infiltrat	HPV-Infektion
Rezidiv	rez. Leukoplakie mit chron. lichenoider Entzündung	Zungenrand li	mäßig bis hochgradig	fokal geringes, bandf. lymphoplasmazytäres Infiltrat	-
PEC	gutdiff. Plattenepithelkarzinom	Zungenrand li	G1	mäßig bis ausgepr. Rundzellinfiltrat	6/11
Leukoplakie	einfache Leukoplakie	Zungenrand li	ohne	mäßige z.T. bandförmige, z.T. follikuläre rundzellige entz. Infiltrate	16
PEC	mäßig diff. PEC	hinterer Zungenrand li	G2	stärkere entz. Reaktionen akuter bis chron. Art	-
Rezidiv	Hyperkeratose geringe chron. Entzündung	anteriorer Mundboden li.	ohne	geringes Rundzellinfiltrat	-
infringent	mikroinvasives PEC	Mundboden neben Zungenbändchen	G1	nichts erwähnt	-
Leukoplakie	Leukoplakie	Zungenrand re	mittel	Lympho-, Histiocyten, Plasmazellen,	16
Leukoplakie	frühinvasives PEC	Zungenrand re	G1-2	stärkere entzündliche Rundzellinfiltrate, Lymphozyten und Plasmazellen	-
Lichen	eros. lichenoider Stomatitis	Wange re	keine	mäßiges lymphoplasmazelluläres Infiltrat	-
Leukoplakie	frühinvasives PEC	Schleimhautexzidate	G2	dichtes lymphoplasmazelluläres Infiltrat	-
erosive Leukoplakie	erosive Leukoplakie mit chron. Entzündung	Zungenrand li	mäßig	bandförmige lymphoplasmazelluläre Infiltration	-
Leukoplakie	frühinvasives PEC	Zungenrand li	G1	mäßige Rundzellinfiltration	-
Rezidiv	mäßige chron. hyperplastische Stomatitis	Zungenrand li	leicht	subepitheliale Fibrose, mäßige Rundzellinfiltrate	-
Rezidiv	frühinvasives PEC	Zungenrand li	G2	dichtes plasmazelluläres und histiozytäres Infiltrat	-
Rezidiv, Mykose	chron. unspez. Entzündung	Wangenschleimhaut re.	ohne	ausgedehnte lymphoplasmazelluläre Proliferationen	18
ulceröses Stomatitis	PEC, Parakeratose	Wange, Gaumen, Alveolarfortsatz re	G2	fokale lichenoider Entzündung in regione 18	-

## 5 Diskussion

### Teil A:

#### 5.1 Geschlechterverteilung

In der vorliegenden Untersuchung waren etwa zwei Drittel der Patienten männlich, ein Drittel weiblich. Damit ähnelt die Geschlechterverteilung der anderen Studien, die sich mit oralen Leukoplakien befassen. Die bei Miller & White (1996) angegebene Geschlechterverteilung betrug 5:1. Die bei Seifert et al. (2000) angegebene Geschlechterverteilung liegt hingegen bei m:w gleich 1,3:1. Konsens ist, dass eine Prädisposition für das männliche Geschlecht vorliegt.

#### 5.2 Alter

Das Durchschnittsalter der in dieser Untersuchung berücksichtigten Patienten betrug zum Zeitpunkt der Diagnosestellung „Leukoplakie“ 53 Jahre (min. 18 Jahre, max. 75 Jahre). Dabei waren Frauen durchschnittlich 10,5 Jahre älter als die Männer. Zum Zeitpunkt der zweiten HPV-Untersuchung waren sogar 75% der Patienten über 55 Jahre alt. Auch Burkhardt und Maerker fanden den Altersgipfel jenseits von 50 Jahren (Seifert et al. 2000). In der von Miller & White (1996) analysierten Literatur waren die HPV-positiven Leukoplakiepatienten im Schnitt 3,3 Jahre älter als die HPV-negativen.

#### 5.3 HPV-Infektion

In der Literatur finden sich mehrere Angaben über die Nachweisrate von HPV-Viren in Leukoplakien bzw. in Präkanzerosen (siehe Tabelle 31). Dabei hängt die Nachweisrate stark von der verwendeten Untersuchungsmethode ab (Miller & Johnstone 2001; Ha & Califano 2004). Einfluss auf die Nachweisrate haben das Untersuchungsgut, z.B. ob es sich um Frischmaterial bzw. schockgefrorenes Material oder um Paraffinmaterial, ob es sich um Zellen, die aus Abstrichen gewonnen wurden oder aus Mundspülungen stammen, handelt. Besonders wesentlich ist die Untersuchungsmethode (in der Reihenfolge wachsender Sensitivität aufgelistet), z.B. immunhistochemische Methoden, wie die Peroxidase anti-Peroxidase Technik, die in situ Hybridisation, ein alleiniger Southern Blot, oder die PCR, eventuell kombiniert mit einem Southern Blot. Die Unterschiede zwischen den Detektionsraten sind für die verschiedenen Untersuchungsmethoden statistisch signifikant (Miller & White 1996). Doch auch bei der PCR ändert sich die Sensitivität der Methode mit der Verwendung unterschiedlicher Primer. So sind typenspezifische Primer, wie sie für diese Arbeit verwendet wurden,

sensitiver als Consensusprimer, mit deren Hilfe sich mehrere HP-Virusarten nachweisen lassen. Primer aus der „early gene“ Region sind sensitiver als Primer aus der „late-gene“ Region. Bei der sogenannten „nested PCR“ werden zwei PCRs hintereinander geschaltet. Sie ist besonders sensitiv. Auch die Größe des PCR-Produkts spielt eine Rolle. Große PCR-Produkte benötigen große DNA-Mutterstränge, anhand derer die Tochterstränge synthetisiert werden können. Infolge von Fixierung und Färbung können aber kleinere DNA-Fragmente in einer Probe entstehen. Deshalb müssen die Ergebnisse immer unter Berücksichtigung der angewandten Methode betrachtet werden.

Da die PCR als Untersuchungsmethode sehr sensitiv ist (schon weniger als eine Kopie HPV-DNA pro Zelle kann nachgewiesen werden), besteht immer die Gefahr von durch Kontamination hervorgerufenen falsch-positiven Ergebnissen. Um dieses zu vermeiden wurde in dieser Arbeit bei jeder PCR eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitlaufen gelassen. Die PCR und die Arbeit mit den PCR-Produkten wurde in unterschiedlichen Räumen durchgeführt, die PCR Ansätze sogar unter dem Abzug angemischt.

Wie im Abschnitt 3 beschrieben, wurden von jedem Patienten auf unterschiedliche Weise drei Proben gewonnen. In keinem Fall ließ sich ein positiver HPV-Nachweis in einer Probe durch eine der anderen beiden Proben bestätigen. Dieses Phänomen wurde bereits von Bräuer (1997) festgestellt, die die HPV-Prävalenz in verschiedenen Proben (Mundspülflüssigkeit, Probeexzidat, Wangenabstrich, Zungenabstrich) gesunder Patienten untersuchte. Sie begründete dies mit einer fokalen Natur der HPV-Infektion. Darüber, dass HPV-Infektionen in lokalen Abstrichen, dann aber nicht in der Mundspülflüssigkeit des gleichen Probanden nachzuweisen war, wurde leider kein Erklärungsversuch abgegeben. Am zuverlässigsten sei die Verwendung unterschiedlicher Methoden der Probengewinnung, da hier HPV-Infektionen entdeckt würden, die mit einer Methode allein nicht aufgedeckt würden. In der eigenen Untersuchung spricht für einen fokalen Charakter der HPV-Infektion der Mundhöhle die Tatsache, dass lediglich in einem Abstrich von unveränderter Mundschleimhaut HPV nachgewiesen wurde, während es in drei Proben von veränderter Schleimhaut entdeckt wurde. Doch auch, dass orale HPV-Infektionen fokaler Natur seien, ist umstritten (D'Costa et al. 1998; siehe „Verlauf der Infektion“). Eine andere Erklärung dafür, dass HPV entweder in Abstrichen oder in der Mundspüllösung nachgewiesen werden konnte, könnte unter Berücksichtigung sogenannter latenter HPV-Infektionen geliefert werden. Bei diesen liegt HPV mit relativ konstanter Kopienzahl in der Basalschicht des Epithels vor (zur Hausen 2002). Eine stabile Aufrechterhaltung extrachromosomaler DNA in höheren Epithelschichten erfordert die Expression von E6 und E7, ansonsten kommt es schnell zur Entfernung der

extrachromosomalen DNA (Stubenrauch & Laimins 1999). Bei der Benutzung des scharfen Löffels zur Probengewinnung werden auch aus tieferen Epithelschichten Zellen gewonnen, so dass mit dieser Methode zusätzlich latente HPV-Infektionen nachgewiesen werden könnten. Trotzdem wurde in der Mundspüllösung am häufigsten HPV nachgewiesen. Dies könnte damit begründet werden, dass Zellen aus allen Bereichen der Mundhöhle gewonnen und die DNA aus der Probe präpariert wurde (DNA-asen und andere Substanzen in einer Probe, die die PCR behindern könnten, wurden dabei besonders sicher entfernt). Da die Mundspülprobe nach der Probenentnahme mit dem „scharfen Löffel“ durchgeführt wurde, könnten außerdem HPV infizierte Zellen aus tieferen Epithelschichten, die durch die Probenentnahme mit dem „scharfen Löffel“ gelöst worden sind, in die Spüllösung aufgenommen worden sein. So könnten eventuell auch latente Infektionen durch die Mundspülung nachgewiesen worden sein.

### 5.3.1 Vergleich der HPV-Prävalenzen aus der Literatur mit den eigenen Ergebnissen

Die in der Literatur gemachten Angaben zur HPV-Prävalenz in oralen Leukoplakien reichen von 1% bis 88% (Tabelle 30). Dabei liegt die Infektionsrate der meisten Studien zwischen 14% und 40,8%. Nur die Studien von Chen et al. (2006) und Bouda et al. (2000) lieferten höhere Ergebnisse (61% und 88%). Im Gegensatz dazu fanden Ha et al. (2002) mit ihrer quantitativen PCR nur in 1% der Fälle HPV-DNA.

Tabelle 30: HPV-Prävalenz in Leukoplakien und Präkanzerosen

Autor	Material/Methode	n	m:w	Alter	Durchschnittsalter	Prävalenz	Sonstiges <sup>1</sup>	Tabak
(Luttmann 1995)	scrabs, Frischmaterial, PCR und Southern blot (S.b.)	43	2:3	keine Angabe (k.A)	51,4	27,9%	Von den 27,9% verteilen sich auf HPV 16:13,9%, HPV 18:4,6% HPV 6/11 4,6%, HPV 16 und 18:4,6	Raucher 32% zu Nichtraucher 22% <sup>2</sup>
(Nielsen et al. 1996)	Paraffinmaterial, IHC <sup>3</sup> , ISH <sup>4</sup> , PCR und S.b.	49	1:1	34-94	67	40,8%		
(D'Costa et al. 1998)	Frischmaterial, PCR und S.b.	65	7:1	19-70	45	29%	nur HPV 16	90% Betelnuß & Tabakkauer <sup>5</sup>
(Elamin et al. 1998)	Frischmaterial, nPCR <sup>6</sup> , Sequenzierung	4	3:1	43-82	65,8	50%	33,3% in Präkanzerosen, (4/12)	
(Sand et al. 2000)	Paraffinmaterial, PCR und S.b.	7	5:2	60,4; ±14,4	60,4	28,5%		Raucher sig. häufiger Betroffen
(Bouda et al. 2000)	Paraffinmaterial, nested PCR <sup>6</sup>	34	1,4:1	27-75	48,1	88,20%	Dysplasien und Hyperplasien	70,6% <sup>5</sup>
(Miller & Johnstone 2001)	Metaanalyse	22 Studien (benigne Leukoplakie inkl. Nielsen 1996) und 28 Studien (intraepitheliale Neoplasie)				22,2% und 26,2%	Leukoplakien sowie dysplastisches Gewebe und Ca. in situ	
(Ha et al. 2002)	Paraffinmaterial, quantitative PCR	102	5:1	21-99	59	1%	Präkanzerosen, meistens Leukoplakien	
(Giovannelli et al. 2002)	Bürstenabstriche, nPCR <sup>6</sup> , Sequenzierung	25	1,2:1 <sup>7</sup>	18-94	ca. 55	28%		
(Ostwald et al. 2003)	schockgefrorenes Gewebe, PCR und S.b.	72	1,2:1	30-88	56,8	22,2%		
(Campisi et al. 2004)	scrabs, nPCR <sup>6</sup>	68	1,3:1	+/-14,1	54,4	17,60%	Alle Läsionen ohne oder nur mit leichter Dysplasie, in 75% Typ 18	Raucher sig. häufiger betroffen
(Lazzari et al. 2004)	scrabs/ Consensusprimer, Sequenzierung	7	k.A.	k.A.	k.A.	14,30%	Diagnose nicht histologisch bestätigt; HPV-Typen 6b, MM4, MM9	
eigene Untersuchung (A)	scrabs, Mundspg. PCR und S.b.	24	2:1	41-85	62,9	16,7% und 33,3%	HPV 6/11, 16 und 18,	Raucher 38% zu Nichtraucher 18% <sup>2</sup>
(Chen et al. 2006)	Paraffinmaterial, Consensusprimer, ISH <sup>4</sup>	40	k.A.	k.A.	k.A.	61,5% HPV 16, 38,5% HPV 18	nur Läsionen ohne oder mit leichter Dysplasie	69,7% Betelnuß 84,4% Raucher <sup>5</sup>

<sup>1</sup>: wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um Leukoplakien

<sup>3</sup>: Immunohistochemisch Peroxidase-Antiperoxidase Technik

<sup>5</sup>: Anteil von Rauchern/ Betelnußkonsumenten an der Gesamtanzahl der Patienten

<sup>2</sup>: HPV-Prävalenz bei Rauchern und Nichtrauchern

<sup>4</sup>: in situ Hybridisierung mit vorangegangener PCR

<sup>6</sup>: nested PCR

<sup>7</sup>: für Patienten mit oralem Lichen planus und Leukoplakien

Die in der Metaanalyse von Miller & Johnstone (2001) errechnete durchschnittliche HPV-Prävalenz lag bei 22,2% für Leukoplakien und bei 26% für intraepitheliale Neoplasien. Von

den in der vorliegenden Arbeit zitierten Veröffentlichungen (siehe Tabelle 30, aus den ausgewerteten Arbeiten waren die Leukoplakien herausgefiltert wurden) wurde bei 482 untersuchten Fällen HPV in 116 nachgewiesen. Prozentual ausgedrückt worden in 24% der Leukoplakien HPV gefunden. Die Veröffentlichungen aus Tabelle 31 wurden bis auf die Arbeit von Nielsen (1996) von Miller und Johnstone (2001) noch nicht berücksichtigt. Bezieht man die Arbeiten von Bouda (2000) und Sugiyama (2003) mit ein, die nicht explizit Leukoplakien untersuchten, sondern allgemein epitheliale Dysplasien (Sugiyama) bzw. auch Hyperplasien (Bouda), betrug die durchschnittliche HPV-Prävalenz 31,2%.

In der vorliegenden Untersuchung waren in der ersten HPV-Analyse 17% der Patienten HPV-positiv, in der zweiten HPV-Analyse waren 33 % HPV-positiv. Verglichen mit dem ersten oben errechneten Wert aus der zitierten Literatur liegt die Nachweisrate für den ersten Nachweis etwas unter und für den zweiten Nachweis etwas über dem dort errechneten Wert (24%). Diese Abweichung wurde wahrscheinlich durch die bei relativ kleinen Fallzahlen vorkommenden statistischen Schwankungen hervorgerufen. Verglichen mit den von Miller und Johnstone (2001) angegebenen Werten für die HPV-Prävalenz in unveränderter Mundschleimhaut zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte HPV-Prävalenz bei Leukoplakiepatienten.

Innerhalb dieser Untersuchung war die HPV-Nachweisrate im zweiten Nachweis doppelt so hoch wie im ersten. Allerdings war dies nur auf eine höhere Infektionsrate mit HPV 6/11 zurückzuführen, die „high risk“-Typen wurden gleich selten nachgewiesen. Von einigen Autoren wurde zunehmendes Alter als Risikofaktor für eine HPV-Infektion genannt (siehe oben). Beim Vergleich des Durchschnittsalters der HPV-positiven Patienten zur ersten und zweiten HPV-Untersuchung zeigte sich aber nur eine geringe Zunahme des Durchschnittsalters. Es nahm durchschnittlich nur um 2,9 Jahre zu, obwohl der zeitliche Abstand zwischen den beiden HPV-Untersuchungen durchschnittlich 8,1 Jahre betrug. Das Patientenalter kann also nicht zur Erklärung herangezogen werden. Der Unterschied zwischen den Detektionsraten lässt sich noch am ehesten durch die unterschiedlichen Probenmaterialien erklären, die für die beiden Nachweise verwendet wurden. Für den ersten Nachweis wurden Abstriche, Mundspülungen und Frischmaterial aus Biopsien verwendet, es wurden aber nicht alle Probentypen von jedem Patienten entnommen. In dieser Untersuchung lagen von jedem Patienten drei Proben vor, so dass die Chance einfach größer war, HPV nachzuweisen.

Betrachtet man die erste und die zweite Analyse gemeinsam, waren insgesamt 50% der Fälle HPV-positiv. (Vorrübergehende) HPV-Infektionen bei Patienten mit oralen Leukoplakien sind nach den Ergebnissen dieser Arbeit also nichts Ungewöhnliches.

Ursächlich dafür könnten sein:

- Leukoplakiepatienten erwerben leichter eine HPV-Infektion
- HPV-Infektionen lassen sich bei Leukoplakiepatienten besonders gut nachweisen (weniger falsch negative Ergebnisse, z.B. wegen höherer Kopienanzahl oder weil insgesamt leichter mehr Zellen gewonnen werden können. Vielleicht ist auch das Verhältnis von aktiver zu latenter Infektion zugunsten der aktiven Infektion verschoben)

Es bleibt die Frage offen, ob eine HPV-Infektion eine ursächliche Rolle in der Entstehung oraler Leukoplakien spielt oder aber ob bei einer vorliegenden Leukoplakie besonders häufig eine HPV-Infektion auftritt. Es ist ebenfalls unklar, ob HPV eine ursächliche Rolle in der oralen Kanzerogenese spielt, oder ob HPV nur als „Kommensale“ in verändertem Epithel auftritt.

#### 5.4 Einfluss des Rauchverhaltens auf die HPV-Infektion

Über einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit einer HPV-Infektion und dem Rauchverhalten gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Campisi et al. (2004) fanden bei Rauchern häufiger HPV als bei Nichtrauchern. Luttmann (1995) fand ebenfalls bei Rauchern (32%, acht von 25) eine gering erhöhte HPV-Nachweisrate gegenüber Nichtrauchern (22%, vier von 18). Miller & White (1996) fanden in der von ihnen durchgesehenen Literatur, dass orale Plattenepithelkarzinome öfter mit HPV infiziert waren, wenn eine positive Alkohol- und/oder Tabakanamnese vorhanden war. In der zuletzt erschienenen Metaanalyse von Miller & Johnstone (2001) konnten aber keine Angaben über die Co-Faktoren Alkohol und Rauchen gemacht werden, da in den ausgewerteten Publikationen nicht immer Angaben hierzu gemacht worden waren. Kurose et al. (2004) fanden bei Rauchern kein erhöhtes Risiko einer persistenten HPV-Infektion (allerdings nur zwei Fälle). In der eigenen Untersuchung war nur in der zweiten HPV-Untersuchung die Gruppe der HPV-positiven Raucher (37,5%) prozentual größer als die der HPV-negativen Raucher (18,7%). Bei den ehemaligen Rauchern war aber die HPV-Detektionsrate in der zweiten Untersuchung am niedrigsten. Im Gegensatz dazu ließ sich in der ersten Untersuchung kein erhöhtes Risiko für Raucher vermuten, eine HPV-Infektion zu haben. Dieses scheint widersprüchlich zu sein, kann aber durch die kleine Gruppenzahl bedingt sein, statistisch ließ sich kein signifikanter Zusammenhang nachweisen.

Die Gruppe der ehemaligen Raucher war zum Zeitpunkt des ersten Nachweises inhomogen, da nicht bekannt ist, ob die Betroffenen damals noch rauchten oder nicht.

Es ließ sich auch in Läsionen von vorwiegend Kautabak- und Betelnußbenutzern eine gegenüber normaler Schleimhaut erhöhte HPV-Nachweisrate feststellen (Greer et al. 1988; D'Costa et al. 1998; Chen et al. 2006). HPV besiedelt also auch Läsionen, die eine vermeintlich andere klare ätiologische Ursache haben. Dies könnte dafür sprechen, dass orale Läsionen eventuell sekundär besiedelt werden. Auch ein synergistischer Effekt von HPV und Kautabak wäre möglich.

Die einzelnen Virustypen wurden unterschiedlich häufig nachgewiesen: Typ 6/11 am häufigsten in 66% der Fälle, HPV 16 in 17% der Fälle, HPV 18 in 8% der Fälle und in weiteren 8% der Fälle wurde eine Doppelinfektion von HPV 6/11 und HPV 18 festgestellt. Damit stehen die Ergebnisse im Einklang mit vielen anderen Veröffentlichungen, in denen ebenfalls häufiger „low risk“ als „high risk“ Virustypen in Leukoplakien festgestellt worden waren (Miller & White 1996; Nielsen et al. 1996; Miller & Johnstone 2001). Im Gegensatz dazu wiesen D'Costa et al. (1998) in den von ihnen untersuchten Läsionen ausschließlich HPV 16 nach. HPV 18, 33, 6, 11 wurden nicht nachgewiesen. Auch Campisi et al. (2004) fanden in ihrer Untersuchung fast ausschließlich „high-risk“-Typen (HPV 18 in 75%, HPV 16 in 16% und in 8% HPV 33). Ostwald et al. (2003) wiesen in ihrer Untersuchung nahezu gleichhäufig Typ 16 (12,5%) und Typ 6/11 (11,1% der Fälle) nach.

Als eine Ursache für die unterschiedliche Nachweisrate der einzelnen Virustypen werden die geographisch verschiedenen Ursprünge der Proben genannt (Campisi et al. 2004).

### 5.5 Verlauf der HPV-Infektion

Bei Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Infektion ist auffällig, dass alle vier HPV-positiven Patienten des ersten Nachweises beim zweiten Nachweis HPV-negativ waren. Dass durch eine chirurgische Entfernung der Läsion bei einem Teil der Patienten die Infektion beseitigt wurde, ist unwahrscheinlich. Schweder (2001) wies bei Plattenepithelkarzinompatienten vor und nach chirurgischer Therapie etwa gleichhäufig HPV nach. Passend dazu legen Ergebnisse anderer Untersuchungen nahe, dass eine HPV-Infektion der Mundhöhle keinen fokalen Charakter haben (D'Costa et al. 1998).

In diesen Fällen war die HPV-Infektion also wohl transient. Wegen der kleinen Fallzahl lässt sich dieses Ergebnis statistisch aber nicht verallgemeinern. Der zeitliche Abstand zwischen den beiden Untersuchungen lag durchschnittlich bei 8,1 Jahren. Dies ist im Vergleich zu den

unten zitierten Arbeiten ein relativ großer Zeitraum. Es ist aber trotzdem ein Hinweis dafür, dass HPV-Infektionen in der Mundhöhle bei Leukoplakiepatienten über einen längeren Zeitraum häufig einen transienten Charakter haben könnten. In der Literatur finden sich keine Arbeiten, die den Infektionsverlauf bei Leukoplakiepatienten untersuchen. Es gibt aber Untersuchungen an Kleinkindern, Kindern, Heranwachsenden und von gesunden Erwachsenen.

Eine finnische Studie (Rintala et al. 2005), die die HPV-Infektion bei Neugeborenen über zwei Jahre nachuntersuchte, konnte keine persistente HPV-Infektion feststellen. In einer anderen Untersuchung (Mant et al. 2003) wurde auch bei Vier- bis Neunjährigen eine hohe Dynamik von HPV 16-Infektionen festgestellt. Bei initial HPV-positiv getesteten Kindern war die Infektion nach 30 Monaten in 50% der Fälle überwunden. Auf der anderen Seite wurde bei initial HPV-negativ getesteten Kindern in der zweiten Untersuchung nach ebenfalls 30 Monaten in 63% der Fälle HPV 16 nachgewiesen. In einer japanischen Studie zur Feststellung der HPV-Prävalenz in einer Gruppe von ca. 600 erwachsenen Probanden ohne Mundschleimhautveränderungen wurden die gefundenen vier HPV-positiven Fälle nachuntersucht. Dabei war die Infektion in zwei Fällen über zweieinhalb Jahre persistent (Kurose et al. 2004). Bei den Betreffenden waren jedoch die HPV-Typen 71 und HPV 12 nachgewiesen worden.

Es ist von zervikalen HPV-Infektionen bekannt, dass diese nur in der Minderzahl der Fälle persistieren. In einer Untersuchung konnten in 91% der Fälle Frauen innerhalb von zwei Jahren die Infektion überwinden. Frauen, bei denen eine zervikale intraepitheliale Neoplasie festgestellt wurde, waren in 100% der Fälle HPV-positiv und wurden in 81% der Fälle bereits sechs Monate zuvor HPV-positiv getestet (Ho et al. 1998).

Während also vor dem Auftreten einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie sehr häufig eine persistierende HPV-Infektion vorliegt, ist dies bei oralen Leukoplakien wohl nicht der Fall. In der vorliegenden Untersuchung lag in keinem Fall eine persistente HPV-Infektion vor, obwohl viele Patienten dysplastische Leukoplakien hatten. Die Ergebnisse aus den frauenheilkundlichen Untersuchungen unterscheiden sich insofern von denen dieser oralen Untersuchungen. Die Tatsachen, dass bei insgesamt 50% der Patienten HPV nachgewiesen werden konnte, sowie das Fehlen von persistenten HPV-Infektionen könnten als Hinweise dafür gewertet werden, dass Infektion und Überwindung der Infektion bei oralen Leukoplakiepatienten häufig sind. Dass trotzdem dysplastische Leukoplakien gefunden wurden, spricht für ein multifaktorielles Geschehen, in dem HPV eventuell nur eine Nebenrolle spielt.

Da, wahrscheinlich durch die geringe Patientenzahl bedingt, bei keinem Patienten eine persistente HPV-Infektion festgestellt werden konnte, kann leider keine Aussage darüber

getroffen werden, ob eine persistierende HPV-Infektion der Mundhöhle analog zu persistierenden HPV-Infektionen des Genitaltraktes mit einem stark erhöhten Krebsrisiko einhergeht. Eine (nichtpersistierende) HPV-Infektion hatte jedenfalls den Krankheitsverlauf der 12 HPV-positiven Patienten in Bezug auf das Entartungsrisiko nicht erkennbar beeinflusst. Keiner dieser Patienten hatte ein Plattenepithelkarzinom entwickelt und auch der mittlere Dysplasiegrad lag weit unter dem der HPV-negativen Patienten. Der einzige Patient, der ein orales Plattenepithelkarzinom entwickelte, wurde bei allen HPV-Untersuchungen negativ getestet (am 25.10.1996, 10.11.1997 (PEC), und am 01.04.2001).

### 5.6 HPV-Prävalenz in Vorläuferläsionen oraler Plattenepithelkarzinome

Da inhaltlich passend, werden in diesem Kapitel die Ergebnisse aus Untersuchung B diskutiert.

Es gibt nur wenige Studien, die den Infektionsstatus von später entarteten Leukoplakien bestimmt haben. Hierbei reichte der Anteil an HPV-positiven Leukoplakien von 70 bis 100% (Lind et al. 1986; Nielsen et al. 1996; Sugiyama et al. 2003). Eine tabellarische Übersicht ist in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: HPV-Prävalenz bei maligner Entartung

Autor	Methode	n	m:w	Patientenalter (Jahre)	Durchschnittsalter (Jahre)	Dauer bis zur Entartung (Jahre)	HPV positiv (%)	Läsionstyp	maligne entartet/davon HPV+	Tabakkonsum/davon HPV+
(Lind et al. 1986)	IHC <sup>1</sup> Kapsidantigene	20	2:1	-	63,9	2,6	70%	Leukoplakien	10/7	10/3
(Nielsen et al. 1996)	Paraffinmaterial, IHC <sup>1</sup> , ISH <sup>2</sup> , PCR & SbH <sup>3</sup>	49	1:1	34-94	67	6,3	40,8%	Leukoplakien	3/3	3/3
(Sugiyama et al. 2003)	Paraffinmaterial; PCR	51	1:1,12	40-80	40 und älter	k.A.	61% (31/51)	Läsionen mit Dysplasie	22/18	keine Angaben
eigene Untersuchung (B)	Paraffinmaterial, PCR & SbH <sup>3</sup>	8	3:1	40-70	53,6	2,4	37,5%	<sup>4</sup>	8/3	keine Angaben

<sup>1</sup>: IHC Immunohistochemischer Nachweis

<sup>2</sup>: ISH in situ Hybridisierung

<sup>3</sup>: PCR & SbH Polymerasekettenreaktion und Southern blot Hybridisierung

<sup>4</sup>: Leukoplakien, Hyperkeratose, lichenoider Stomatitis, unspezifische Entzündung

Drei der 49 von Nielsen et al. (1996) untersuchten Patienten mit prämaligen Läsionen entwickelten nach 4-12 Jahren ein orales Plattenepithelkarzinom. Alle Läsionen waren HPV-positiv, eine davon für HPV 16. Die Diagnosen der Vorläuferläsionen waren in zwei Fällen

eine Erythroplakie mit leichter bzw. mit schwerer Dysplasie, sowie eine verrucöse Leukoplakie ohne Dysplasie.

Lind et al. (1986) untersuchten 20 Leukoplakien und berichteten, dass 10 Leukoplakien innerhalb eines 10-Jahreszeitraums zu einem oralen Plattenepithelkarzinom entarteten. Sieben (70%) von ihnen entstanden aus einer HPV-positiven Leukoplakie, drei aus einer HPV-negativen. In jener Studie war das Virus immunohistochemisch nachgewiesen worden. Interessanter Weise lag die HPV-Prävalenz in der Untersuchung von Lind et al. (1986) auch in der Kontrollgruppe (Patienten, die innerhalb von 49 Monaten noch kein PEC entwickelt hatten) ähnlich hoch (bei 60%) wie in der Gruppe von Patienten, die ein PEC entwickelten (70%).

Sugiyama et al. (2003) untersuchten 51 Epitheldysplasien, davon 31 (61%) HPV 16 DNA positive. Insgesamt 22 der Läsionen entwickelten sich zu einem oralen Plattenepithelkarzinom, 18 (82%) davon aus HPV-positiven Läsionen. Von diesen 18 Fällen waren auch nach der malignen Transformation noch 16 HPV-positiv. In den zwei anderen Tumoren ließ sich das Virus nicht mehr nachweisen. In den vier weiteren Tumoren ließ sich das Virus weder in den Vorläuferläsionen, noch in den Tumoren nachweisen.

In der eigenen Untersuchung wurden in drei (37%) von acht Vorläuferläsionen, die später zu einem Plattenepithelkarzinom entarteten, die „high risk“ HPV-Viren 16 und 18 gefunden. Diese Läsionen waren aber nur in fünf Fällen als Leukoplakie bzw. Hyperkeratose bezeichnet worden, während die drei anderen Läsionen eher entzündlichen Charakter hatten (lichenoide Stomatitis, chronisch unspezifische Entzündung, chronische hyperplastische Stomatitis). In den Leukoplakien wurde zweimal (40% der Leukoplakien) HPV 16 nachgewiesen, in den drei anderen Läsionen einmal (30% der Läsionen mit entzündlichem Charakter) HPV 18.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Lind et al. (1986); Sugiyama et al. (2003) und Nielsen et al. (1996) war also die HPV-Prävalenz in der eigenen Untersuchung erheblich niedriger. Sie lag mit 37,5% nur etwas höher als in den Studien zur HPV-Prävalenz in Leukoplakien, die nicht entarteten (siehe Abschnitt A).

Auch in den Studien von Nielsen et al. (1996) und Sugiyama (2003) wurde Paraffinmaterial und PCR gestützte Verfahren verwandt. Deshalb lassen sich die Unterschiede zwischen diesen Ergebnissen nicht durch methodische Unterschiede erklären. Lind et al. (1986) stellten die HPV-Infektion in ihren Proben nur immunohistochemisch fest, diese Methode weist sogar eine geringere Sensitivität auf als die PCR-gestützten Methoden der anderen Studien. Trotzdem lag die HPV-Prävalenz in allen untersuchten Leukoplakien bei 65%. Zur Erklärung

könnte allerdings der unterschiedliche Dysplasiegrad des Probenmaterials herangezogen werden, sofern man davon ausgeht, dass die HPV-Prävalenz mit steigendem Dysplasiegrad zunimmt. So wiesen bei Sugiyama et al. (2003) alle Proben eine Epitheldysplasie auf, während in der eigenen Untersuchung nur in der Hälfte der Fälle eine Dysplasie nachweisbar war. In zwei der drei von Nielsen et al. (1996) untersuchten Läsionen lag eine Dysplasie vor. Allerdings war hier der Zeitraum bis zur Entartung mit durchschnittlich 7 Jahren sehr lang. Bei Lind et al. (1986) wurden in neun der entarteten Leukoplakien eine Epitheldysplasie festgestellt. Es ist aber weiterhin unklar, ob HPV ursächlich für die Entstehung der Dysplasie und der Entartung war, da ja nur das Vorhandensein und nicht die Expression des viralen Genoms untersucht worden war.

Erwähnenswert ist noch, dass in der vorliegenden Untersuchung ein Unterschied in der Dauer zur malignen Entartung zwischen den HPV-positiv getesteten und den HPV-negativ getesteten Läsionen gefunden wurde. Die durchschnittliche Dauer bis zur malignen Entartung betrug bei HPV-positiven Patienten 2,4 Jahre, bei HPV-negativen Patienten aber nur 0,75 Jahre. Es lässt sich nicht feststellen, wie der Infektionsstatus der HPV-positiven Läsionen unmittelbar vor der malignen Transformation war. Das Gleiche trifft auf die von Nielsen et al. (1996) untersuchten Läsionen zu. Sugiyama et al. (2003) machten leider keine Angaben zur Dauer bis zur malignen Entartung. In der Untersuchung von Lind et al. (1986) lag die durchschnittliche Dauer bis zur malignen Entartung bei 2,6 Jahren.

Interessant ist auch, dass in diesem Teil dieser Untersuchung (Abschnitt B) wie auch im ersten Teil dieser Untersuchung (Abschnitt A) keine persistente HPV-Infektion festzustellen war, die HPV-DNA der HPV-positiven Zellen muss also verlorengegangen sein. Diese Befunde könnten deshalb ein Hinweis für die Richtigkeit der sogenannten „hit and run“-Hypothese sprechen. Danach spielt das Virus eine Initiatorrolle bei der Kanzerogenese und die Virus-DNA geht nach der Entartung der Zelle verloren. Dass dies möglich ist, zeigten Iwasaka et al. (1992) an transfizierten Zellen. Die neu aufgetretene Infektion eines Karzinoms mit HPV 6/11 könnte ein Hinweis dafür sein, dass bestehende Plattenepithelkarzinome mit HPV infizierbar sind.

### 5.7 Anzahl der Leukoplakien

Bei den 24 untersuchten Patienten wurden insgesamt 89 Leukoplakien (davon 32 Rezidive) diagnostiziert. Es wurden durchschnittlich 3,7 Leukoplakien oder Rezidive pro Patient festgestellt. Mit 9,5 Jahren war der klinische Untersuchungszeitraum aber sehr lang, so dass sich in dieser Zeitspanne viele neue Leukoplakien entwickeln konnten.

75% der Patienten hatten maximal vier Leukoplakien (inkl. Rezidive) und nur 25% litten an bis zu 10 Leukoplakien. Bei separater Betrachtung von HPV-positiven und HPV-negativen Patienten ergab sich, dass HPV-positive Patienten durchschnittlich 4,2 Leukoplakien entwickelten, während HPV-negative Patienten nur 3,3 Leukoplakien entwickelten. Noch größer waren die Unterschiede, wenn man die Rezidive nicht mitbetrachtete. Dann lag die durchschnittliche Anzahl bei 1,8 für die HPV-negativen Patienten und bei 2,9 für HPV-positive Patienten. Dieser Unterschied war zwar statistisch nicht signifikant, aber ein Trend war vorhanden ( $p=0,078$ ). Da beide Gruppen etwa gleich häufig Rezidive entwickelten, lässt sich diese Tatsache nicht für die Gesamtanzahl übernehmen. Es muss auch darauf hingewiesen werden, dass die Rezidive eines einzelnen HPV-negativen Patienten mehr als ein Drittel der Rezidive dieser Gruppe ausmachte. Insofern könnte es tatsächlich sein, dass HPV-positive Patienten mehr Leukoplakien entwickeln als HPV-negative. Auch Raucher hatten ein höheres Risiko, an mehreren Leukoplakien zu erkranken. Raucher entwickelten durchschnittlich 4,1 Leukoplakien pro Patient. Verglichen mit der HPV-Infektion als möglicher Risikofaktor für eine erhöhte Anzahl von Leukoplakien nimmt das Rauchen einen ähnlichen Stellenwert ein. Bei Rauchern und HPV-positive Patienten wurden durchschnittlich 4,1 bzw. 4,2 Leukoplakien im Untersuchungszeitraum pro Patient festgestellt.

### 5.8 Lokalisation und der Einfluss der Risikofaktoren Rauchen und HPV darauf

Waldron & Shafer (1975) gaben die Lage der von ihnen untersuchten 3256 Leukoplakien wie folgt an: Unterkieferschleimhaut mit Vestibulum 25,2%, Wange 21,9%, Gaumen und Oberkiefer mit Vestibulum zu je 10,7%, Lippe 10,3%, Mundboden 8,9%, Zunge 6,8% und Retromolarraum in 5,9% der Fälle. Seifert et al. (2000) hingegen gaben an, die Mehrzahl der Leukoplakien lägen an Zunge und Wange. Pindborg (1982) fand, dass in Dänemark 32% der Leukoplakien an der Wange, 5-8% an der Zunge, 24% am Mundwinkel und 13% am Mundboden lokalisiert waren.

In der vorliegenden Untersuchung fanden sich die meisten Leukoplakien etwa zu je 20% im Planum buccale, am Alveolarkamm des Unterkiefers und retroangulär. Der Mundboden war zusammen mit der ventralen Zungenoberfläche in 10% der Fälle betroffen, ebenso der

Zungenrand. Die verbleibenden 20% teilten sich unter den an der Lippe, dem Alveolarkamm des Oberkiefers, am harten Gaumens, dem Retromolarraums und an der dorsalen Zungenoberfläche lokalisierten Leukoplakien auf. Um die Ergebnisse dieser Untersuchung mit denen von Waldron und Shafer vergleichen zu können, muss man die im Planum buccale und die retroangulär gelegenen Leukoplakien zusammenfassen. So gesehen lagen 40% der Leukoplakien in der Wangenschleimhaut. Das sind mehr als bei Waldron und Shafer angegeben (22%). Die Verteilung der restlichen Leukoplakien stimmt aber weitestgehend überein. Pindborg (1982) fand eine Prävalenz von in der buccalen Mucosa und retroangulär gelegenen Leukoplakien von insgesamt 56%. Das liegt über den eigenen Ergebnissen. Verglichen mit den Zahlen von Waldron und Shafer ist in der vorliegenden Untersuchung lediglich die Zunge nur leicht „überrepräsentiert“, stimmt aber mit den Ergebnissen von Pindborg überein. Auf der anderen Seite deckt sich aber das Ergebnis mit der Aussage von Seifert et al. (2000). Die Lageverteilung der Leukoplakien entspricht insofern schon den in der Literatur angegebenen Zahlen, zumindest was die europäischen angeht.

In der von Miller & White (1996) bearbeiteten Literatur wurde am häufigsten HPV in Leukoplakien der bukkalen/ labialen Mukosa, der Zunge und des Gaumens nachgewiesen. Eine unterschiedliche Lageverteilung von HPV-positiven und HPV-negativen Leukoplakien gab es vor allem am Gaumen (4,1% HPV- zu 10,3% HPV+), an der Zunge (13,5% HPV- zu 15,5% HPV+), an der Lippe (25,6% HPV- zu 17,2% HPV+) und am Mundboden (9,01% HPV- zu 6,9% HPV+). D'Costa et al. (1998) fanden HPV-positive Leukoplakien fast ausschließlich in der buccalen Mucosa, nur je einmal an der Zunge und Alveolarkamm des Unterkiefers. Allerdings waren über 90% der Patienten Betelnuß und Kautabak Konsumenten. Auch in der Studie von Nielsen et al. (1996) waren die Mehrzahl der HPV-positiven Präkanzerosen (Leukoplakien und Erythroplakien) in der Wangenschleimhaut lokalisiert und imponierten überwiegend als verrucöse Leukoplakien ohne oder mit geringer Dysplasie. Die Mehrzahl der HPV-negativen Läsionen befand sich sublingual, stellten sich überwiegend als Erythroplakie und noduläre Leukoplakie dar, ebenfalls ohne oder nur mit geringer Dysplasie.

In der vorliegenden Untersuchung lagen die meisten der Leukoplakien von HPV-positiven Patienten im Planum buccale, retroangulär und am Alveolarkamm des Unterkiefers. Alle Leukoplakien im Lippenrot und am Alveolarkamm des Oberkiefers waren von HPV-positiven Patienten. Nur an der Zunge überwogen Läsionen von HPV-negativen Patienten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich aber schlecht mit denen anderer vergleichen, da in dieser Arbeit Läsionen von HPV-positiven Patienten mit HPV-positiven Läsionen anderer

Arbeiten verglichen werden. Darüber hinaus waren die Patienten dieser Arbeit nicht über den gesamten Untersuchungszeitraum HPV-positiv.

Vergleicht man die durchschnittliche Anzahl von Leukoplakien pro Patient von Rauchern (inkl. ehemaligen Rauchern) mit HPV-positiven Patienten separat für die verschiedenen Lokalisationen (Diagramm 18), fanden sich bei letzteren weniger Läsionen am Zungenrand (0,86 Leukoplakien pro Patient bei Rauchern zu 0,5 Leukoplakien pro Patient bei HPV-positiven Patienten), retroangulär (1:0,8) und am Mundboden (0,6:0,3). Auf der anderen Seite fanden sich bei HPV-positiven Patienten mehr Leukoplakien am Alveolarkamm des Unterkiefers (0,3:0,75) und im Planum buccale (0,64:0,75). Das gehäufte Vorkommen von Leukoplakien am Mundboden von Rauchern (Diagramm 18) lässt sich durch den so genannten Syphoneffekt begründen. Demzufolge bleiben die Kanzerogene aus dem Tabakrauch am längsten an der tiefsten Stelle der Mundhöhle, dem Mundboden und wirken deshalb dort am stärksten. Bei Nichtrauchern wurden keine Leukoplakien am Mundboden festgestellt! Ähnlich verhält es sich für die retroangulär gelegenen Leukoplakien, da auch hier Raucher massiv häufiger betroffen waren als Nichtraucher. In einer von Pindborg (1982) zitierten Studie wurde festgestellt, dass bei Bidirauchern der Mundwinkelbereich am häufigsten betroffen war. Es ist durchaus denkbar, dass auch normaler Zigarettenrauch für die Entstehung der Mehrzahl dort lokalisierter Leukoplakien verantwortlich ist.

Fasst man all diese Daten zusammen, kann man zu dem Schluss kommen, dass die Unterschiede in der Lageverteilung eher auf das Rauchen als auf die HPV-Infektion zurückzuführen sind. HPV kommt als alleiniger Risikofaktor lediglich für die meisten Läsionen des Alveolarkamms des Unterkiefers in Frage (siehe Diagramm 18). Hier konnte das Rauchen als Risikofaktor ausgeschlossen werden kann und es überwogen Läsionen von HPV-positiven Patienten, wenn auch keine Aussagen über das Mitwirken von Faktoren wie Alkohol oder noch anderer, unbekannter Faktoren getroffen werden können. An anderen Lokalisationen (Planum buccale, Zungenrand) fanden sich auch Läsionen von HPV-negativen Nichtrauchern, jedoch machten sie hier nur einen kleinen Teil der gefundenen Läsionen aus. Die Tatsache, dass die Läsionen am Lippenrot (und in abgeschwächter Form auch bei retroangulär lokalisierten Läsionen) hauptsächlich bei HPV-positiven Rauchern vorkamen, lässt hier evtl. an einen möglich Synergismus von HPV und Rauchen in Leukoplakien dieser Lage denken. Der wichtigste ätiologische Faktor für Leukoplakien und Plattenepithelkarzinome des Unterlippenrots ist aber bekanntermaßen das Sonnenlicht (Pindborg 1982). Dieser Faktor wurde in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt.

## 5.9 Klinisches Erscheinungsbild und der Einfluss von Rauchen und HPV-Infektion

Luttman (1995) fand in ihrer Untersuchung in 77% der Fälle eine homogene Leukoplakie (Leukoplakia simplex), in den anderen 23% eine inhomogene Leukoplakie (18% Leukoplakia verrucosa und 5% Leukoplakia erosiva). Analog dazu wurden auch in dieser Untersuchung 65% der untersuchten Leukoplakien klinisch als homogen oder plan beschrieben. 34% wurden als inhomogen klassifiziert, davon 8% als nodular, 14% als verrucös, 10% als ulzeriert und zu 2% als Erythroleukoplakie. Die Ergebnisse sind nur zum Teil miteinander vergleichbar, weil zwei unterschiedliche Einteilungssysteme verwendet wurden. Das eine wurde von Burkhardt & Maerker (1981) erstellt und unterscheidet zwischen Leukoplakia simplex, verrucosa und erosiva. Das andere, hier verwandte, von Axell et al. (1996) vorgeschlagene System unterscheidet in plane, noduläre, verrucöse, ulzerierte und Erythroleukoplakie. Die einzelnen Formen der verschiedenen Klassifikationen lassen sich nur zum Teil in die andere übertragen. Allen Untersuchung ist aber gemeinsam, dass die absolute Mehrheit der Läsionen homogen waren und nur ein Viertel bis ein Drittel inhomogen.

Vergleicht man Raucher und Nichtraucher miteinander (siehe Tabelle 16), so hatten bei einer gleichen Häufigkeit von planen Leukoplakien Raucher mehr inhomogene Leukoplakien als Nichtraucher. Raucher hatten also mehr risikobehaftete Leukoplakien als Nichtraucher. Trotzdem wurden bei Rauchern und Nichtrauchern gleich häufig Leukoplakien mit rötlichem Erscheinungsbild (ulzerierter Typ und Erythroleukoplakie) gefunden.

HPV wird als möglicher Faktor in der Ätiopathogenese diskutiert (Reichart 2007). Es zeigte sich, dass die HPV-positiven Patienten sowohl mehr homogene (2 pro HPV-positivem Patienten zu 1,3 pro HPV-negativem Patienten) als auch inhomogene (eine pro HPV-positivem Patienten und 0,75 pro HPV-negativem Patienten) Leukoplakien entwickelten als HPV-negative Patienten. HPV-positive Patienten entwickelten allerdings weniger ulzerierte Leukoplakien und Erythroleukoplakien als HPV-negative Patienten, aber dafür mehr noduläre. Campisi et al. (2004) konnten in ihrer Untersuchung keinen Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion und dem klinischen Erscheinungsbild (homogene oder inhomogene Form) herstellen.

Vergleicht man das klinische Erscheinungsbild der Leukoplakien separat für Raucher und HPV-positive Patienten, so fällt auf, dass HPV-positive Patienten zwar mehr plane Leukoplakien (2 pro HPV-positivem Patienten, 1,7 pro Patient bei Rauchern) entwickelten, aber geringfügig weniger inhomogene Leukoplakien (1,07 pro Raucher, eine pro HPV-negativen

Patient). Auch entwickelten Raucher mehr Leukoplakien vom ulzerierten Typ und Erythroplakien. Das geringste Risiko sowohl für inhomogene als auch für homogene Leukoplakien hatten die Gruppe der Nichtraucher. Da die Verteilung von Rauchern und Nichtrauchern in der Gruppe der HPV-positiven und HPV-negativen Patienten gleich ist, scheint HPV das klinische Erscheinungsbild eher weniger aggressiv zu beeinflussen. Die kleine Fallzahl dieser Arbeit erlaubt aber keine verlässliche Aussage.

#### 5.10 Dysplasiegrad und die Risikofaktoren HPV und Rauchen

Einen Überblick über Dysplasiehäufigkeiten erhält man im Buch „Krebs und Vorkrebs der Mundhöhle“ von Pindborg (1982). Dort ist Zahlenmaterial aus Untersuchungen von Waldron und Shafer (1975) und Shafer (1975) (insgesamt 3360 Biopsien) zusammengestellt worden. In 80% der untersuchten Leukoplakien wurde keine, in 12% der Fälle eine geringe bis mäßige und in 5% der Fälle eine starke bis zum Carcinoma in situ reichende Dysplasie festgestellt worden. In 3% der Fälle lag bereits ein Karzinom vor. In einer früheren Arbeit, die sich u.a. mit der Dysplasiehäufigkeit in Leukoplakien an der Rostocker Klinik befasste, wurden sogar in 52% der Fälle eine Dysplasie festgestellt (Luttmann 1995). Dunsche & Härle (2000) fanden in 67,3% der von ihnen untersuchten Fälle keine Dysplasie, in 21,6% der Fälle eine leichte Dysplasie, in 7,2% der Fälle eine moderate Dysplasie und in 4% der Fälle eine starke Dysplasie. In der vorliegenden Untersuchung waren 67,7% der untersuchten Leukoplakien ohne Dysplasie. 16,6% hatten eine geringe Dysplasie, 11% eine mittlere Dysplasie. Eine hochgradige Dysplasie sowie ein Carcinoma in situ wurden nicht festgestellt, während sich in einem Fall ein invasives Karzinom fand. Es überwiegen in dieser Untersuchung also klar die Leukoplakien ohne Dysplasie. Die Werte liegen zwischen denen von Pindborg (1982) und Luttmann (1995), decken sich aber mit denen von Dunsche und Härle (2000). Unterschiede in der Bewertung des Dysplasiegrades können aber auch durch die Subjektivität des Pathologen begründet sein (Warnakulasuriya 2001). Insofern ist die Dysplasiehäufigkeit in der vorliegenden Studie durchaus mit der der anderen Untersuchung vergleichbar.

Es ist bekannt, dass Leukoplakien an Mundboden, Zunge und Lippe besonders häufig einen hohen Dysplasiegrad haben (Seifert et al. 2000). Pindborg (1982) gab die Dysplasiehäufigkeit von Leukoplakien, die an der Wange lokalisiert waren mit 17% an, für Läsionen an der Zunge mit 35% und 24% für Leukoplakien an der Lippe. Solche Aussagen waren mit dem Material dieser Untersuchung aufgrund der kleinen Fallzahl nicht möglich, aber auch hier fand sich die absolute Mehrzahl der dysplastischen Läsionen am Zungenrand und im Mundboden. Vereinzelt wurden dysplastische Läsionen auch in der Wangenschleimhaut und im Bereich

des Mundwinkels gefunden. Die hier vorgestellten Ergebnisse stehen somit in Einklang mit der Literatur.

Es wurde festgestellt, dass Leukoplakien mit klinisch inhomogenem Erscheinungsbild häufiger eine Dysplasie enthalten als die homogene Form (Gundlach et al. 1992). Passend dazu lag in dieser Untersuchung die Dysplasiehäufigkeit in inhomogenen Leukoplakien bei 33% gegenüber 22% in homogenen Leukoplakien.

Einige Autoren stellten die Zunahme der Dysplasiehäufigkeit mit zunehmenden Alter fest (Seifert et al. 2000). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Leukoplakien mit mittelgradiger Dysplasie wurden allerdings in zwei von drei Fällen im Alter von 65-85 Jahren festgestellt. Da nur sechs Leukoplakien (Rezidive konnten nicht mit berücksichtigt werden, da das Patientenalter bei Rezidiven nicht festgehalten worden war) mit Dysplasie fünf Altersklassen zugeordnet worden, reichte die Fallzahl nicht aus, um ein klares Bild der Verteilung der dysplastischen Leukoplakien zu entwerfen (Tabelle 19).

Ein Hinweis für eine mögliche ätiologische Rolle von HPV in der oralen Kanzerogenese wurde in der Tatsache vermutet, dass in dysplastischen Leukoplakien häufiger HPV gefunden wurde als in nicht dysplastischen. So fanden Ostwald et al. (2003) in ihrer Untersuchung ein Ansteigen der Infektionsrate mit steigendem Dysplasiegrad. Die Detektionsrate lag bei 18% (n=66) in nicht dysplastischen Leukoplakien und 44% (n=13) in dysplastischen und verrucösen Leukoplakien. Sugiyama et al. (2003) fanden in ihrer Untersuchung ein Ansteigen der Infektionsrate zumindest in starker Dysplasie gegenüber schwacher und mäßiger Dysplasie. Die Detektionsraten waren 64,3% (9 von 14) in Läsionen mit geringer, 55,2% (16 von 29) in Läsionen mit mittlerer, und 75% (6 von 8) in Läsionen mit starker Dysplasie. Es handelte sich in dieser Studie allerdings nicht unbedingt um Leukoplakien, sondern allgemein um epitheliale Läsionen mit Dysplasie.

Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Untersuchung bei HPV-positiven Patienten nur sechs Leukoplakien mit Dysplasie gefunden (14% der Leukoplakien von HPV-positiven Patienten), bei HPV-negativen Patienten aber 16 (entspricht 32%). Der durchschnittliche Dysplasiegrad war bei HPV-negativen Patienten etwa dreimal so hoch wie bei HPV-positiven (0,26 zu 0,75). Dieses Ergebnis war aber statistisch nicht signifikant. Beim Vergleich mit den oben erwähnten Studien müssen aber auch methodische Unterschiede berücksichtigt werden. In den Studien von Ostwald et al. (2003) und Sugiyama et al. (2003) wurde das histologisch untersuchte Material auch für den HPV-Nachweis verwendet, so dass Dysplasiegrad und Infektionsstatus von einer Läsion zu ein und demselben Zeitpunkt bestimmt worden waren. In

der vorliegenden Arbeit wurde das Untersuchungsmaterial aus Abstrichen und Mundspülungen gewonnen, die Läsion aber nur selten zeitnah zur HPV-Untersuchung exzidiert, so dass die histologische Untersuchung der Läsionen zum Teil schon Jahre früher oder später vorgenommen worden waren. Es wurden über den gesamten Untersuchungszeitraum neu aufgetretene Leukoplakien und Rezidive entfernt und histologisch untersucht, während die HPV-Untersuchung durchschnittlich 1,5 Jahre nach der ersten klinischen Untersuchung bzw. am Ende der klinischen Untersuchung stattfand. Es lässt sich also kein klarer zeitlicher Zusammenhang zwischen histologischen Untersuchungen und HPV-Untersuchung herstellen, insbesondere weil nie eine persistente Infektion gefunden wurde. Dies mag zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Diese Tatsache lässt aber trotzdem vermuten, dass eine nicht über den gesamten Untersuchungszeitraum bestehende HPV-Infektion nicht zu steigenden Dysplasiegraden führte, d.h. die Entartungsrate von Leukoplakien nicht wesentlich beeinflusste.

Auch in anderen Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen Infektionsstatus und Dysplasiegrad in Exzisionsmaterial nicht bestätigt werden. Elamin et al. (1998) fanden in den von ihnen untersuchten prämaligen Läsionen (n=12, davon vier Leukoplakien) zwar bei vier HPV positiven Patienten in zwei Fällen (50%) eine Dysplasie, aber bei HPV-negativen Patienten sogar in 5 von acht (62%) Fällen. In den Leukoplakien wurde in drei der vier Fälle eine Dysplasie festgestellt. Zwei der Leukoplakien mit Dysplasie waren HPV-negativ, die dritte HPV-positiv. Die vierte Leukoplakie war ohne Dysplasie und auch HPV-positiv. In den von Campisi et al. (2004) untersuchten Proben (n=68) fanden sich nur Leukoplakien ohne oder mit geringer Dysplasie, obwohl 18,6% der Proben HPV-positiv waren.

### 5.11 Dysplasiegrade in Erstmanifestationen und Rezidiven

Vergleicht man die errechneten, mittleren Dysplasiegrade von Erstmanifestationen und Rezidiven miteinander, war der mittlere Dysplasiegrad bei Rezidiven (0,87) mehr als doppelt so hoch wie bei Erstmanifestationen (0,36). Dieses Ergebnis war aber statistisch nicht signifikant. Trotzdem ist es ein Ansporn dafür, Rezidive genauso kritisch zu betrachten wie Erstmanifestationen. Auf der anderen Seite ist das Ergebnis vielleicht dadurch zu erklären, dass der Behandler bei Rezidiven zurückhaltender in der Indikationsstellung zur chirurgischen Exzision ist, um den Patienten nicht zu stark zu belasten. Deshalb wurden vielleicht die Leukoplakien nur entfernt, wenn sie klinisch besonders kritisch erschienen und dann auch öfter einen höheren Dysplasiegrad aufwiesen.

### 5.12 Dauer bis zum Auftreten eines Rezidives für die verschiedenen Risikogruppen

In der Untersuchung von Eilert (2004) traten 56% der Rezidive innerhalb des ersten halben Jahres, 19% während der ersten 2 Jahre und 6% nach 3 Jahren auf. Die durchschnittliche Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs der in jener Arbeit ausgewerteten Fälle lässt sich anhand einer Abbildung errechnen und liegt bei etwa 12 Monaten. Der dortige Untersuchungszeitraum betrug durchschnittlich 3,5 Jahre.

In der eigenen Untersuchung lag die mittlere Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs bei durchschnittlich etwa 22 Monaten. Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen von Eilert (2004). Allerdings war der klinische Untersuchungszeitraum in dieser Arbeit fast dreimal so lang. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit u.a. Patienten einbestellt, die schon sehr lange nicht mehr zu einem Recalltermin erschienen waren. Es ist also möglich, dass Rezidive schon wesentlich eher aufgetreten waren, aber erst zu einem späteren Zeitpunkt diagnostiziert wurden. So lassen sich auch die maximal aufgetretenen Zeiträume von bis zu acht Jahren erklären. Dies könnte die Unterschiede zwischen beiden Untersuchungen erklären. Die andere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass auch zu einem späteren Zeitpunkt Rezidive auftreten können. Dies würde die Forderung nach einem langandauernden Recall bestärken.

Für die untersuchten Risikofaktoren wurden Unterschiede in der Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidivs festgestellt. So bekamen HPV-negative Patienten im Durchschnitt 7,6 Monate eher ein Rezidiv als HPV-positive Patienten. Zwischen Rauchern und Nichtrauchern waren die Unterschiede nicht so stark ausgeprägt. Nichtraucher bekamen 4,3 Monate eher als Raucher ein Rezidiv. Aufgrund der kleinen Fallzahlen soll aber keine Interpretation versucht werden.

### 5.13 Größe der Leukoplakien für die beiden Risikogruppen

In der Untersuchung von Eilert (2004) wurden die Leukoplakien in drei Gruppen unterteilt. Kleiner als 50mm<sup>2</sup> waren 55% der Leukoplakien, 50-150mm<sup>2</sup> 30% und größer als 150mm<sup>2</sup> nur 15% der untersuchten Leukoplakien.

In der vorliegenden Untersuchung lag die Durchschnittsgröße der im jetzigen Befund untersuchten Leukoplakien bei 53 mm<sup>2</sup>. Damit ist die Durchschnittsgröße etwas geringer als in der Untersuchung von Eilert (2004). Allerdings wurden bei Eilert (2004) nur Leukoplakien erfasst, die auch entfernt wurden. Da kleinere Leukoplakien nicht so häufig entfernt wurden, wurden in der Arbeit von Eilert durch eben diese Indikationsstellung zur Exzision wahrscheinlich größere Leukoplakien erfasst.

Für die Risikofaktoren Rauchen und HPV-Infektion wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Durchschnittsgröße festgestellt. Am größten waren die Unterschiede zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Patienten. HPV-positive Patienten hatten durchschnittlich nur halb so große Läsionen wie HPV-negative Patienten. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (U-Test nach Mann Whitney  $p=0,077$ ). Bei aktiven Rauchern im Vergleich mit Nichtrauchern und ehemaligen Rauchern waren nur geringe Unterschiede in der Durchschnittsgröße feststellbar.

## 6 Zusammenfassung

Für die vorliegende Arbeit wurden Zellen der Mundschleimhaut von 24 Leukoplakiepatienten auf das Vorhandensein von HPV-DNA hin untersucht. Diese Patienten waren bereits zu einem früheren Zeitpunkt darauf getestet worden. Anhand der Patientenakte wurde außerdem der Krankheitsverlauf rekonstruiert. Weiterhin wurden fixierte histologische Exzidate (Paraffinmaterial) weiterer acht Patienten ebenfalls auf HPV-DNA untersucht. Dabei handelte es sich um Läsionen der Mundschleimhaut, aus denen sich zu einem späteren Zeitpunkt ein orales Plattenepithelkarzinom entwickelt hatte, sowie die Karzinome selbst. Die Viren-DNA wurde mittels PCR und nachfolgender Southern Blot Hybridisierung mit virenspezifischen Sonden nachgewiesen.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich bei Leukoplakiepatienten eine höhere HPV-Prävalenz verglichen mit den in der Literatur angegebenen Werten über die HPV-Prävalenzen bei Menschen mit unveränderter Mundschleimhaut. Die im ersten Teil der Untersuchung (A) gefundenen HPV-Prävalenzen von 16% (1. Untersuchungszeitpunkt) und von 33% (2. Untersuchungszeitpunkt) liegen im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte für Patienten mit oralen Leukoplakien. Insgesamt wurde bei 50% der hier untersuchten Patienten das HP-Virus nachgewiesen - entweder beim ersten oder beim zweiten Untersuchungszeitpunkt. Im zweiten Teil der Untersuchung (B) ließ sich HPV-DNA in 37,5% der Vorläuferläsionen und in einem der Karzinome nachweisen.

Während sich in frauenheilkundlichen Untersuchungen zeigte, dass eine persistente HPV-Infektion ein Hauptrisikofaktor für das Entstehen einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie ist, ließ sich bei den von uns untersuchten Patienten, weder im Teil A noch im Teil B eine persistente Infektion feststellen. Vorübergehende HPV-Infektionen bei Patienten mit oralen Leukoplakien sind also anscheinend nicht ungewöhnlich, während persistente HPV-Infektionen der Mundschleimhaut bei Leukoplakiepatienten möglicherweise selten sind. Es gibt bisher leider noch keine vergleichbaren Daten über das Verhalten von HPV-Infektionen bei Leukoplakiepatienten. Das Wesen der HPV-Infektion bei Erwachsenen mit unveränderter Mundschleimhaut ist ebenfalls schlecht untersucht. Nur in einer Arbeit wurden HPV-positive Patienten nachuntersucht. Kurose et al. (2004) fanden in zwei von vier Fällen eine über einen längeren Zeitraum (durchschnittlich 14 Monate) bestehende HPV-Infektion.

In der vorliegenden Untersuchung konnte eine (nicht über den gesamten Untersuchungszeitraum bestehende) HPV-Infektion weder mit einem höheren (durchschnittlichen) Dysplasiegrad noch mit einer erhöhten oder frühzeitigen Entartungsrate korreliert werden. Es ließ sich auch keine Korrelation zwischen „high risk“-Virustypen und dem Dysplasiegrad feststellen. Von den vier in der ersten HPV-Untersuchung positiv getesteten Patienten hatte keiner im Untersuchungszeitraum von 8 Jahren ein orales Plattenepithelkarzinom entwickelt.

Die im Teil B untersuchten Vorläuferläsionen waren nur in 37,5% der Fälle HPV-DNA positiv. Dies ist verglichen mit den Zahlen aus der Literatur ein geringer Wert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es noch Klärungsbedarf gibt. Um den Einfluss von HPV auf die Entstehung oraler Plattenepithelkarzinome zu klären, müssen weitere Verlaufsstudien erfolgen. Nicht nur das Vorhandensein viraler DNA, sondern auch die Quantität und die Expression viraler DNA in oralen Leukoplakien müssen untersucht werden. Parallel dazu sollten vielleicht auch die bekannten Tumorsuppressorgene (z.B. p53, pRb) auf Mutationen, aber auch auf ihre Funktionstüchtigkeit (Methylierungen) hin untersucht werden, wie es Wiest et al. (2002) für Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs taten.

Eine Auswirkung der HPV-Infektion auf orale Leukoplakien könnte sein, dass HPV-positive Patienten eher mehrere kleine Leukoplakien entwickeln, die aber (noch?) keine oder nur geringe Dysplasien aufweisen. Eventuell sind auch einige Leukoplakien des Alveolarkamms des Unterkiefers auf HPV zurückzuführen, da hier das Rauchen als ätiologischer Faktor unwahrscheinlich war, während hingegen Alkohol nicht als Mitursache ausgeschlossen werden konnte.

Raucher scheinen mehrere Leukoplakien zu entwickeln als Nichtraucher. Diese lagen dann häufig am Mundboden oder im Bereich des Mundwinkels, wie dies auch schon bekannt war. Im Gegensatz zu HPV-Patienten und Nichtrauchern wiesen Raucher auch einen höheren durchschnittlichen Dysplasiegrad auf. Alle diese Ergebnisse konnten aber nicht statistisch abgesichert werden.

## 7 Thesen

- Leukoplakiepatienten sind häufiger mit HPV infiziert als Patienten mit unveränderter Mundschleimhaut
- HPV-Infektionen der Mundschleimhaut sind bei Leukoplakiepatienten häufig transient, persistente HPV-Infektionen bei Leukoplakiepatienten sind wahrscheinlich selten
- Eine vorübergehende HPV-Infektion bei oralen Leukoplakiepatienten wirkt sich wahrscheinlich nicht beschleunigend auf die maligne Entartung aus.
- Bestehende Läsionen der Mundschleimhaut können mit HPV infiziert werden.
- HPV-positive Patienten entwickeln kleinere und zahlreichere Leukoplakien als HPV-negative Patienten.
- Raucher haben häufiger eine HPV-Infektion als Nichtraucher
- Bei Rauchern sind Leukoplakien häufiger am Mundboden und retroangulär lokalisiert als bei Nichtrauchern

## 8 Literaturverzeichnis:

- Al-Bakkal, G.; Ficarra, G.; McNeill, K.; Eversole, L.R.; Sterrantino, G. & Birek, C. (1999). Human papilloma virus type 16 E6 gene expression in oral exophytic epithelial lesions as detected by in situ rtPCR. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 87, 197-208.
- Axell, T.; Pindborg, J.J.; Smith, C.J. & van der Waal, I. (1996). Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med.* 25, 49-54.
- Barbosa, M.S.; Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogen.* 4, 1529-1532.
- Bienz, K.A. (1998). Viren als Krankheitserreger. In: Kayser, F.H.; Bienz, K.A.; Eckert, J. & Zinkernagel, R.M. (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie.* (S. 419 – 482), Thieme: Stuttgart, New York
- Bouda, M. & Vassilis, G. (2000). "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol.* 13; 644-653.
- Bouquot, J.E.; Weiland, L.H. & Kurland, L.T. (1988). Leukoplakia and carcinoma in situ synchronously associated with invasive oral/oropharyngeal carcinoma in Rochester, Minn., 1935-1984. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 65, 199-207.
- Bräuer, D. (1997). *Nachweis humaner Papillomaviren Typ 6/11, 16 und 18 und ihre Verteilung in Abstrichen, Biopsien und Mundspülflüssigkeit gesunder Erwachsener;* Diss. med., Rostock
- Burkhardt, A. & Maerker, R. (1981). *Vor- und Frühstadien des Mundhöhlenkarzinoms.* Hanser: München, Wien
- Campion, M.J. (1987). Clinical manifestations and natural history of genital human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 14, 363-388.
- Campisi, G.; Giovannelli, L.; Arico, P.; Lama, A.; Di Liberto, C.; Ammatuna, P. & D'Angelo, M. (2004). HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 98, 705-711.
- Chen, P.C.; Pan, C.C.; Kuo, C. & Lin, C.P. (2006). Risk of oral nonmalignant lesions associated with human papillomavirus infection, betel quid chewing, and cigarette smoking in Taiwan: an integrated molecular and epidemiologic study. *Arch Path Lab Med.* 130, 57-61.
- Claudio, P.P.; Howard, C.M.; Baldi, A.; De Luca, A.; Fu, Y.; Condorelli, G.; Sun, Y.; Colburn, N.; Calabretta, B. & Giordano, A. (1994). p130/pRb2 has growth suppressive properties similar to yet distinctive from those of retinoblastoma family members pRb and p107. *Cancer Research.* 54, 5556-5560.
- Clertant, P. & Seif, I. (1984). A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature.* 311, 276-279.
- Cuschieri, K.S.; Cubie, H.A.; Whitley, M.W.; Gilkison, G.; Arends, M.J.; Graham, C. & McGoogan, E. (2005). Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study. *J Clin Pathol.* 58, 946-950.
- Davies, R.; Hicks, R.; Crook, T.; Morris, J. & Vousden, K. (1993). Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* 67, 2521-2528.

- D'Costa, J.; Saranath, D.; Dedhia, P.; Sanghvi, V. & Mehta, A.R. (1998). Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. *Oral Oncol.* 34, 413-420.
- Duggan, M.A. (2002). A review of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemoth.* 29 Suppl 1, 176-193.
- Dunsche, A. & Härle, F. (2000). [Precancer stages of the oral mucosa: a review]. *Laryngo-rhinootologie* 79, 423-427.
- Eilert, C. (2004). *Erfolgsbewertung der CO-2-Lasertherapie bei oraler Leukoplakie. Eine klinische Untersuchung.* Diss. med., Rostock
- Einhorn, J. & Wersall, J. (1967). Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of the oral mucosa. *Cancer.* 20, 2189-2193.
- Elamin, F.; Steingrimsdottir, H.; Wanakulasuriya, S.; Johnson, N. & Tavassoli, M. (1998). Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in U.K. subjects: a novel method of detection. *Oral Oncol.* 34, 191-197.
- Evstifeeva, T.V. & Zaridze, D.G. (1992). Nass use, cigarette smoking, alcohol consumption and risk of oral and oesophageal precancer. *Europ J Cancer. Part B, Oral Oncol.* 28B, 29-35.
- Fields, B.; Knipe, D. & Howley, P. (1995). Papillomaviruses. In: Shah, KV; Howley, PM (Eds.) *Fields virology.* (pp. 2077-109). Lippincott-Raven Press. New York
- Fornatora, M.; Jones, A.C.; Kerpel, S. & Freedman, P. (1996). Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (koilocytic dysplasia): an entity of unknown biologic potential. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82, 47-56.
- Fuchs, P.G. & Pfister, H. (1994). Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirol.* 37, 159-167.
- Garlick, J.A. & Taichman, L.B. (1991). Human papillomavirus infection of the oral mucosa. *Am J Dermatopathol.* 13, 386-395.
- Gassenmaier, A. & Hornstein, O.P. (1988). Presence of human papillomavirus DNA in benign and precancerous oral leukoplakias and squamous cell carcinomas. *Dermatologica* 176, 224-233.
- Giovannelli, L.; Campisi, G.; Lama, A.; Giambalvo, O.; Osborn, J.; Margiotta, V. & Ammatuna, P. (2002). Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis* 185, 833-836.
- Greer RO, Jr.; Schroeder, K.L. & Crosby, L. (1988). Morphologic and immunohistochemical evidence of human papillomavirus capsid antigen in smokeless tobacco keratoses from juveniles and adults. *J Oral Maxillofac Surg.* 46, 919-929.
- Gundlach, K.K.H. (1992). Wieviele Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle sind aus Leukoplakien entstanden? *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir.* 16, 109-111.
- Gupta, P.C. (1984). Epidemiologic study of the association between alcohol habits and oral leukoplakia. *Community Dent Oral Epidemiol.* 12, 47-50.
- Gupta, P.C.; Mehta, F.S.; Daftary, D.K.; Pindborg, J.J.; Bhonsle, R.B.; Jalnawalla, P.N.; Sinor, P.N.; Pitkar, V.K.; Murti, P.R.; Irani, R.R.; Shah, H.T.; Kadam, P.M.; Iyer, K.S.; Iyer, H.M.; Hegde, A.K. & Chandrashekar, G.K. (1980). Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dent Oral Epidemiol.* 8, 283-333.
- Ha, P.K. & Califano, J.A. (2004). The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 15, 188-196.
- Ha, P.K.; Pai, S.I.; Westra, W.H.; Gillison, M.L.; Tong, B.C.; Sidransky, D. & Califano, J.A. (2002). Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res.* 8, 1203-1209.

- Havre, P.A.; Yuan, J.; Hedrick, L.; Cho, K.R. & Glazer, P.M. (1995). p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res.* 55, 4420-4424.
- Heilman, C.A.; Engel, L.; Lowy, D.R. & Howley, P.M. (1982). Virus-specific transcription in bovine papillomavirus-transformed mouse cells. *Virology.* 119, 22-34.
- Hindle, I.; Downer, M.C.; Moles, D.R. & Speight, P.M. (2000). Is alcohol responsible for more intra-oral cancer? *Oral Oncol.* 36, 328-333.
- Ho, G.Y.; Bierman, R.; Beardsley, L.; Chang, C.J. & Burk, R.D. (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 338, 423-428.
- Hubbert, N.L.; Sedman, S.A. & Schiller, J.T. (1992). Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol.* 66, 6237-6241.
- Iwasaka, T.; Hayashi, Y.; Yokoyama, M.; Hara, K.; Matsuo, N. & Sugimori, H. (1992). 'Hit and run' oncogenesis by human papillomavirus type 18 DNA. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 71, 219-223.
- Jaber, M.A.; Porter, S.R.; Gilthorpe, M.S.; Bedi, R. & Scully, C. (1999). Risk factors for oral epithelial dysplasia - the role of smoking and alcohol. *Oral Oncol.* 35, 151-156.
- Kellokoski, J.; Syrjanen, S.; Syrjanen, K. & Yliskoski, M. (1990). Oral mucosal changes in women with genital HPV infection. *J Oral Pathol Medicine.* 19, 142-148.
- Klingelutz, A.J.; Foster, S.A. & McDougall, J.K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature.* 380, 79-82.
- Koolman, J. & Röhm, K.-H. (1994). Kontrolle des Zellcyclus. In: Koolman, J. & Röhm, K.-H. (Hrsg.), *Taschenatlas der Biochemie* (S. 352- 353). Thieme, Stuttgart, New York
- Kramer, I.R.; Lucas, R.B.; Pindborg, J.J. & Sobin, L.H. (1978). Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 46, 518-539.
- Kurose, K.; Terai, M.; Soedarsono, N.; Rabello, D.; Nakajima, Y.; Burk, R.D. & Takagi, M. (2004). Low prevalence of HPV infection and its natural history in normal oral mucosa among volunteers on Miyako Island, Japan. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 98, 91-96.
- Lazzari, C.M.; Krug, L.P.; Quadros, O.F.; Baldi, C.B. & Bozzetti, M.C. (2004). Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med.* 33, 260-263.
- Lind, P.O.; Syrjanen, S.M.; Syrjanen, K.J.; Koppang, H.S. & Aas, E. (1986). Local immunoreactivity and human papillomavirus (HPV) in oral precancer and cancer lesions. *Scand J Dent Res.* 94, 419-426.
- Luttmann, B. (1995). *Zur Problematik der Leukoplakie der Mundschleimhaut.* Diss. med. Rostock
- Mant, C.; Kell, B.; Rice, P.; Best, J.M.; Bible, J.M. & Cason, J. (2003). Buccal exposure to human papillomavirus type 16 is a common yet transitory event of childhood. *J Med Virol.* 71, 593-598.
- Mao, E.J.; Schwartz, S.M.; Daling, J.R.; Oda, D.; Tickman, L. & Beckmann, A.M. (1996). Human papilloma viruses and p53 mutations in normal pre-malignant and malignant oral epithelia. *Int J Cancer.* 69, 152-158.
- Mashberg, A.; Boffetta, P.; Winkelman, R. & Garfinkel, L. (1993). Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer.* 72, 1369-1375.
- McBride, A.A.; Romanczuk, H. & Howley, P.M. (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem.* 266, 18411-18414.
- McKaig, R.G.; Baric, R.S. & Olshan, A.F. (1998). Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 20, 250-265.
- Miller, C.S. & White, D.K. (1996). Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 82, 57-68.

- Miller, C.S. & Johnstone, B.M. (2001). Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 91, 622-635.
- Modrow, S.; Falke, D. & Truyen, U. (2003). Virusproteine. In: Modrow (Hrsg.), *Molekulare Virologie* (S. 494- 499). Spektrum Wissenschaftsverlag, Heidelberg, Berlin.
- Moreno-Lopez, L.A.; Esparza-Gomez, G.C.; Gonzalez-Navarro, A.; Cerero-Lapiedra, R.; Gonzalez-Hernandez, M.J. & Dominguez-Rojas, V. (2000). Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol.* 36, 170-174.
- Morrison, E.A. (1994). Natural history of cervical infection with human papillomaviruses. *Clin Infect Dis.* 18, 172-180.
- Moscicki, A.B. (1999). Human papillomavirus infection in adolescents. *Ped Clin North Am.* 46, 783-807.
- Munger, K.; Phelps, W.C.; Bubb, V.; Howley, P.M. & Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.* 63, 4417-4421.
- Nair, S. & Pillai, M.R. (2005). Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis.* 11, 350-359.
- Neville, B.W. & Day, T.A. (2002). Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 52, 195-215.
- Nielsen, H.; Norrild, B.; Vedtofte, P.; Praetorius, F.; Reibel, J. & Holmstrup, P. (1996). Human papillomavirus in oral premalignant lesions. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 32B, 264-270.
- Oda, D.; Bigler, L.; Lee, P. & Blanton, R. (1996). HPV immortalization of human oral epithelial cells: a model for carcinogenesis. *Exp Cell Res.* 226, 164-169.
- Ostwald, C.; Muller, P.; Barten, M.; Rutsatz, K.; Sonnenburg, M.; Milde-Langosch, K. & Loning, T. (1994). Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. *J Oral Pathol Med.* 23, 220-225.
- Ostwald, C.; Rutsatz, K.; Schweder, J.; Schmidt, W.; Gundlach, K. & Barten, M. (2003). Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. *Med Microbiol Immunol. (Berl)* 192, 145-148.
- Palefsky, J.M.; Silverman, S. Jr.; Abdel-Salaam, M.; Daniels, T.E. & Greenspan, J.S. (1995). Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16. *J Oral Pathol Med.* 24, 193-197.
- Park, N.H.; Gujuluva, C.N.; Baek, J.H.; Cherrick, H.M.; Shin, K.H. & Min, B.M. (1995). Combined oral carcinogenicity of HPV-16 and benzo(a)pyrene: an in vitro multistep carcinogenesis model. *Oncogene.* 10, 2145-2153.
- Peitsaro, P.; Johansson, B. & Syrjanen, S. (2002). Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* 40, 886-891.
- Pfister, H.; Fuchs, P.G. & Volcker, H.E. (1985). Human papillomavirus DNA in conjunctival papilloma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 223, 164-167.
- Pindborg, J.J. (1982). *Krebs und Vorkrebs der Mundhöhle*. Quintessenz, Berlin.
- Pindborg, J.J.; Smith C.J. & van der Waal, I. (1997). *Histological typing of cancer and precancer*. Springer, Berlin
- Postma, T.C. & Van Heerden, W.F. (2003). Is the human papillomavirus a mutual aetiological agent in oral and cervical squamous cell carcinoma? *Anticancer Res.* 23, 3509-3512.
- Reichart, P.A. (2000). Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dent Oral Epidemiol.* 28, 390-398.
- Reichart, P.A. (2001). Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. PG - 207-13. *Clin Oral Investig.* 5, 207-13.

- Reichart, P.A. (2007). Orale Leukoplakie – Erythroplakie. *Dtsch Zahnärztl Z.* 62, 45-48
- Richardson, H.; Kelsall, G.; Tellier, P.; Voyer, H.; Abrahamowicz, M.; Ferenczy, A.; Coutlee, F. & Franco, E.L. (2003). The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12, 485-90.
- Rintala, M.A.; Grenman, S.E.; Jarvenkyla, M.E.; Syrjanen, K.J. & Syrjanen, S.M. (2005). High-risk types of human papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV Family Study. *J Clin Virol.* 41, 1728-1733.
- Roed-Petersen, B. (1982). Effect on oral leukoplakia of reducing or ceasing tobacco smoking. *Acta Derm Venereo.* 62, 164-167.
- Sand, L.; Jalouli, J.; Larsson, P.A. & Hirsch, J.M. (2000). Human papilloma viruses in oral lesions. *Anticancer Res.* 20, 1183-1188.
- Sand, L.; Wallstrom, M.; Jalouli, J.; Larsson, P.A. & Hirsch, J.M. (2000). Epstein-Barr virus and human papillomavirus in snuff-induced lesions of the oral mucosa. *Acta Otolaryngol.* 120, 880-884.
- Scheffner, M.; Huibregtse, J.M.; Vierstra, R.D. & Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 75, 495-505.
- Scheffner, M.; Werness, B.A.; Huibregtse, J.M.; Levine, A.J. & Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63, 1129-1136.
- Schweder, J. (2000). *Prävalenz von humanen Papillomaviren Typ 6/11 und 18 bei intraoralen Leukoplakien und Plattenepithelkarzinomen in Abhängigkeit von der Therapiephase.* Diss. med. Rostock
- Schwenzer, N. & Schmelzle, R. (2001). Erkrankungen der Mundschleimhaut- klinische Erscheinungsbilder. In: Schwenzer, N; Ehrenfeld, M. (Eds.): *Zahnärztliche Chirurgie, Lehrbuch zur Aus- und Weiterbildung* (S. 225-262). Thieme. Stuttgart, New York
- Scully, C. (1996). New aspects of oral viral diseases. *Curr Top Patho.* 90, 29-96.
- Scully, C. (2005). Oral cancer; the evidence for sexual transmission. *Br Dent J.* 199, 203-207.
- Seifert, G.; Burkhardt, A. & Morgenroth, K. (2000). Prämaligne orale Veränderungen (Präkanzerosen). In: Seifert, G. (Ed.), *Oralpathologie III- Mundhöhle, angrenzendes Weich- und Knochengewebe* (S. 257-285). Springer. Berlin, Heidelberg
- Sellers, J.W.; Karwalajtys, T.L.; Kaczorowski, J.; Mahony, J.B.; Lytwyn, A.; Chong, S.; Sparrow, J. & Lorincz, A. (2003). Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ.* 168, 421-425.
- Seo, Y.S.; Müller, F.; Lusky, M.; Gibbs, E.; Kim, H.Y.; Phillips, B. & Hurwitz, J. (1993). Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 2865-2869.
- Silverman S, Jr.; Gorsky, M. & Lozada, F. (1984). Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer.* 53, 563-568.
- Snijders, P.J.; van den Brule, A.J.; Meijer, C.J. & Walboomers, J.M. (1994). Papillomaviruses and cancer of the upper digestive and respiratory tracts. *Curr Top Microbiol Immunol.* 186, 177-198.
- Squier, C.A.; Cox, P. & Hall, B.K. (1986). Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J Oral Pathol.* 15, 276-279.
- Steenbergen, R.D.; Hermsen, M.A.; Walboomers, J.M.; Joenje, H.; Arwert, F.; Meijer, C.J. & Snijders, P.J. (1995). Integrated human papillomavirus type 16 and loss of heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivative cell line. *Cancer Res.* 55, 5465-5471.

- Stoppler, H.; Stoppler, M.C. & Schlegel, R. (1994). Transforming proteins of the papillomaviruses. *Intervirology*. 37, 168-179.
- Stubenrauch, F. & Laimins, L.A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol*. 9, 379-386.
- Sudbø, J.; Kildal, W.; Risberg, B.; Koppang, H.S.; Danielsen, H.E. & Reith, A. (2001). DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia. *N Engl J Med*. 344, 1270-1278.
- Sugerman, P.B. & Shillitoe, E.J. (1997). The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis*. 3, 130-147.
- Sugiyama, M.; Bhawal, U.K.; Dohmen, T.; Ono, S.; Miyauchi, M. & Ishikawa, T. (2003). Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 95, 594-600.
- Syrjanen, S.M.; Syrjanen, K.J. & Happonen, R.P. (1988). Human papillomavirus (HPV) DNA sequences in oral precancerous lesions and squamous cell carcinoma demonstrated by in situ hybridization. *J Oral Pathol*. 17, 273-278.
- Terai, M.; Hashimoto, K.; Yoda, K. & Sata, T. (1999). High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol*. 14, 201-205.
- van der Waal, I.; Schepman, K.P.; van der Meij, E.H. & Smeele, L.E. (1997). Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol*. 33, 291-301.
- van Houten, V.M.; Snijders, P.J.; van den Brekel, M.W.; Kummer, J.A.; Meijer, C.J.; van Leeuwen, B.; Denkers, F.; Smeele, L.E.; Snow, G.B. & Brakenhoff, R.H. (2001). Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 93, 232-235.
- Waldron, C.A. & Shafer, W.G. (1975). Leukoplakia revisited. A clinopathological study of 3256 oral leukoplakias. *Cancer* 36, 1386-92
- Warnakulasuriya, S. (2001). Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol*. 194, 294-297.
- Werness, B.A.; Levine, A.J. & Howley, P.M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 248, 76-79.
- Wiest, T.; Schwarz, E.; Enders, C.; Flechtenmacher, C. & Bosch, F.X. (2002). Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 21, 1510-1517.
- Zhu, L.; van den Heuvel, S.; Helin, K.; Fattaey, A.; Ewen, M.; Livingston, D.; Dyson, N. & Harlow, E. (1993). Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev*. 7, 1111-1125.
- zur Hausen, H. (1991). Viruses in human cancers. *Science*. 254, 1167-1173.
- zur Hausen, H. (1999a). immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol* 9, 405-411.
- zur Hausen, H. (1999b). Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians*. 111, 581-587.
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2, 342-350.
- zur Hausen, H. & de Villiers, E.M. (1994). Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol*. 48, 427-447.

## 9 Anhang

### **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema **„Eine Untersuchung zum Krankheitsverlauf von Patienten mit oralen Leukoplakien und/oder Plattenepithelkarzinomen unter Berücksichtigung des Rauchverhaltens und des HPV-Infektionsverlaufs“** selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Es wurden von mir ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen.

Eine Promotionsarbeit über dieses Thema liegt noch nicht vor.

Sandnes, den 27.01.2008

Gero Moshagen

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Gundlach für die gegebene Hilfe bei der Auswahl des Themas, die Unterstützung bei der Patientenuntersuchung und für die unendliche Geduld bei der Korrektur der Arbeit herzlich bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Barten möchte ich mich besonders für die interessanten Einblicke beim gemeinsamen Mikroskopieren der Plattenepithelkarzinome und ihrer Vorläuferläsionen bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Ostwald, die mir nicht nur bei der Untersuchung der Proben mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern auch immer zu einem Gedankenaustausch bereit war.

Frau Specht möchte ich für die Hilfe beim Einbestellen der Patienten und ihre aufmunternde Art bedanken.

Bei Frau Lauschius und ihren Kolleginnen möchte ich mich für die Unterstützung beim Wiederfinden von scheinbar verschollenen Patientenkartekarten bedanken.

Meiner lieben Freundin Ulrike möchte ich für ihre tatkräftige Hilfe, das dauernde Korrekturlesen und ihre Geduld danken.

Meinem Bruder Volker möchte für die Hilfe beim Lösen von PC-Problemen danken.