

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. G. Sauter

Humane Papillomaviren in primären Vulvakarzinomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Hiltla Bohlken
aus Marburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 2.7.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. F. Jänicke

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	4
1.1	HUMANES PAPILLOMAVIRUS (HPV)	6
1.2	ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT	7
2	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1	PATIENTENGUT	8
2.2	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	10
2.3	STATISTIK	13
3	RESULTATE	14
3.1	DNA-QUALITÄT	14
3.2	PATIENTINNEN- UND TUMORCHARAKTERISTIKA	17
3.3	HPV-ASSOZIATION	18
3.4	KLINIKOPATHOLOGISCHE KORRELATIONEN	19
3.5	ÜBERLEBENSZEITANALYSE	20
4	DISKUSSION	22
5	ZUSAMMENFASSUNG	27
6	LITERATURVERZEICHNIS	28
7	DANKSAGUNG	35
8	CURRICULUM VITAE	36
9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	37

1 Einleitung

Das Vulvakarzinom ist eine seltene bösartige Tumorerkrankung der äußeren Geschlechtsorgane der Frau mit 2000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland. Die Inzidenz liegt bei 2-7/100.000 Frauen pro Jahr (Fischer et al. 2009).

Klinisch ergibt sich ein variables Bild der Ausprägung von warzenartigen Veränderungen, ulzerierenden Tumoren oder Verhornungsstörungen (Leukoplakien), die immer biopsiert und histologisch abgeklärt werden sollten (Engel et al. 2000, Schnürch et al. 2008, Dornoff et al. 2010). Das diagnostische Vorgehen bei symptomatischen Patientinnen setzt sich aus der Inspektion der Vulva, einer Vulvoskopie nach Einwirkung von 3% Essigsäure zur Festlegung repräsentativer Biopsie-Areale, der Zytologie und der Biopsie zur histologischen Sicherung zusammen. Als weitere diagnostische Maßnahmen folgen eine Inspektion der umgebenden Strukturen, eine Palpation der gesamten Vulva, Vagina, des inneren Genitale, des Anus, des Rektums, der Beckenwand, der Leisten einschließlich der Schenkelgruben und je nach Stadium bildgebende Verfahren.

In 95% der Vulvakarzinome liegen Plattenepithelkarzinome vor, die die oberste Hautschicht betreffen mit den verschiedenen Varianten u.a. Basalzell- und verruköses Karzinom, ansonsten maligne Melanome, Sarkome und Adenokarzinome. Analog zur Neoplasie der Cervix (CIN) bezeichnet man die präkanzeröse intraepitheliale Neoplasie der Vulva als VIN. Die Metastasierung erfolgt entweder per continuitatem auf angrenzende Strukturen des Primärtumors (Vagina, Urethra, Anus, Vesica urinaria, Rektum), kann aber ebenso lympho- (ipsi- und kontralaterale inguinale Lymphknoten) und hämatogen (Leber, Lunge, Knochen) erfolgen.

Chronisch-degenerative Erkrankungen, die mit einer Verhornung, Entzündung und Austrocknung im Bereich der äußeren Geschlechtsorgane einhergehen wie exemplarisch der Lichen sclerosus begünstigen die Entstehung eines Vulvakarzinoms. Die Therapie erfolgt nach Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO)- und Union internationale contre le cancer (UICC)- Stadium, basierend auf chirurgischem Staging, klinischer (TNM-Stadien) und pathologischer Klassifikation. Dabei müssen umschriebene Epithelveränderungen komplett in sano entfernt werden, einfache oder radikale Vulvektomien mit bilateraler Lymphonodektomie durchgeführt und die Defekte mit Spalthautlappen aufgefüllt werden.

Für die Pathogenese der Plattenepithelkarzinome der Vulva werden zwei Entstehungswege diskutiert: Eine virusabhängige und eine virusunabhängige Variante (van der Avoort et al 2006). Bei der virusabhängigen Gruppe handelt es sich meist um jüngere Patientinnen mit histomorphologisch verrukös-basaloidem Karzinomtyp und tumorangrenzender VIN. Die nicht virusassoziierte Gruppe ist durch ein höheres Lebensalter und eine Überexpression des Tumorsuppressorgens p53 gekennzeichnet (Kurman et al. 1993, Yang et al. 2000, Joura et al. 2007, Kruse et al. 2008). Die für die Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) verantwortlichen Subtypen sind meist HPV 16 und 18 wie auch beim Zervixkarzinom (Smith et al. 2009). Diese gehören zur Gruppe der high risk HPV Typen und scheinen mit weiteren Risikofaktoren für die Tumorgenese assoziiert zu sein.

Die HPV- Infektion ist eine der häufigsten sexuell übertragbaren Erkrankungen, deren Ansteckungsrisiko mit der Anzahl der Geschlechtspartner zunimmt. Eine Übertragung kann ebenso durch Schmierinfektion, Körperkontakt bei gemeinsamem Baden oder möglicherweise kontaminierte Gegenstände erfolgen. Unter der Geburt kann die Übertragung zu genitoanalen Warzen, aber auch zu Larynxpapillomen führen. Eine

Infektion mit einem oder mehreren HPV-Typen bleibt in den meisten Fällen unbemerkt, die low-risk Typen können zu lokal begrenzter Warzenbildung führen und ca. 20 % der high-risk Typ Infektionen bleiben über Monate bis Jahre inaktiv.

Es wurde postuliert, dass HPV 16 bei VIN Läsionen mit einer starken Expression von p16 und einer moderaten Expression von p14, die Inhibitoren von zyklinabhängigen Proteinkinasen sind, vergesellschaftet ist (Lukas et al. 1994, Müller et al. 1994). Da es sich bei p16 um ein Schlüsselenzym in der Initiation der Zellzyklusregulation handelt und p14 an der zytoplasmatischen Seite von späten endosomalen/lysosomalen Membranen lokalisiert ist und dort mit dem mitogen-activated protein (MAP)-Kinase Ankerprotein MP1 interagiert, womit die epidermal growth factor (EGF)-vermittelte Signaltransduktion an die Endosomen dirigiert wird, wird klar, dass durch die Überexpression dieser regulatorischen Proteine maßgeblich zum Tumorwachstum beigetragen wird. Zusätzlich dazu wird über die Genexpression der Komponenten E6 und E7 mit Hilfe von p53 die Apoptose karzinogener high risk-HPV infizierter Zellen und die Reparatur von Doppelstrangbrüchen verhindert.

1.1 Humanes Papillomavirus (HPV)

Beim HPV handelt es sich um ein unbehülltes doppelsträngiges Desoxyribonucleic Acid (DNA)- Virus aus der Familie Papillomaviridae, von dem mittlerweile über 100 verschiedene Genotypen gefunden wurden (zur Hausen et al. 1974, zur Hausen 2002, Munoz et al. 2006). Die verschiedenen Papillomaviren werden in drei Gruppen unterteilt: eine mukokutane (HPV 1-4 u.a.), eine epidermodysplasie-assoziierte (HPV 5, 8, 9 u.a.) und eine anogenitale (HPV 6, 11, 16, 18, 31 u.a.) (Walboomers et al. 1999). Aufgrund epidemiologischer und molekularbiologischer Studien konnte ein kausaler

Zusammenhang zwischen einer HPV 16/HPV 18- Infektion und der Entstehung des Zervixkarzinoms und seinen Vorstufen belegt werden, weshalb die HPV-Typen 16 und 18 von der World Health Organisation (WHO) und der International agency for research on cancer (IARC) als karzinogen und die HPV-Typen 31, 33 und 35 als wahrscheinlich karzinogen eingestuft wurden.

Ca. 30 HPV Typen sind in der Lage, Infektionen im Genitalbereich hervorzurufen, indem sie fast ausschließlich Epithelzellen befallen und ihre Virusgenexpression und Virusreplikation dem Plattenepithel anpassen. Nach Befall der Epithelzellen rufen sie ein tumorartiges unkontrolliertes Wachstum hervor, das am Ort der Infektion zur Warzenbildung (spitze Kondylome) führt. Diese ist meist durch low-risk HPV-Genotypen 6 oder 11 induziert. Die high-risk HPV-Typen 16, 18, 31, 33 und 35 und weitere werden für verschiedene Karzinome, wie z.B. das Gebärmutterhals-, Scheiden-, Penis- und Analkarzinom verantwortlich gemacht, da man entweder in Vorstufen oder invasiven Karzinomen HPV-DNA nachweisen konnte (Franceschi 2005, Petersen und Klein 2008). Vor allem Genotyp 16 scheint eine große Rolle in der Karzinogenese zu spielen.

1.2 Ziele der vorliegenden Arbeit

1. Analyse der Inzidenz und der prognostischen Bedeutung der Infektion mit humanen Papillomaviren vom high-risk Typ in einer größeren Kohorte klinisch und pathomorphologisch gut charakterisierter primärer Vulvakarzinome.
2. Korrelation der Ergebnisse mit wichtigen bekannten Prognoseparametern beim Vulvakarzinom. Weiterhin sollte die prognostische Rolle der HPV-Infektion für das Gesamtüberleben der Patientinnen herausgearbeitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengut

Es standen 183 formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Vulvakarzinompräparate zur Verfügung, die aus Operationspräparaten von Patientinnen in den Jahren 1989 bis 2008 in der Frauenklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf gewonnen wurden (Tabelle 1). Die für diese Untersuchung relevanten klinikopathologischen Daten wurden den pathologisch-anatomischen Befundberichten der Operationspräparate bzw. den klinischen Krankenakten entnommen. Das Durchschnittsalter der 183 Patientinnen des Gesamtkollektivs lag bei 62,4 Jahren. Am häufigsten wurden Karzinome im pT1b- bzw. im pT2-Stadium (85,1%) diagnostiziert. Tumoren in einem fortgeschrittenen Stadium wie pT3 und pT4 sowie Frühkarzinome im pT1a Stadium traten in der vorliegenden Kohorte seltener (10,5 % bzw. 4,4 %) auf. 33,3 % (51/153) der Vulvakarzinome zeigten zum Diagnosezeitpunkt bereits regionale inguinale Lymphknotenmetastasen. Die durchschnittliche Zahl positiver Lymphknoten pro nodalpositivem Tumor lag bei 2,47 (1 – 51). Der überwiegende Teil der Tumoren waren G2-Karzinome (63 %). Die mittlere Eindringtiefe und die mittlere Tumorgöße der für die HPV-Analyse geeigneten Tumoren lag bei 7,0 mm bzw. 25,5 mm. Histologisch wurden in der überwiegenden Mehrheit der Fälle keratinisierende Plattenepithelkarzinome (59,9%) diagnostiziert. Basaloide und nicht keratinisierende Karzinome waren zu beinahe gleichen Teilen (15,4% und 14,3%) im Kollektiv enthalten. Jeweils kleinere Anteile (3,3%, 3,3% und 4,4%) machten die warty-type, verrukösen und gemischten Karzinome aus. Die Abbildungen 1a und 1b zeigt die Übersichtsaufnahme eines prädominant exophytisch wachsenden Vulvakarzinoms bzw.

die exemplarische Dokumentation eines mittelgradig differenzierten nicht keratinisierenden Plattenepithelkarzinoms der Vulva.

Tabelle 1

Klinisch-pathologische Parameter des Gesamtkollektivs der für diese Untersuchung zur Verfügung stehenden primären Vulvakarzinome.

	Parameter	Anzahl/Wert (%)
Total		183
Patientenalter	Median (a)	65
	Mittelwert (a)	62,4
Histologischer Subtyp	Keratinisierend	109 (61,6)
	nicht keratinisierend	28 (15,8)
	Basaloid	26 (14,7)
	warty-type	6 (3,4)
	Verrukös	5 (2,8)
	Gemischt	8 (1,7)
T-Stadium	pT1a	8 (4,4)
	pT1b	63 (34,8)
	pT2	91 (50,3)
	pT3	18 (9,9)
	pT4	1 (0,6)
N-Stadium	pN0	102 (66,7)
	pN1	40 (26,1)
	pN2	11 (7,2)
Grading	G1	12 (8,7)
	G2	87 (63,0)
	G3	39 (28,3)

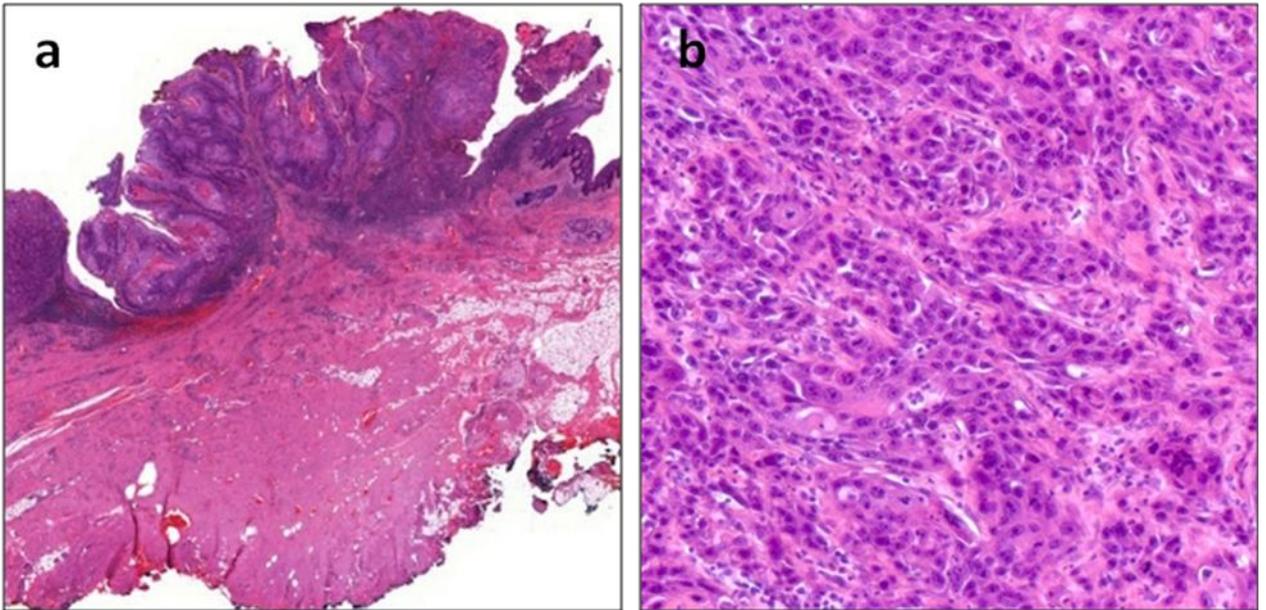


Abbildung 1

Primäres Vulvakarzinom:

- a) Übersichtsaufnahme eines oberflächlich polypoid wachsenden Tumors (HE, 1x).
- b) Mikrophotographisches Bild eines mittelgradig differenzierten, nicht verhornenden Plattenepithelkarzinoms (HE, 40x).

2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für den molekularbiologischen HPV-Nachweis stand das in Paraffin eingebettete Tumormaterial der Operationspräparate zur Verfügung. Anhand eines mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten histologischen Schnittpräparates wurde die tumorenhaltende Region identifiziert. Das korrespondierende Areal wurde am Paraffinblock aufgesucht, und es erfolgte die Entnahme von drei bis fünf Gewebestanzylindern mittels einer Gerätschaft wie sie auch für die Herstellung von Gewebemikroarrays gebräuchlich ist. Die Probezylinder wurden für die weitere Bearbeitung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß

überführt. Die Entparaffinierung und DNA-Extraktion folgten den Standardprotokollen der Firma Qiagen[®] unter Verwendung des QIAamp DNA mini kit[®]. Die Messung der Konzentration der extrahierten DNA wurde mit dem Spektralphotometer „Nano Drop 1000“ entsprechend den Anwendungsvorschriften der Herstellerfirma Thermo Fisher Scientific Inc[®] durchgeführt. Die optimale DNA-Konzentration für die PCR-Analyse liegt zwischen 100 und 130 ng/μl. Die weitere Durchführung der PCR folgte leicht modifizierten Standardprozeduren in einer 22,5 μl Reaktion (Schrimpf 2002). Die Nukleinsäuresequenzen der verwendeten Primer für die Amplifikation eines 518 bp langen Abschnittes des humanen β-Globin-Gens sowie der L1-Region des HPV sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 2 enthält das benutzte Thermocycler-Programm, wobei für HPV und β-Globin jeweils ein identisches Ablaufschema verwendet worden ist. Die erhaltenen PCR-Produkte sind im Multikapillargerät QIAxcel[®] der Firma Qiagen elektrophoretisch aufgetrennt worden. Bei Erhalt einer positiven Bande für HPV erfolgte die Sequenzierung des Produktes in einem Sequinator der Firma Applied Biosystems (ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer) für die automatische fluoreszenzbasierte DNA-Analyse. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der NCBI- Datenbank durch das Basic Local Alignment Search Tool dem individuellen HPV-Typ zugeordnet.

Tabelle 1

Primersequenzen für die Amplifikation eines 518 bp langen Abschnittes des humanen β -Globin-Gens sowie die Sequenzen des MY09/11 Konsensus-Primerpaares für die Amplifikation eines ~500bp langen Abschnittes des L1-Gens humaner Papillomaviren (Angaben in 5' nach 3' Richtung).

Primer	Nukleotidsequenz
β -Globin forward	CAC AGC CAT CCC AAT AAC TC
β -Globin reverse	TAT TAA CTC ACT CGG GCT GC
MY-09	CGT CC(AC) A(AG) (AG) GGA (AT)AC TGA TC
MY-11	GC(AC) CAG GG(AT) CAT AA(CT) AAT GG

Tabelle 2

Ablaufschema des PCR-Programms für die Amplifikation des β -Globin-Gens und der L1-Region des HPV-Virusgenoms.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Frequenz
initiale Denaturierung	94°C	10min	1x
Denaturierung	94°C	90s	} 35x
Primerhybridisierung	55°C	90s	
Elongation	72°C	120s	
Reaktionsabbruch	72°C	7min	1x
Reaktionsende/Kühlung	10°C	~	1x

2.3 Statistik

Pearson's Chi-Quadrat-Test und Student's t-Test wurden zur Untersuchung von kategorialen bzw. metrischen Zusammenhängen zwischen klinisch-pathologischen Parametern und HPV-Status angewendet. Die Erfassung prognostischer Effekte der HPV-Infektion erfolgte nach der Methode von Kaplan-Meier und die Prüfung der Signifikanz mit Logrank-Tests. Für alle Berechnungen wurde die freie Statistik-Software R für Windows verwendet (Version 2.7.2, R Foundation for statistical computing).

3 Resultate

3.1 DNA-Qualität

Für die Durchführung der vorliegenden Analyse standen 183 primäre Vulvakarzinome zur Verfügung. Aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebematerial von 156 (85,2%) Tumoren konnte in der PCR ein Amplifikat für humanes β -Globin erzeugt werden (Tabelle 4, Abbildung 2a). Die restlichen 27 Tumoren waren in der β -Globin-PCR negativ. Das mittlere Probenalter war bei β -Globin positiven Tumorproben mit 4,2 Jahren etwas geringer als bei β -Globin negativen Proben mit einem durchschnittlichen Probenalter von 5,2 Jahren (Abbildung 3). Die Differenz war jedoch statistisch nicht signifikant.

Zusätzlich zur β -Globin-PCR wurde an allen Tumorproben eine quantitative Analyse des DNA-Gehaltes mit dem Nano-Drop-1000 Verfahren durchgeführt (Abbildung 3). In 97 (53%) von 183 der Tumorproben zeigte sich dabei ein für nachfolgende PCR-Untersuchungen optimaler DNA-Gehalt zwischen 100 und 130 ng/ μ l. Die restlichen Tumorproben wiesen zu etwa gleichen Anteilen höhere oder niedrigere DNA-Konzentrationen auf. Zwischen dem Ergebnis der Messung des DNA-Gehaltes mittels der Nano-Drop-1000-Methode und dem Resultat der β -Globin-PCR konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang gefunden werden ($p = 0,56$). Beim Vergleich des mittleren Probenalters ergab sich für Tumorproben mit einem DNA-Gehalt unter 100 ng/ μ l ein mittleres Probenalter von 5,1 Jahren, bei einem DNA Gehalt zwischen 100 und 130 ng/ μ l 4,4 Jahre und schließlich bei einem DNA Gehalt größer 130 ng/ μ l 3,7 Jahre. Die Differenz des Probenalters zwischen Tumorproben mit weniger als 100 ng/ μ l und mehr als 130 ng/ μ l war statistisch signifikant ($p = 0,029$). Somit zeigte sich,

dass je älter die untersuchte Probe, umso geringer war der mittels Nano-Drop-1000 Verfahren bestimmbare DNA-Gehalt.

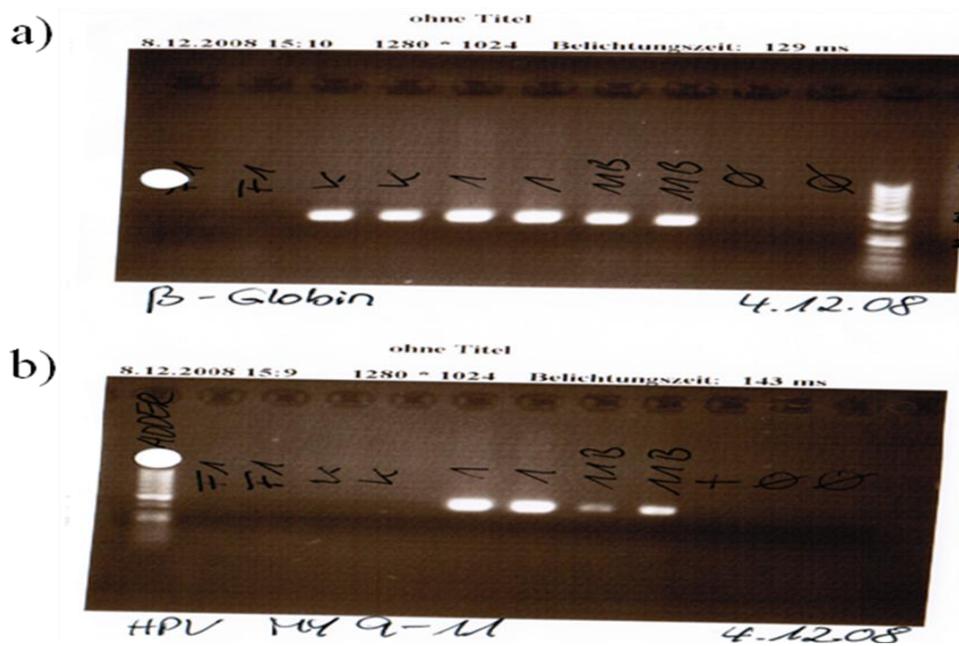


Abbildung 2

Exemplarische Darstellung des Ergebnisses der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte bei Amplifikation des β -Globin-Gens (a) in 2 Tumorzellen (1 und 11B) sowie 2 Positivkontrollen (K) und korrespondierend positivem HPV-DNA Nachweis (b) im Tumorgewebe bei negativer Kontrollprobe.

Tabelle 4

Ergebnisse der β -Globin-PCR sowie der Messung der DNA-Konzentration mit dem Nano-Drop-1000 Verfahren bei 183 Proben primären Vulvakarzinomen.

	Total	DNA-Konzentration in ng/ μ l			p-Wert
		<100	100 - 130	>130	
β-Globin positiv (%)	156	35 (22,4)	84 (53,8)	37 (23,7)	0,56
β-Globin negativ (%)	27	5 (18,5)	13 (48,1)	9 (33,3)	
Total	183	40	97	46	

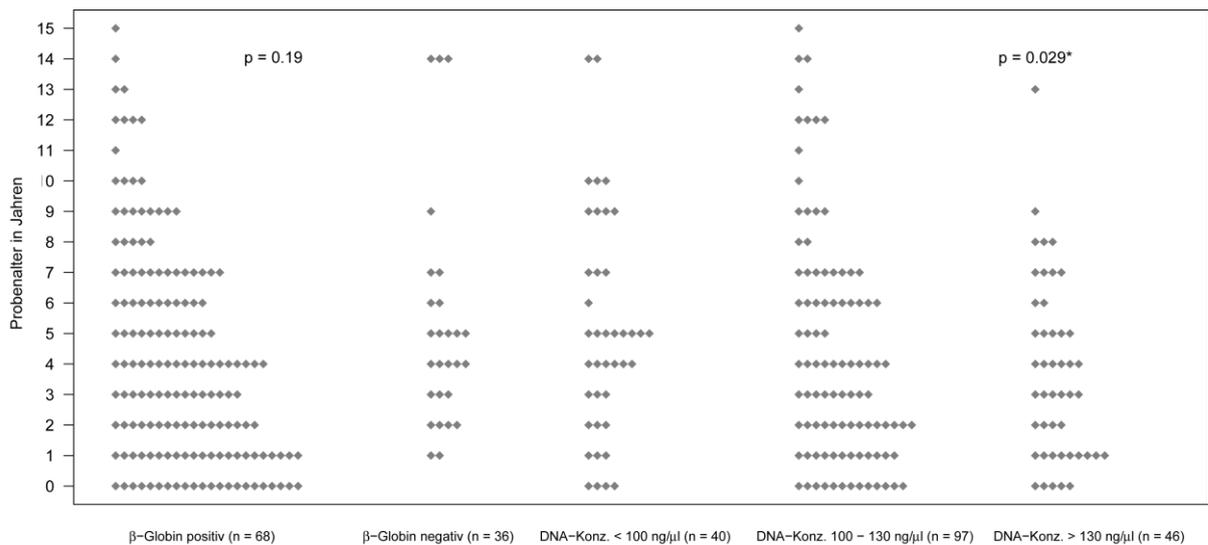


Abbildung 3

Vergleichende Darstellung des Probenalters zwischen in der β -Globin-PCR positiven und negativen Tumoren sowie zwischen verschiedenen im Nano-Drop-1000 Verfahren gemessenen DNA-Konzentrationen (*siehe Text).

3.2 Patientinnen- und Tumorcharakteristika

In der vorliegenden Untersuchung zeigten insgesamt 156 primäre Vulvakarzinome ein positives Ergebnis in der β -Globin-PCR und waren damit geeignet für die Analyse des HPV-Status (Tabelle 5, Abbildung 2b). Das Durchschnittsalter der Patientinnen lag bei 62,1 Jahren. Die Mehrzahl der Karzinome wurden im pT1b bzw. im pT2 Stadium (85,7%) diagnostiziert. Fortgeschrittene Tumoren im pT3 und pT4 sowie Frühkarzinome im pT1a Stadium waren dagegen deutlich seltener in der vorliegenden Kohorte vertreten (4,5% bzw. 9,7%). 34,9% (45/129) der Vulvakarzinome zeigten zum Diagnosezeitpunkt bereits regionale inguinale Lymphknotenmetastasen. Der überwiegende Teil der Tumoren waren G2-Karzinome (62,1%).

Tabelle 5

Klinische und pathologische Merkmale von 156 primären Vulvakarzinomen in Beziehung und HPV-Status.

	Analysierbar	HPV		p-Wert
		positiv (%)	negativ (%)	
Anzahl	156	48 (30,8)	108 (69,2)	-
Patientenalter				
Median (a)	64	65	64	0,72
Mittelwert (a)	62,1	60,3	61,5	
Histologischer Subtyp				
Keratinisierend	91	22 (24,2)	69 (75,8)	
nicht keratinisierend	24	8 (33,3)	16 (66,7)	
Basaloid	23	14 (60,9)	9 (39,1)	< 0,01
warty-type	6	2 (33,3)	4 (66,7)	
Verrukös	3	-	3 (100,0)	
Gemischt	8	2 (28,6)	6 (71,4)	
T-Stadium				
pT1a	7	-	7 (100,0)	0,29
pT1b	55	20 (36,4)	35 (63,6)	
pT2	77	23 (29,9)	54 (70,1)	
pT3	14	3 (21,4)	11 (78,6)	
pT4	1	-	1 (100,0)	
N-Stadium				
pN0	84	28 (33,3)	56 (66,7)	0,62
pN1	36	14 (38,9)	22 (61,1)	
pN2	9	2 (22,2)	7 (77,8)	
Grading				
G1	9	2 (22,2)	7 (77,8)	0,96
G2	72	19 (26,4)	53 (73,6)	
G3	35	9 (25,7)	26 (74,3)	

3.3 HPV-Assoziation

48 (30,8%) der 156 analysierbaren primären Vulvakarzinome zeigten in der PCR für HPV ein positives Amplifikationsergebnis (Abbildungen 2b und 4). Dabei konnte am häufigsten (81,3%) der HPV-Subtyp 16 isoliert werden. In 5 Tumoren war der HPV-

Subtyp 33 identifizierbar. In 4 Tumorproben war das Resultat der Sequenzierungsreaktion uneinheitlich, sodass in der Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)-Analyse keine sichere Zuordnung zu einem bestimmten HPV-Subtyp gelang.

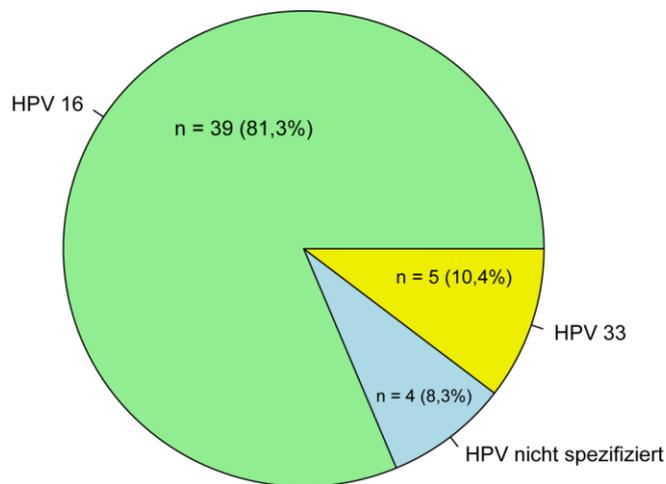


Abbildung 4

Häufigkeit und Verteilung von HPV-Subtypen in 48 virusassoziierten Vulvakarzinomen.

3.4 Klinikopathologische Korrelationen

Die klinisch-pathologischen Charakteristika der in der vorliegenden Analyse HPV-assoziierten primären Vulvakarzinome im Vergleich zu Vulvakarzinomen ohne nachweisbare HPV-Assoziation sind in Tabelle 5 zusammenfassend dargestellt. Patientinnen mit HPV-positiven Tumoren waren zum Diagnosezeitpunkt geringfügig jünger als Patientinnen mit HPV- negativem Vulvakarzinom. Die Differenz war

statistisch jedoch nicht signifikant ($p = 0,72$). Der HPV- Status von Vulvakarzinomen zeigte keine Korrelation zum pT-Stadium, dem Nodalstatus sowie der Graduierung nach Kurman et al. (1992) (jeweils $p > 0,05$). Der histologische Subtyp des basaloiden Plattenepithelkarzinoms der Vulva war statistisch hochsignifikant mit einem positiven HPV-Status verknüpft. 14 der 23 (60,9%) erfassten basaloiden Vulvakarzinome waren positiv für HPV der high risk-Gruppe. Die übrigen histologischen Subtypen des Vulvakarzinoms zeigten keine Korrelation zum HPV-Status.

3.5 Überlebenszeitanalyse

Von 116 der 156 für die HPV-Analyse berücksichtigten primären Vulvakarzinomen standen Daten für die Überlebenszeitanalyse zur Verfügung. Das mediane Gesamtüberleben lag bei 19,5 Monaten mit einer Spannbreite von 0,25 bis 110 Monaten. Während dieses Zeitraumes konnten insgesamt 25 Todesereignisse erfaßt werden.

Von den 116 analysierten Vulvakarzinomen waren 27 HPV positiv. Das mediane Überleben in dieser Gruppe bezifferte sich zu 26 Monaten bei 10 Todesereignissen. Die HPV-negativen Vulvakarzinompatientinnen zeigten eine mediane Überlebenszeit von 17 Monaten bei 15 Todesereignissen. Die Analyse der Überlebenszeiten nach dem Kaplan-Meier-Verfahren ergab einen Trend zu einer etwas schlechteren Prognose HPV-assoziiertes Vulvakarzinome im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren (Abbildung 5). Die Differenz erreicht jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau.

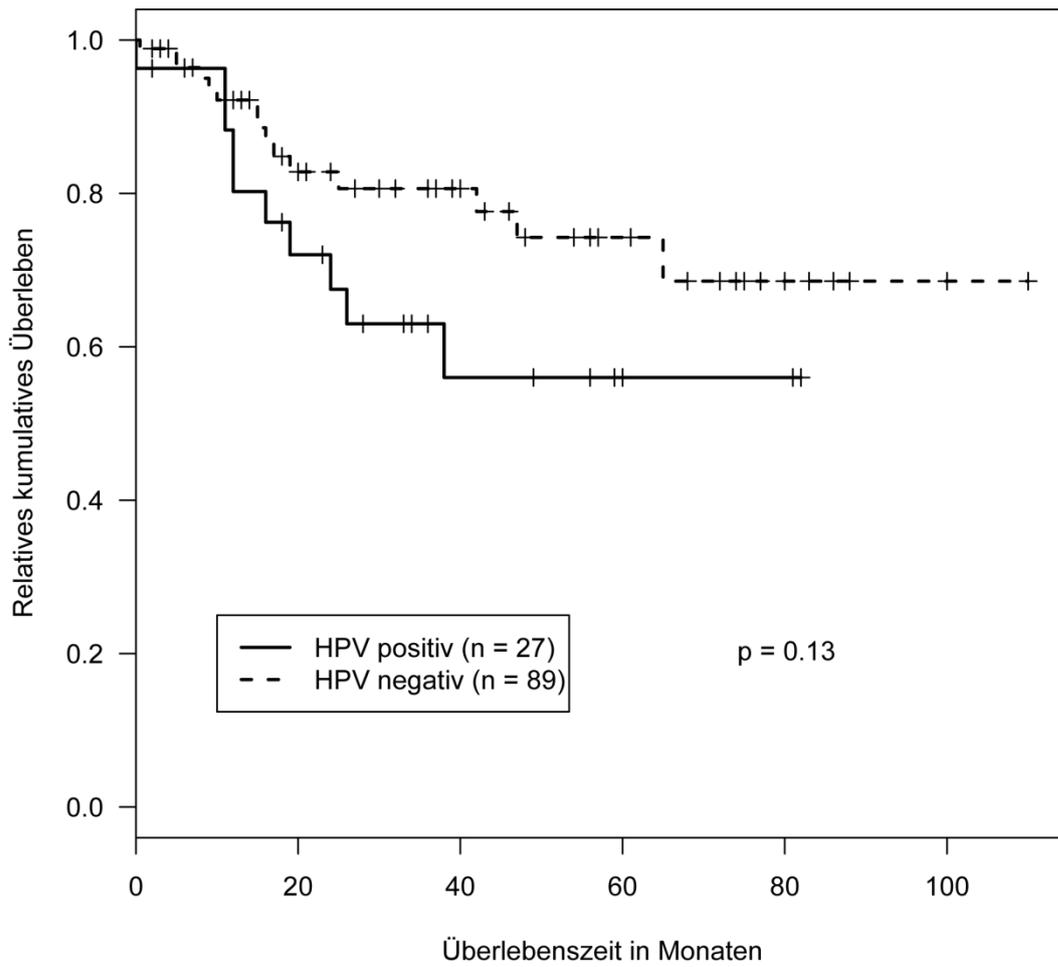


Abbildung 5

Überlebenszeitanalyse primärer Vulvakarzinome in Abhängigkeit vom HPV-Status.

4 Diskussion

Der Nachweis von HPV-DNA in formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe erlangt in der klinischen Praxis sowie der wissenschaftlichen Forschungsarbeit eine zunehmende Bedeutung (Mies 1992). Die HPV-Assoziation eines Teils der primären Vulvakarzinome ist dabei ein wichtiges Modellsystem für die Erforschung der molekularen Pathogenese virusassoziierter maligner epithelialer Tumoren. Die in den letzten Jahren eingeführte Impfprophylaxe des Zervixkarzinoms bzw. seiner Vorstufen scheint auch im Bereich des Vulvakarzinoms einen bedeutsamen Anwendungsbereich zu finden (Hampl et al. 2006, Administration USFaD 2008, Garland et al. 2009). Daher kommt in Zukunft möglicherweise dem sicheren Virus-DNA-Nachweis in klinisch gewonnenen Gewebeproben eine zunehmende Bedeutung zu. Zur Detektion von HPV-DNA in Tumorgeweben sind in der Vergangenheit eine ganze Reihe molekularbiologischer Techniken entwickelt worden (Baay et al. 1996, Jacobs et al. 1999, Petersen et al. 2007, Morshed et al. 2008, Pretet et al. 2008, Siriaunkgul et al. 2008). Die PCR mit Amplifikation eines 450 bp langen Segmentes der L1-Region des HPV-Genoms und der Verwendung des MY09/11 Primerpaares ist dabei als Referenzmethode zu bezeichnen und auch in der vorliegenden Studie durchgängig angewendet worden (Bauer et al 1991, Petersen et al. 2007). Voraussetzung für eine erfolgreiche HPV-PCR ist das Vorhandensein genügend langer DNA-Fragmente in ausreichender Konzentration im Probenmaterial. Wichtige Einflussfaktoren sind der Typ des Ausgangsgewebes, das Alter der Proben, Lagerungsbedingungen, das verwendete Fixativ sowie die Fixationsdauer. Dabei hat sich die Verwendung von 10%igem gepuffertem Formalin, wie durchgängig am in unserer Untersuchung verwendeten Tumormaterial, als optimale Lösung erwiesen. Die extrahierbare DNA-

Menge spielt insofern eine Rolle, als das die Effektivität der PCR mit der Länge der zu amplifizierenden Fragmente invers korreliert ist.

In unserer Untersuchung konnte in 85,2% aller Tumorproben ein 518bp langes Fragment des β -Globin-Gens amplifiziert werden. Dieses Ergebnis belegt eindrücklich die gute Eignung des verwendeten Tumorgewebes für eine detaillierte Analyse der HPV-Assoziation von Vulvakarzinomen. Das Probenalter hatte dabei kaum einen Einfluß auf die Effektivität der PCR, da β -Globin-positive und β -Globin-negative Ausgangsmaterialien keine statistischen Unterschiede hinsichtlich des Lagerungsalters aufwiesen. Für die fortgeschrittene DNA-Degradation bei β -Globin-negativen Proben wären somit anderweitige präanalytische Prozesse wie z.B. eine im Einzelfall zu lange oder zu kurze Fixation anzunehmen. Eine wesentliche Bedeutung für die erfolgreiche Amplifikation längerer Genabschnitte kommt auch der DNA-Extraktionsmethode zu. Hierbei spielt die Entstehung von Protein-DNA-Addukten im Rahmen der Formalinfixation und Paraffindurchtränkung eine wichtige Rolle. Weiterhin ist verbleibendes Paraffin im Reaktionsansatz als effektiver Inhibitor der PCR identifiziert worden. Der in unseren Protokollen verwendete Proteinase-K-Verdau in Kombination mit dem QiaAmp-System hat sich dabei besonders auch hinsichtlich der recovery längerer DNA-Fragmente in mehreren Untersuchungen gegenüber anderen Systemen als überlegen erwiesen (Farrugia et al. 2010, Huijsmans et al. 2010, Torrente et al. 2010). Unsere Resultate bestätigen damit Ergebnisse dieser Analysen. Die Bestimmung der DNA-Konzentration mittels fluoreszenzaktivierter Spektrophotometrie ist auch im Bereich kleinster DNA-Mengen zu den molekularbiologischen Routinemethoden zu zählen (Ash und Desjardins 2007). Das in der vorliegenden Untersuchung verwendete Nano-Drop-1000-System erbrachte in allen Proben eine verwertbare DNA-Konzentration. Dabei waren die gemessenen DNA-Konzentrationen statistisch mit dem Lagerungsalter des Gewebes korreliert. Dieses Resultat entspricht durchaus den

Erwartungen, da wie oben bereits ausgeführt, die DNA-Degradation mit dem Probenalter korreliert ist. Kein statistischer Zusammenhang konnte zwischen DNA-Konzentrationsmessung und dem Resultat der β -Globin-PCR als Positivkontrolle für einen spezifischen und sensitiven HPV-Nachweis gefunden werden. Die in verschiedenen Untersuchungen postulierte größere Stabilität integrierter Virus-DNA könnte als Erklärungsansatz für diese Befunde herangezogen werden (Riethdorf et al. 1998, Milde-Langosch et al. 1999). Ein verlässlicher HPV-DNA-Nachweis ist daher auch bei älteren Proben und nur geringen DNA-Mengen möglich. Das Nano-Drop-1000-System scheint damit weniger geeignet zur Voraussage eines spezifischen und sensitiven HPV-PCR-Resultates.

Für die Entstehung von Vulvakarzinomen werden gegenwärtig zwei unabhängige ätiopathogenetische Mechanismen angenommen: eine HPV-assoziierte Variante sowie eine HPV-unabhängige Pathogenese (van der Avoort et al. 2006, Ambrosio et al. 2008). In unserer Untersuchung von 156 Vulvakarzinomen waren 30,8% HPV-assoziiert. Diese Häufigkeit stimmt mit den in früheren Analysen veröffentlichten Angaben gut überein. So fanden Skapa et al. (2007) in 42% der untersuchten vulvären Plattenepithelkarzinome HPV-DNA. Van de Nieuwenhof et al. (2009) testeten 45 (34,6%) von 130 Vulvakarzinomen als positiv für HPV. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Rusk et al. (1991). Dabei scheint die Inzidenz HPV-positiver Vulvakarzinome in Nordamerika etwas höher zu sein als in Mitteleuropa. Eine Metaanalyse von 1873 Vulvakarzinomen beschreibt in 40,4% der Tumoren eine HPV-Assoziation (de Vuyst et al. 2009). Die Verteilung der verschiedenen HPV-Subtypen entspricht in den genannten Studien dem in unserer Analyse gefundenen Spektrum mit einer Prädominanz von HPV 16 und daneben HPV 33 (Sutton et al. 2008, Tachezy et al. 2011). Andere Subtypen können nur in Einzelfällen nachgewiesen werden. Für die HPV-abhängigen Tumoren bestehen recht genaue Vorstellungen über mögliche

molekulare Mechanismen der Tumorinduktion. Durch Integration der Virus-DNA in das Wirts-Genom kommt es zur Überexpression der viralen Onkogene E6 und E7. E6 konnte u.a. als Inhibitor des Tumorsuppressor-Proteins p53 identifiziert werden und hemmt damit die Apoptose, wobei kürzlich zusätzliche pleiotrope Funktionsmechanismen beschrieben worden sind (Heer et al. 2011). E7 greift dagegen bei der Zellzyklusregulation durch Inaktivierung des Tumorsuppressors Retinoblastom-Protein an (Scheffner et al 1993, Lukas et al. 1994, Müller et al. 1994). Die molekularen Mechanismen zur Induktion nicht mit HPV assoziierter Tumoren scheinen hingegen deutlich heterogener zu sein. Für eine ganze Reihe dieser Tumoren einschließlich deren Vorläuferläsionen wie dem Lichen sclerosus konnten Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 nachgewiesen werden (Lee et al. 1994, Milde-Langosch et al. 1995, Kim et al. 1996, Ngan et al. 1999, Rolfe et al. 2003, Osakabe et al. 2007, Pinto et al. 2010). Daneben spielen jedoch offenbar auch andere molekulare Veränderungen eine bedeutsame Rolle. So wurden kürzlich EGFR-Amplifikationen vorzugsweise in HPV-negativen Vulvakarzinomen beschrieben (Growdon et al. 2008). In einer institutseigenen Arbeit konnten in 20,5% der untersuchten Vulvakarzinome weder p53 Mutationen noch eine HPV-Assoziation gefunden werden (Choschzick et al. 2011a). Zannoni et al. (2011) beschreiben in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit Veränderungen der Östrogenrezeptor- und E-Cadherin-Expression in HPV-negativen Vulvakarzinomen im Vergleich zu Normalgeweben. Schließlich konnten wir in einer noch unveröffentlichten Studie gehäuft Amplifikationen des CCND1-Gens in HPV-negativen primären Vulvakarzinomen nachweisen (Choschzick et al. 2011b).

In unserer Studie konnten keine Beziehungen zwischen dem HPV-Status von Vulvakarzinomen sowie dem TN-Stadium bzw. dem Grading aufgezeigt werden. Hinsichtlich dieser Parameter liegen in der Literatur bisher nur spärlich gesicherte Erkenntnisse vor. Wir stimmen mit den Ergebnissen von Alonso et al. (2011) überein,

die gleichfalls keine Korrelationen zwischen HPV-Status und FIGO-Stadium, Tumorgroße, Invasionstiefe und Lymphknotenstatus in ihrem Patientenkollektiv beschreiben. Hingegen ist in zahlreichen früheren Arbeiten eine enge Beziehung zwischen dem basaloiden Phänotyp von Plattenepithelkarzinomen der Vulva und einem positivem HPV-Status belegt worden, ein Befund, der sich auch in unserer Analyse bestätigen lässt (Kurman et al. 1993, Osakabe et al. 2007, de Koning et al. 2008). Dieses Resultat bekräftigt gleichzeitig die Validität der in der vorliegenden Arbeit erhobenen molekularbiologischen Daten zur HPV-Assoziation von Vulvakarzinomen. Schließlich fanden wir keine Beziehung des Patientinnenalters zum HPV-Status. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Unterrepräsentation von Tumoren in frühen Stadien in unserem Untersuchungsgut sein, da diese Tumoren möglicherweise vorzugsweise bei jüngeren Frauen mit HPV-positiven Tumoren anzutreffen sind. Der Einfluß des HPV-Status auf die Prognose der Patientinnen ist in der Vergangenheit immer wieder kontrovers diskutiert worden (Monk et al. 1995, Pinto et al. 2004, van der Nieuwenhof et al. 2009, Alonso et al. 2011). In unserer Untersuchung fanden sich in der univariaten Analyse keine Zusammenhänge zwischen Gesamtüberleben und positivem oder negativem HPV-Status. Dieses Ergebnis schließt jedoch eine mögliche geringe prognostische Relevanz in einem multiparametrischen Gesamtkontext nicht aus. Der entscheidende prognostisch negative Prädiktor beim Vulvakarzinom scheint jedoch der metastatische Befall der regionalen Lymphknoten zu sein, wie insbesondere in der multivariaten Analyse gezeigt worden ist (Woelber et al. 2009).

5 Zusammenfassung

Der Analyse des HPV-Status in klinisch gewonnenem Tumorgewebe wird in Zukunft eine größer werdende Bedeutung zuzumessen sein. Ziel der vorliegenden Untersuchung war der Nachweis von HPV-DNA in 183 klinisch und pathomorphologisch gut charakterisierten primären Vulvakarzinomen in Kombination mit Überlebensdaten für die Prognoseabschätzung aus den Jahren 1989 bis 2008. Aus 156 Tumoren war eine qualitativ und quantitativ ausreichende DNA-Menge zur Durchführung einer HPV-PCR extrahierbar. Dieses Resultat zeigt, daß auch älteres Gewebe für eine HPV-Analyse geeignet sein kann. In 48 (30,8%) der Vulvakarzinome konnte HPV-DNA nachgewiesen werden, vorwiegend der Subtypen 16 und 33. Ein positiver HPV-Status war statistisch signifikant mit dem basaloiden Phänotyp des Vulvakarzinoms korreliert. Darüber hinaus fanden sich keine statistischen Zusammenhänge zwischen HPV-Status und Tumorstadium, Lymphknotenbefall, Grading, Patientinnenalter und Prognose. Die erzielten Ergebnisse wurden im Lichte der aktuellen Literatur diskutiert. Die vorliegenden Daten könnten als Grundlage für eine zukünftige Impfprophylaxe des Vulvakarzinoms dienen.

6 Literaturverzeichnis

1. Administration USFaD (2008) FDA approves expanded uses for Gardasil to include preventing certain vulvar and vaginal cancers, September 12.
2. Alonso I, Fuste V, del Pino M, Castillo P, Torné A, Fusté P, Rios J, Pahisa J, Balasch J, Ordi J (2011) Does human papillomavirus infection imply a different prognosis in vulvar squamous cell carcinoma? *Gynecol Oncol* 122:509-514.
3. Ambrosio MR, Onorati M, Rocca BJ, Santopietro R (2008) Vulvar cancer and HPV infection: analysis of 22 cases. *Pathologica* 100:405-407.
4. Ash D, Desjardins P (2007) The state of microsample quantitation. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 27:38-39.
5. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM (1991) Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 265:472-477.
6. Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, Stolz E, Herbrink P (1996) Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 34:745-747.
7. Choschzick M, Hantaredja W, Tennstedt P, Giesecking F, Woelber L, Simon R. (2011) Role of TP53 Mutations in Vulvar Carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 30:497-504.
8. Choschzick M, Tennstedt P, Holst F, Bohlken H, Giesecking F, Mahner S, Woelber L, Simon R, Sauter G (2011) Role of CCND1 amplification and expression in vulvar carcinomas, eingereicht zur Publikation .
9. de Koning MN, Quint WG, Pirog EC (2008) Prevalence of mucosal and cutaneous human papillomaviruses in different histologic subtypes of vulvar carcinoma. *Mod Pathol* 21:334-344.
10. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S (2009) Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer* 124:1626-1636.
11. Dornoff W, Hagemann FG, Preiß J, Schmieder A (Hrsg.): Taschenbuch Onkologie 2010: Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2010/2011, Zuckschwerdt Verlag 2010, S. 235-236.

12. Engel J, Schmidt M, Schubert-Fritschle G, Tretter W, Hölzel D (2000) Jahresbericht 1999 des klinisch-epidemiologischen Krebsregisters am Tumorzentrum München - Schwerpunkt: Gynäkologische Tumoren. Zuckschwerdt, München Bern Wien New York. 2000
13. Farrugia A, Keyser C, Ludes B (2010) Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Sci Int* 194:e25-28.
14. Fischer D, Katalinic A, Mundhenke C, Dittmer C, Diedrich K, Thill M (2009) Epidemiologie maligner Erkrankungen der Vagina und Vulva. *Onkologe* 15:8-14.
15. Franceschi S (2005) The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res* 166:277-297.
16. Garland SM, Insinga RP, Sings HL, Haupt RM, Joura EA (2009) Human papillomavirus infections and vulvar disease development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:1777-1784.
17. Growdon WB, Boisvert SL, Akhavanfard S, Oliva E, Dias-Santagata DC, Kojiro S, Horowitz NS, Iafrate AJ, Borger DR, Rueda BR (2008) Decreased survival in EGFR gene amplified vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol* 111:289-297.
18. Hampl M, Sarajuuri H, Wentzensen N, Bender HG, Kueppers V (2006) Effect of human papillomavirus vaccines on vulvar, vaginal, and anal intraepithelial lesions and vulvar cancer. *Obstet Gynecol* 108:1361-1368.
19. Heer A, Alonso LG, de Prat-Gay G (2011) E6*, the 50 amino acid product of the most abundant spliced transcript of the e6 oncoprotein in high-risk human papillomavirus, is a promiscuous folder and binder. *Biochemistry* 50:1376-1383.
20. Huijsmans CJ, Damen J, van der Linden JC, Savelkoul PHM, Hermans MHA (2010). Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues: effect on downstream molecular applications. *BMC Res Notes* 3:239.
21. Jacobs MV, Snijders PJ, Voorhorst FJ, J Dillner, Forslund O, Johansson B, von Knebel Doeberitz M, Meijer CJ, Meyer T, Nindl I, Pfister H, Stockfleth E, Strand A, Wadell G, Walboomers JM (1999) Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. *J Clin Pathol* 52:498-503.

22. Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Garland SM, Harper DM, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Jones RW, Bryan J, Taddeo FJ, Bautista OM, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego JW, Sattler C, Barr E, Paavonen J (2007) Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet* 369:1693-1702.
23. Kim YT, Thomas NF, Kesis TD, Wilkinson EJ, Hedrick L, Cho KR (1996) p53 mutations and clonality in vulvar carcinomas and squamous hyperplasias: evidence suggesting that squamous hyperplasias do not serve as direct precursors of human papillomavirus-negative vulvar carcinomas. *Hum Pathol* 27:389-395.
24. Kurman RJ, Norris HJ, Wilkinson EJ (1992) Tumors of the cervix, vagina, and vulva. Atlas of tumor pathology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.
25. Kurman RJ, Toki T, Schiffman MH (1993) Basaloid and warty carcinomas of the vulva. Distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. *Am J Surg Pathol* 17:133-145.
26. Kruse AJ, Bottenberg MJ, Tosserams J, Slangen B, van Marion AM, van Trappen PO (2008) The absence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to the HPV-independent pathway as the causative agent for vulvar squamous cell carcinoma and its precursor simplex VIN in a young patient. *Int J Gynecol Pathol* 27:591-595.
27. Lee YY, Wilczynski SP, Chumakov A, Chih D, Koeffler HP (1994) Carcinoma of the vulva: HPV and p53 mutations. *Oncogene* 9:1655-1659.
28. Lukas J, Müller H, Bartkova J, Spitkovsky D, Kjerulff AA, Jansen-Dürr P, Strauss M, Bartek J (1994) DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *J Cell Biol* 125:625-638.
29. Mies C (1992) Molecular pathology of paraffin-embedded tissue. Current clinical applications. *Diagn Mol Pathol* 1:206-211.
30. Milde-Langosch K, Albrecht K, Joram 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* 63:639-645.

31. Milde-Langosch K, Riethdorf S, Park TW (1999) Natural course of HPV infection. Usefulness of HPV analysis in cervix diagnosis. *Pathologe* 20:15-24.
32. Monk BJ, Burger RA, Lin F, Parham G, Vasilev SA, Wilczynski SP (1995) Prognostic significance of human papillomavirus DNA in vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol* 85:709-715.
33. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymanski M, Polz D (2008) Short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of human papillomaviruses in laryngeal squamous cell carcinoma and normal mucosa: clinico-pathological evaluation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 265 Suppl 1:S 89-96.
34. Müller H, Lukas J, Schneider A, Warthoe P, Bartek J, Eilers M, Strauss M (1994) Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2945-2949.
35. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L (2006) Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3:S3/1-10.
36. Ngan HY, Cheung AN, Liu SS, Yip PS, Tsao SW (1999) Abnormal expression or mutation of TP53 and HPV in vulvar cancer. *Eur J Cancer* 35:481-484.
37. Osakabe M, Hayashi M, Katayama Y, Emura I, Nemoto K, Umezu H, Saitoh K, Motoyama T (2007) Characteristics of vulvar squamous cell carcinoma in Japanese women. *Pathol Int* 57:322-327.
38. Petersen I, Klein F (2008) HPV in non-gynecological tumors. *Pathologe* 29 Suppl 2:118-122.
39. Petersen I, Schewe C, Schluns K, Dietel M, Speich N, Schmitt C, Bollmann M, Sotlar K, Bültmann B, Dours-Zimmermann MT, Padberg B, Zimmermann DR (2007) Inter-laboratory validation of PCR-based HPV detection in pathology specimens. *Virchows Arch* 451:701-716.
40. Pinto AP, Schlecht NF, Pintos J, Kaiano J, Frabco EF, Crum CP, Villa L (2004) Prognostic significance of lymph node variables and human papillomavirus DNA in invasive vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol* 92:856-865.
41. Pinto AP, Miron A, Yassin Y, Monte N, Woo TY, Mehra KK, Medeiros F, Crum CP (2010) Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia contains Tp53 mutations and is genetically linked to vulvar squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 23:404-412.

42. Pretet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Charlot JF, Bouhour D, Kantelip B, EDITH study group (2008) Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer* 122:428-432.
43. Riethdorf S, Friedrich RE, Suhwold J, Ostwald C, Barten M, Gogacz P, Gundlach K K H, Schlechte H, Becker J, Bregenzer T (1998) p53 mutations and HPV infections in squamous epithelial carcinomas of the head-neck region. Long-term follow-up. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2:30-34.
44. Rolfe KJ, MacLean AB, Crow JC, Benjamin E, Reid WM, Perrett CW (2003) TP53 mutations in vulval lichen sclerosus adjacent to squamous cell carcinoma of the vulva. *Br J Cancer* 89:2249-2253.
45. Rusk D, Sutton GP, Look KY, Roman A (1991) Analysis of invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vulvar intraepithelial neoplasia for the presence of human papillomavirus DNA. *Obstet Gynecol* 77:918-922.
46. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75:495-505.
47. Schnürch HG, Hantschmann P, Beckmann MW(2008) Vulvakarzinom. In: Deutsche Krebsgesellschaft (Hrsg.): Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2008. Zuckschwerdt, München 2008.
48. Schrimpf G (ed) (2002) *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
49. Siriaunkgul S, Suwiwat S, Settakorn J, Khunamorpong S, Tungsinmunkong K, Boonthum A, Chaisuksunt V, Lekawanvijit S, Srisomboon J, Thorner PS (2008) HPV genotyping in cervical cancer in Northern Thailand: adapting the linear array HPV assay for use on paraffin-embedded tissue. *Gynecol Oncol* 108:555-560.
50. Skapa P, Zamecnik J, Hamsikova E, Salakova M, Smahelova J, Jandova K, Robova H, Rob L, Tachezy R (2007) Human papillomavirus (HPV) profiles of vulvar lesions: possible implications for the classification of vulvar squamous cell carcinoma precursors and for the efficacy of prophylactic HPV vaccination. *Am J Surg Pathol* 31:1834-1843.

51. Smith JS, Backes DM, Hoots BE, Kurman RJ, Pimenta JM (2009) Human papillomavirus type-distribution in vulvar and vaginal cancers and their associated precursors *Obstet Gynecol* 113:917-924
52. Sutton BC, Allen RA, Moore WE, Dunn ST (2008) Distribution of human papillomavirus genotypes in invasive squamous carcinoma of the vulva. *Mod Pathol* 21:345-354.
53. Tachezy R, Smahelova J, Salakova M, Arbyn M, Rob L, Skapa P, Jirasek T, Hamsikova E (2011) Human papillomavirus genotype distribution in Czech women and men with diseases etiologically linked to HPV. *PLoS One* 6:e21913.
54. Torrente MC, Rios C, Misad C, Ramírez R, Acuña M, Cifuentes L (2010) DNA extraction from formalin-fixed laryngeal biopsies: Comparison of techniques. *Acta Otolaryngol* 131:330-333.
55. van de Nieuwenhof HP, van Kempen LC, de Hullu JA, Bekkers RL, Bulten J, Melchers WJG, Massuger LFAG (2009) The etiologic role of HPV in vulvar squamous cell carcinoma fine tuned Cancer. *Epidemiol Biomarkers Prev* 18:2061-2067.
56. van der Avoort IA, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte MM, de Hullu JA, de Wilde PCM, Bulten J, Melchers WJG, Massuger LFAG (2006) Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *Int J Gynecol Pathol* 25:22-29.
57. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19.
58. Woelber L, Mahner S, Voelker K, Eulenbug CZ, Giesecking F, Choschzick M, Jaenicke F, Schwarz J (2009) Clinicopathological prognostic factors and patterns of recurrence in vulvar cancer. *Anticancer Res* 29:545-552.
59. Yang B, Hart WR (2000) Vulvar intraepithelial neoplasia of the simplex (differentiated) type: a clinicopathologic study including analysis of HPV and p53 expression. *Am J Surg Pathol* 24:429-441.
60. Zannoni GF, Prisco MG, Vellone VG, De Stefano I, Scambia G, Gallo D (2011) Changes in the expression of oestrogen receptors and E-cadherin as molecular markers of progression from normal epithelium to invasive cancer in elderly patients with vulvar squamous cell carcinoma. *Histopathology* 58:265-275.

61. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW (1974) Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 13:650-656.
62. zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-350.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.med. G. Sauter für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, für seine wissenschaftliche Betreuung sowie für die Bereitschaft zur kritischen wissenschaftlichen Diskussion.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr.med M. Choschick und Frau Dr.med. L. Woelber für ihre hervorragende engagierte Betreuung sowie für ihre wertvollen zahlreichen Anregungen und Diskussionen bedanken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich bei Frau G. Rieck für die intensive Einarbeitung in die verschiedenen Labortechniken und die ständige Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung auftretender Probleme.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir mit guten Ratschlägen und viel Geduld beigestanden hat.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung für Gynäkopathologie sowie den Mitdoktoranden für die angenehme Zusammenarbeit.

8 Curriculum vitae

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

Unterschrift: