
Aus dem ehem. Institut für Oralpathologie des
Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf
Komm. Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. T. Lönning

**Präsenz von humanen Papillomaviren (HPV) in
oralen Schleimhautläsionen**

Promotion

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt
von

Alexander Ruthke

aus Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 07.04.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Herr Prof. Dr. med. T. Löning

Prüfungsausschuss: 2. Gutachtin Frau PD Dr. rer. nat. K. Milde-Langosch

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter Herr PD Dr. med. Dr. med. dent. M. Pohlenz

Widmung

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1.	Humane Papillomaviren.....	6
1.2.	Leukoplakien.....	9
1.3.	Lichen planus.....	13
1.4.	Transformation von HPV infizierten Zellen.....	15
1.5.	HPV in Schleimhautläsionen der Cervix uteri.....	17
1.6.	HPV in oralen Plattenepithelkarzinomen.....	19
1.7.	HPV in oralen Schleimhautläsionen.....	22
1.7.1.	HPV in oralen Leukoplakien.....	23
1.7.2.	HPV in oralem Lichen planus.....	24
1.8.	Ziele der Arbeit.....	26

2. Material und Methoden

2.1.	Versuchsmaterial.....	28
2.1.1.	Normalschleimhautproben.....	31
2.2.	Laborgeräte.....	31
2.3.	Feinchemikalien.....	32
2.4.	Enzyme.....	33
2.5.	Oligonukleotide.....	33
2.6.	Methoden.....	34
2.6.1.	Allgemeine Methoden.....	34
2.6.2.	Vorbehandlung.....	35
2.6.2.1.	Proteinase-K-Vorbehandlung.....	35
2.6.2.2.	Chelex-Vorbehandlung.....	36
2.7.	Polymerase-Kettenreaktion.....	36
2.7.1.	Ansatz der PCR für β -Globin.....	38

2.7.2.	Ansatz der PCR für HPV.....	39
2.7.3.	Temperaturprogramm für die PCR.....	40
2.7.4.	Reamplifikation von HPV-PCR Produkten.....	40
2.7.5.	Ansatz der PCR für Reamplifikation.....	41
2.7.6.	Horizontale Agarosegelelektrophorese.....	42
2.7.6.1	Herstellung des Agarosegels.....	43
2.7.6.2.	Vorbereiten der Proben.....	44
2.7.6.3.	Durchführung der Agarosegelelektrophorese.....	44
2.7.6.4.	Färbung der Agarosegelelektrophorese.....	45
2.7.6.5.	Blot-Transfer der Amplifikate.....	45
2.8.	Hybridisierung.....	46
2.8.1.	Markieren der Sonde mit Digoxigenin.....	46
2.8.2.	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	47
2.9.	Detektion.....	48
2.10.	Negativkontrolle.....	50

3. Ergebnisse

3.1.	Leukoplakien: HPV - Detektion durch PCR mit General Primer und Hybridisierung.....	54
3.1.1.	Leukoplakien: HPV-Typisierung durch PCR mit General-Primer und spezifische Hybridisierung.....	56
3.1.2.	Mehrfachinfektionen in Leukoplakien.....	59
3.1.3	Leukoplakien: HPV - Infektion in Beziehung zum Lebensalter.....	60
3.1.4.	HPV - Typen in histologisch unterschiedlichen Leukoplakien.....	64
3.2.	Lichen planus / erosivum: HPV - Nachweis und Typisierung.....	65
3.2.1.	Lichen planus / erosivum: HPV - Nachweis durch General PCR / Reamplifikation und Hybridisierung.....	65

3.2.2.	Lichen planus / erosivum: HPV Typisierung durch General - PCR / Reamplifikation und Hybridisierung mit typspezifischen Oligonukleotidsonden.....	67
3.2.3.	Mehrfachinfektionen in Lichen planus / Lichen erosivum.....	69
3.2.4.	Lichen planus / erosivum: HPV - Infektionen in Abhängigkeit zum Patientenalter.....	69
3.3.	Entzündungen: HPV - Detektion und -Typisierung.....	71
3.3.1.	Entzündungen: HPV - Detektion durch PCR mit General-Primer-PCR / Reamplifikation und Hybridisierung.....	71
3.3.2.	Entzündungen: HPV - Typisierung durch PCR mit General Primer / Reamplifikation und typspezifische Hybridisierung.....	73
3.3.3.	Mehrfachinfektionen in Entzündungen der Mundschleimhaut.....	74
3.4.	Kontrollmaterial: HPV -Detektion.....	75
3.4.1.	Kontrollmaterial: HPV - Detektion durch General Primer - PCR / Reamplifikation und Hybridisierung.....	75

4. Diskussion

4.1.	HPV-Nachweis in oralen Schleimhautabstrichen.....	76
4.2.	HPV- Nachweis und -Typisierung in oralen Leukoplakien.....	81
4.2.1	HPV- Nachweis in Leukoplakien verschiedener Altersstufen.....	83
4.2.2.	HPV-Nachweis in histologisch unterschiedlichen Leukoplakien.....	84
4.3.	HPV-Nachweis in Lichen planus/erosivum.....	87
4.4.	HPV-Nachweis in gesunder Kontrollgruppe.....	88

5.	<u>Zusammenfassung</u>	89
6.	<u>Bibliographie</u>	91

1. Einleitung

1.1.	Humane Papillomaviren.....	6
1.2.	Leukoplakien.....	9
1.3.	Lichen planus.....	13
1.4.	Transformation von HPV infizierten Zellen.....	15
1.5.	HPV in Schleimhautläsionen der Zervix uteri.....	17
1.6.	HPV in oralen Plattenepithelkarzinomen.....	19
1.7.	HPV in oralen Schleimhautläsionen.....	22
1.7.1.	HPV in oralen Leukoplakien.....	23
1.7.2.	HPV in oralem Lichen planus.....	24
1.8.	Ziele der Arbeit.....	26

1. Einleitung

1.1. Humane Papillomaviren (HPV)

Papillomaviren sind DNA-Viren aus der Familie der Papova Viridea. Innerhalb dieser Familie werden humane Papillomaviren (HPV) von tierischen Papillomaviren (z.B. bovine Papillomaviren - BPV) unterschieden, die sich phylogenetisch aus einer gemeinsamen Wurzel ableiten. Nicht allein die unterschiedliche Wirtsspezifität der Papillomaviren läßt die Heterogenität dieser Virusfamilie deutlich werden. Die gegenwärtig bekannten, mehr als 100 verschiedenen Genotypen variieren in Bezug auf ihren Tropismus für Plattenepithelien, ihrer Assoziation zu klinisch unterschiedlichen Krankheitsbildern und dem ihnen eigenen onkogenen Potential (De Villiers 1989, El-Mofty, 2007, zur Hausen 2000 und 2002). Mehr als 30 HPV Typen werden sexuell übertragen und infizieren die menschliche Schleimhaut.

Trotz der genannten Heterogenität von HPV besteht kein Zweifel an einem gemeinsamen phylogenetischen Ursprung und einer engen Verwandtschaft. Dies verdeutlichen sehr ähnliche Nukleotidsequenzen in hochkonservierten Genomregionen und charakteristische, nur innerhalb des Entwicklungszweiges von HPV ausgeprägte Transkriptions - und Promotorelemente (Bernard et al. 1994, Chan et al. 1992, Chong et al. 1991, Tan et al. 1992, Van Ranst et al. 1992).

Die Heterogenität der humanen Papillomaviren kommt auch durch unterschiedliche Ansätze der Klassifikation zum Ausdruck. Eine historische Einteilung nach der Organlokalisation unterschied z.B. zwischen cutanen, genitalen oder oralen Typen.

Die Klassifikation nach der Morphologie der infizierten Zelle (Jablonska 1985) differenziert aufgrund Papillomavirus - spezifischer morphologischer Veränderungen (Jablonska 1985). Verschiedene Virustypen bieten sehr vielgestaltige, gut abgrenzbare klinische Bilder, die eine jeweilige Gruppenzuordnung erlauben. HPV -1, HPV -3 und HPV -7 verursachen beispielsweise unterschiedliche Arten von cutanen Warzen, während Condylomata acuminata vorwiegend durch HPV - 6, -11, -42, -43, -44 u.a. bedingt sind. Die orale fokale Hyperplasie (Morbus Heck) wird mit HPV-13 und HPV -32 in Zusammenhang gebracht. Auch auf zellulärer Ebene gibt es Typ - spezifische Ausprägungen, die sich in Form unterschiedlicher Arten von Einschlußkörpern (ICB) manifestieren (Egawa et al. 1994, Egawa et al. 1993).

Auch die Pathogenität der Papillomaviren kann als Klassifikationskriterium dienen. Die Viren werden aufgrund ihrer Prävalenz in Läsionen der Zervix uteri mit unterschiedlicher Dignität nach dem viruseigenen pathogenen Potential differenziert. Die "low - risk" HPV- Typen finden sich bevorzugt in gutartigen Epithelveränderungen wie Condylomata accuminata. (De Villiers 1989, Hellberg et al. 1993, Lörincz et al. 1992). In invasiven Karzinomen sind vorwiegend "high - risk"- HPV-Typen detektierbar, dabei handelt es sich fast ausschließlich um HPV-16 und HPV-18 (De Villier 1989, Fisher 1994, Hellberg 1993, Schiffman et al. 1993).

<u>low - risk - Typen</u>	HPV 6,11,42,43,44
<u>intermediate - risk - Typen</u>	HPV 31,33,35,51,52,58
<u>high-risk-Typen</u>	HPV 16,18

Kursiv stehende Ziffern bezeichnen seltene HPV Typen, nicht aufgeführt sind HPV mit unbekanntem assoziierten Risiko.

Die Vervollkommnung molekularbiologischer Techniken, wie z.B. der DNA - Sequenzierung, ermöglicht den Vergleich der Homologie von Papillomavirus - Genomen. Die heute gebräuchliche HPV-Klassifikation orientiert sich am Grad der genomischen Verwandtschaft definierter Genorte. Dazu erfolgt ein Vergleich der Basensequenz innerhalb der E6-, E7- und L1- Region des Virusgenoms. Bei einer Homologie der Basenpaare von weniger als 90% zur Sequenz eines anderen HPV-Genotyps liegt definitionsgemäß ein spezifischer neuer HPV-Typ vor. Eine Übereinstimmung der Basensequenz von über 90 % spricht für das Vorliegen eines Subtyps (Baker 1987, De Villiers 1994, Dürst 1989, Egawa 1994, Lörincz et al. 1992).

1.2. Leukoplakien

Die Leukoplakie bezeichnet nach der Definition der WHO von 1978 "eine weiße, nicht wegwischbare Veränderung der Schleimhaut, die keiner anderen definierten Krankheit zuzuordnen ist" (WHO 1978). Die Definition umfaßt nicht nur die orale Schleimhaut, sondern Leukoplakien können danach ubiquitär auftreten. Die folgenden Angaben beziehen sich ausschließlich auf Leukoplakien der Mundschleimhaut. Orale Leukoplakien sind keine seltene Erkrankung, ihre Prävalenz liegt in Europa zwischen 0.57 % und 3,6 % (Axell 1976, Banoscy und Sugar 1972).

Die größte Häufigkeit erreichen Leukoplakien in der 5., 6. und 7. Lebensdekade, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen (Bouqout und Gorlin 1986, Wilsch et al. 1978).

Typische Lokalisationen von Leukoplakien sind die mandibuläre und buccale Schleimhaut. Über 50% der Leukoplakien sind dort zu finden (Waldron und Shafer 1975). Das klinische Bild einer Leukoplakie kann große Variabilität aufweisen: Unterschiedliche Ausdehnung, Oberflächenrelief, Farbe, Lokalisation und Konsistenz erschweren die Diagnostik. Eine klinische Klassifikation nach den genannten Kriterien bietet die Einteilung nach Sugar und Banoczy. Danach lassen sich eine Leukoplakia simplex von einer Leukoplakia verrucosa und einer Leukoplakia erosiva differenzieren (Sugar und Banoczy 1959).

Eine gegenüber dem klinischen Befund sehr viel verlässlichere Bestimmung bietet das histologische "Grading".

Üblicherweise werden die Leukoplakien aufgrund des vorliegenden Dysplasiegrades eingeteilt in:

- Leukoplakien mit geringer oder ohne Dysplasie
- Leukoplakien mit mittelgradiger Dysplasie
- Leukoplakien mit hochgradiger Dysplasie

Kriterien, nach denen die Bestimmung des Dysplasiegrades vorgenommen werden, sind das vermehrte Vorliegen von mitotischen Kernteilungen, Kernatypien wie z.B. Megakaryosis und Poikilokaryosis, eine erhöhte Kern - Plasma-Relation, der Verlust der Zellpolarität und Hyperchromatismus, atypische Zellkeratinisierung und basalzellige Hyperplasie (Warnakulasuriya et al. 2001). Molekularbiologische Methoden nutzen den Nachweis spezifischer Proteine oder Antigene zur Differenzierung des Dysplasiegrades (Kövesi et al. 2004, Seoane et al. 2006).

Zwischen dem klinischen Erscheinungsbild und dem histologischen Grading muß kein Zusammenhang bestehen: Einige der klinisch besonders suspekt erscheinenden Leukoplakien stellen sich in der histologischen Begutachtung nur als ausgeprägte Keratose ohne Dysplasie dar. Im umgekehrten Fall werden sehr kleine, klinisch einfache Leukoplakien gefunden, die morphologisch als invasives Karzinom erscheinen: Etwa 6% der vermeintlichen klinischen Leukoplakien stellen sich als Karzinome heraus oder entarten im weiteren Verlauf (Bouquot und Gorlin 1986, Waldron and Shafer 1975). Zweifelsfrei entwickelt sich nicht aus jeder Leukoplakie ein Karzinom, aber die unterschiedlichen Formen von Leukoplakien weisen verschiedene Entartungsrisiken auf (Bagan et al. 2003, Gundlach 1992, Tischendorf et al. 1990).

<u>Leukoplakieform</u>	<u>Entartungsrisiko</u>
Leukoplakia simplex	3%
Leukoplakia verrucosa	11%
Leukoplakia erosiva	38%
Leukoplakie mit geringgradiger Dysplasie	3 %
Leukoplakie mit mittelgradiger Dysplasie	4 %
Leukoplakie mit hochgradiger Dysplasie	43 %

Die proliferative verrucöse Leukoplakie ist durch Epithelabnormitäten charakterisiert, die im Verlauf progredient zu verschiedenen Formen oraler Karzinome führen können (Bagan et al. 2003). Frauen sind häufiger betroffen als Männer, möglicherweise aufgrund hormoneller Unterschiede (Murrah et al. 2003).

Leukoplakien mit hochgradiger Dysplasie und auch Plattenepithelkarzinome finden sich bevorzugt im Bereich des Mundbodens und der Zunge (Bagan et al. 2003, El Mofty et al. 2007, Zhang et al. 2006, Zhang et al. 2007).

Die Ätiologie der Leukoplakien ist nach Auffassung der meisten Untersucher multifaktorieller Natur, wobei extrinsische ätiologische

Faktoren von intrinsischen Faktoren unterschieden werden können (Hornstein 1977):

Extrinsische Faktoren	Intrinsische Faktoren
<u>Tabakkonsum</u> (geraucht, gekaut oder geschnupft)	<u>chronische Irritation der Mundschleimhaut</u>
<u>Alkoholismus, chronischer Leberschaden</u>	
<u>Kauen von Betelnüssen</u>	
<u>Heiße, stark gewürzte Speisen</u>	<u>Sexualhormone</u>
<u>Mangelernährung</u> (Eisen- und Proteinmangel sowie Mangel an Vitamin A und B).	<u>Candidiasis</u>
<u>chronisch unzureichende Mundhygiene</u>	<u>HPV - Infektion</u>

Jede klinisch diagnostizierte Leukoplakie sollte aufgrund des äußerlich nicht sichtbaren und prognostisch entscheidenden Dysplasiegrades biopsiert und histologisch untersucht werden.

Die Behandlung sollte am Dysplasiegrad orientiert sein, sie umfasst sinnvollerweise vor allem die Ausschaltung prädisponierender Faktoren. Dabei scheint die Ausschaltung lokaler Irritationen vordringlicher als die systemische Therapie. Der Einschränkung bzw. Aufgabe des Rauchens scheint besondere Bedeutung zuzukommen (Banoczy und Sugar 1977).

Leukoplakien ohne oder mit geringer Dysplasie sollten einer regelmäßigen Kontrolle unterzogen werden. Eine chirurgische Exzision ist bei mittel- und hochgradigen Dysplasien indiziert, während die früher praktizierte lokale Chemotherapie oder Röntgenbestrahlung heute obsolet ist.

1.3. Lichen planus

Der Lichen planus ist eine häufige dermatologische Erkrankung, die sich auch in der Mundhöhle manifestiert und einen oftmals chronischen, fluktuierenden Verlauf zeigt.

Die Ätiologie ist unklar, psychische Belastung, Mangelernährung, erbliche und infektiöse Faktoren bei mangelnder Zahnhygiene werden diskutiert (Oral Pathology 1984, Agarwal et al. 2002).

Der Lichen planus ist eine Erkrankung des Erwachsenenalters, das Durchschnittsalter der Patienten beträgt etwa 53-55 Jahre (Thorn et al. 1988, Mignogna et al. 2001).

Es wird eine kutane von einer oralen Form unterschieden:

Hautmanifestationen von Lichen planus betreffen beide Geschlechter in etwa mit gleicher Häufigkeit, im Gegensatz dazu ist die orale Ausprägung mit einer Prävalenzrate von 1.2/1000 bei Frauen in etwa doppelt so oft zu finden als bei Männern (Bouqout und Gorlin 1986, Holmstrup et al. 1988, Thorn et al. 1988).

Die buccale Schleimhaut ist mit 80 % der Fälle am häufigsten befallen, gefolgt von der Zunge mit 65 %. Lippen, Gingiva und Mundboden sind in weniger als 10 % beteiligt (Bouqout und Gorlin 1986, Agarwal 2002).

Meistens kommt es nach mehreren Jahren zu einer Spontanheilung.

Seit Anfang der siebziger Jahre berichten verschiedene Autoren über die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen aus Lichen planus: Danach beträgt die Rate einer malignen Entartung von Lichen planus zwischen 0.4 % und 12.3 % (Cardozo et al. 2004, Eisen 2002, Lanfranchi-Tizeira et al. 2002, Holmstrup et al. 1988, Kaplan und Barnes 1985, Kaugars und Svirsky 1982, Kövesi und Banoczy 1973, Marder und Deesen 1982, Mignogna et al. 2001, Mignogna et al. 2002, Murti et al. 1986, Silverman et al. 1974 und 1985, Reinhardt 2003, van der Meijn et al. 2003). Es wird kontrovers diskutiert, ob hier von einer direkten malignen Transformation ausgegangen werden kann. Für den Hautbefall ist diese Möglichkeit bereits länger akzeptiert (Kaugars et al. 1982).

Das Vorhandensein von Epitheldysplasien in Lichen planus korreliert mit einem erhöhten Karzinomrisiko (Epstein et al. 2003). Als ein prädisponierender Faktor für die maligne Entartung wird eine Besiedelung der Schleimhautläsionen mit *Candida albicans* angesehen (Holmstrup und Dabelsteen 1974, Krogh et al. 1987, Simon und Hornstein 1980).

Die Ergebnisse von Studien der Prävalenz maligner Transformationen aus Lichen planus differieren im wesentlichen durch die unterschiedliche Länge des Beobachtungszeitraumes: Mit zunehmender Dauer der Untersuchungszeit nimmt auch die Zahl der Krebsfälle zu. Frauen scheinen stärker gefährdet als Männer, bei einem Geschlechtsverhältniss von 409 Frauen zu 202 Männern mit Lichen planus waren 8/9 (89 %) Patienten mit Karzinomentwicklung weiblich (Holmstrup et al. 1988). Einheitliche Empfehlungen für eine Überwachung von Patienten mit Lichen planus hinsichtlich einer malignen Entartung gibt es noch nicht (Cowan et al. 2001, Mattson et al. 2002).

Es gibt Hinweise, die ein vermehrtes Auftreten von Zweitkarzinomen und Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit karzinomatös entartetem Lichen planus vermuten lassen (Mignona et al. 2002). Aus diesem Grund wird für solche Patienten ein erhöhter Überwachungsbedarf gesehen (Mignona et al. 2002).

Die Behandlung von Lichen planus sollte sich aus dem Vorhandensein von Epitheldysplasien und damit dem vermutlichen malignen Potential ableiten: Lichen planus ohne Dysplasien kann topisch mit immunmodulierenden Medikamenten wie Corticoiden behandelt werden. Lichen planus mit nachgewiesenen Epitheldysplasien sollte regelmäßig bioptisch kontrolliert werden, bei starkem Dysplasiegrad sollte eine Resektion erfolgen. Generell sollten schleimhautirritierende Faktoren wie Alkohol, Nikotin oder starke thermische Reize vermieden werden (Epstein et al. 2003).

1.4. Transformation von HPV-infizierten Zellen

Die Rolle von Viren als Kofaktoren für die Karzinogenese wird für verschiedene Malignome postuliert, so wurde bereits 1964 eine virale Onkogenese für das Burkitt-Lymphom durch Epstein Barr Viren postuliert. Dem Hepatitis B- und C- Virus wird eine Beziehung zum hepatozellulären Karzinom zugeschrieben. Ebenfalls besteht eine Assoziation des humanen T -Zell-Leukämie-Virus zur T-Zell-Leukämie. Für HPV gilt eine Beteiligung an der Karzinogenese von Zervixkarzinomen heute als unbestritten (Bekkers et al. 2004, Gasco et al. 2003, Wani et al. 2003, zur Hausen 1991, 2000, 2002).

Der molekularbiologische Mechanismus der HPV-Gen-Expression und der HPV-getriggerten Entwicklung von Zervixkarzinomen ist Gegenstand zahlreicher Studien.

(Blons et al. 2003, Braakhuis et al. 2004, Dai et al. 2004, Duensing et al. 2003, Fiedler 2004, Gasco et al. 2003, Jeon et al. 2002, Kanao et al. 2004, Motoyama et al. 2004, Pett et al. 2004, Ragin 2004, Scheffner et al. 1994, Taylor et al. 2003, Tommasino et al. 2003, Wentzensen et al. 2004).

Die als Onkogene bezeichneten Abschnitte des Virusgenoms, wie die E6- und E7-Region, kodieren die Synthese von entsprechenden Onkoproteinen. Deren Interaktion mit Zell-regulatorisch wirkenden Proteinen wie dem p53 und pRb inaktiviert die protektiv wirkenden Tumorsuppressorproteine der Wirtszelle. Die durch E6 vermittelte p53-Inaktivierung ist ein Hauptmechanismus der HPV-getriggerten Karzinogenese.

Das Onkoprotein E7 wirkt hemmend auf das pRb Tumorsupressorprotein. Beide Mechanismen sind durch Zytokine miteinander gekoppelt und wirken synergistisch auf die Proliferation von Tumorzellen. Die Transkription der Onkogene E6 und E7 wird unter anderem negativ durch das E2 -Protein reguliert. Eine Modulation des E2-Gens erfolgt durch die Integration von viraler DNA. Daraus kann eine Inaktivierung des E2-Proteins resultieren. Dies führt zu einer vermehrten Expression von entsprechenden E6-und E7-Onkoproteinen. Die Menge an E6- und E7-Onkoproteinen in einer Zelle steht im Zusammenhang mit einer erhöhten chromosomalen Instabilität und Veränderungen der Centromere. Eine Störung der Genexpression und der genetischen Stabilität kann zu einer unkontrollierten Zellproliferation und damit zur Entstehung eines Malignoms führen. (Blons et al. 2003, Braakhuis et al. 2004, Dai et al. 2004, de Oliveira 2006, Duensing et al. 2003, Fiedler 2004, Gasco et al. 2003, Jeon et al. 2002, Kanao et al. 2004, Motoyama et al. 2004, Pett et al. 2004, Ragin 2004, Scheffner et al. 1994, Taylor et al. 2003, Tommasino et al. 2003, Wentzensen et al. 2004).

1.5. HPV in zervikalen Schleimhautläsionen

Humane Papillomaviren können in fast allen Dysplasien und Karzinomen der Zervix uteri nachgewiesen werden, so daß HPV heute als wichtigster Risikofaktor der zervikalen Karzinogenese gilt (Bekkers et al. 2004, Beral et al. 1994, Bosch et al. 1992, De Villiers 2003, Duggan et al. 1995, Fisher 1994, Franco et al. 2003, Gasco et al. 2003, Kleter et al. 1998, Koutsky et al. 1988, Muñoz et al. 1992, Schiffmann 1993, Schellekens et al. 2004, Trottier et al. 2006, Ishi et al. 1995, Walboomers et al. 1999, Wolf et al. 2003, Zielinski et al. 2003, zur Hausen 2000, 2002).

Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Dysplasiegrad der zervikalen Schleimhaut und dem Vorliegen von HPV: Mit zunehmender Zellatypie, eingeteilt nach zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN I – III), steigt die Nachweisrate von HPV an. Im normalen Epithel liegt die Prävalenz von HPV zwischen 10 - 40 % (Lörincz et al. 1992, Milde-Langosch et Löning 1994, Von Knebel-Doeberitz et zur Hausen 1990).

Bei milden Formen der Dysplasie, den CIN I Läsionen, kann HPV zwischen 70 - 90 % nachgewiesen werden. Die Prävalenz von HPV in schweren Epithelatyphen, wie sie CIN III Läsionen repräsentieren, liegt demgegenüber zwischen 90 - 100 % (Bergeron et al. 1992, Fisher 1994, Hellberg et al. 1993, Koutsky et al. 1988, Kühler-Obbarius et al. 1994 a/b, Lörincz et al. 1992, Negrini et al. 1990, Schiffman et al. 1990, Schellekens et al. 2004, Vandenvelde et van Beers 1994).

Zervixkarzinome sind in etwa 95-100 % der Fälle mit HPV infiziert (Dürst 1989, Kiviat et Koutsky 1993, Milde -Langosch et al. 1993,

Muñoz et Bosch 1992, Schneider 1994, Reeves et al. 1989, Vandenvelde et van Beers 1994). HPV - 16 weist mit bis zu 80 % die größte Verbreitung in malignen Läsionen der Zervix auf. Mit HPV - 18 sind zwischen 3 - 30 % der Karzinome vergesellschaftet (De Villiers 1989, Fuchs et al. 1988, Kadish et al. 1992, Koutsky et al. 1988, Lörincz et al. 1992, Milde - Langosch et Löning 1994, Milde - Langosch et al. 1995).

Obwohl Infektionen mit humanen Papillomaviren als wichtigster Risikofaktor für Zervixkarzinome erkannt sind, ist auch die genitale Kanzerogenese ein multifaktorielles Geschehen: Geographische und sozioökonomische Faktoren spielen ebenso eine Rolle wie eine sehr frühe erste Schwangerschaft, die Einnahme oraler Kontrazeptiva, endogene hormonelle Einflüsse, Rauchen und die Infektion mit Herpes simplex-Viren sowie mit *Candida albicans*. Ein Mangel an Vitamin C, Vitamin B12, Carotinoiden und Folsäure wird als ätiologischer Faktor der Kanzerogenese ebenso diskutiert wie Störungen des Immunsystems (Bauer et al. 1993, Bosch et al. 1992, Butterworth et al. 1992, Franco et al. 2003, Hernandez et al. 2003, Herrero et al. 1989, Kjaer et al. 1988, Koutsky et al. 1992, Negrini et al. 1990, Potischman et al. 1991, Schiffman et al. 1993, Vermund et al. 1991).

Seit dem Jahre 2006 ist eine HPV-Impfung zur Prävention des Zervixkarzinoms möglich. Nicht infektiöse, virusähnliche Partikel immunisieren gegen die HPV-Typen -6,-11, -16 und -18. Studien zeigen eine Effektivität von 100% bei der Prävention von Präkanzerosen der Zervix und nahezu 100% Effektivität bei der Prävention von Präkanzerosen der Vulva und Vagina (Harper et al. 2004, Schiffman et al. 2005, Steinbrook et al. 2006).

1.6. HPV in oralen Karzinomen

Auf eine HPV- Infektion in oralen Malignomen wiesen erstmalig Syrjänen und Mitarbeiter hin (Syrjänen et al. 1983). Sie beschrieben zytopathische Veränderungen (Koilozytose) in Karzinomen der Mundschleimhaut. Diese spezifischen Zellveränderungen waren von HPV- assoziierten Läsionen der Zervix bekannt. Tatsächlich konnten zunächst mit immunhistochemischen Methoden HPV- Antigene in oralen Karzinomen nachgewiesen werden (Löning et al. 1985).

Die Tabelle 1.6.1 zeigt den HPV-Nachweis in oralen Karzinomen und Normalschleimhaut durch verschiedene Untersucher mit unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden:

Tabelle 1.6.1.

Detektion von HPV in oralen Karzinomen und Normalschleimhaut

Studie	HPV-pos. Karzinome	-Normal SH.	HPV-Typen	Methode
Braakhuis et al. 2004	24	143	16	PCR
Chang et al. 2003	51/110	6/30	11,16,18	PCR
Gillison et al. 2000	62/253	-	16,18	PCR,SB,ISH
Gonzales et al. 1994	10 / 27	-	6/11	ISH

Studie	HPV-pos. Karzinome	-Normal SH.	HPV-Typen	Methode
Kansky et al. 2003	5/59	4/61	11,16,18,33,58,68	PCR
Ostwald et al. 2003	41/118	-	16/18	PCR, SB
Palefsky et al. 1995	8 / 24	-	16	PCR
Zhang-Z-Y et al. 2004	54/73	22/44	16/18	PCR

Ingesamt schwanken die Angaben über die Prävalenz von HPV in oralen Karzinomen in Abhängigkeit von der verwendeten Detektionsmethode, der Lokalisation und Einflußfaktoren wie Alter, Rasse und Geschlecht zwischen 2.5% und 76% (Barton et al. 1995, Chang et al. 2003 Gillison et al. 2000, Li et al. 2004, Mork et al. 2002, Riethdorf et al. 1997, Snijders et al. 1994, Palefsky et al. 1995, Yaltirik et al. 2001, Zhang et al. 2004).

Ähnlich wie auch bei der Zervixschleimhaut unterscheidet sich die HPV-Prävalenz in verschiedenen Graden von oralen Epitheldysplasien: Mit zunehmendem Dysplasiegrad einer Läsion steigt auch die HPV-Prävalenz (Miller et al. 2001).

Ethnische Unterschiede in Bezug auf molekulare Mechanismen der Virusgenom-Integration und der daraus resultierenden Modulation des Zellzyklus sind für Zervixkarzinome und auch für orale Karzinome bekannt (Li et al. 2004).

Auch die Lokalisation eines Karzinoms innerhalb der Mundhöhle scheint in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung zu sein: In 29% - 100% der Fälle läßt sich HPV in Karzinomen der Tonsillen und des Alveolarringes nachweisen, gefolgt von den Hypopharynxkarzinomen einschließlich der Zungenkarzinome mit 19% - 25% , von Karzinomen der Wangenschleimhaut mit 17% - 20% und von nasopharyngealen Karzinomen mit 8% (Brachmann et al. 1992; Brandsma and Abramson 1989; Correnti et al. 2004, El Mofty et al. 2003, Fischer et al. 2003, Hafkamp et al. 2004, Klussmann et al. 2003, Klussmann et al. 2004; Snijders et al. 1992 Syrjänen 2004).

Wie auch in den Zervixkarzinomen überwiegen die Viren der high-risk- Gruppe, HPV-16, -18, -30, -31, und -33 in maligne transformierter Mundschleimhaut. Die low-risk Typen, HPV -2, -6, -11, u.a., sind indessen vorzugsweise in benignen Läsionen und Präkanzerosen nachzuweisen (Giovanelli 2002, Snijders et al. 1994; Kinsky 2003, Ostwald 2003). HPV-16 gilt aber sowohl in benignen als auch in malignen Läsionen insgesamt als häufigster oraler HPV Typ (Chang et al. 1990; Ha et al. 2004, Kinsky 2003, Kumar et al. 2003, Mork et al. 2002, Palefsky et al. 1995, Perez- Ayala et al. 1990, Syrjänen 2004, Tang et al. 2003, Yeudall et al. 1991). Eine kausale Beziehung zwischen dem Vorliegen von humanen Papillomaviren zu oralen Karzinomen und Präkanzerosen scheint jedoch wesentlich seltener vorzuliegen als in Zervixkarzinomen und -Dysplasien (Cortezzi 2004, Ha et al. 2004, Kinsky 2003). Möglicherweise bilden die HPV- positiven oralen Karzinome eine besondere Entität: Patienten mit HPV- Infektion in oralen Karzinomen sind im Durchschnitt jünger (<40 Jahren) und haben eine bessere Überlebensrate als Patienten mit HPV- negativen oralen Karzinomen (El Mofty et al. 2003 und 2006, Shiboski 2005).

Zudem weisen diese Patienten häufig nicht die üblichen karzinogenen Risikofaktoren wie Rauchen und Alkoholabusus auf (Baez et al. 2003, Chang et al. 2003, Dahlstrom et al. 2003, El Mofty et al. 2003, Hafkamp et al. 2004, Kansky et al. 2003, Ringstrom et al. 2002, Ritchie et al. 2003, Schwartz et al. 2001, Syrjänen 2004, Zhang et al. 2004). Demgegenüber gibt es Hinweise auf eine Beziehung von HPV-Infektion und das Kauen von Betelnüssen, die das Zellgift Arecoline enthalten, zur oralen Karzinogenese (Chang et al. 2002, Chen et al. 2002, Nagpal et al. 2002, Yang et al. 2004). Eine mangelhafte Mundhygiene und niedriger sozialer Status scheinen ebenfalls mit einer erhöhten Kanzerogenität bei gleichzeitiger HPV-Infektion einherzugehen. (Premoli de Perocco et al. 2001). Durch Genomanalysen von oralen Tumoren gibt es Hinweise für eine Beteiligung von high-risk HPV-Typen an der Karzinogenese auch mancher oraler Karzinome. Hier scheint ein wesentlicher Unterschied zu den zervikalen Karzinomen zu bestehen: Die meisten oralen Karzinome scheinen nicht HPV assoziiert, sondern in Zusammenhang mit vielfältigen Noxen und Umweltfaktoren. Die HPV-positiven Karzinome bilden hingegen eine eigene Entität.

Der Nutzen einer HPV -Impfung in Bezug auf die orale Präkanzerosen ist noch nicht bekannt (Harper et al. 2004, Schiffman et al. 2005, Steinbrook et al. 2006).

1.7. HPV in oralen Schleimhautläsionen

Einen der ersten Hinweise auf eine Beteiligung von HPV an der Ätiologie oraler Schleimhautläsionen brachte die Beobachtung einer gehäuften Erkrankung an Larynxpapillomen von Kleinkindern, deren Mütter an Condylomata acuminata litten (Quick et al. 1978).

Verschiedene Autoren erhärteten diesen Verdacht durch den Nachweis von HPV - 6/11 „capsid“- Antigenen in Larynxpapillomen (Gissmann et al. 1983; Mounts et al. 1982; Steinberg et al. 1983).

1.7.1. HPV in oralen Leukoplakien

Mit steigendem Dysplasiegrad der oralen Leukoplakien scheint die Prävalenz von HPV zuzunehmen. (Miller 2001, Ostwald 2003). Vergleichbar ist dies mit der Situation bei "cervikaler intraepithelialer Neoplasie" (CIN). Aufgrund der weniger eindeutig definierten Dysplasiegrade in oralen Leukoplakien sind die Ergebnisse verschiedener Gruppen allerdings nur schwer miteinander zu vergleichen.

Tabelle 1.7.1

Detektion von HPV in einfachen Leukoplakien mit unterschiedlichem Dysplasiegrad und in oralen proliferativen verrucösen Leukoplakien (PVL).

Studie	HPV- pos. Leukopl. ohne Dysplasie	HPV- pos. Leukopl. mit Dysplasie	überwiegender HPV-Typ
Eberlein-Gonska et al. 1994	2/5 (40 %)	0/3	11
Gonzales et al. 1994	38 %	60 %	6/11
Löning et al. 1983	2/5 (40 %)	-	-
Maitland et al. 1987	80 %, unabhängig von Dysplasie		16
Palefsky et al. 1995	PVL = 89	PVL = 5/5 (100 %)	16
	nicht PVL = 50 %		16

Die Tabelle 1.7.1. belegt die hohe Variabilität in der Prävalenz von HPV in verschiedenen Leukoplakieformen.

Ein Zusammenhang der Entartungswahrscheinlichkeit einer Läsion mit einer HPV-Infektion ist nicht immer gegeben. Eine Erklärung für die differierenden Angaben zur Prävalenz bietet die unterschiedliche Sensitivität des HPV - Nachweises (Brennan et al. 2001). Geographische Unterschiede und Unterschiede in verschiedenen Typen von Läsionen sind ebenfalls belegt (Lazzari et al. 2004). Die Heterogenität der Einflußfaktoren zwischen verschiedenen Patientenkollektiven könnte ein weiterer Grund für die voneinander abweichenden Angaben sein: Das Sexualverhalten scheint nicht nur einen Einfluss auf die Prävalenz von HPV in genitalen Läsionen zu haben. Auch in oralen Läsionen, vorwiegend der Tonsillen, steigt die Anzahl von HPV-Infektionen mit dem Praktizieren von Oralsex und mit der Anzahl von vor allem homosexuellen Sexualpartnern (Kreimer et al. 2004).

Es gibt Hinweise darauf, dass Tabakkonsum einen Einfluß auf orale HPV Infektionen hat: In einer Studie an 100 Leukoplakien ohne Dysplasien waren nur 4 % der nicht mit Tabak in Zusammenhang stehenden Leukoplakien HPV positiv. Dagegen fand sich HPV-DNA in 10 % der mit Kau- oder Schnupftabak assoziierten Leukoplakien (Greer et al. 1990). Ein kausaler Zusammenhang zwischen HPV, Nikotinabusus und maligner Entartung ist allerdings nicht bewiesen (Kansky et al. 2003).

1.7.2. HPV in oralem Lichen planus

In oralen Formen von Lichen planus gelang ebenfalls der Nachweis viraler Infektionen. In einer Arbeit von Campisi zeigte sich in 14 von 77 Fällen (19%) ein Nachweis von HPV-DNA. Häufigster Virustyp war HPV - 18 in 10 von den 14 Fällen. Als Nachweismethode wurde die PCR mit nachfolgender DNA Sequenzierung genutzt (Campisi et al. 2004). In einer anderen Untersuchung von 2 Fällen lag in beiden Biopsien HPV-

DNA vor. Eine Probe enthielt HPV - 11, in der anderen war HPV - 16 nachzuweisen (Syrjänen et al. 1986).

Eine Studie, die 8 Biopsien von Lichen planus einbezog, ergab in 7/8 (87%) der Fälle eine Infektion mit HPV.

Vorherrschender Virustyp war HPV -16 bzw. ein genetisch sehr naher Verwandter von HPV-16. Die HPV -Typen 1, - 2, - 4, - 6, - 11, - 13 und -18 konnten dagegen nicht detektiert werden (Maitland et al. 1987). Eine etwas umfangreichere Studie umfasste 65 Biopsien von Lichen planus, die auf das Vorliegen einer HPV- Infektion untersucht wurden. Dabei wurde mit Hilfe von PCR und Southern blot in 15/65 (15,4%) Proben von Lichen planus HPV- DNA nachgewiesen (Ostwald et al. 2003). Zu einer zuverlässigen Einschätzung der Prävalenz von HPV in Lichen planus fehlen bisher Studien mit größeren Fallzahlen.

1.8. Ziele der Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ziele verfolgt:

1. Hauptziel war die Evaluation der Präsenz von HPV-DNA in entzündlichen sowie fakultativ prämaligen Läsionen der Mundschleimhaut.
2. Der Nachweis war auf die wichtigsten zu erwartenden HPV-Typen begrenzt (HPV-6 / HPV-11 / HPV-16 / HPV-18 / HPV-31).
3. Die HPV-DNA-Präsenz in den oralen Schleimhautläsionen wurde verglichen mit einer Referenzgruppe. Es wurden Schleimhautproben von Probanden mit klinisch gesunder Schleimhaut in gleicher Weise aufgearbeitet.
4. Zur Detektion von HPV-DNA sollten Methoden mit einem Höchstmaß an Sensitivität und Spezifität verwandt werden. Dazu erfolgte eine Optimierung des HPV-DNA Nachweises in Zellsuspensionen von Gewebe bzw. Läsionen mit bekanntermaßen geringer Viruslast.

2. Material und Methoden

2.1.	Versuchsmaterial.....	28
2.1.1.	Normalschleimhautabstriche.....	31
2.2.	Laborgeräte.....	31
2.3.	Feinchemikalien.....	32
2.4.	Enzyme.....	33
2.5.	Oligonukleotide.....	33
2.6.	Methoden.....	34
2.6.1.	Allgemeine Methoden.....	34
2.6.2.	Vorbehandlung.....	35
2.6.2.1.	Proteinase-K-Vorbehandlung.....	35
2.6.2.2.	Chelex-Vorbehandlung.....	36
2.7.	Polymerase-Kettenreaktion.....	36
2.7.1.	Ansatz der PCR für β -Globin.....	38
2.7.2.	Ansatz der PCR für HPV.....	39
2.7.3.	Temperaturprogramm für die PCR.....	40
2.7.4.	Reamplifikation von HPV-PCR Produkten.....	41
2.7.5.	Ansatz der PCR für Reamplifikation.....	41
2.7.6.	Horizontale Agarosegelelektrophorese von DNA.....	42
2.7.6.1.	Herstellung des Agarosegels.....	43
2.7.6.2.	Vorbereiten der Proben.....	44
2.7.6.3.	Durchführung der Agarosegelelektrophorese.....	44
2.7.6.4.	Färbung der Agarosegelelektrophorese.....	45
2.7.6.5.	Blot-Transfer der Amplifikate.....	45
2.8.	Hybridisierung.....	46
2.8.1.	Markieren der Sonde mit Digoxigenin.....	46
2.8.2.	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	47
2.9.	Detektion.....	48
2.10	Negativkontrollen.....	50

2.1. Versuchsmaterial

Das Untersuchungsmaterial der vorliegenden Arbeit bestand aus Abstrichen von Mundschleimhautzellen. Schleimhautproben von 40 Patienten mit Leukoplakien, Lichen planus und -erosivum sowie unspezifischen entzündlichen Erkrankungen fanden in der vorliegenden Arbeit Berücksichtigung. Als Kontrolle dienten 33 Schleimhautabstriche von gesunden Probanden. Dieses Kontrollkollektiv wies keine Risikofaktoren in Bezug auf Schleimhauterkrankungen auf. Die Proben wurden in der Zeit von September 1993 bis August 1995 in der Kieferchirurgischen Ambulanz des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Hamburg gesammelt.

Mit Hilfe eines sterilen Watteträgers konnten die Schleimhautzellen aus unterschiedlichen Regionen der Mundhöhle gewonnen werden.

Die auf diese Weise erhaltenen Zellabstriche wurden in Cryo - Tube Röhrchen überführt, die mit jeweils 10 ml isotoner NaCl - Lösung gefüllt waren. Die Proben wurden unmittelbar danach bei - 20 ° C kryokonserviert, die endgültige Lagerung erfolgte bei - 80 ° C.

Die 40 Patientenproben unterteilten sich in:

• 29 Leukoplakien

• 6 Lichen planus

• 1 Lichen erosivum

• 4 sonstige Entzündungen

Bei den Leukoplakien handelte es sich nach der klinischen Einteilung von Sugár und Bánóczy in 26/29 der Fälle um "einfache Leukoplakien" (Leucoplacia simplex). Als Leucoplacia verrucosa wurden 3/29 Fälle angesehen.

Die Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten ermittelte sich folgendermaßen: Das Durchschnittsalter der 3 Patienten mit histologisch verrucöser Leukoplakie betrug 57.0 Jahre. Davon waren 2 Patienten männlich und ein Patient weiblich.

Die 26 Patienten mit einfacher Leukoplakien waren durchschnittlich 59.4 Jahre alt. Aus dieser Gruppe wiesen die 19 weiblichen Patientinnen ein deutlich höheres mittleres Alter von 61 Jahren auf als die 7 männlichen Patienten mit durchschnittlich 55 Jahren.

Bei den 6 Fällen von Lichen planus beziehungsweise 1 Fall von Lichen erosivum hatten die 5 weiblichen und 2 männlichen Patienten ein Alter von im Mittel 60 Jahren.

Abb. 2.1.: Alters - und Geschlechtsverteilung von Patienten mit Leukoplakien, Lichen planus und erosivum sowie Entzündungen (sonstige)

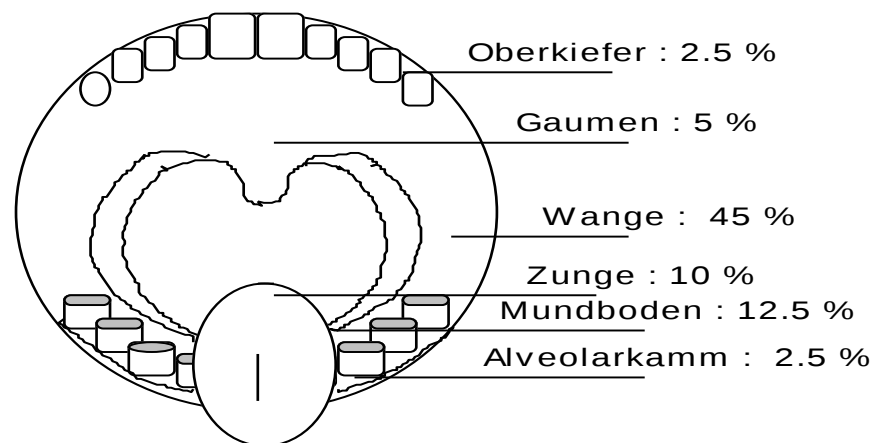
Abb.2.1.:

	einf. Leukoplakie	verruc. Leukoplakien	Lichen	sonstige Infekt.
weiblich	19	1	2	1
männlich	7	2	5	3
Durchschnittsalter	59.4	57.0	60.0	
alter w = 61 m = 55				
w = weiblich m = männlich				

Abbildung 2.1.1: Lokalisation der Gewebeproben in der Mundhöhle:

Abb 2.1.2.:

Lokalisation der Gewebeproben:



2.1. Normalschleimhautabstriche

Das Sammeln von Schleimhautabstrichen gesunder Probanden erfolgte in gleicher Weise und durch die gleiche Person wie unter 2.1 beschrieben.

Die 33 Probanden der Kontrollgruppe wiesen anamnestisch keine Risikofaktoren in Bezug auf Mundschleimhauterkrankungen auf (z.B. Rauchen, Alkoholabusus, Exposition von Holzstäuben). Bezüglich der Altersverteilung der Probanden war eine Unterteilung in zwei Altersgruppen möglich: Das mittlere Lebensalter der Gruppe " jüngerer Probanden " betrug 52 Jahre (33 - 59 Jahre). Die Gruppe " älterer Probanden " wies ein Durchschnittsalter von 68 Jahren auf (60 - 81 Jahre).

2.2. Laborgeräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Agarosegelelektrophorese - Apparaturen (DNA SUB CELL, WIDE MINI SUB CELL)	Biorad / München
Autoklav (Technoklav 50)	Technomara /Fernwald
Eppendorf Kohlenhubpipetten	Eppendorf/Hamburg
Eppendorf Safe Lock TM Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf/Hamburg
Kühlzentrifuge (Hermle / Centrikon H - 401)	Kontron /München
Mikropipetten	Eppendorf/Hamburg
Netzgerät (200 / 20)	Biorad/München
PCR - Cyclor	Biometra/Göttingen

- Photoapparat Polaroid/Offenbach
- Pipettenspitzen mit Filter Continental Laboratory
Products San Diego, CA , USA
- Pipettenspitzen ohne Filter Eppendorf/Hamburg
- Reaktionsgefäße mit Schraubverschluß, 2 ml Sarstedt/Nürnberg
- Thermostat (CH) Haake/Karlsruhe
- Tischzentrifuge Heraeus/Hanau
- UV - Transilluminator UVP/San Gabriel/USA
- Vortier (Reax 2000) Heidolph/Göttingen
- Schüttelwasserbad (1083) GFL/Burgwald

2.3. Feinchemikalien

- | <u>Substat</u> | <u>Hersteller</u> |
|-------------------------------|-----------------------|
| • Blocking Reagenz 10% | Boehringer / Mannheim |
| • Chelex Chelating Resin | Sigma / Deisenhofen |
| • DNA Molekulargewichtsmarker | Boehringer / Mannheim |
| - Marker V, - Marker VI | |
| • dNTP`s | Boehringer / Mannheim |
| • Ethidiumbromid | Sigma / Deisenhofen |
| • Mineralöl | Sigma / Deisenhofen |
| • NuSieve Agarose 3:1 | BIOzym / Oldendorf |

Alle weiteren Chemikalien wie Salze, Säuren, u.s.w. wurden von der Firma Merck / Darmstadt bezogen.

2.4. Enzyme

<u>Enzyme</u>	<u>Bezugsquelle</u>
• Taq-Polymerase	Boehringer/Mannheim
• PCR-Reaktionspuffer (10 x konzentriert)	Boehringer/Mannheim

2.5. Oligonukleotide

Bezugsquelle: Perkin Elmer/Weiterstadt

<u>Name</u>	<u>Sequenz der Primer</u>
β -Globin- Primer 1 (PC 04)	5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
β -Globin- Primer 2 (GH 20)	5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC
HPV - Primer 1(MY 09)	5' - CGT CC (A / C) A (A / G) (A / G) GGA (A / T) AC TGA TC
HPV - Primer 2 (MY 11)	5'- GC (A / C) CAG GG (A / T) CAT AA (C / T) AAT GG

2.6. Methoden

Nach einer Chelex Vorbehandlung wurden spezifische DNA-Abschnitte mit der PCR amplifiziert. Daran schloß sich eine Reamplifikation an. Die Auftrennung der Amplifikate bzw.- Reamplifikate erfolgte nach Größe und elektrischer Ladung durch die Gelelektrophorese. Alle PCR - Produkte wurden geblottet (Southern 1975) und der Hybridisierung mit spezifischen Oligonucleotidsonden zugeführt. Mit den Abstrichen der gesunden Kontrollgruppe wurde in gleicher Weise verfahren.

2.6.1. Allgemeine Methoden

Um eine Kontamination durch Fremd - DNA zu vermeiden, wurden die für das Arbeiten mit DNA benötigten Lösungen und Materialien sterilisiert. Bei direktem Umgang mit DNA fanden Latexhandschuhe Verwendung. Der Arbeitsbereich für die Vorbereitung der PCR und die Detektion der Amplifikate wurde regelmäßig mit flüssigen Desinfektionsmitteln gereinigt. (Kwok et Higuchi 1989), (Williams 1989), (Rolfs et al.1992).

Die Sterilisation der Labormaterialien erfolgte in feuchter Hitze bei 121°C und 1 bar in einem Autoklaven für 20 Minuten.

2.6.2. Vorbehandlung der Proben

Alle Proben wurden in Cryo - Tube Röhrchen mit einem Volumen von 3.6 ml 5 Minuten lang bei 2.000 U / m zentrifugiert.

2.6.2.1. Proteinase K - Vorbehandlung

Die Vorbehandlung der Proben diente der Aufspaltung und Denaturierung der Zellen, um die im Zellkern vorhandene DNA der weiteren Untersuchung zugänglich zu machen. Für jede Probe wurde ein Ansatz von 100 µl Denaturierungslösung zusammengestellt: Diese enthielt 200 µg / ml Proteinase K und 1 % Tween - 20 in Pufferlösung. Der Puffer setzte sich aus 50 mM Tris - HCl (pH 8.5) mit 1 mM EDTA zusammen.

Auf das Vorlegen von 100 µl Denaturierungslösung in sterile 1000 µl Eppendorf - Plastikreaktionsgefäße folgte die Zugabe von 100 µl Zellsuspension. Die Proteinase wurde durch anschließende Inkubation bei 55°C für 2 - 3 Stunden aktiviert.

Im letzten Schritt der Vorbehandlung erfolgte die Hitzeinaktivierung der Proteinase bei 95°C für genau 10 Min. (Bauer et al.,1992). Diese Art der Vorbehandlung erbrachte in der darauffolgenden Amplifikation von β - Globin nur sehr wenige positive Fälle. Daher wurde die Vorbehandlung mit Proteinase K nicht weiter angewandt, sondern der Chelex Vorbehandlung der Vorzug gegeben.

2.6.2.2. Chelex Vorbehandlung

Aus den Cryo-Tube Röhrchen wurden 1000 µl Zellsuspension in Eppendorfröhrchen überführt und 2 Minuten lang zentrifugiert. Es folgte das Waschen des Überstandes mit 100 µl TE 8 - Puffer.

TE 8 Puffer: 1 µM EDTA + 1 mM Tris - HCl, pH 8

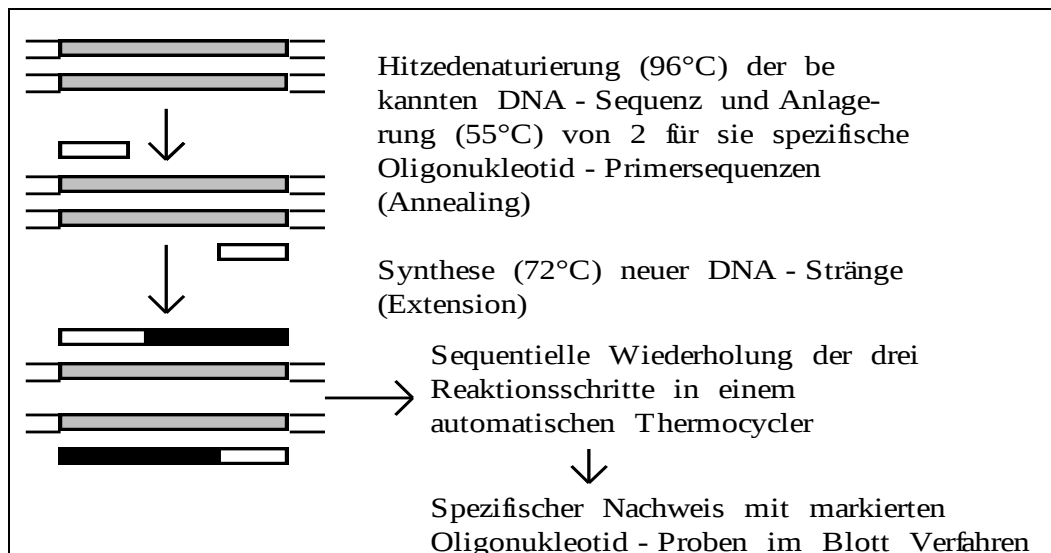
Nach zweiminütigem Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstandes wurden die Proben erneut in 100 µl TE 8 Puffer resuspendiert. Schließlich folgte die Zugabe von ca. 10 µg "Chelex Chelating Resin". Die so vorbereiteten Proben mußten 20 Minuten bei einer Temperatur von 100 ° C im Wasserbad (F3) Haake/Karlsruhe kochen. Dies führte zur Denaturierung der Zellkerne und machte die darin enthaltene DNA der weiteren Untersuchung zugänglich (Singer - Sam et al.1989), (Walsh et al. 1991). Erneutes zweiminütiges Zentrifugieren ermöglichte die Trennung der Chelexkugeln vom Überstand. Die vorbehandelten Proben wurden bei - 80 ° C eingefroren und gelagert.

2.7. Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Die PCR bietet eine Möglichkeit der gezielten Vervielfältigung eines bekannten DNA Abschnittes in vitro. In einem zyklischen Prozeß erhöht sich die Zahl der DNA - Sequenzstücke mit jedem Durchlauf exponentiell. Die zu untersuchende DNA wird durch Hitze denaturiert, d.h. in ihre Einzelstränge aufgespalten. Nach Abkühlung lagern sich synthetisch hergestellte Oligonukleotidprimer definierter Länge und Struktur an die komplementären DNA - Stränge (Annealing). Die dazu notwendigen Primer entsprechen in ihrer Basensequenz dem 5'- bzw. 3'- terminalen Ende dieser DNA - Stränge. Die Zugabe einer hitzestabilen DNA - Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq - Polymerase) ermöglicht die Synthese neuer DNA - Moleküle an der Matrize der beiden ursprünglichen DNA - Stränge

(Extension). Aus der Wiederholung dieser drei Schritte resultiert die Amplifikation der DNA. (Saiki et al. 1988, Saiki 1990, Sambrook et al. 1989, Shibata et al. 1988 a/b).

Abb. 2.7.: Prinzip der Polymerasekettenreaktion (Saiki et al. 1988)



Mit diesem Verfahren wurden aus der vorhandenen DNA ausgewählte Bereiche amplifiziert. Gearbeitet wurde mit zwei verschiedenen Primerpaaren: Zunächst wurde ein 268 bp langes Fragment des β -Globin-Gens mit dem Primerpaar β -1 und β -2 amplifiziert. Durch den Nachweis des β -Globin-Gens konnte die Integrität von DNA im Untersuchungsmaterial nachgewiesen werden. Die L1 Region des Virusgenoms repräsentiert das Zielgen des Primerpaars My09 und My11. Dieses Gen hat eine Länge von 450 bp. Das Amplifikat der Primer My09 und My11 entspricht einem hochkonservierten Bereich des HPV-L1-Gens. Die hochgradige Homologie der L1 Region zwischen einer Vielzahl von Virustypen ermöglicht die Detektion eines großen Spektrums verschiedener HPV (Bauer et al. 1992).

Ausgewählt wurden die Primersequenzen nach Friend et al. (1987).

2.7.1. Ansatz der PCR für β - Globin

Für jede Probe wurde ein " Master-Mix "-Ansatz vorbereitet und jeweils 40 μ l in Eppendorf Safe - Lock TM Reaktionsgefäße vorgelegt. Ein " Master-Mix "-Ansatz von 40 μ l enthielt:

10 x PCR - Reaktionspuffer + Mg ²⁺ (Boehringer) *

5 μ l dNTP Gemisch **

4 μ l Primer β_1 / Primer β_2

jeweils 0,25 μ l Taq - Polymerase (Boehringer) 1 unit

A. bidest. steril ad 40 μ l

* 10 x PCR - Reaktionspuffer: 10 mM Tris - HCL, pH 8.3

1.5 mM MgCl

50 mM KCl

** dNTP Gemisch: je 5 μ l ATP / TTP / CTP / GTP (10 μ mol /10 μ l

ad 40 μ l mit aqua dest.

In einem Eppendorf Safe - LockTM Reaktionsgefäß wurde jeweils ein Ansatz von 40 μ l mit 10 μ l der vorbehandelten Probe (siehe 2.7.2.2.) versetzt. Dazu fand eine spezielle, kontaminationsverhindernde

Pipettenspitze ("aerosol-resistant-tip") Verwendung. Der Ansatz einer DNA - freien Negativkontrolle erfolgte am Ende. Die Negativkontrolle enthielt anstelle der Probe 10 µl Aqua bidest. steril, um eine mögliche Verunreinigung mit Fremd - DNA im PCR - Ansatz auszuschließen.

Eine Positiv - Kontrolle entfiel bei der Amplifikation von β - Globin (Saiki et al 1985). Nach Überschichtung jedes Gemisches mit ca. 80 µl Mineralöl zum Schutz vor Verdunstung konnten die Reaktionsgefäße in den Thermocycler eingebracht und die PCR gestartet werden.

Alle Gewebeproben wurden auf diese Weise durch die Amplifikation der β - Globin Region auf die Integrität der DNA untersucht.

2.7.2. Ansatz der PCR für HPV

Für jede β - Globin positive Probe und für vier β -Globin negative Proben wurde ein Ansatz vorbereitet.

10 x PCR - Reaktionspuffer + Mg^{2+} (Boehringer)*

5 µl dNTP Gemisch **

4 µl Primer My 09/Primer My 11

jeweils 0,5 µl Taq - Polymerase 1 unit

A. bidest. steril ad 40 µl

* 10 x Puffer 1 s. unter 2.7.3.1.

** dNTP Gemisch s. unter 2.7.3.1.

Das Einsetzen und Mischen von "Master - Mix"-Ansatz (jeweils 40 µl) mit 10 µl Probe erfolgte mit einer "aerosol-resistant-tip" - Pipettenspitze. Eine Überschichtung mit ca. 80 µl Mineralöl verminderte die Verdunstung.

Als Kontrolle für die korrekte Amplifikation von HPV - DNA diente der Einsatz von HPV - typspezifischen Positivkontrollen. Zur Positivkontrolle eignen sich besonders Zelllinien, deren Stammzellen aus HPV enthaltenen Zervixkarzinomen stammen: CaSki Zellen enthalten als Plasmide 500 Kopien von HPV- DNA in jeder Zelle (Bauer et al. 1992).

Zusätzlich wurden bei jeder durchgeführten PCR zwei Negativkontrollen mitgeführt, um mögliche Kontaminationen mit Fremd - DNA im PCR-Ansatz zu detektieren. Eine Negativkontrolle bestand aus dem "Master - Mix" Ansatz der PCR + 10µl A. bidest. steril, die zweite mitgeführte Negativkontrolle enthielt den Ansatz der PCR+10µl aus der Negativkontrolle der Vorbehandlung.

2.7.3. Temperaturprogramm für die PCR

Zu Beginn der PCR wurden die Proben bei 94 °C für 5 Minuten denaturiert, um die DNA - Doppelstränge möglichst vollständig voneinander zu trennen. Darauf folgten die Zyklen mit dem Denaturierungsschritt, 30 Sekunden bei 94 °C. Es schloß sich der Anlagerungsschritt von 30 Sekunden Dauer an. Dabei entstand ein Hybrid jeweils zwischen einem Strang der Ziel - DNA und dem entsprechendem Primer. Dieser Schritt ist entscheidend, da hierbei die Amplifikation des richtigen Fragmentes festgelegt wird. Die Anlagerungstemperatur wird durch die Sequenz des jeweiligen Primers bestimmt. Als Richtwert gilt die sogenannte "Wallace" - Temperatur $[2\text{ °C} \times (A + T) + 4\text{ °C} \times (G + C)]$. Die optimale Anlagerungstemperatur liegt etwa bei $\pm 5\text{ °C}$ von diesem Richtwert.

Die Anlagerungstemperatur betrug sowohl für die β - Globin Primer $\beta 1$ / $\beta 2$ als auch für die HPV Primer My09 / My11 für HPV 55 °C. Als Ansatzpunkt für die Taq - Polymerase dient das DNA - Primer - Hybrid. Da das Temperaturoptimum der Taq - Polymerase bei 72 °C liegt, mußte die Extension für 60 Sekunden bei dieser Temperatur ablaufen. Währenddessen erfolgt der Anbau von Desoxynukleosid 5' -Triphosphaten (dNTP's). Die Dauer der einzelnen Zyklen ist abhängig von der Fragmentlänge und -qualität. Die Anzahl der Zyklen kann ebenfalls variiert werden. Im vorliegenden Fall wurden 35 Zyklen durchlaufen. Die Reaktionsfolge wird mit jedem Zyklus wiederholt, dabei kommt es in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen Amplifikation des von Primern flankierten DNA - Fragmentes. Die Abschlußextension fand nach Durchlauf der 35 Zyklen bei 72 °C für 7 Minuten statt. Mit diesem Schritt sollen unvollständig amplifizierte Fragmente vervollständigt werden. Die PCR -Produkte wurden für kurze Zeit bei 4 °C gelagert, für einen längeren Zeitraum bei -80 °C tiefgefroren.

2.7.4. Reamplifikation von HPV - PCR Produkten

Um die Sensitivität der Untersuchungsmethoden zu erhöhen, wurden alle PCR - Produkte, die amplifizierte HPV - DNA enthielten, einer Reamplifikation, d.h. einer erneuten PCR zugeführt.

2.7.5. Ansatz der PCR für Reamplifikation

Für die Reamplifikation der Amplifikate wurde jeweils ein Ansatz vorbereitet, wie unter 2.7.2. beschrieben. Der Ablauf der PCR erfolgte in gleicher Weise wie unter 2.7.3. aufgeführt. In der Reamplifikation dienten zwei Negativkontrollen dem Ausschluß von Verunreinigungen. Die erste Negativkontrolle enthielt 40 μ l PCR - Ansatz + 10 μ l Negativkontrolle der vorausgegangenen PCR. Die

zweite Negativkontrolle beinhaltete 40 µl des „Master-Mix“-Ansatzes + 10 µl A. bidest. steril. Die Positivkontrollen entsprachen den in der einfachen PCR verwendeten, beschrieben unter Punkt 2.7.2. Es wurde in gleicher Weise vorgegangen wie bei der vorangegangenen PCR..

Abb. 2.7.5. Primersequenzen und Primermengen

PRIMER	ZIELGEN	SEQUENZ DER PRIMER	MICROLITER PRIMER
β₁ 04	β - GLOBIN	5` - CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	0.25
β₂ G H 20	β - GLOBIN	5` - GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	0.25
MY 09 (HPV - GEN.)	HPV - L 1	5` - CGT CC(A/C) A(A/G) (A/G) GGA (A/T)AC TGA	0.5
MY 11 (HPV - GEN.)	HPV - L	5` - GC(A/C) CA GG (A/T) AA(C/T) AAT GG	0.5

2.7.6. Horizontale Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung der Proben in einem Agarosegel diente der Qualitätskontrolle der PCR - Produkte. Mit der Elektrophorese können unspezifische PCR - Fragmente detektiert werden. Ebenfalls können Verunreinigungen der PCR - Substanzen durch fremde DNA mit Hilfe der Negativkontrolle nachgewiesen werden. Zusätzlich bietet die Gelelektrophorese die Möglichkeit einer weitergehenden Untersuchung der aufgetrennten DNA durch Blotting und Hybridisierung. Die Trennung der PCR - Produkte erfolgt einerseits nach der Molekülgröße, andererseits nach elektrophoretischer Beweglichkeit. In Abhängigkeit der Porengröße des Gels verringert sich die Beweglichkeit großer Moleküle relativ zu kleineren. Der pH - Wert der Pufferlösung, von der das Gel vollständig umspült ist, gewährleistet eine negative Ladung der DNA. Deren Auftrennung erfolgt im Verlauf der Wanderung zur Anode. Jedes Fragment zeigt auf Grund seiner Größe eine charakteristische Lauflänge. Zu deren Ermittlung dienen Molekulargewichtsmarker mit DNA - Abschnitten definierter Länge.

2.7.6.1. Herstellung des Agarosegels

Zusammensetzung des Gels: 3 % w/v Agarose NuSieve (3:1)

1 x v/v Tris - Acetat - EDTA Puffer *pH 7.8

1.3 mM Ethidiumbromid

* Tris - Acetat - EDTA Puffer : 40 mM Tris, pH 7.8

2 mM EDTA

0.15 % v/v Essigsäure

Die durch Kochen gelöste und verflüssigte Agaroselösung wurde in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. In Abhängigkeit der Anzahl

von Proben fanden Gelträger mit einem Volumen von 100 ml (30"Slots") bzw. 200 ml (60 "Slots") Gebrauch. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde das erstarrte Gel nach Entfernen der taschenbildenden Kämme in die Elektrophoresekammer (BIORAD) eingehängt. Als Laufpuffer diente 1 x Tris - Acetat - Puffer.

Elektrodenpuffer:

40 mM Tris, pH 7.8

2 mM EDTA

0,15 % v/v Essigsäure

2.7.6.2. Vorbereitung der Proben

Nach Entfernen des Mineralöls von den PCR - Proben wurden 10 µl Probe in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 µl Lastpuffer (1 / 10 v / v Probenpuffer) versetzt. Durch den Glyceringehalt des Probenpuffers wird eine Vermischung der Proben mit dem Reservoirpuffer verhindert. Bromphenol - Blau dient als Markierung. In der gleichen Weise wurde mit dem Molekulargewichtsmarker VI verfahren. Es kamen 5 µl Molekulargewichtsmarker VI mit 0,5 µl Lastpuffer zur Mischung.

Lastpuffer (Probenpuffer):

2 % v/v Glycerin,

10 mM EDTA,

6 mM Bromphenol - Blau

2.7.6.3. Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Die vorbereiteten Proben wurden in die Geltaschen einpipettiert, in die außenliegenden Geltaschen die Positivkontrollen bzw. gegenüberliegend die Negativkontrollen. Die mittlere Geltasche jeder Probenreihe nahm den Molekulargewichtsmarker auf.

2.7.6.4. Färbung und Dokumentation des Agarosegels

Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid läßt DNA unter UV - Licht sichtbar werden. Ethidiumbromid bindet an doppelsträngige DNA durch Interkalation. Es lagert sich verstärkt zwischen den gestapelten Basen an. Dies intensiviert die Fluoreszenz im UV - Licht im Vergleich zu dem freien Farbstoff. Das Agarosegel wurde unter UV -Licht photographiert (Polaroid Polaplan Film, Orangefilter Y 02,5 G).

2.7.6.5. Blot - Transfer der Amplifikate

Die im Agarosegel befindliche DNA wird durch die Diffusionskraft einer Salzlösung auf eine Zellulosemembran übertragen. Die auf diese Weise lagerungsfähig gemachte DNA erlaubt eine weitergehende Spezifizierung durch Hybridisierung. Vor dem eigentlichen Blotten mußte die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten werden. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel 30 Minuten in 0.5 M NaOH /1.5 M NaCl inkubiert. Nach Entfernen der DNA-freien Ränder des Agarosegels und Anpassen einer BioDyne Transfer Membran erfolgte das Blotten der DNA. Das Gel wurde über Nacht auf ein doppelagiges, mit 10 x SSC - Lösung getränktes Blotting - Papier gelegt. Die Ränder dieses Papiers tauchten in selbige Salzlösung. Die Lösung wurde durch das Blotting-Papier aufgesogen und diffundierte durch das Agarosegel und die aufliegende Membran in eine darüber- liegende,

mit einem Gewicht von 1 Kg beschwerte Schicht Zellstoff. In der Blotting - Membran lagerte sich die aus dem Gel herausgelöste Einzelstrang - DNA ab und wurde im Anschluß 20 Min. bei 80 °C auf der Membran fixiert und zur Aufbewahrung luftdicht in Folie eingeschweißt.

2.8. Hybridisierung

Die sich anschließende Hybridisierung diente der weiteren Steigerung der Sensitivität und der HPV-Typspezifizierung

2.8.1. Markieren der Sonde mit Digoxigenin

Zur Stammlösung der unmarkierten Sonde, deren Basensequenz innerhalb des Amplifikates der verwendeten Primern lag, wurden die folgenden Lösungen zugefügt:

12.0 µl unmarkierte Sonde

10.0 µl " Tailing buffer " (BRL)

1.0 µl Dig - dUTP (1 mM, Boehringer)

0,9 µl dATP (10 mM, Boehringer)

5.0 µl terminale Transferase (BRL)

71.1 µl aqua dest.

Das Gemisch wurde eine Stunde lang auf die für die terminale Transferase optimale Temperatur von 37 °C erwärmt. Es folgte die Zugabe von 1 µl Lachssperma - DNA (10 mg / ml), 10 µl 3 M Na - Acetat (pH 5.2) und 280 µl Ethanol abs. Die sich anschließende Abkühlung, 30 Minuten bei - 80 °C, erbrachte die Ausfällung der nunmehr markierten Sonde. Durch Zentrifugation für 15 Minuten bei

13.000 Upm konnte der Überstand abgetrennt werden. Das Präzipitat wurde mit 0.5 ml Ethanol (70 %, gekühlt auf -20 °C) gewaschen, 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt.

Nach Lösen des Sediments in 100 µl aqua dest. steril (12 ng / µl) erfolgte die Kontrolle der Sonde durch die Dot - Blot - Methode. Um die Sensitivität der Sonde zu ermitteln wurde eine Verdünnungsreihe aufgestellt und in gleicher Weise detektiert wie die Hybride, beschrieben unter 2.2.8 . Eine positive Farbreaktion bei Verdünnung von 1 pg / µl war ausreichend.

2.8.2. Prähybridisierung und Hybridisierung

Zuerst wurden die BioDyne - Transfer - Membranen (tragen jetzt Einzelstrang - DNA) für 1 Stunde unter ständiger Rotation mit 20 ml Hybridisierungslösung inkubiert (Prähybridisierungsschritt) Dies geschah im Hybridisierungsofen bei der jeweils spezifischen Temperatur für die unterschiedlichen HPV - Sonden. Danach wurden die markierten Sonden für ca. 16 Stunden zu den BioDyne - Transfer - Membranen gegeben (Hybridisierungsschritt). Der Hybridisierungsschritt erfolgte ebenfalls unter ständiger Rotation und bei spezifischer Temperatur der HPV - Sonden.

HYBRIDISIERUNG

verwendete Sonden

HPV General

GP 1 (5 µl) + GP 2 (5 µl) +

Hybridisierungslösung (10 ml)

bei 53 °C

HYBRIDISIERUNGverwendete Sonden

HPV 16	MY 95 (5 µl) + WD 133 (5 µl) + Hybridisierungslösung (10 ml) bei 53 °C
HPV 18	WD 74 (10 µl) + Hybridisierungslösung (10ml) bei 55 °C
HPV 6 / 11	MY 125 (10 µl) Hybridisierungslösung (10 ml) bei 53 °C
HPV 31	WD 128 (10 µl) + Hybridisierungslösung (10 ml) bei 53 °C

2.9. Detektion

Die Detektionsbedingungen für die verschiedenen HPV - Typen waren einzustellen. Für jeden HPV - Typen mußte die "Stringenz" der Waschlösungen optimiert werden. Dazu wurde sowohl die Temperatur und Dauer des Waschvorganges, als auch die Salzkonzentration der Waschlösung variiert. Diese Modifikationen erbrachten eine gesteigerte Sensitivität für die untersuchten Virustypen. Nach zweimaligem fünfminütigem Waschen der Filter bei Raumtemperatur schloß sich ein weiterer Waschvorgang von zweimal fünfzehn

Minuten an. Diese Schritte liefen bei der jeweils spezifischen ermittelten Temperatur und Waschlösungskonzentration für die unterschiedlichen HPV - Typen ab:

<u>HPV – Typ</u>	<u>Konzentration der Waschlösung</u>
HPV 16	1 x SSC, 0,1 % SDS
	2 x 5 Minuten bei Raumtemperatur
	2 x 15 Minuten bei 53 °C
HPV 18	0,5 x SSC, 0,1 % SDS
	2 x 5 Minuten bei Raumtemperatur
	2 x 15 Minuten bei 55 °C
HPV 31	0,5 x SSC, 0,1 % SDS
	2 x 5 Minuten Raumtemperatur
	2 x 15 Minuten bei 53 °C
HPV 6/11	1,0 x SSC, 0,1 % SDS
	2 x 5 Minuten Raumtemperatur
	2 x 15 Minuten bei 53 °C

Danach schloss sich, ebenfalls unter Rotation, die Inkubation bei Raumtemperatur mit folgenden Lösungen an:

- 1x 5 Minuten mit 20 ml Puffer 1,
- 30 Minuten mit 20 ml Puffer 2,
- 30 Minuten mit 10 ml Puffer 2 und
- 1 μ l Anti -digoxigenin Antikörper,
- 2 x 15 Minuten mit 20 ml Puffer 1,
- 1 x 5 Minuten mit 20 ml Puffer 3

Als letzter Schritt der Detektion folgte die Zugabe der Substratlösung (30 ml Puffer 3 +135 μ l NBT - Lösung + 105 μ l BCIP). In der Substratlösung wurden die Filter ohne Schütteln 4-6 Stunden lichtgeschützt inkubiert. Nach dieser Zeit folgte das Abstoppen der Reaktion durch Spülen der Filter unter Wasser. Nach Trocknung der Filter konnte die Reaktion abgelesen werden. (Höltge et al 1990), (Rolfs et al.1992), (Sambrook et al.1989).

2.10. Negativkontrollen

Als Negativkontrolle wurde zusammen mit jeder Probenreihe Aqua bidest. der gleichen Untersuchung unterzogen: Zunächst erfolgte eine PCR mit HPV-Primer, anschließend eine Hybridisierung mit typspezifischen Sonden. Auch nach der darauffolgenden Reamplifikation und typspezifischen Hybridisierung wurde in keiner der Negativkontrollen HPV-DNA nachgewiesen.

3. Ergebnisse

3.1.	Leukoplakien: HPV - Detektion durch PCR mit General Primer und Hybridisierung.....	54
3.1.1.	Leukoplakien: HPV-Typisierung durch PCR mit General-Primer und spezifische Hybridisierung.....	56
3.1.2.	Mehrfachinfektionen in Leukoplakien.....	59
3.1.3	Leukoplakien: HPV - Infektion in Beziehung zum Lebensalter.....	60
3.1.4.	HPV - Typen in histologisch unterschiedlichen Leukoplakien.....	64
3.2.	Lichen planus / erosivum: HPV - Nachweis und Typisierung.....	65
3.2.1.	Lichen planus / erosivum: HPV - Nachweis durch General PCR / Reamplifikation und Hybridisierung.....	65
3.2.2.	Lichen planus / erosivum: HPV Typisierung durch General - PCR / Reamplifikation und Hybridisierung mit typspezifischen Oligonukleotidsonden.....	67
3.2.3.	Mehrfachinfektionen in Lichen planus + Lichen erosivum.....	69
3.2.4.	Lichen planus / erosivum: HPV - Infektionen in Abhängigkeit zum Patientenalter.....	69
3.3.	Entzündungen: HPV - Detektion und -Typisierung.....	71
3.3.1.	Entzündungen: HPV - Detektion durch PCR mit General-Primer-PCR / Reamplifikation und Hybridisierung.....	71

3.3.2.	Entzündungen: HPV - Typisierung durch PCR mit General Primer / Reamplifikation und typspezifische Hybridisierung.....	73
3.3.3.	Mehrfachinfektionen in Entzündungen der Mundschleimhaut.....	74
3.4.	Kontrollmaterial: HPV -Detektion.....	75
3.4.1.	Kontrollmaterial: HPV - Detektion durch General Primer - PCR / Reamplifikation und Hybridisierung.....	75

3. Ergebnisse

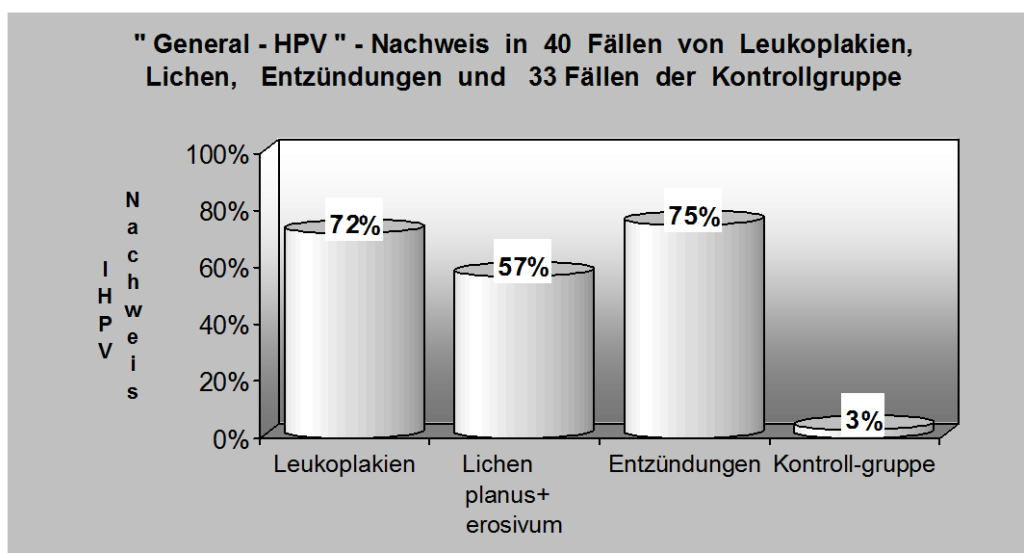
Gegenstand der Untersuchung waren Mundschleimhaut - Abstriche von insgesamt 73 Patienten. Es erfolgte der Nachweis und die Typisierung von HPV-DNA. Als Negativkontrollen wurde mit jedem Schleimhautabstrich eine Probe von sterilem Aqua dest. in gleicher Weise untersucht. Diese Kontrollproben blieben auch nach Reamplifikation und Hybridisierung negativ.

Eine krankhaft veränderte Schleimhaut lag bei 40 Patienten vor, 33 prima vista Schleimhautgesunde bildeten die Vergleichsgruppe.

Die 40 Krankheitsfälle unterteilten sich in 29 Leukoplakien, 6 Patienten mit Lichen planus, einen Patienten mit Lichen erosivum und 4 entzündliche Erkrankungen.

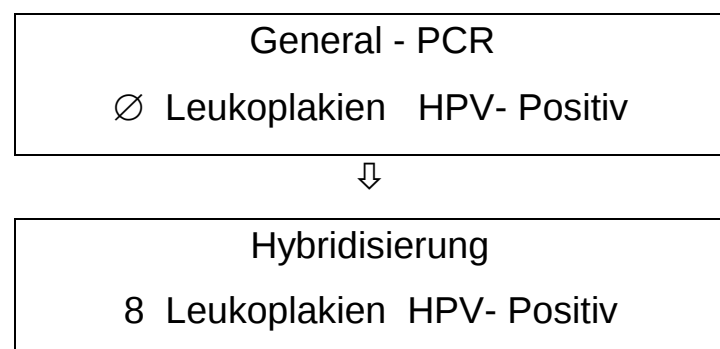
Das Diagramm 3 zeigt den HPV-DNA Nachweis in Leukoplakien, Lichen planus und Lichen erosivum sowie in entzündlichen Erkrankungen.

Abb. 3



3.1. Leukoplakien: HPV - Detektion durch PCR mit General Primer/ Reamplifikation und Hybridisierung

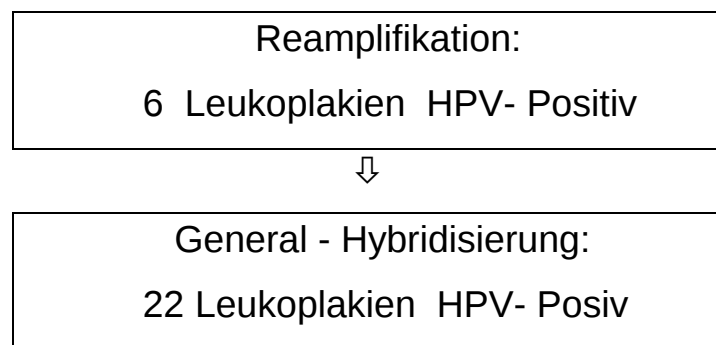
Durch die PCR mit General Primer konnte in keiner Probe HPV-DNA nachgewiesen werden. Die nachfolgende Hybridisierung ließ in 8 Leukoplakiefällen einen HPV - Befall erkennen.



Nach Reamplifikation der " General - PCR - Produkte " erwiesen sich einzelne Proben als positiv: In 6 von 29 Leukoplakien konnte HPV-DNA nachgewiesen werden. Dabei wurden die General-PCR-Produkte einer erneuten PCR nach dem gleichen Protokoll unterzogen wie bei der vorangegangenen Amplifikation.

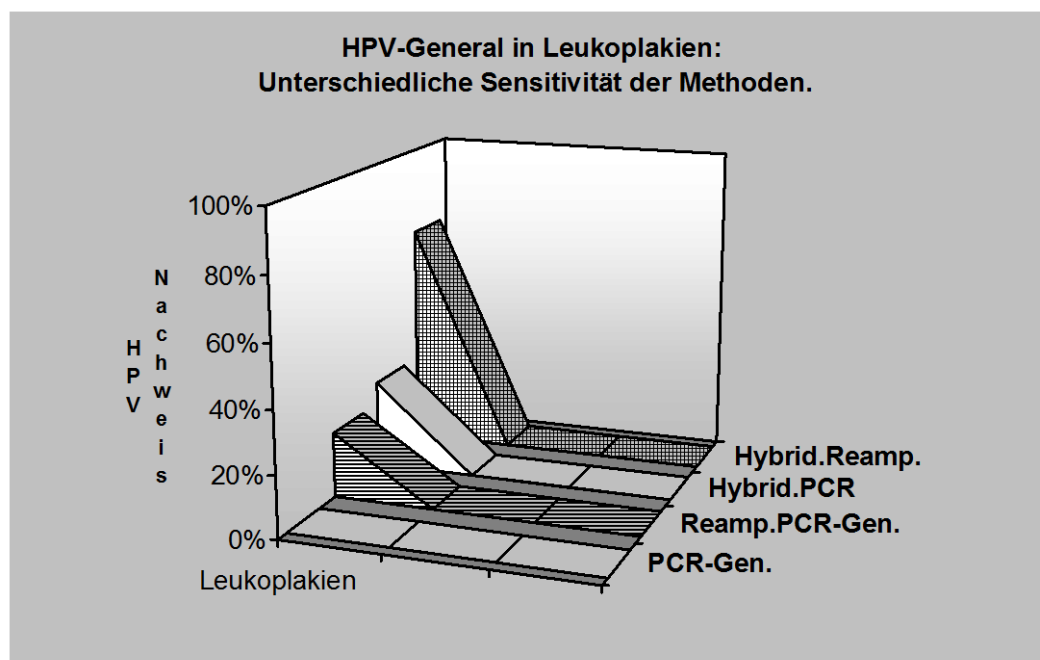
Eine Steigerung der Sensitivität ergab sich nach Hybridisierung der Reamplifikate:

Unter den Leukoplakien fand sich in 22/29 Proben HPV-DNA.



Das Diagramm 3.2.1. verdeutlicht die schrittweise Erhöhung der Sensitivität bei der Detektion:

Abb.3.2.1.:



3.1.1. Leukoplakien: HPV-Typisierung durch PCR mit General-Primer/ Reamplifikation und spezifische Hybridisierung

Alle Proben einschließlich der HPV - General negativen Fälle, wurden auf das Vorliegen bestimmter HPV-Subtypen untersucht. Die Virustypisierung erfolgte durch Hybridisierung: Die Amplifikate der L1 - Region des Virusgenoms konnten mit HPV- typspezifischen Oligonukleotidsonden detektiert werden.

Die Virustypisierung erfolgte für die in oralen Läsionen am häufigsten zu erwartenden Typen HPV - 16, HPV - 18, HPV - 6/11, und HPV - 31.

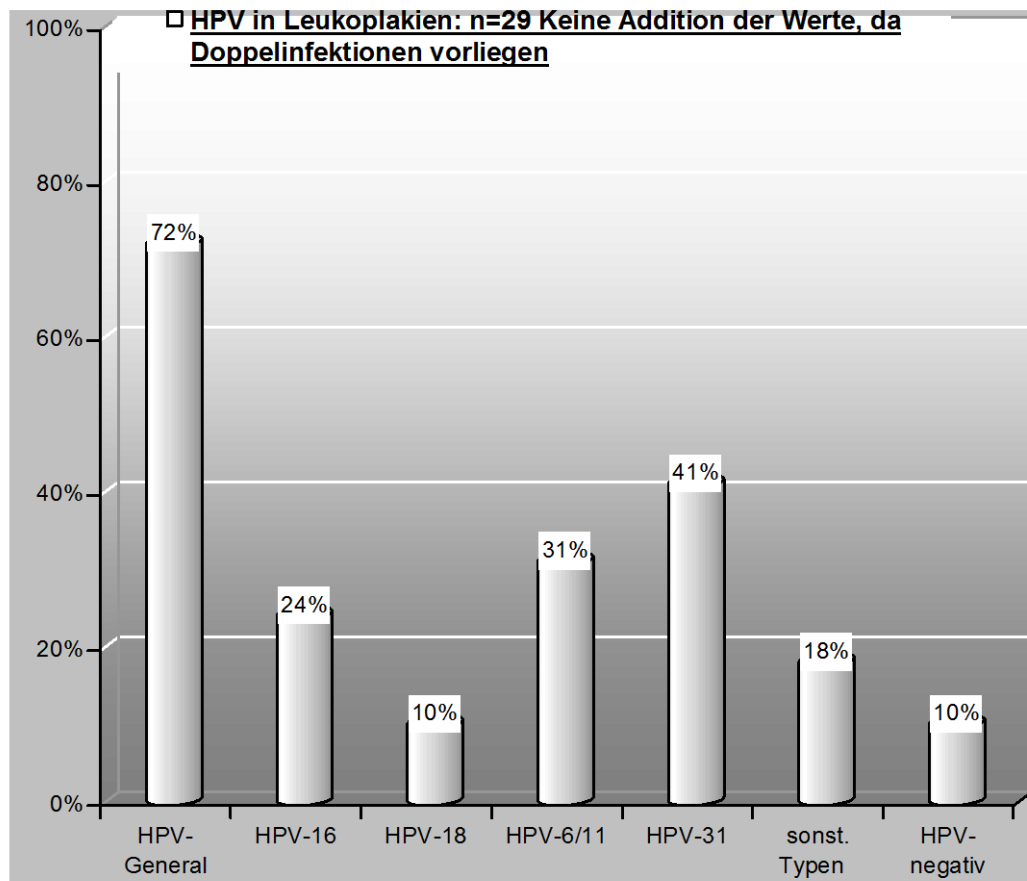
HPV - 31 war in den Leukoplakien mit 12/29 Fällen der vorherrschende Virustyp. Viren des Typs HPV-6/11 konnten in 9/29 Leukoplakien detektiert werden.

Die Virustypen der "high risk" Gruppe, HPV-16 und HPV-18 waren demgegenüber seltener zu ermitteln: HPV-16 DNA konnte in 7/29 Fällen nachgewiesen werden, HPV-18 DNA nur in 3/29.

Das Vorkommen mehrerer HPV - Typen in einer Probe konnte in 9 Gewebeproben detektiert werden. In 3/29 Schleimhautabstrichen konnte kein HPV - Befall festgestellt werden.

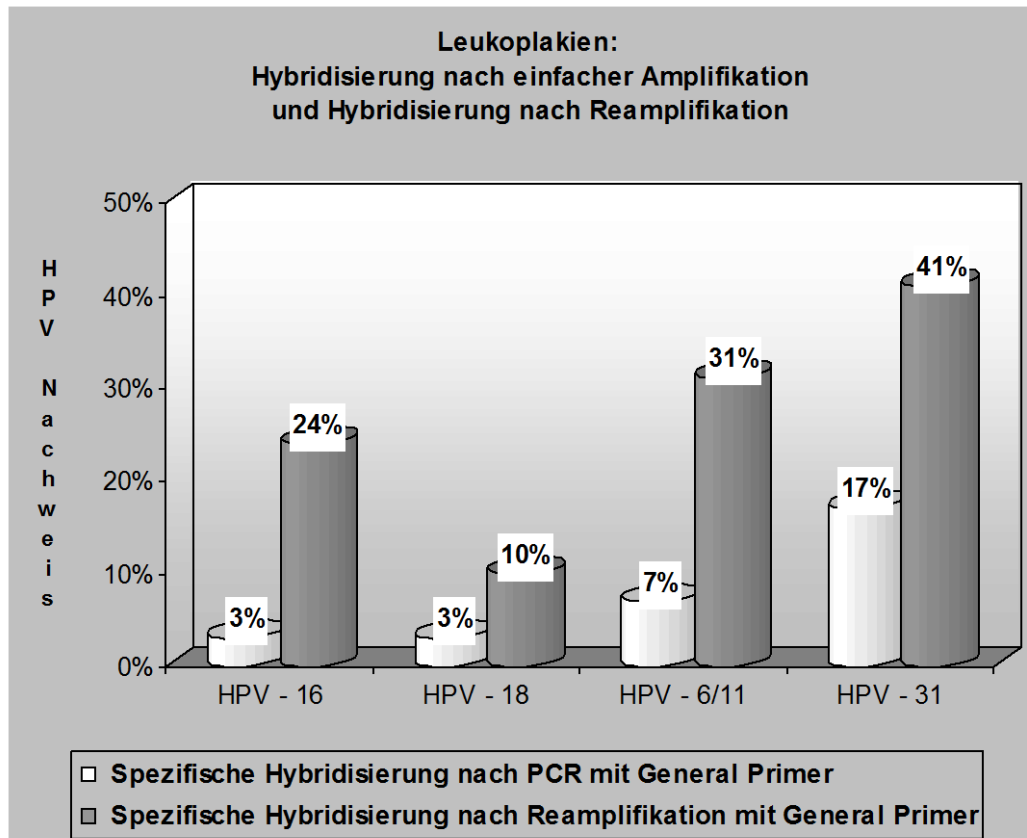
Die folgende Abbildung 3.1.1. zeigt den Anteil verschiedener HPV-Typen in Leukoplakien:

Abb 3.1.1.



Das folgende Diagramm 3.1.2. zeigt die Steigerung der Sensitivität im Vergleich der Hybridisierung nach einfacher PCR mit der Hybridisierung nach Reamplifikation:

Abb.3.1.2.



3.1.2. Mehrfachinfektionen in Leukoplakien

Die Angaben der Präsenz von HPV-DNA sind nicht addierbar. Sie beziehen sich auf den Befall mit **einem** spezifischen HPV -Typ in der jeweiligen Gewebeprobe. Mehrfachinfektionen einer Probe führen zu Verzerrungen dieser Werte. Aus diesem Grund kann die Gesamtzahl der HPV-infizierten Fälle die Anzahl der Proben übersteigen.

In 29 Leukoplakien fanden sich in etwa jeder dritten Probe Mehrfachinfektionen durch zwei verschiedene Virustypen und in einem Fall von verrucöser Leukoplakie eine Mehrfachinfektion mit allen vier untersuchten HPV - Typen. Tendenziell am häufigsten nachzuweisen war die Infektion von HPV-6/11 mit HPV-31. Bei über einem Viertel der Patienten lag eine derartige Doppelinfection vor. In 3/29 Fällen zeigte sich eine Koinfektion von HPV-16 mit HPV-18. Die anderen Kombinationen von HPV-Typen stammen aus einer Probe von verrucöser Leukoplakie.

HPV-Typen	HPV- 16 mit HPV- 18	HPV-16 mit HPV-6/11	HPV-16 mit HPV-31	HPV-18 mit HPV-6/11	HPV18 mit HPV-31	HPV-6/11 mit HPV- 31
LEUKO Pl. n = 29	3/29	1/29	1/29	1/29	1/29	8/29

Eine Infektion mit mehr als zwei Virustypen war ebenfalls in einem Fall von verrucöser Leukoplakie nachweisbar.

In dieser Probe waren alle hier untersuchten Virustypen zu detektieren.

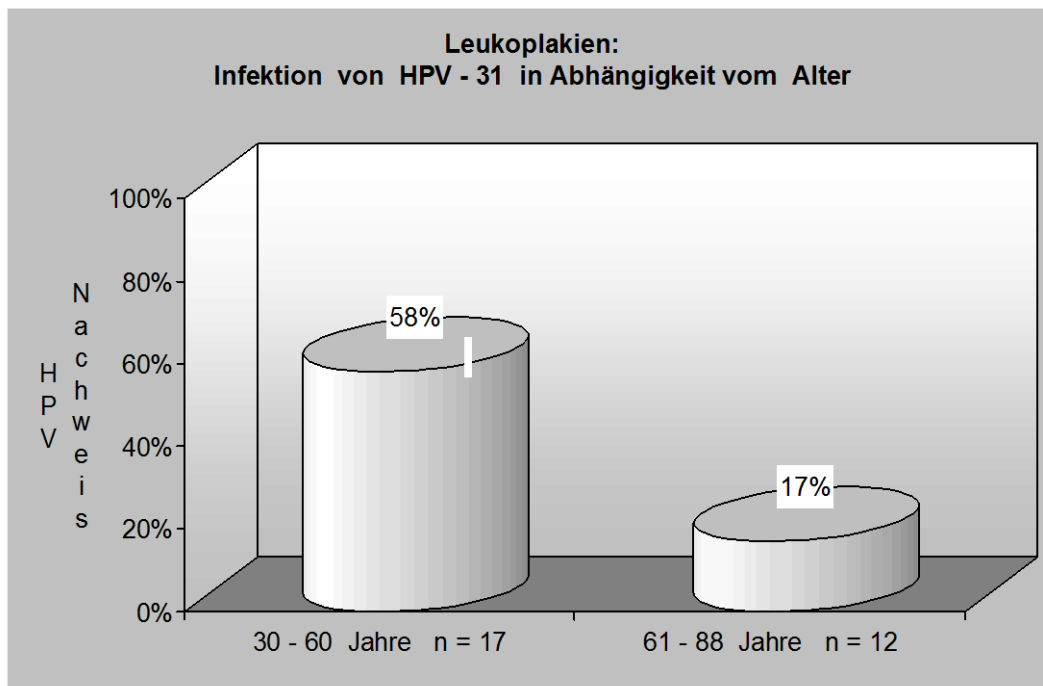
3.1.3. Leukoplakien: HPV - Infektion in Beziehung zum Lebensalter

Das Patientenkollektiv wurde bezüglich des Lebensalters in zwei Gruppen aufgeteilt. Für jede Altersgruppe wurde die Präsenz von HPV-DNA ermittelt sowie die untersuchten HPV-Typen spezifiziert.

Die größte Schwankungsbreite innerhalb der beiden Altersgruppen wies HPV - 31 auf. In der Gruppe der bis 60 jährigen Patienten war HPV - 31 tendenziell am häufigsten zu finden. Ein Befall mit diesem Virustyp lag bei den jüngeren Patienten zwischen 30-60 Jahren in 10/17 der Fälle vor. Dagegen fand sich in der Gruppe von älteren Patienten zwischen 61 und 88 Jahren HPV - 31 mit 2/12 Fällen tendenziell am seltensten.

Im folgenden Diagramm 3.1.3. ist die Infektion mit HPV-31 in verschiedenen Altersstufen dargestellt:

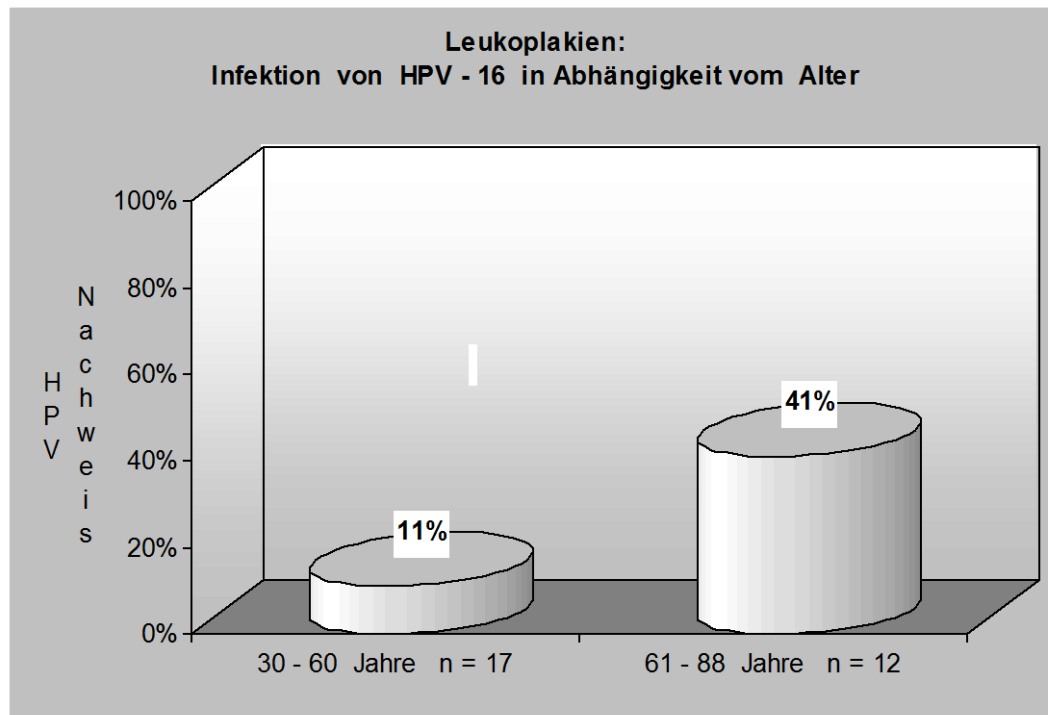
Abb.3.1.3.



Dieser Altersverteilung gegenüber entgegengesetzt war die Infektion mit HPV - 16: Dieser Virustyp war in der Gruppe älterer Patienten mit 5/12 tendenziell häufiger verbreitet als in der anderen Altersgruppe: Bei den Patienten jüngeren Alters fand sich HPV - 16 nur in maximal 2/17 Fällen.

Dies stellt das Diagramm 3.1.4. dar:

Abb 3.1.4.



Die Infektion mit HPV-18 zeigte sich relativ einheitlich für die verschiedenen Altersgruppen. Für diesen Virustyp zeigte sich keine Bevorzugung einer Altersgruppe.

Altersgruppe	30 - 60 Jahre	61 - 88 Jahre
HPV – 18	2/17	2/12

Auch HPV-6/11 war in den beiden Altersgruppen relativ gleich häufig zu detektieren:

Altersgruppe	30 - 60 Jahre	61-88 Jahre
HPV - 6/11	6/17	3/12

Mehrfachinfektionen insgesamt waren mit 6/17 Fällen nur tendenziell häufiger bei Patienten jüngerer Jahrgänge erkennbar. Eine Ausnahme bildeten Mehrfachinfektionen von HPV-6/11 mit HPV-31 : Diese Virustypen fanden sich am häufigsten in der Gruppe jüngerer Patienten. In einer Probe muß das Vorhandensein eines mit den in dieser Arbeit verwendeten Sonden nicht zu charakterisierenden Virustypen angenommen werden. Die übrigen Mehrfachinfektionen von HPV-16 mit HPV-18 und die Mehrfachinfektion mit allen untersuchten HPV-Typen wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Altersverteilung auf.

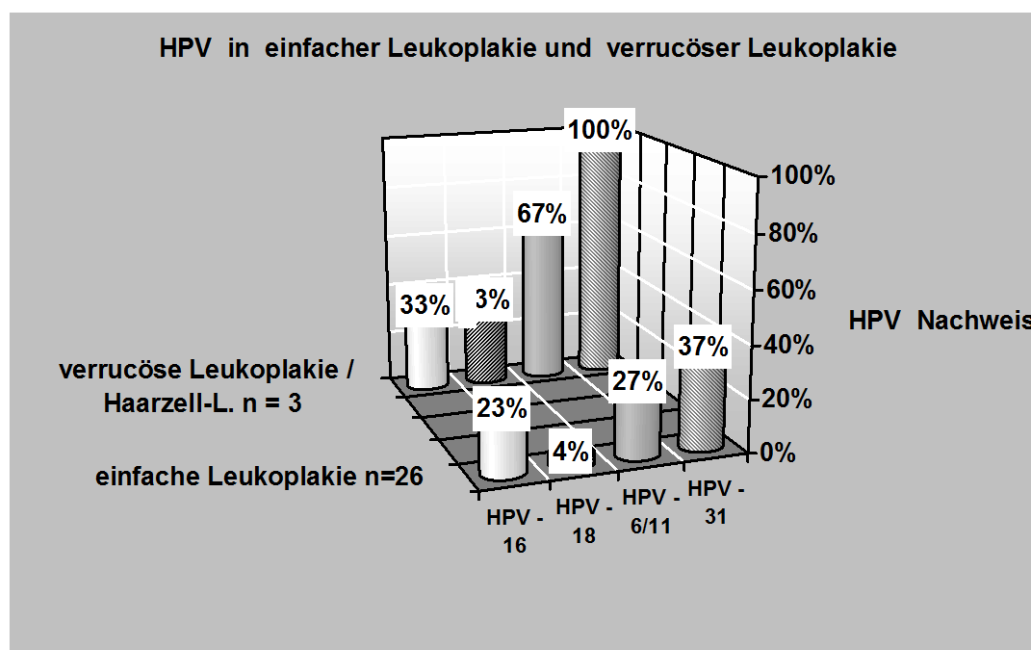
Aus der Gruppe der älteren Patienten zwischen 61 und 88 Jahren wiesen 3/12 der Fälle Mehrfachinfektionen auf. In einer Probe lagen alle vier untersuchten HPV - Typen zusammen vor.

In 2 Fällen war das Vorliegen von anderen, nicht untersuchten Virustypen wahrscheinlich (HPV-positiv und in der Spezifizierung negativ).

3.1.4. HPV - Typen in histologisch unterschiedlichen Leukoplakien

26/29 der untersuchten Leukoplakien konnten nach der histologischen Einteilung von Sugar (Sugar und Bánóczy 1959) als "einfache Leukoplakie" klassifiziert werden. Zwei Leukoplakien entsprachen dem Bild der verrucösen Leukoplakie, in einem Fall lag eine "Haarzell"-Leukoplakie vor. Das Diagramm 3.1.4.1. zeigt die Verteilung verschiedener HPV-Typen in Leukoplakien unterschiedlicher Histologie:

Abb. 3.1.4.1.



Auffällig ist beim Vergleich der „einfachen Leukoplakien“ mit den „verrucösen Leukoplakien“ einerseits der Unterschied der Infektion mit HPV-31: Die verrucösen Leukoplakien wiesen in jeder Probe einen Befall mit HPV - 31 auf, in den anderen Fällen von Leukoplakien war HPV - 31 nur etwa in einem Drittel der Proben nachweisbar.

Andererseits fällt das tendenziell häufigere Auftreten von Mehrfachinfektionen in den "verrucösen Leukoplakien" auf. Der Befall einer Probe mit mehreren HPV-Typen war in derartigen Geweben in 2/3 erkennbar und damit mehr als doppelt so oft erkennbar als in den "einfachen Leukoplakien". Dieser Unterschied ist aufgrund der kleinen Fallzahl nicht signifikant.

Die einzige Mehrfachinfektion, die alle hier typisierten HPV-Typen zeigte, rekrutierte sich ebenfalls aus den verrucösen Leukoplakien.

3.2. Lichen planus / erosivum:

HPV - Nachweis und Typisierung

Die Untersuchung beinhaltete insgesamt 6 Fälle von Lichen planus, zuzüglich einer Probe mit Lichen erosivum.

Die Detektion von HPV und die anschließende Virustypisierung erfolgten in gleicher Weise wie unter 3.1.1. beschrieben.

3.2.1. Lichen planus/erosivum: HPV - Nachweis durch

General – PCR / Reamplifikation und Hybridisierung

Die Amplifikation mit General-PCR zeigte keine von 7 Proben mit Lichen planus/erosivum positiv für HPV. Auch durch anschließende Hybridisierung konnte kein HPV Nachweis erbracht werden.

PCR mit General-Primern

Ø/7 Lichen planus/erosivum HPV- positiv



Hybridisierung HPV General

Ø/7 Lichen planus/erosivum HPV- positiv

Die Reamplifikation zeigte in 1/6 Fällen von Lichen planus und in 1/1 Fall von Lichen erosivum eine Infektion mit HPV. Durch die Hybridisierung nach Reamplifikation konnten in 2 weiteren Abstrichen von Lichen planus HPV detektiert werden:

Reamplifikation:

1 Lichen planus+ 1L.eros. HPV- positiv



Hybridisierung

3 Lichen planus+ 1L.eros. HPV- positiv

3.2.2. Lichen planus + erosivum: HPV Typisierung durch General – PCR / Reamplifikation und Hybridisierung mit typspezifischen Oligonukleotidsonden

Untersucht wurden die Abstriche von Lichen planus/erosivum auf das Vorliegen der Virustypen HPV-16, HPV-18, HPV-6/11 und HPV-31. Der Virustyp HPV-31 war tendenziell am häufigsten nachzuweisen. In 3 von 7 Fällen war eine Infektionen mit HPV-31 detektierbar. HPV-16 konnte in den lichenoiden Erkrankungen bei 2/7 der Abstriche erst nach Reamplifikation und Hybridisierung gefunden werden, die gleiche Anzahl der Proben war frei von HPV. HPV -18 und HPV -6/11 waren nur in einem von 7 Fällen detektierbar.

In einer Probe konnte eine HPV-Infektion nachgewiesen werden, die Typisierung mißlang jedoch. In diesem Fall ist die Infektion mit einem anderen, nicht untersuchten HPV-Typ anzunehmen.

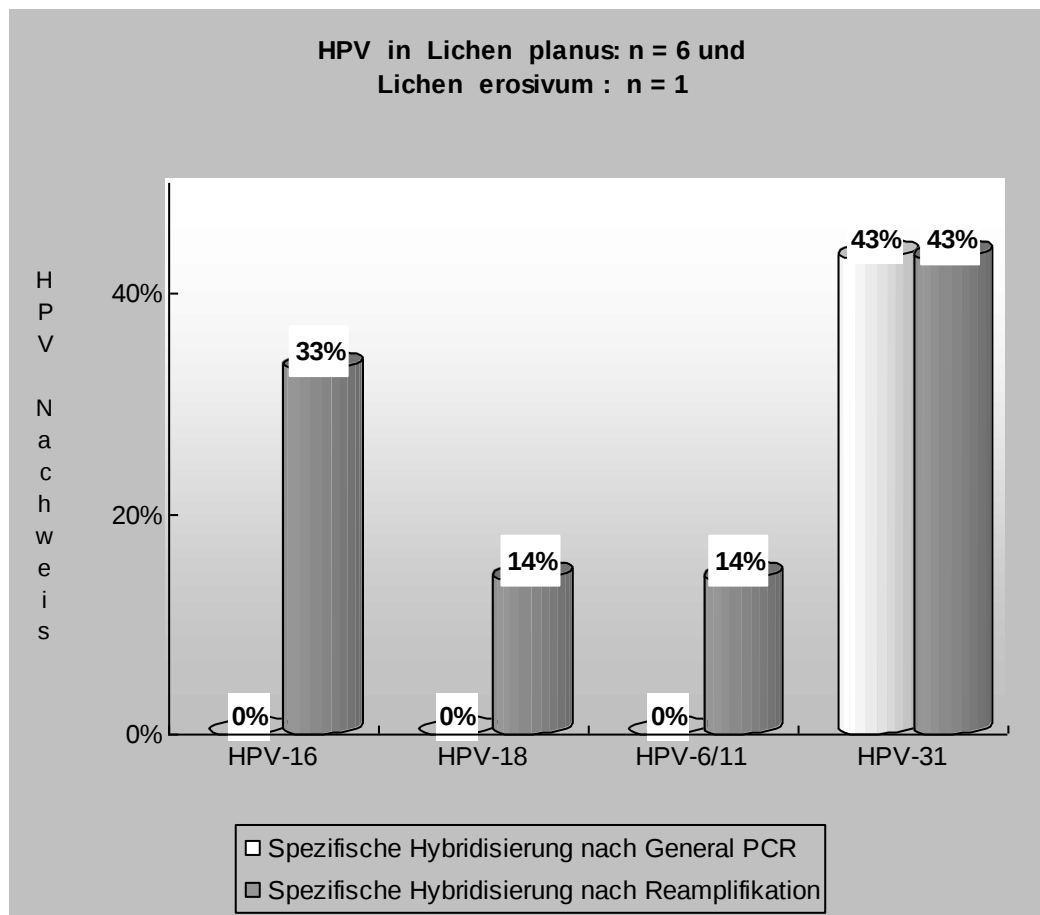
Mehrfachinfektionen lagen in 2 Fällen vor. Dabei fand sich in einem Fall die Infektion mit HPV-16, HPV-6/11 und HPV-31.

In dem anderen Fall war eine Doppelinfektion von HPV-18 mit HPV-31 erkennbar.

LICHEN	HPV GEN POS.	HPV 16 POS.	HPV 18 POS.	HPV 6 / 11 POS.	HPV 31 POS.	HPV NEG.
planus: n= 6	3	2	1	1	2	2
eros.: n=1	1	Ø	Ø	Ø	1	-

Das folgende Diagramm 3.2.2.1. zeigt die Steigerung der Sensitivität der Hybridisierung nach Reamplifikation gegenüber der Hybridisierung nach einfacher General - PCR.

Abb. 3.2.2.1.



3.2.3. Mehrfachinfektionen in **Lichen planus + Lichen erosivum**

Unter den 6 Fällen von Lichen planus fand sich eine Doppelinfektionen von HPV - 18 mit HPV - 31. Eine weitere Gewebeprobe war mehrfachinfiziert, in diesem Fall waren HPV - 16 mit HPV - 6/11 und HPV - 31 nachweisbar.

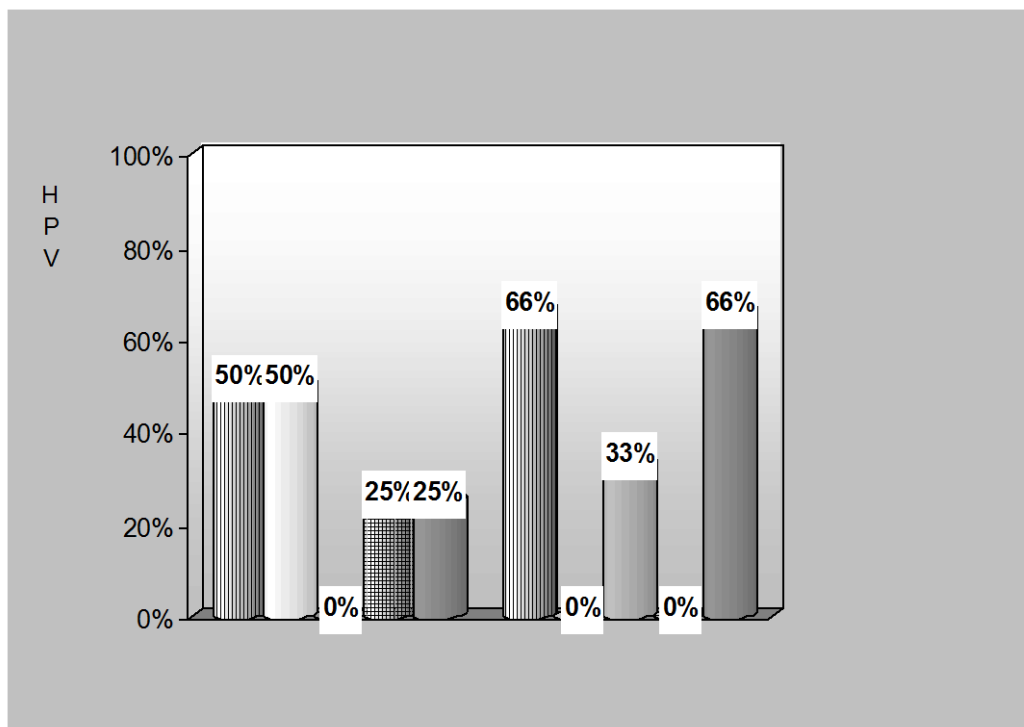
Die Probe mit Lichen erosivum wies keine Mehrfachinfektion auf.

3.2.4. Lichen planus + erosivum: HPV - Infektionen in **Abhängigkeit zum Patientenalter**

Um die Infektion mit HPV in Korrelation zum Alter darzustellen, erfolgte die Einteilung der Patienten mit Lichen planus/erosivum in zwei Altersgruppen: Eine Gruppe von jüngeren Patienten im Alter zwischen 50-60 Jahren (n = 4) und eine Gruppe von 61-71 jährigen Patienten (n = 3).

Die Infektion von Lichen planus und erosivum mit unterschiedlichen HPV-Typen und in Abhängigkeit zum Alter zeigt das Diagramm 3.2.4.1.

Abb 3.2.4.1.



Der Vergleich der beiden Altersgruppen zeigt tendenziell einen häufigeren Nachweis von HPV-16 bei jüngeren Patienten. Die Hälfte der bis 60 jährigen Patienten wies eine Infektion mit diesem high - risk Virustyp auf. Im Gegensatz dazu fand sich bei keinem über 60 Jahre alten Patienten HPV-16. Ebenfalls in der Gruppe jüngerer Patienten tendenziell häufiger zu detektieren war HPV-6/11: Ein Viertel dieser Patienten zeigte eine derartige Infektion, jedoch keiner der älteren Patienten.

Eine dazu gegensätzliche Altersverteilung war bei HPV-18 zu erkennen. Während die jüngeren Patienten von diesem Virustyp

nicht betroffen waren, zeigte jeder 3. ältere Patient HPV -18 DNA in den Schleimhautläsionen.

HPV-31 war bei 2/3 der Proben detektierbar und damit der tendenziell vorherrschende Virustyp in Abstrichen älterer Patienten mit Lichen planus. Die jüngere Patientengruppe war hingegen nur in einem Viertel der Fälle von HPV -31 betroffen.

3.3. Entzündungen: HPV - Detektion und - Typisierung

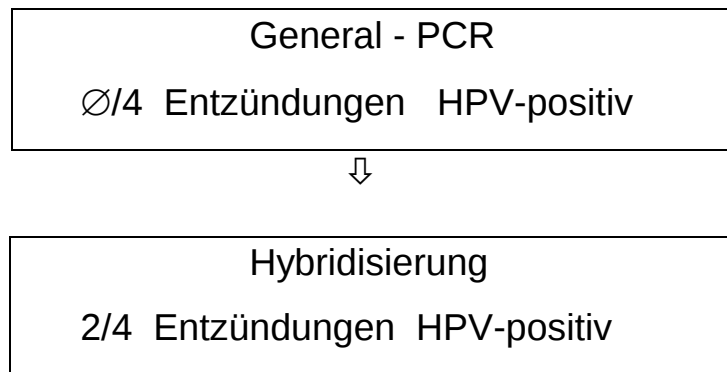
Bestandteil der Arbeit waren 4 Abstriche von entzündlichen Veränderungen aus dem Bereich des Mundes und der Zunge:

- Eine chronische Entzündung
- Eine pemphigoide Entzündung
- Ein chronischer Reizzustand
- Eine Glossitis

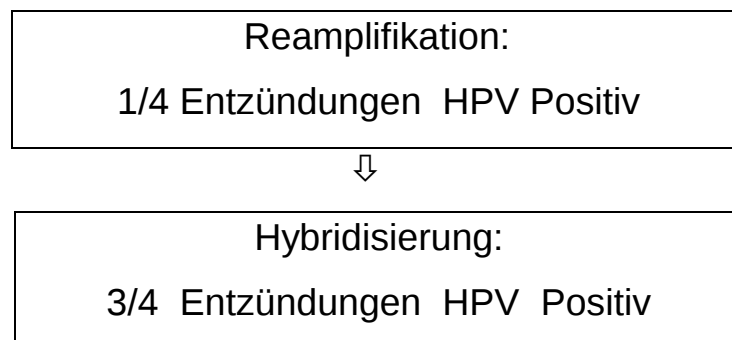
Die Proben wurden entsprechend der bereits oben beschriebenen Methodik auf das Vorliegen von HPV-DNA untersucht.

3.3.1. Entzündungen: HPV- Detektion durch PCR mit General-Primer-PCR / Reamplifikation und Hybridisierung.

Nach Amplifikation zeigte sich in keinem Fall ein Vorliegen von HPV. Mit der anschließenden Hybridisierung war HPV-DNA in 2 Proben nachzuweisen.



Die Reamplifikation zeigte in 1/4 Fällen von Entzündungen eine Infektion mit HPV. Durch die Hybridisierung nach Reamplifikation konnten in 3/4 Abstrichen HPV detektiert werden. Die Probe der pemphigoiden Entzündung erwies sich als HPV - negativ.



3.3.2. Entzündungen: HPV-Typisierung durch PCR mit General Primer / Reamplifikation und typspezifische Hybridisierung

Die Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotidsonden nach PCR mit General-Primern zeigte in dem Fall von chronischem Reizzustand eine Infektion mit HPV-18. In dem Abstrich der Glossitis ließen sich HPV-6/11 und HPV-31 nachweisen. Nach Reamplifikation und Hybridisierung vergrößerte sich die diagnostische Ausbeute wiederum:

In dem Schleimhautabstrich der Glossitis war eine Mehrfachinfektion der Virustypen HPV-16, HPV-6/11 und HPV-31 erkennbar. Die Probe des chronisch entzündlichen Reizzustandes war sowohl für den HPV - Typ 18, als auch für HPV-6/11 positiv.

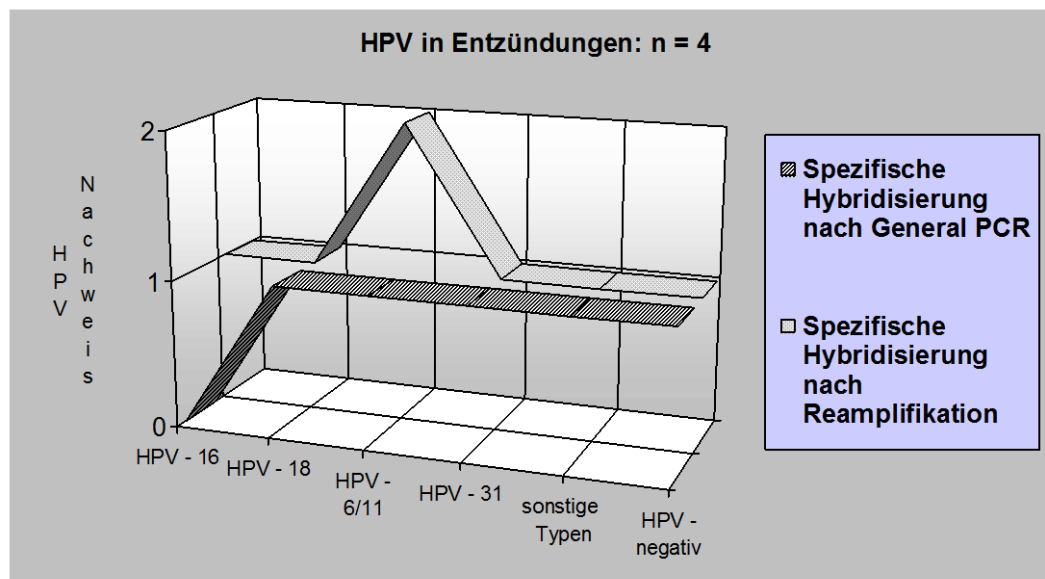
Im Fall der chronischen Entzündung konnte eine HPV General - Infektion nachgewiesen werden, die Virustypisierung fiel jedoch negativ aus. Daher ist das Vorliegen eines nicht untersuchten Virustyps in diesem Gewebe wahrscheinlich.

FÄLLE INSG.	HPV GEN. POSITIV	HPV 16 POSITIV	HPV 18 POSITIV	HPV 6 / 11 POSITIV	HPV 31 POSITIV

chron. Entzündung	⊕	∅	∅	∅	∅
pemphigoide Entzündung	∅	∅	∅	∅	∅
chron. Reizzustand	⊕	∅	⊕	⊕	∅
Glossitis	⊕	⊕	∅	⊕	⊕

Das folgende Diagramm 3.3.2.1 zeigt die Steigerung der Sensitivität der Hybridisierung nach Reamplifikation gegenüber der Hybridisierung nach einfacher PCR.

Abb.3.3.2.1.



3.3.3. Mehrfachinfektionen in Entzündungen der Mundschleimhaut

Von vier untersuchten Entzündungen lag in einer Probe eine Doppelinfektion vor, ein anderer Fall wies eine Mehrfachinfektion auf. Die Doppelinfektion, nachgewiesen im Abstrich der Glossitis, beinhaltete den Befall von HPV-18 mit HPV-6/11.

In der Probe des chronischen Reizzustandes fand sich eine Mehrfachinfektion mit HPV-16, HPV-6/11 und HPV-31.

3.4. Kontrollmaterial: HPV - Detektion

Das Abstrichmaterial der Kontrollgruppe umfasste 33 Proben von unauffälliger Mundschleimhaut. Der HPV-Nachweis erfolgte in gleicher Weise wie für die pathologischen Schleimhautveränderungen beschrieben.

3.4.1 Kontrollmaterial: HPV - Detektion durch General - Primer - PCR Reamplifikation und Hybridisierung

Nach Reamplifikation erwies sich eine Probe aus dem Kontrollkollektiv mit unauffälliger Schleimhaut als positiv für HPV-DNA. Eine Typisierung mit den vorbeschriebenen spezifischen Sonden gelang nicht. Insofern wird auch hier von dem Vorhandensein eines mit den eingesetzten spezifischen Oligonukleotidsonden nicht detektierbaren Virustyps ausgegangen.

4. Diskussion

4.1.	HPV-DNA Nachweis in oralen Schleimhautabstrichen.....	76
4.2.	HPV-DNA Nachweis und -Typisierung in oralen Leukoplakien.....	81
4.2.1	HPV-DNA Nachweis in Leukoplakien verschiedener Altersstufen.....	83
4.2.2.	HPV-DNA Nachweis in histologisch unterschiedlichen Leukoplakien.....	84
4.3.	HPV-DNA Nachweis in Lichen planus/erosivum.....	87
4.4.	HPV-DNA Nachweis in gesunder Kontrollgruppe.....	88

4.1. HPV-DNA Nachweis in oralen Schleimhautabstrichen

In der vorliegenden Arbeit wurden orale Schleimhautabstriche untersucht. Abstrichmaterial ist weniger invasiv als Biopsiematerial zu entnehmen. Nachteilig kann die Variabilität der Abstrichmenge sein. Eine Quantifikation durch Zellzählung wäre grundsätzlich denkbar, aber mit hohem Aufwand verbunden. Der Nachweis von Zellmaterial erfolgte daher durch die Bestimmung von β -Globin DNA. Die β -Globin DNA konnte in 92% der Proben nachgewiesen werden. Es erfolgte anschließend die Detektion von HPV-DNA aus diesen Proben.

Der HPV-DNA Nachweis erfolgte unter Anwendung einer Methodik mit hoher Sensitivität: Auf die PCR und die Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotidsonden folgte eine Reamplifikation der PCR-Produkte mit erneuter Hybridisierung. Die im Literaturvergleich (Brennan et al 2001, Fischer et al. 2003, Miller and White 2001, Mao et al. 1996) hohe Sensitivität dieser Methodik wurde aufgrund der noninvasiven Materialgewinnung erforderlich:

Gegenüber den hier untersuchten, mit Watteträgern gewonnenen Abstrichproben wurden in anderen Studien zumeist Bürstenabstriche oder Biopsate beziehungsweise paraffineingebettete Gewebestücke verwendet. Obwohl die Detektion von HPV-DNA in frischem Gewebe signifikant häufiger gelingt als in Paraffinmaterial (Miller und White 1996), so muß doch die vorhandene Zellzahl des Materials in Betracht gezogen werden: Während bei der Untersuchung von Bürstenabstrichen oder Biopsaten relativ viel Material vorhanden ist, hatte die Probengewinnung des Gewebeabstriches mit Watteträgern zur Folge, dass teilweise sehr wenig Zellmaterial zur Verfügung stand. Der Schleimhautabstrich ist der Biopsie nicht nur in Bezug auf die Materialmenge unterlegen, sondern auch hinsichtlich der histologischen Lokalisation auf das Oberflächenepithel einer Läsion begrenzt. Insofern ist die Exaktheit der Materialgewinnung bei Abstrichen geringer als bei Biopsien, weil nicht nur weniger Material gesammelt wird, sondern auch nur oberflächliche Zellen der Läsion, zusammen mit Zelldetritus und oberflächlichen Zellen der Umgebung.

Eine vergleichende Untersuchung über den Nachweis von HPV-DNA in oralen Schleimhautabstrichen von potentiell malignen und gesichert malignen Läsionen mit gleichartigen Biopsien zeigte eine höhere Nachweisrate in den Abstrichen (Furrer et al. 2006).

Demgegenüber zeigte ein Vergleich des HPV-DNA Nachweises von Abstrichen mit Biopsien aus Larynxkarzinomen ein gegenteiliges Ergebnis: In allen Biopsien fand sich HPV-DNA, aber nur in einer der Abstrichproben (Vowles et al. 1997). In beiden Arbeiten wurde als Nachweismethode die PCR eingesetzt.

Untersuchungen, die bei unterschiedlicher Entnahmetechnik auch verschiedene Nachweismethoden vergleichen, stehen aus.

In Abstrichmaterial der Zervix uteri fand sich eine vergleichbar hohe HPV-Infektionsrate wie in Biopsaten, wobei als Nachweismethode die In situ Hybridisierung diente (Petry et al. 1993, Melo et al. 2005).

Differenzen im Nachweis von HPV-DNA können auch durch unterschiedliche Lagerungsbedingungen bedingt sein. Die Art der Konservierung des Materials beeinflusst die Nachweisbarkeit von HPV-DNA: In kryokonserviertem Ausgangsmaterial konnte HPV häufiger detektiert werden als in Paraffin-eingebettetem Material (Miller und White 1996). Dabei sind auch die Art der Entnahme, die Lagerung und die Dauer der Transportwege von Probenmaterial zu berücksichtigen. Bei einer längedauernden, unsachgemäßen Lagerung von Proben kann es durch Autolyse zu einer Verminderung von HPV-DNA kommen. Die Integrität der DNA und die Viruslast der Zelle, d.h. die DNA-Kopienzahl im Probenmaterial können die Nachweisbarkeit von HPV beeinflussen (Remmerbach et al. 2004).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der mit der HPV-DNA Nachweisrate korreliert, ist der Dysplasiegrad einer Läsion: In Epithelien ohne oder mit nur geringen dysplastischen Veränderungen konnte signifikant weniger häufig HPV nachgewiesen werden als in Proben von schweren Dysplasien. (Miller und White 1996, Gonzales 1994, Mao 1996, Nielsen 1996, Ostwald 2003).

In Karzinomen ist allerdings nicht zwangsläufig häufiger HPV-DNA nachweisbar als in Leukoplakien mit Dysplasien. (Gonzales 1994, Eberlein-Gonska 1994, Eversole et al. 2000, Ostwald et al. 2003).

Ein anderer, den Nachweis von HPV determinierender Faktor kann der Keratinisierungsgrad einer Läsion sein:

Es zeigte sich in Abstrichen der unmittelbaren Umgebung von Läsionen eine höhere Prävalenz von HPV als in den keratinisierten Läsionen selbst. Die Keratinisierung der Schleimhaut erschwert demnach den Nachweis von HPV-DNA aus Abstrichmaterial. Es wird daher zu einem

Abstrich aus der Umgebung der Läsion geraten. Nachweismethode war die PCR mit My 09 und My 11 sowie GP05+ und GP06+ Primern mit anschließender Hybridisierung. (Giovanelli et al. 2006).

Es gibt Hinweise für eine in der Mundhöhle lokal unterschiedliche Prävalenz von HPV zumindest bei Karzinomen: Biopsate wurden einer PCR und anschließender Reamplifikation unterzogen: Bei 28 von 70 Fällen konnte auf diese Weise HPV-DNA nachgewiesen werden. Dabei differierte der HPV- Nachweis stark in Abhängigkeit von der Lokalisation der Läsion in der Mundhöhle (El Mofty et al. 2003 und 2006, Fischer et al. 2003). Ob diese Lokalisationsabhängigkeit von HPV auch für Präkanzerosen gilt, ist noch unklar.

Für den Nachweis von HPV-DNA in oralen Schleimhautproben sind neben dem Dysplasiegrad und der Art des Materials die Sensitivität der Nachweismethode von großer Bedeutung (Brennan et al. 2001, Nielsen 1996, Miller und White 1996, Gonzales Moles 1994): Im Literaturüberblick unterscheiden Miller und White mehrere „Sensitivitätsgrade“ die mit unterschiedlichen Detektionsmethoden erzielt werden:

- | | |
|---|---|
| 1. geringe Sensitivität:
detektieren > 10 Kopien
von Virus-DNA pro Zelle | <u>Immunoperoxidase, In situ Hybridisierung</u> |
| 2. mittlere Sensitivität:
detektieren 1-10 Kopien
von Virus-DNA pro Zelle | <u>Southern blot, dot blot, reverse blot</u> |
| 3. hohe Sensitivität:
detektiert < 1 Kopie
von Virus DNA pro Zelle | <u>Polymerase-Kettenreaktion PCR</u> |

Die Häufigkeit nachgewiesener HPV-Infektionen ist abhängig von der Sensitivität der Nachweismethode: Bei Anwendung einer hochsensitiven Nachweismethode wie der PCR kann in oralen Neoplasien signifikant öfter HPV-DNA nachgewiesen werden als nach Anwendung weniger sensibler Methoden wie Southern Blot, Immunhistochemie, oder in situ Hybridisierung (Brennan et al. 2001, Fischer et al. 2003, Si et al. 2003). Die Rate der nachweisbaren HPV erhöht sich nach Durchführung einer Reamplifikation von PCR Produkten und wiederum nach Hybridisierung von Reamplifikaten (Fischer et al. 2003).

Ein Vergleich der PCR Ergebnisse nach Einsatz unterschiedlicher Primer ergab eine leicht höhere Effektivität von GP05+/ GP06+ Primern gegenüber den in dieser Arbeit verwandten My09/My11 Primern für den HPV-Nachweis in oralen Schleimhautabstrichen. Demgegenüber waren bei cervicalen Schleimhautabstrichen beide Primerpaare gleichwertig (Remmerbach et al. 2004).

In einer Arbeit von Kurose et al. waren Abstriche normaler oraler Schleimhaut Gegenstand der Untersuchung. In diesen Fällen war die Prävalenz von HPV mit 0,6% auffallend gering. Detektiert wurde HPV-DNA mittels PCR mit My09/My11 Primern (Kurose et al. 2004).

Abstrichmaterial bietet den Vorteil einer geringeren Invasivität gegenüber Biopsien: Wiederholte Kontrollen der Infektionsrate von HPV sind einfacher zu realisieren.

4.2. HPV- Nachweis und -Typisierung in Leukoplakien

In der vorliegenden Arbeit war der HPV-DNA-Nachweis in Leukoplakien allein mit der PCR und anschließender Hybridisierung zunächst gering. Erst nach Steigerung der Sensitivität mittels Reamplifikation der PCR-Produkte gelang der HPV-DNA Nachweis in einer mit früheren Untersuchungen vergleichbaren Rate.

Gegenstand einer Arbeit von Arndt waren laryngeale Leukoplakien. HPV-6/11 konnte in 63 % der Leukoplakien und HPV-16/-18/-33 in 36 % der Leukoplakien nachgewiesen werden. Der häufige Nachweis von HPV in den laryngealen Leukoplakien konnte auch in dieser Studie nur mittels hochsensitiver Untersuchungsmethoden dokumentiert werden (Arndt 1997). Der in der vorliegenden Arbeit vorherrschende Virustyp HPV-31 wurde in der Studie von Arndt nicht untersucht .

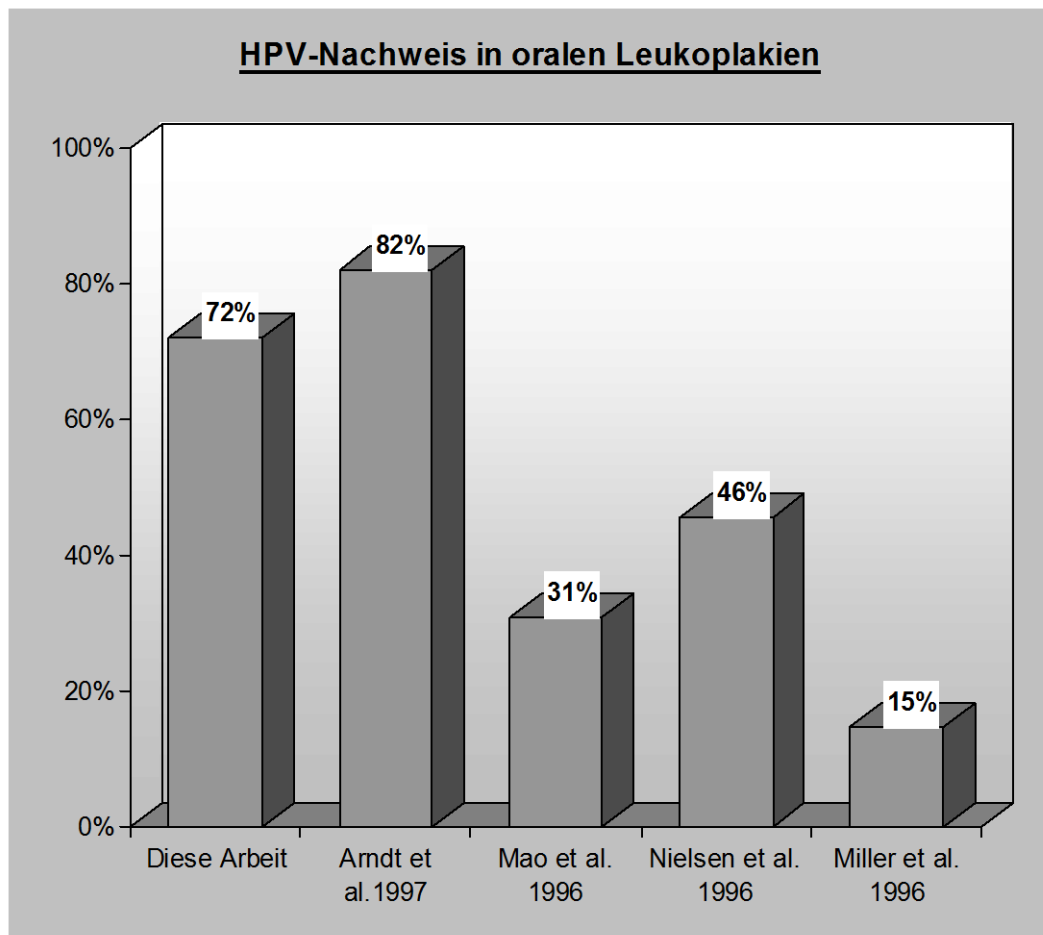
In einer Untersuchung von Nielsen et al. bei 49 Patienten mit prämaligen oralen Läsionen gelang in 40.8% aller Proben ein HPV-16 Nachweis. In verrucösen Leukoplakien waren 62.5 % positiv für HPV-16, in den Proben von homogenen Leukoplakien konnte in 45.5% HPV 16 nachgewiesen werden. Anderere HPV Typen wurden in dieser Studie nicht untersucht. (Nielsen et al. 1996).

Eine deutlich geringere HPV-Nachweisrate zeigen Arbeiten, in denen ausschließlich die PCR eingesetzt und auf anschließende Hybridisierung verzichtet wurde: (Mao 1996, Miller und White 1996): In der Studie von Mao waren 31% der Patienten mit Mundschleimhauterkrankungen mit überwiegend leichten Epitheldysplasien HPV- positiv. Etwa ein Drittel der als prämaligne oder als Karzinoma in situ eingestuft Proben waren ebenfalls positiv für HPV. Als Untersuchungsmethode wurde ausschließlich die PCR mit

Primern für HPV- General genutzt. Eine weitergehende HPV- Typisierung erfolgte nicht.

Ein zusammenfassender Literaturüberblick von Miller und White zeigte eine durchschnittliche HPV-Nachweisrate von 14.8% in benignen Leukoplakien , 18.5 % in intraepithelialen Neoplasien und 37.1 % in Plattenepithelkarzinomen. In normaler Mundschleimhaut konnte in 13.5% der Fälle HPV nachgewiesen werden (Miller et al. 2001).

Abb. 4.1.



Die Abbildung 4.1. zeigt die Infektionsrate von oralen Leukoplakien mit überwiegend niedrigem Dysplasiegrad in unterschiedlichen Studien.

Bei der Detektion von HPV-DNA in Leukoplakien waren die low-risk Typen HPV-31 und HPV-6/11 tendenziell häufiger als die high-risk Typen HPV-16 und HPV-18 nachzuweisen. Diese Daten werden durch die Ergebnisse früherer Studien bestätigt (Eberlein- Gonska 1994, Miller et White 1996, Ostwald et al. 2003).

HPV-31 konnte in 12/29 Fällen festgestellt werden. HPV-18 fand sich in 3/29 Fällen.

4.2.1. HPV-Nachweis in Leukoplakien verschiedener Altersstufen

Mit dem Alter der Patienten scheint eine Veränderung der HPV-Prävalenz und des Typspektrums einherzugehen: In dem Kollektiv jüngerer Patienten zwischen 30-60 Jahren lag die HPV-Nachweisrate mit 10/17 Fällen tendenziell niedriger als bei älteren Patienten, es überwog der intermediate-risk Typ HPV-31. Im Gegensatz dazu fanden sich 8/12 der Patienten zwischen 61 und 88 Jahren HPV positiv. Dieser Befund wird durch andere Untersucher bestätigt: In einer Metaanalyse zeigte sich bei älteren Patienten eine höhere Prävalenz von HPV als bei jüngeren Patienten, häufigster Virustyp war HPV-18 (Giovanelli et al. 2001).

In der Gruppe älterer Patienten überwog in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein high-risk HPV-Typ: HPV-16 war bei 5/12 der älteren Patienten nachweisbar. Möglicherweise ist das höhere maligne Potential der high-risk HPV-Typen mitverantwortlich für die erhöhte Disposition älterer Patienten zur Malignomentwicklung.

Die Infektion mit HPV einerseits und die immunologische Abwehr der Infektion oder „Clearance“ andererseits zeigen ein individuelles, im zeitlichen Verlauf höchst unterschiedliches Bild des HPV-DNA Nachweises: Bei Verlaufskontrollen von Kindern lag ein persistierender HPV-DNA Nachweis in oraler Schleimhaut nur bei 10% in den ersten 26

Lebensmonaten. Initial war eine Infektion bei 42% der Kinder nachweisbar. Die Rate der Aquisition und der Clearance von HPV-DNA war in oraler und genitaler Schleimhaut ähnlich (Rintala et al. 2005). Insofern ist der HPV-DNA Nachweis in der Schleimhaut eine momentane Beobachtung und unterliegt -in der Balance zwischen den Faktoren Neuinfektion und immunologischer Clearance- auch deutlichen zeitlichen Schwankungen.

4.2.2. Nachweis von HPV-DNA in histologisch unterschiedlichen Leukoplakien

Untersucht wurden 26 Fälle von "Leukoplacia simplex" und 3 Fälle von "Leukoplacia verrucosa". Epitheldysplasien konnten histologisch nicht nachgewiesen werden. Der in dieser Arbeit vergleichsweise hohe Anteil von HPV positiven Läsionen ohne nachgewiesene Dysplasie liegt vermutlich in der hohen Sensitivität der Nachweismethode begründet. Augenfällig ist beim Vergleich der "einfachen Leukoplakien" mit den "verrucösen Leukoplakien" einerseits der deutliche Unterschied der Infektion mit HPV-31: Die verrucösen Leukoplakien wiesen in jeder Probe einen Befall mit HPV-31 auf, in den anderen Fällen von Leukoplakien war HPV-31 nur etwa in jeder 3. Probe nachweisbar.

Zum anderen fällt das häufige Auftreten von Mehrfachinfektionen in den "verrucösen Leukoplakien" auf. Der Nachweis mehrere HPV-Typen in einer Probe war in derartigen Geweben in 2/3 Fällen möglich. Demgegenüber zeigten sich Mehrfachinfektionen in den "einfachen Leukoplakien" nur in weniger als einem Drittel der Proben.

Die Assoziation von proliferativen verrucösen Leukoplakien zu HPV ist gut belegt. (Campisi et al. 2004 und 2005, Gopalakrishnan et al. 1997, Palefsky et al. 1995). In proliferativen verrucösen Leukoplakien fanden sich nach der Untersuchung von Palefsky et al. in 89% der Fälle Infektionen mit HPV-16. Bei Vorliegen von Epitheldysplasien in derartigen Leukoplakien konnte sogar in 5/5 (100%) der Fälle HPV - 16 nachgewiesen werden.

Proliferative verrucöse Leukoplakien (PVL) entarten in bis zu 30% der Fälle (Campisi et al. 2005, Hansen et al. 1985, Pindborg 1980, Murrah et al. 2003 und 2007, Nielsen 1996).

Dies kann als ein Indiz für eine ätiologische Bedeutung von HPV auch in der oralen Kanzerogenese gesehen werden. Nach Nielsen waren 100% der Patienten, die innerhalb von 4-12 Jahren ein Karzinom der Mundschleimhaut aus einer Leukoplakie heraus entwickelten, HPV positiv.

Das maligne Potential einer Leukoplakie steht in direkter Beziehung zum Dysplasiegrad der Läsion: Leukoplakien ohne Dysplasien können als harmlos angesehen werden, während mit zunehmender Dysplasie auch die Entartungsneigung wächst (Arndt 1997). Mit zunehmendem Dysplasiegrad von oralen Schleimhautveränderungen steigt nicht nur die Entartungswahrscheinlichkeit, sondern auch die Prävalenz von HPV nimmt zu (Miller et al. 2001, Ostwald-C et al. 2003). Leukoplakien mit Dysplasien, die ein Entartungsrisiko von bis zu 43% aufweisen, waren in einer Arbeit von Palefsky zur Hälfte mit HPV - 16 infiziert. (Palefsky et al. 1995)

In einer Untersuchung von 5 homogenen Leukoplakien war in zwei Fällen (40 %) HPV nachweisbar, bei zwei nodulären Leukoplakien, von der eine den Übergang in ein invasives Karzinom darstellte, gelang die Detektion von humanen Papillomaviren in beiden Fällen (Löning et al. 1983).

In einer anderen Arbeit, die einfache orale Leukoplakien unterschiedlichen Dysplasiegrades zum Gegenstand hatte, konnte

unabhängig von den Epitheldysplasien bei über 80 % der Leukoplakien HPV - 16 nachgewiesen werden (Maitland et al. 1987). Eine Untersuchung von HPV in 5 oralen Hyperkeratosen ohne Dysplasie und in 13 dysplastischen Hyperkeratosen, erbrachte in 38 % der nicht dysplastischen Hyperkeratosen eine Infektion mit HPV - DNA. In den Fällen mit Dysplasie konnte HPV-DNA bei 60 % nachgewiesen werden (Gonzalez Moles et al. 1994).

Schließlich zeigte eine Untersuchung von Sugiyama eine höhere HPV-16 Prävalenz in oralen Epitheldysplasien als in normaler Schleimhaut und in oralen Karzinomen. Die höchste HPV-16 Prävalenz fand sich in Epitheldysplasien, die später maligne entarteten (Sugiyama et al. 2003). Diese Zusammenhänge legen eine Beteiligung von HPV an der oralen Krebsentstehung im Sinne eines Kofaktors nahe. Möglicherweise bilden die HPV assoziierten Karzinome eine eigene Entität: In mehreren Studien wurde keine Beziehung der sonst häufigen Risikofaktoren wie Alkohol- und Tabakkonsum mit einer HPV Infektion gefunden (Baez et al. 2003, Chang et al. 2003, Dahlstrom et al. 2003, El Mofty et al. 2003 und 2007, Giovanelli et al. 2002, Hafkamp et al. 2004, Kansky et al. 2003, Ringstrom et al. 2002, Ritchie et al. 2003, Schwartz et al. 2001, Syrjänen 2004, Zhang et al. 2004).

Trotz der nachgewiesenen Korrelation zwischen dem Dysplasiegrad einer Läsion und der HPV-Prävalenz beweist die Detektion von HPV-DNA nicht zwangsläufig auch den Einfluss des Virus auf die Kanzerogenese.

Hierzu wurden parallel zum Nachweis von HPV-DNA die Expression von Onkogenen und eine Beeinflussung der Zellzyklus-Regulation durch Proteine wie p53 und pRb untersucht. (Braakenhuis et al. 2004). Genetische Veränderungen lassen vermuten, dass die Infektion mit HPV-16 ein frühes Ereignis in der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen ist (Braakenhuis et al. 2005).

4.3. HPV -Nachweis in Lichen planus/erosivum

Als Untersuchungsmaterial dienten Schleimhautabstriche von 6 Patienten mit histologisch nachgewiesenem Lichen planus und einem Patienten mit Lichen erosivum. Diese wurden auf das Vorkommen der HPV-Typen-6/11, -16, -18 und -31 untersucht. Dem Nachweis diente zunächst die PCR mit Konsensusprimern mit anschließender Hybridisierung. Nach Anwendung dieser Methoden konnte in keiner Probe HPV-DNA nachgewiesen werden. Bisherige Studien zeigten eine deutliche Abhängigkeit des HPV-Nachweises in oralen Schleimhautproben von der Sensitivität der Nachweismethode (Ostwald et al. 2003).

Nach einer Reamplifikation der Proben zeigte sich eine Probe als positiv für HPV. Eine anschließende Hybridisierung liess in drei Fällen HPV erkennen, zwei davon in Proben von Lichen planus, eine in einem Lichen erosivum.

In der Kontrollgruppe von 33 Gesunden konnte hingegen nach gleicher Behandlung kein HPV nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht in etwa dem einer Studie von Cox (Cox M. 1993): Hier fanden sich unter Verwendung der Southern- Blot- Hybridisierung drei von vier Patienten mit Lichen planus positiv für HPV . Allerdings zeigten bei Cox et al. auch 3 von 5 Patienten mit normaler Schleimhaut einen HPV positiven Befund.

Eine Spezifizierung von HPV-Subtypen erfolgte mittels PCR und anschließender Hybridisierung mit spezifischen Sonden. Auf diese Weise konnten 2 Fälle von HPV-16, jeweils ein Fall von HPV-6/11 und HPV- 18 sowie 2 Fälle von HPV-31 detektiert werden. Die Lichen erosivum-Probe beinhaltete HPV-31. Darüberhinaus konnten in 2 Fällen Mehrfachinfektionen nachgewiesen werden.

Ostwald et al. fanden bei 2 von 65 untersuchten Patienten mit oralem Lichen planus eine Infektion mit HPV -16 oder HPV-18. In einer späteren Untersuchung mittels PCR und Southern- Blot-Analyse konnten diese

Autoren jedoch in 6 der 65 Fälle von Lichen planus HPV-16 und -18 nachweisen (Ostwald et al. 1992 und 2003).

4.4. HPV-Nachweis in gesunder Kontrollgruppe

Die Untersuchung der klinisch unauffällig erscheinenden Mundschleimhautproben auf einen HPV-DNA Nachweis erfolgte mit der gleichen Methode, mit der auch die pathologischen Mundschleimhautproben untersucht wurden.

In einer der Proben von gesunder Schleimhaut konnte HPV-DNA nach Anwendung der höchsten Sensitivitätsstufe nachgewiesen werden. Eine Typisierung gelang mit den spezifischen Sonden nicht. Es muss also ein anderer HPV-Typ vorliegen, der nicht den hier untersuchten entspricht. Auch andere Studien dokumentieren die geringe HPV-Prävalenz bei gesunden Probanden (Nielsen 1996, Jimenez et al. 2001).

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt die Präsenz von HPV-DNA und verschiedener HPV-Subtypen in Abstrichproben von oralen Schleimhautläsionen und von Abstrichen normaler Schleimhaut. Es erfolgte der spezifische Nachweis verschiedener Risikoklassen von HPV. Die unterschiedlichen Risikoklassen leiten sich aus dem onkogenen Potential in Bezug auf das Zervixkarzinom ab. Die herausragende Rolle von HPV in der Karzinogenese der meisten Zervixkarzinome ist bekannt.

Einmalig in der Karzinomprävention kann seit 2006 dieser infektiösen Genese des Zervixkarzinoms mit einem HPV-Impfstoff begegnet werden. Die HPV-Impfung verhindert die Infektion mit HPV und schützt auf diese Weise vor einem Karzinom.

Die Assoziation von HPV mit der Entwicklung oraler Karzinome scheint demgegenüber geringer ausgeprägt.

Wenig bekannt ist die Prävalenz von HPV in normaler Mundschleimhaut und in potentiell prämaligen Keratosen wie Leukoplakien oder dem Lichen planus. In dieser Arbeit wurden 29 Proben von Leukoplakien, 7 Proben von Lichen planus/erosivum, 4 Proben von unspezifischen Entzündungen, sowie 33 normale Mundschleimhautproben bearbeitet.

Der HPV-Nachweis ist in hohem Maße von den verwendeten Nachweismethoden abhängig. Dies konnte auch in dieser Untersuchung gezeigt werden, indem nach initialer PCR eine Reamplifikation erfolgte. Es resultierte eine deutlich erhöhte Nachweisrate von HPV-DNA. Die Subtypisierung erfolgte mit einer Hybridisierung der PCR Produkte mit typspezifischen Oligonucleotidsonden. Die erforderlichen Waschlösungen und Temperaturprogramme wurden darauf abgestimmt und optimiert.

Mit der Kontrollgruppe von unauffälligen Schleimhautproben wurde in gleicher Weise verfahren.

Ein HPV-DNA Nachweis gelang in 22/29 der Leukoplakien, in 4/7 der Fälle von Lichen planus/erosivum und in 3/4 der unspezifischen Entzündungen. Demgegenüber fand sich in normaler Schleimhaut nur in einer von 33 Proben HPV.

In den Leukoplakien fand sich DNA des HPV-Typ-31 mit 12/29 am häufigsten. HPV-6/11-DNA wurde in 9/29 Fällen detektiert. Die High-risk HPV-Typen -16 und -18 waren in 7/29 bzw. in 3/29 Fällen nachweisbar. Mehrfachinfektionen mit verschiedenen Virustypen kamen vor, die einzige Mehrfachinfektion mit allen untersuchten HPV-Typen zeigte sich in der Probe einer verrucösen Leukoplakie.

Um eine prognostische Wertigkeit bezüglich der HPV-Infektion im Hinblick auf ein onkogenes Risiko abzugeben, bedürfte es einer prospektiven Studie.

6. Bibliographie

Agarwal, R; Saraswat A (2002): Oral lichen planus: An update
Drugs-of-Today.38:(8): 533-547

Andreasen, JO; (1968): Oral lichen planus. A histologic evaluation of ninety-seven cases. Oral Surg 25: 158

Arndt, O; (1997): High risk types in oral and laryngeal papilloma and leukoplakia. Laryngorhinootologie 1997 Mar; 76(3): 142-9

Axell, T; (1975): A preliminary report of oral mucosal lesions in an adult Swedish population. Odonol Revy 27: 1-103

Baez, A; Almodovar JI, Cantor A, Celestin F, Cruz-Cruz L, Fonseca S, Trinidad-Pinedo J, Vega W (2003): High frequency of HPV16-associated head and neck squamous cell carcinoma in the Puerto Rican population. Head-Neck. 26(9): 778-84

Bagan, JV; Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Milian MA, Murillo J, Scully C (2003): Proliferative verrucous leukoplakia: a high incidence of gingival squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2003 Aug; 32(7): 379-82

Baker, CC; (1987): Sequence analysis of papillomavirus genomes. In: Salzman MP, Howley PM (eds): The Papovaviridae vol 2, The Papillomaviruses. Plenum Press, New York, 321-385

Banowsky, J; Sugar L (1972): Longitudinal studies in oral leukoplakias. J Oral Pathol 1 265

Banoczy, J; Sugar L (1977): Follow up studies in oral leukoplakia.

J Max fac Surg 5: 69

Bauer, HM; Greer CE, Manos MM (1992): Determination of genital HPV infektion by consensus PCR amplification. MI 42 131-152

Bauer, HM; Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, Cadell DM, Kurman RJ, Manos MM (1993): Determinants of genital human papillomavirus infection in low risk women in Portland,Oregon. Sex Transm Dis 20: 274-278

Becker, J;Schuppan D (1995): Altered expression of extracellular matrix proteins and integrins in oral lichen planus (OLP). J Oral Pathol Med 24: 159-164

Bekkers, RL; Massuger LF, Bulten J, Melchers WJ (2004): Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. Rev-Med-Virol. 14(2): 95-105

Beral, V; Hermon C, Munoz N, Devesa SS (1994): Cervical cancer Cancer-Surv. 19- 20: 265 - 285

Bergeron, C; Barasso R, Beaudenon S, Flamant P, Croissant O, Orth G (1992): Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia. Am J Surg Pathol 16: 641-649

Bernard, HU; Chan SY, Delius H (1994): Evolution of human papillomaviruses. In: zur Hausen H: Human pathogenic papillomaviruses. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp: 34-54

Blons, H; Laurent-Puig P (2003): TP53 and head and neck neoplasms. Hum-Mutat. 2003 Mar; 21(3): 252-7

Bosch, FX; Schwarz E, Boukamp P, Fusening NE, Bartsch D, zur Hausen H (1992): Suppression in vivo of human papillomavirus type 18E6-E7 gene expression in non tumorigenic HeLa-fibroblast hybrid cells. J Virol 64: 4743

Bouquot, JE; und Gorlin, RJ (1986): Leukoplakia; lichen planus, and other oral keratoses in 23.616 white Americans over the age of 35 years. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 61: 373-381

Braakhuis, BJ; Brakenhoff RH, Leemans CR (2005): Head and neck cancer. Molecular carcinogenesis. Ann oncol. 2005; 16 Suppl 2:ii249-50

Braakhuis, BJ; Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2004): Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. J-Natl-Cancer-Inst. 2004 Jul 7;96: (13): 998-1006

Brachmann, DG; Graves D, Vokes E, Beckett M, Haraf D, Montag A, Dunphy E, Mick R, Yandell D, Weichselbaum RR (1992): Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus in head and neck cancer. Cancer Res 52: 4832-4836

Brandsma, JL; Abramson AL (1989): Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 115: 621-625

Brennan, MM; Lambkin HA, Sheehan CD, Ryan DD, O'Connor TC, Kealy WF (2001): Detection of high-risk subtypes of human papillomavirus in cervical swabs: Routine use of the Digene Hybrid Capture< trademark > assay and polymerase chain reaction analysis British-Journal-of-Biomedical-Science. 2001; 58(1): 24-29

Burghard, A; Maerker R (1981): Vor- und Frühstadien des Mundhöhlenkarzinoms. Hanser Verlag München.

Butterworth, CE; Hatch K, Macaluso M, Cole P, Sauberlich H, Soong SJ, Borst M, Baker V (1992): Folate deficiency and cervical dysplasia. JAMA 267: 528-533

Campisi, G; Giovaneli L, Ammatuna P, Capra G, Collela G, Di Liberto C. (2004): Proliferative verrucous leukoplakia: no significantly increased risk of HPV Infektion. Oral Oncol. 2004 Sep; 40(8):835-840

Campisi, G; Giovaneli L, Arico P, Lama A (2004): Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod, 98(6):705-11

Campisi, G; DiFede O, Giovaneli G, Capra G, Greco I, Calvino F (2005): Use of fuzzy neural networks in modeling relationships of HPV infection with apoptotic and proliferation markers in potentially malignant oral lesions. Oral Oncol. 2005 Nov; 41(10): 994-1004.

Cardozo-Pereira, AL; Castro-Jacques M; Cabral MG, Cardoso AS, Ramos-e-Silva M (2004): Oral lichen planus part II: therapy and malignant transformation. Skinmed. 3:(1): 19-22

Castle, PE; Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Wacholder S, Tarone R, Burk RD (2005): A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Costa Rica. J Infect Dis. 2005 Jun 1 ; 191(11) :1808-16

Chan, SY; Bernard HU, Ong CK, Chan SP, Hoffmann B, Delius H (1992): Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. J Virol 66: 714-725

Chang, F; Syrjänen S, Nuutinen J, Kärjä J, Syrjänen K (1990): Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous carcinomas by in situ hybridisation and polymerase chain reaktion. Clin Otolaryngol 15: 177-188

Chang, KC; Su IJ, Tsai ST, Shieh DB, Jin YT (2002): Pathological features of betel quid-related oral epithelial lesions in Taiwan with special emphasis on the tumor progression and human papillomavirus association. Oncolog 63:(4): 362-369

Chang, JY; Lin MC, Chiang CP (2003): High-risk human papillomaviruses may have an important role in non-oral habits-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan.
Am-J-Clin-Pathol.120(6): 909-16

Chen, PC; Kuo C, Pan CC, Chou MY (2002): Risk of oral cancer associated with human papillomavirus infection, betel quid chewing, and cigarette smoking in Taiwan--an integrated molecular and epidemiological study of 58 cases. J-Oral-Pathol-Med. 31(6): 317-22

Chomczynshi, P; Sacchi N, (1987): Single step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Am Biochem 1987 162: 156-159

Chong, T; Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU (1991): The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-1, NF-1, and AP-1 participate in epithelial cell specific transcription. J Virol 65: 5933-5943

Correnti, M; Rivera H, Cavazza ME (2004): Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. Oral-Dis. 10 :(3): 163-6

Cortezzi, SS; Provazzi PJ, Sobrinho JS, Mann-Prado JC, Reis PMP, De-Freitas SE, Filho JF, Fukuyama EE, Cordeiro JA, Cury PM, Maniglia JV, Villa LL, Tajara EH, Rahal P (2004): Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism head and neck squamous cell carcinomas *Cancer-Genetics-and-Cytogenetics*. 150(1): 44

Cowan, CG; Gregg TA, Napier SS, McKenna SM, Kee F (2001): Potentially malignant oral lesions in northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral-Dis*.7(1): 18-24

Cox, M; Maitland N, Scully C (1993): HSV 1 and HPV type16 homologous DNA sequences in normal, potentially malignant and malignant oral mucosa *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1993 Jul; 29B (3): 215-9.

Christophers, E; Ständer M (1992): *Haut und Geschlechtskrankheiten* 5. Auflage Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore: 82

Dahlstrom, KR; Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, Spitz MR, Schiller JT, Wie Q, Sturgis EM (2003): Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis.*Clin-Cancer-Res*. 2003 Jul; 9(7): 2620-6

Dai, M; Clifford GM, le-Calvez F, Castellsague X, Snijders PJ, Pawlita M, Herrero R, Hainaut P, Franceschi, S (2004): Human papillomavirus type 16 and TP53 mutation in oral cancer: matched analysis of the IARC multicenter study. *Cancer-Res*.64:(2): 468-71

De, Oliveira DE, (2006) : DNA viruses in human cancer. *Cancer Lett*. 2006 Jun 28.

DeVilliers, EM, (2003): Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int-J-Cancer*. 2003 Mar 1; 103(6): 705-8

DeVilliers, EM; (1989): Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 63: 4898-4903

DeVilliers, EM; Weidenauer H, Otto H, zur Hausen H, (1985): Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 1985 36: 575

Duensing, S; Munger, (2003): Centrosomes, genomic instability, and cervical carcinogenesis. *Crit-Rev-Eukaryot-Gene-Expr*. 13(1): 9-23

Dürst, M; (1989): The human papillomaviruses: Classification and molecular biology. *Clinical Practice of Gynecology* 2: 29-41

Duggan, MA; McGregor SE, Benoit JL, Inoue M, Nation JG, Stuart GC (1995): The human papillomavirus status of invasive cervical adenocarcinoma: a clinicopathological and outcome analysis. *Hum Pathol* 26 (3): 319-325

Egawa, K; (1994): New types of human papillomaviruses and intracytoplasmic inclusion bodies: A classification of inclusion warts according to clinical features, histology and associated HPV types. *Br J Dermatol* 130

Egawa, K; Delius H, Matsukura T, Kawashima M, DeVilliers EM (1993): Two novel types of human papillomavirus, HPV-63 and HPV-65: comparisons of their clinical and histological features and DNA sequences to other HPV types. *Virology* 194: 789-799

El-Mofty, SK; Lu DW (2003): Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am-J-Surg-Pathol.* (11): 1463-70

El-Mofty, SK; Patil S, (2006): Human papillomavirus (HPV) –related oropharyngeal nonkeratinizing squamous cell carcinoma: characterization Of a distinct phenotype. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 101(3): 339-345

El-Mofty, SK; (2007): HPV - related carcinomas of the upper aerodigestive tract. North American Society for Head and neck Pathology Companion Meeting USCAP 2007.

Eisen, D; (2002): The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: A study of 723 patients *Journal-of-the-American-Academy-of-Dermatology.* 2002;

Ensser, A; Pfister H (1990): Epidermodysplasia verruciformis associated human papillomavirus present a subgenus-specific organization of the regulatory genome region. *Nucleic Acids Res* 18: 3919-3922

Eversole, LR; (2000): Papillary lesions of the oral cavity. *J Calif. Dent. Assoc.* 2000 Dez., 28 (12):922-7.

Fiedler, M; Muller-Holzner E, Viertler HP, Widschwendter A, Laich A, Pfister G, Spoden GA, Jansen-Durr P, Zwerschke W (2004): High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRb -levels in cervical biopsies. FASEB-J.18: (10): 1120-2

Fischer, DJ; Epstein JB, Morton jr. TH, Schwartz SM (2004): Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral premalignant lesions. Journal-of-Oral-Pathology-and-Medicine 33:(2): 65

Fischer, M; Von-Winterfeld F (2003):Evaluation and application of a broad-spectrum polymerase chain reaction assay for human papillomaviruses in the screening of squamous cell tumours of the head and neck Acta-Oto-Laryngologica. 123: (6): 752-758

Fisher, SG; (1994): Epidemiology: A tool for the study of human papillomavirus-related carcinogenesis. Inter Virology 37: 215-225

Franco, EL; Schlecht NF, Saslow D (2003): The epidemiology of cervical cancer. Cancer-J.Sep-Oct; 9(5): 348-59

Friend, SH; Horowitz JM, Gerber MR, Wang XF, Bogenmann E, Liu FP, Weinberg RA (1987): Deletions of a DNA sequenz in retinoblastomas and mesenchymal tumors: Organisation of the sequence and its encoded protein, Proc. Natl. Acad. Sci., A 84: 9059-9063

Fuchs, PG; Girardi F, Pfister H, (1988): Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. Int J Cancer 41: 41-45

Furrer, VE; Benitez MB, Furnes M, Lanfranchi HE, Modesti NM (2006): Biopsy vs scraping: detection of human papillomavirus 6,11,16 and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. J Oral Path Med. 2006 Jul;35(6):388-44.

Gasco, M; Crook, T (2003): The p53 network in head and neck cancer. Oral-Oncol. 2003 Apr; 39(3): 222-31

Gillison, ML; Koch WM, Cupone RB, Spafford M, Westra WH (2000): Evidence for a Causal Association between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. J. Nat. Canc. Inst. 92: (9) 709-718

Giovannelli, L; Campisi G; Colella G, Capra G, Di Liberto C, Ammatuna P. (2006): Brushing of oral mucosa for diagnosis of HPV infection in patients with potentially malignant and malignant oral mucosa. Mol Diagn Ther. 2006; 10(1):49-55

Giovannelli, L; Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, Ammatuna (2002): Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions Journal-of-Infectious-Diseases. 185:(6): 833-836

Gissmann, L; Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürck HG, zur Hausen H (1983): Human papillomavirus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. Proc Natl Acad Sci USA 80: 506-563

Gonzales Moles, MA; Ruiz Avila I, Gonzales Moles S, Martinez I, Ceballos A, Nogales F (1994): Detection of HPV DNA by in situ hybridization in benign, premalignant, and malignant lesions of the oral mucosa. Bull Group Int Rech Sci Stomatol 37 (3-4): 79-85

Gopalakrishnan, R; Weghorst CM, Lehmann TA, Calvert RJ, Bijur G, Sabourin CL, Mallery SR, Schuller DE (1997): Mutated and wild-type p53 expression and HPV integration in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; 1997 Apr, 83 (4): 471-7

Greer, RO; Eversdole LR, Crosby LK (1990): Detektion of human papillomavirus-genomic DNA in oral epithelial dysplasias, oral smokeless tobacco associated leukoplakias, and epithelial malignancies. J Oral Maxillofac Surg 48: 1201-1205

Gross, G; Gundlach K, Reichart PA (2001): Virus infections and tumors of the oral mucosae. Symposium of the "Arbeitskreis Oralpathologie und Oralmedizin" and the "Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Infektiologie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft". Eur-J-Med-Res. 6(10): 440-58

Gundlach, KKH; (1992): Wieviele Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle sind aus Leukoplakien entstanden? Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir 16: 109-111

Ha, PK; Califano JA (2004): The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. Crit-Rev-Oral-Biol-Med.15(4): 188-96

Hafkamp, HC; Manni JJ, Speel EJ (2004): To review the literature on the role of oncogenic human papillomaviruses (HPVs) in the carcinogenesis of the head and neck mucosa. Acta-Otolaryngol. 124: (4): 520-6

Hansen, L; Olson J, Silverman Jr S (1985): Proliferative verrucous leukoplakia. A long term study of thirty patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1985: 60

Harper, DM; Franco E, Wheeler C (2004): Efficacy of a bivalent L1 virus like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised trial. *Lancet* 2004; 364 (9447):1757-1765

Hedberg, N; Ng A, Hunter N (1986): A semiquantitative assessment of the histopathology of oral lichen planus. *J Oral Pathol* 15: 268

Hellberg, D; Nilsson S, Grad A, Hongxin J, Fujii C, Syrjänen S, Syrjänen K (1993): Behaviour of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) associated with various human papillomavirus (HPV) types. *Arch Gynecol Obstet* 252: 119-128

Hemminki, K; Dong C, Frisch M (2000): Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands *European-Journal-of-Cancer-Prevention*. 2000; 9(6): 433-437

Hernandez, BY; McDuffie K, Wilkens LR, Kamemoto L, Goodman MT (2003): Diet and premalignant lesions of the cervix: evidence of a protective role for folate, riboflavin, thiamin, and vitamin B12. *Cancer-Causes-Control*. 14: (9): 859-70

Herrero, R; Brinton LA, Szklo M, Reeves WC, Brenes MM, Tenorio F, de Britton RC, Gaitan E, Garcia M, Rawls M (1989): Invasive cancer and smoking in Latin America. *J Natl Cancer Inst* 81: 205-211

Hogewind, WFC, Waal I van der (1988): Leukoplakia of the labial commissure. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988, 26, 33-140

Höltke, H ; Seibl R, Burg J, Mühlegger K, Kessler C, (1990): Non radioactive Labeling and Detection of Nucleic acidr. II: Optimisation of the Digoxigenin System. Biol Chem Hoppe-Seyler 371: 929-938

Holmstrup, P; Thorn JJ, Rindum J, Pindborg JJ (1988): Malignant development of lichen planus-affected oral mucosa. J Oral Pat`ol 17:II. Follow-up on 200 patients, clinical characteristics and associated malignancy. Oral Surg 37: 705

Hornstein, OP; (1977): Orale Leukoplakien. @tsch zahnärztl Z 32 497-505

Ishi, K; Saito A, Kina K, Kawashima T, Suzuki F, Utsuno H, Nakamura H, Igari J (1995): HPV infektion of the uterine cervix by cytodiagnosis, histodiagnosis and dot blot hybridization method. Cancer Lett. 89 (2): 177-181

Jablonska, S; Orth G, Obalek S, Croissant O, (1985): Cutaneous warts. Clinical, histological and virological correlations. In: Jablonska S, Orth G (eds): Clinics in dermatology, vol 3 Lippincott, Philadelphia, pp 71-82

Jeon, JH; Cho SY, Kim JW, Shin DM, Kwon JC, Choi KH, Kim IG (2002): Improved immunodetection of human papillomavirus E7. Exp-Mol-Med.34(6): 496-9

Jimenez, C; Correnti M, Salma N, Cavazza ME, Perrone M (2001): Detection of human papillomavirus DNA in benign oral squamous epithelial lesions in Venezuela. J-Oral-Pathol-Med. 30(7): 385-8

Kadish, AS; Hagan RJ, Ritter DB, Goldberg GL, Romney SL, Kanetsky PA, Beiss BK, Burk RD (1992): Biologic characteristics of specific human papillomavirus types predicted from morphology of cervical lesions. Hum Pathol 23: 1262-1269

Kanao, H; Enomoto T, Ueda Y, Fujita M, Nakashima R, Ueno Y, Miyatake T, Yoshizaki T, Buzard GS, Kimura T, Yoshino K, Murata Y (2004): Correlation between p14(ARF)/p16(INK4A) expression and HPV infection in uterine cervical cancer. Cancer-Lett. 2004 Sep 15; 213(1):31-7

Kansky, AA; Poljak M, Seme K, Kocjan BJ, Gale N, Luzar B, Golouh R (2003): Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. Acta-Virol.: 47(1): 11-6

Kaplan, B; Barnes L (1985): Oral lichen planus and squamous carcinoma. Case report and update of the literature. Arch Otolaryngol 111: 543

Karabulut, A; Reibel J, Therkildsen MH, Praetorius F, Nielsen HW, Dabelsteen E, (1995): Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. J Oral Pathol Med 24(5): 198-200

Kashima, H; Kutcher M, Kesis T, Levin LS, De Villiers EM, Shah K, (1990): Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus, and clinically normal epithelium of the oral cavity. Ann Otol Rhino Laryngol 1990;99,55-61

Kaugars, GE; Svirsky JA (1982): An update on the dysplastic/carcinomatous transformation of oral lichen planus. J Oral Med 37: 75

Kiviat, NB; Koutsky LA (1993): Specific human papillomavirus types as the causal agents of most cervical intraepithelial neoplasia: Implications for current views and treatment.
J Natl Cancer Inst 85: 934-935

Klussmann, JP; Dinh S, Guntinas-Lichius O, Wittekindt C, Weissenborn S, Wieland U, Dienes HP, Hoffmann T, Smith E, Turek L, Speel EJ, Pfister HJ (2004): HPV-assoziierte Tonsillenkarzinome. Ein Update. HNO. 52 : (3): 208-18

Klussmann, JP; Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003): Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: A different tumor entity? Med-Microbiol-Immunol-(Berl).192(3): 129-32

Kövesi, G; Banosczy J (1973): Follow-up studies in oral lichen planus. Int J Oral Surg 2: 13

Kövesi, G; Szende B (2001) : Prognostic significance of cyclin D1, p27 and p63 expression in oral leukoplakia. Magy Onkol 2004; 48 (4):309-13

Koutsky, LA; Galloway DA, Holmes KK (1988): Epidemiology of genital papillomavirus infection. Epidemiol Rev 10: 122

Koutsky, LA; Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Galloway DA, Vernon D, Kiviat NB (1992): Cohort study of risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 associated with cervical papillomavirus infection. N Engl J Med 327: 1272-1278

Kreimer, AR; Alberg, AJ, Viscidi R, Gillison ML (2004): Gender differences in sexual Biomarkers and behaviors associated with Human papillomavirus seroprevalence. Sex Transm Dis. 31: (4): 247-256.

Krogh, P; Hald B, Holmstrup P (1987): Possible mycological etiology of oral mucosal cancer. Carcinogenesis 1987,8, 1543-48.

Kronenberg, K; Fretzin D, Potter B (1971) Malignant degeneration of lichen planus. Arch Dermatol 104:304-307

Kühler-Obbarius C; Milde-Langosch K, Helling-Giese G, Salfelder A, Peimann C, Löning TH (1994a): Polymerase chain reaction-assisted papillomavirus detection in cervicovaginal smears: stratification by clinical risk and cytology repeats.
Virch Arch 425: 157-163

Kühler-Obbarius C; Milde-Langosch K, Löning TH, Stegner HE (1994 b): Polymerase chain reaction - assisted evaluation of low and high grade squamous intraepithelial lesion cytology and reappraisal of the Bethesda system. Acta Cytol 38: 681-686

Kuffer, R; Lombardi T (2002): Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN).
Oral-Oncol. 38(2): 125-30

Kumar, RV; Kadkol SS, Daniel R, Shenoy AM, Shah KV (2003): Human papillomavirus, p53 and Cyclin D1 expression in oropharyngeal Carcinoma. Int- J-Oral-Maxillofac-Surg. 32 :(5): 539-543

Kurose, K; Terai M, Soedarsono N, Rabello D, Nakajima Y, Burk RD, Takagi M (2004): Low prevalence of HPV infection and its natural history in normal oralmucosa among volunteers on Miyako Island, Japan. *Oral-Surg-Oral-Med-Oral-Pathol-Oral-Radiol-Endod.* 98(1): 91-6

Kwok, S; Higuchi R (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237-238

Lanfranchi-Tizeira, HE; Aguas SC, Sano SM (2003): Malignant transformation of atypical oral lichen planus: A review of 32 cases. *Medicina-Oral.* 8:(1): 2-9

Lazzari, CM; Krug LP, Quadros OF, Baldi CB, Bozetti MC (2004): Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med.* 33:(5):260-263

Li, W; Thompson CH, Cossart YE, O'Brien CJ, Liu J, Scolyer A, Carter JR, Dalrymple C, Rose BR (2004): The site of infection and ethnicity of the patient influence the biological pathways to HPV-induced mucosal cancer. *Mod-Pathol.*: 17(9): 1031-7

Löning, TH; Reichart P, Staquet MJ, Becker J, Thivolet J (1983): Occurrence of papillomavirus structural antigens in oral papillomas and leukoplakias. *J Oral Pathol* 13: 155-165

Löning, TH; Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H, (1985): Analysis of oral papillomas, leukoplakias and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Derm* 1985 84: 417

Lörincz, AT; Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ (1992): Human papillomavirusinfection of the cervix: Relative risk associations of 15 common anogenital types. Obstet Gynecol 79: 328-337

Maitland, NJ; Cox MF, Lynas C, Prime SS, Meanwell CA, Scully C (1987): Detection of human papillomavirus DNA in Biopsies of human oral tissue. Br J Cancer 56: 245-250

MAO, EJ; Schwartz SM, Daling JR, Oda D, Tickman L, Beckmann AM (1996): Human papilloma viruses and p53 mutations in normal, pre-malignant and malignant oral epithelial. Int J Cancer 1996 Apr 22; 69(2): 152-8

Marder, MZ; Deesen KC (1982): Transformation of oral lichen planus to squamous cell carcinoma: A literature review and report of case. J Am Dent Assoc 105: 55

Mattsson, U; Jontell M; Holmstrup P (2002): Oral lichen planus and malignant transformation: is a recall of patients justified? Crit-Rev-Oral-Biol-Med.13(5): 390-6

Mehta, FS; Shroff BC, Gupta PC, Dattario K (1972): Oral leukoplakia in relation to tobacco habits. A ten year follow-up studie of Bombay policemen. Oral Surg 34: 42

Meisels, A; und Fortin, R (1976): Condylomatous lesions of the cervix and vagina. Cytologic patterns. Acta Cytol 20: 505

Milde-Langosch, K; Albrecht K, Joran S, Giessing M, Löning T (1994): HPV Infektion and p53 mutation in cervical and vulvar carcinomas and their metastases and Recurrences. 13. Int papillomavirus conference, Amsterdam: pp 35

Milde-Langosch, K; Albrecht K, Joran S, Schlechte H, Giessing M, Löning T (1995): Presence and persistence of HPV - infection and p53 mutation in cancer of the cervix uteri and the vulva. Int J Cancer.

Milde-Langosch, K; Löning T (1994): Viral carcinogenesis in uterine neoplasia. Arch STD/HIV Res 8: 113-136

Milde-Langosch, K; Schreiber C, Becker G, Löning T, Stegner H-E (1993): Human papillomavirus - detection in cervical adenocarcinoma by polymerase chain reaction. Hum Pathol 24: 590-594

Miller, CS; Johnstone BM (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(6): 622-35

Miller, CS; White DK (1996): HPV in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 82: (1): 57-68

Mignogna, MD; Lo-Muzio L, Lo-Russo L, Fedele S, Ruoppo E, Bucci E (2001): Clinical guidelines in early detection of oral squamous cell carcinoma arising in oral lichen planus: a 5-year experience. Oral-Oncol. 37(3): 262-7

Mignogna, MD; Lo-Russo L, Fedele S, Ruoppo E, Califano L, Lo-Muzio L (2002): Clinical behaviour of malignant transforming oral lichen planus European-Journal-of-Surgical-Oncology. 28 :(8): 838-843

Molden, T; Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Hagmar B (2006): Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30years of age. Gynecol Oncol 2006 Jan; 100(1):95-100

Mork, J; Lie AK, Glattre E, Clark S, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Moller B, Pukkala E, Schiller JT, Wang Z, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J (2002): Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. Tidsskrift-for-den-Norske-Laegeforening.

Motoyama, S; Ladines Llave CA, Luis-Villanueva S, Maruo A (2004): The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. Kobe-J-Med-Sci. 2004; 50(1): 9-19

Mounts, Ph; Shah KV, Kashima H (1982): Viral etiology of juvenile- and adult- onset squamous papilloma of the larynx. Proc Nat Acad Sci USA 79: 5425-5429

Muñoz, N; Bosch FX, de Sanjosé S, Tafur L, Izarzugaza I, Gilli M, et al. (1992): The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer, a population based study in Colombia and Spain. Int J Cancer 52: 743

Murrah, VA; Gilchrist EP (2003): Estrogen effects on progressive oral neoplasia in K14-HPV 16 transgenic mice. J Dent Res (Spec Issue A): 0516, 2003

Murti, PR; Daftary DK, Bhonsle RB, Gupta PC, Mehta FS, Pindborg JJ (1986): Malignant potential of lichen planus: observations in 722 patients from India. J Oral Pathol 15: 71 219-225

Nagpal, JK; Patnaik S, Das BR (2002): Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with P53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. Int-J-Cancer. 97:(5): 649-53

Negrini, BP; Schiffman MH, Kurman RJ, Barnes W, Lannom L, Malley K, Brinton LA, Delgado G, Jones S, Tschabo J, Lancaster WD (1990): Oral contraceptive use, human papillomavirus detection, and high risk of early cytologic abnormalities of the cervix. Cancer Res 50: 3610-3613

Nielsen, H; et al. (1996): Human papillomavirus in oral premalignant lesions. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1996 Jul; 32B(4): 264-70

Ostwald, C; Müller P, Barten M, Löning T, (1992) PCR-assisted analysis of HPV infections of the oral mucosa. Abstract, VI. Kongress der Internationalen Vereinigung der Oralpathologen, Hamburg

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. Medical-Microbiology-and-Immunology. 192 :(3): 145-148

Palefsky, JM; Silverman Jr S, Abdel-Salaam M, Daniels TE, Greenspan JS (1995): Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16. J Oral Pathol Med 1995 24: 193-197

Pérez-Ayala, M; Ruiz - Cabello F, Esteban F, Concha A, Redondo M,Olivia MR, Cabrera T, Garrido F (1990): Presence of HPV - 16 sequences in laryngeal carcinomas. *Int J Cancer* 46: 8-11

Petry, KU; Kupsch E, Luck HJ, Werner M (1993):
Correlation of human papillomavirus DNA detection in biopsies of cervical Lesions and the corresponding cervical swabs with the same method of in situ hybridization. *Acta-Virol.* 37(4): 251-7

Pett, MR; Alazawi WO, Roberts I, Downen S, Smith DI, Stanley MA, Coleman N (2004): Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer-Res.* 64(4): 1359-68

Pfister, H; (1990): Molekular biology of genital HPV infections. In: Gross G, Jablonska S, Pfister H, Stegner N (eds): *Genital papillomavfirus infections.* Springer, Berlin Heideilberg New York, pp 37-49

Pindborg, JJ; Renstrup G, Poulsen HE, Silverman S (1963): Studies in oral leukoplakias. V. clinical and histologic signs of malignancy. *Act odont Scand* 21: 407

Pindborg, JJ; (1980): *Oral Cancer and Precancer.* Bristol, John Wright & Sons.

Postma, TC; Van-Heerden W-F (2003): Is the human papillomavirus a mutual aetiological agent in oral and cervical squamous cell carcinoma? *Anticancer-Res.:* 23(4): 3509-12

Potischman, N; Herrero R, Brinton LA, Reeves WC, Stacewicz - Sapuntzakis M, Jones CJ, Brenes MM, Tenorio F, de Britton RC, Gaitan E (1991): A case-control study of nutrient status and invasive cervical cancer II. Serological indicators. Am J Epidemiol 134: 1347-1355

Purola, E; und Savia, E; (1976): Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. Acta Cytol 21: 26

Premoli-De-Percoco, G; Ramirez JL (2001): High risk human papillomavirus in oral squamous carcinoma: evidence of risk factors in a Venezuelan rural population. Preliminary report. J-Oral-Pathol-Med.30(6): 355-61

Quick, CA; Farras A, Krzyzek R (1978): The etiology of laryngeal papillomatosis. Laryngoscope 88: 1789-1795

Ragin, CC; Reshmi SC, Gollin SM (2004): Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. Int-J-Cancer.110(5): 701-9

Reeves, WC; Rawls WE, Brinton LA (1989): Epidemiology of genital papillomaviruses and cervical cancer. Rev Inf Dis 11: 426-439

Reichart, PA; (2003): Oral precancerous conditions-an overview Mund-Kiefer-Gesichtschir.7(4): 201-7

Remmerbach, TW; Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kuhndel K, Liebert UG (2004): PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: Comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets Journal-of-Clinical-Virology. 30(4): 302-308

Riethdorf, S; Friedrich SE, Ostwald C, Barten M, Löning T (1997): p 53 gene mutations and HPV infection in head and neck cancer.

J Oral Path Med 97 Aug, 26 (7):315-21

Ringstrom, E; Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT (2002): Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin-Cancer-Res. 8(10): 3187-92

Rintala, MA; Grenman SE, Jarvenkyla ME, Syrjänen KJ, Syrjänen SM (2005): High risk types of HPV DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience of the Finnish HPV Family study. Clin Infect Dis. 2005 Dec 15 ; 41 (12) :1728-33

Ritchie, JM; Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klusmann JP, Turek LP, Haugen TH, (2003): Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. Int-J-Cancer.104(3): 336-44

Rolfs, A; Schüller I, Finckh U, Weber - Rolfs I (1992): PCR: Clinical Diagnosis and Research.

Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1992

Saiki, RK; Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase. Science 239: 487-491

Saiki, RK; (1990): Amplification of genomic DNA. Innis MA (ed): PCR-Protocols: A guide to methods and applications.

Academic Press, San Diego, USA: 13-20

Saiki, RK; Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Elrich HA, Arnheim N, (1985): Enzymatic Amplifikation of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Aneamia. Science 230: 487-491

Sambrook, KJ; Fritsch EF, Maniatis T (1989): Molekular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Press USA

Scheffner, M; Romanczuk H, Münger K, Howley PM (1994): Funktions of Human Papillomavirus Proteins. In: zur Hausen H (1994): Human Papilloma Viruses , Springer Verlag Berlin, 84-99.

Schellekens, MC; Dijkman A, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Kolkman-Uljee S, Peters LA, Fleuren GJ (2004): Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jakarta, Indonesia. Gynecol-Oncol. 93(1): 49-53

Schiffman, MH; (1992): Commentary - Recent progress in definiting the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. J Natl Cancer Inst 84: 394-398

Schiffmann, MH; Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, Stanton C, Manos MM (1993): Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infektion causes most cervical intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst 85: 958-964

Schiffmann, MH; Castle PE (2005): The promise of global cervical-cancer prevention. N Engl J Med 2005; 353(20): 20101-2104.

Schiffmann, MH; Kurman RJ, Barnes W, Lancaster WD (1990): HPV infection and early cervical cytological abnormalities in 3173 Washington DC women. In: Howley P, Broker TR : Papillomaviruses. Wiley - liss, New York, pp 81-88

Schneider, A; (1994): Natural history of genital papillomavirus infections. Intervirology 37: 201-204

Schulz, J; Ermich T, Kaspar M, Raabe G, Schumann D (1992): Cytokeratin pattern of clinically intact and pathologically changed oral mucosa. Int J Oral Maxillofac Surg 21: 35-39

Schwartz, SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM (2001): Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. Otolaryngol-Head-Neck-Surg. 125(1): 1-9

Scully, C; Maitland NJ, Cox MF, Prime SS (1987): Human papillomavirus DNA and oral mucosa. Lancet 1987 1: 5356

Scully, C; Cox MF, Prime SS, Maitland NJ (1988): Papillomaviruses: The current status in relation to oral disease. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 65: 526-532

Seoane, JM; Varela-Cerelles PI, Ramirez JR, Cameselle J, Romero MA (2006): Heat shock proteins as markers of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Am J Dermatopathol. 2006 Oct; 28(5):417-22

Shibata, DK; Arnheim N, Martin WJ (1988 a): Detection of Human Papilloma Virus in Paraffin-Embedded Tissue using the Polymerase Chain Reaktion. J Exp Med 167: 225-230

Shibata, DK; Fu YS, Gupta JW, Shah KV, Arnheim N, Martin WJ, (1988 b) Detection of human Papillomavirus in Normal and Dysplastic Tissue by the Polymerase Chain Reaktion. Laboratory Investigtion 59: 555-559

Shiboski, CH; Schmidt BL, Jordan RCK. (2005): Tongue and tonsil carcinoma: Increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. Cancer 2005; 103:1843-49

Shklar, G; (1972): Lichen planus as an ulcerative disease. Oral Surg 33: 376

Shklar, G; Meyer I (1961): The histopathology and histochemistry of dermatologic lesions in the mouth. Oral Surg 14: 1069

Si, HX; Tsao SW, Poon CS, Wang LD, Wong YC, Cheung AL (2003): Viral load of HPV in esophageal squamous cell carcinoma. Int-J-Cancer. (4): 496-500

Silverman, S; Griffith M (1974): Studies on oral lichen planus. Oral Surg 37:705

Silverman, S; Gorsky M, Lozada - Nur F (1985): A prospective follow up study of 570 patients with oral lichen planus: persistence, remission, and malignant association. Oral Surg 60: 30

Singer, SJ; Tanguay RL Riggs AD (1989): Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. Amplifikations: A forum for PCR-Users 3: 11

Snijders, PJ; van den Brule AJ, Meijer CJ, Walboomers JM (1994): Papilomaviruses and cancer of the upper digestive and respiratory tracts. In: Human Papillomaviruses, H. zur Hausen, Springer Verlag Berlin Heidelberg 1994

Snijders, PJ; Cromme FV, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow GB, Meijer CJ, Walboomers JM (1992): Prevalence and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas, indicating a possibly viral etiology. Int J Cancer 51: 845-850

Southern, EM; (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517

Steinberg, BM; Topp W, Schneider PS, Abramson A (1983): Laryngeal papillomavirus infection during clinical remission. N Engl J Med 308: 1261-1265

Steinbrook, R; (2006): The potential of human papillomavirus vaccines. N Engl J Med 2006; 354(11):1109-1112

Sugar, L; Banoczy J, (1959): Untersuchungen bei Präkanzrosen der Mundschleimhaut. Dtsch Zahn-, Mund-, Kieferheilk 30:132

Sugiyama, M; Bhawal UK, 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(5): 594-600

Syrjänen, K; Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J, (1983): Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983 12: 418

Syrjanen, S; (2003): Human papillomavirus infections and oral tumors *Med-Microbiol-Immunol-(Berl)*. 192(3): 123-8

Syrjänen, S; (2004): HPV infections and tonsillar carcinoma. *J-Clin-Pathol*. 57:(5): 449-55

Syrjänen, S; Syrjänen KJ, Lamberg MA (1986): Detection of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions using in situ DNA - hybridisation applied on paraffin sections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 62: 660-667

Syrjänen, S; Puranen M (2000): Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11(2):259-74

Tan, SH; Gloss B, Bernard HU (1992): During negative regulation of the human papillomavirus 16 E6 promotor, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res* 20: 251-256

Tang, X; Jia L, Ouyang J, Takagi M (2003): Comparative study of HPV prevalence in Japanese and North-east Chinese oralcarcinoma. *J-Oral-Pathol-Med.*: 32(7): 393-8

Taylor, ER; Dornan ES, Boner W, Connolly JA, McNair S, Kannouche P, Lehmann AR, Morgan IM (2003): The fidelity of HPV16 E1/E2-mediated DNA replication. *J-Biol-Chem*. 278(52): 52223-30

Tischendorf, L; Giehler U, (1990): Studien zur Dignität der Leukoplakien von Mundschleimhaut und Lippen.

Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir 14: 301

Tommasino, M; Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, Zehbe I (2003): The role of TP53 in Cervical carcinogenesis.

Hum-Mutat. 2003 Mar; 21(3): 307-12

Trottier, H; Mahmoud S, Costa MC, Sobrinho JP (2006): Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2006 Jul (7): 1274-80

Tyldesley, WR; (1982): Malignant transformation in oral lichen planus. Br Dent J 153: 324

Vandenvelde, C; Van Beers D (1993): High- risk genital papillomaviruses and degree of dysplastik changes in the cervix: A prospective study by fast multiplex polymerase chain reaktion in Belgium. J Med Virol 39: 273-277

van-der-Meij, EH; Schepman KP, van-der-Waal I (2003): The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study.

Oral-Surg-Oral-Med-Oral-Pathol-Oral-Radiol-Endod. 96(2): 164-71

van Ranst, M; Kaplan JB, Burk RD (1992): Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. J Gen Virol 73: 2653-2660

von Knebel-Doeberitz, M; Zur Hausen H (1990): Biological Significance of human papillomavirus early gene expression in human cervical carcinoma cells. In : Gross G, Jablonska S, Pfister H, Stegner HE (eds): Genital Papillomavirus Infections. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 51-66

Vowles, RH; Myint S, Croft CB, (1997): Incidence of HPV in the upper aerodigestive tract using brush and biopsy techniques. J Laryngol Otol. 1997 Mar; 111(3):215-7

Waldron, CA; Shafer WG (1975): Leukoplakia revisited. A clinicopathological study of 3256 oral leukoplakias. Cancer 36: 1386

Walsh, PS; Metzger DA, Higuchi R (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraktion of DNA for PCR-Based Typing from forensic material. Biotechniques 10: 506-513

Wani, K; Nair CK (2003) : Genetic alterations in cervical cancer. Indian-J-Exp-Biol. 41(8): 789-96

Warnakulasuriya, S; (2001): Histological grading of oral epithelial dysplasia. J Pathol. 2001 Jul; 194(3):303-10

Wen, S; (1997): Detection and analysis of human papillomavirus 16 and 18 homologous DNA sequences in oral lesions. Anticancer -Res. 1997 Jan-Feb;17(1A): 307-11

Wentzensen, N; von Knebel-Doeberitz M (2004): Virale Kanzerogenese von Kopf-Hals-Tumoren. Pathologe. 25:(1): 21-30

WHO; Collaborating centre for oral precancerous lesions (1978): Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancers. Oral Surg 46: 518

Wilczynski, SP; Walker J, Liao S-Y, Bergen S, Berman M, (1988): Adenocarcinoma of the cervix associated with human papillomavirus. Cancer 62: 1331-1336

Williams, JF; (1989): Optimization-Strategies for the PCR. Biotechniques 7: 762-768

Wilsch, L; Hornstein OP, Bruning H (1978): Orale Leukoplakien. Ergebnisse einer 1 jährigen poliklinischen Pilotstudie. Dtsch Zahnärztl Z 33: 132-142

Wolf, JK; Franco EL, Arbeit JM, Shroyer KR, Wu TC, Runowicz CD, Tortolero-Luna G, Herrero R, Crum CP, (2003): Innovations in understanding the biology of cervical cancer. Cancer ; 98(9 Suppl): 2064-9

Yaltirik, M; Ozveren A, Alatli C, Buyukakyuz N (2001): Detection of human papilloma virus in benign, malignant and pre-cancerous lesions of oral mucosa by in situ hybridization. Turkish-Journal-of-Medical-Sciences. 31:(6): 509-515

Yang, YY; Koh LW, Tsai JH, Tsai CH, Wong EF, Lin SJ, Yang CC (2004): Involvement of viral and chemical factors with oral cancer in Taiwan. Jpn-J-Clin-Oncol. (4): 176-83

Yeudall, WA; Campo MS (1991): Human papillomavirus DNA in biopsies of oral tissue. J Gen Virol 72: 173-176

Zhang, ZY; Sdek P, Cao J, Chen WT (2004): Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. International-Journal-of-Oral-and-Maxillofacial -Surgery.33 :(1): 71-74

Zhang, MQ; Davila R, El Mofty SK (2006): Fine needle aspiration cytology of cervical lymph nodes as an aid for localization of occult primary tumor. IAP abstract. 2006 Montreal, Canada

Zhang, MQ; Davila R, El Mofty SK (2007): Detection of HPV by ISH in FNA biopsies of cervical metastasis of head and neck squamous cell carcinoma: A tool for identifying the site of occult primary. USACP abstract. 2007. San Diego, California

Zielinski, GD; Snijders PJ, Rozendaal L, Daalmeijer NF, Risse EK, Voorhorst FJ, Jiwa NM, van-der-Linden HC, de-Schipper FA, Runsink AP, Meijer CJ (2003): The presence of high-risk HPV combined with specific p53and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. J-Pathol. 201(4): 535-43

zur Hausen, H; (2002): Papillomaviruses and cancer. Nat. Rev. Cancer (2):342-350

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest. steril.	Aqua bidestilata sterilisata
BPV	bovine papillomavirus
CIN	cervical intraepithelial neoplasia
DNA	Desoxyribonuclein acid
Gen.	General
HPV	human papillomavirus
HPV-Gen.	human papillomavirus-general
Hybrid	Hybridisierung
ICB	intracytoplasmatic body
ISH	in situ Hybridisierung
L. eros.	Lichen erosivus
M	Mol
mM	Millimol
ml	Milliliter
Mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Upm	Umdrehungen pro Minute
PCR	polymerase chain reaction
Pos.	Positiv
PVL	proliverative veruccöse Leukoplakie
Reamp.	Reamplifikation
SB	southern blot
SH	Schleimhaut
UV	ultraviolett
verruc.	verrucös
WHO	world health organisation

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 12.12.2008

Alexander Ruthke

Danksagungen

Ich danke Herrn Professor Dr. med. T. Löning für die freundliche Überlassung des Themas und seine Unterstützung.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Dipl. Biol. S. Riethdorf für die freundliche Unterstützung und den geduldigen Rat in allen Fragen zu dieser Arbeit.

Ich danke Herrn PD Dr. med. M. Vesper für die Bereitstellung des Probenmaterials.

Lebenslauf:

Name: Alexander Daniel Ruthke

Geburtsdatum: 20.12.1969

Geburtsort: Hamburg

Schulbildung:

1977-1981 Grund und Hauptschule Oststeinbek

1981-1989 Gymnasium Wichern-Schule, Hamburg.

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

04/1990-10/1996: Studium der Humanmedizin in Hamburg

03/1992 Ärztliche Vorprüfung

03/1993 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/1996 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/1997 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit:

06/1998-11/1999 AIP Innere Medizin, DRK- Krankenhaus Ratzeburg

12/1999 Approbation als Arzt

01/2000-06/2000 Assistenzarzt Chirurgie, Praxisklinik Bergedorf

06/2000-11/2000 Assistenzarzt Innere Medizin , Praxis Dres. Brunn
und Ruf, Ratzeburg

12/2000-11/2004 Assistenzarzt Innere Medizin, Wilhelmsburger
Krankenhaus Gross-Sand, Hamburg

12/2005 Facharztprüfung Innere Medizin, Hamburg

12/2004-11/2006 Assistenzarzt Gastroenterologie, Bethesda AK
Bergedorf, Hamburg

02/2007-08/2007 Schiffsarzt Forschungsschiff „Meteor“, Reederei F.
Laeisz, Rostock

06/2007	Erwerb der Teilgebietsbezeichnung Gastroenterologie
seit 09/2007	Angestellt als Facharzt in der Praxis am Borgweg, Hamburg, Dres. Beck, Dühr und Pein

Oststeinbek, 12.12.2008

Alexander Ruthke