Institut für Oralpathologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Prof. Dr. Thomas Löning

Basaloide Plattenepithelläsionen und ihre Beziehung zu einer HPV-Infektion

Dissertation

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Zahnmedizin
der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Carmen Sperber

aus Salzgitter-Lebenstedt

Juni 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 15.09.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg:

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende

Prof. Dr. Th. Löning

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in

Prof. Dr. Dr. R. Friedrich

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in

Prof.Dr. M. Jaehne

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 4

1.1 Fragestellung 12

2 Material und Methoden 13

2.1 Material 13

2.1.1 Untersuchungsgut 13

2.1.2 Kontrollmaterial 15

2.1.3 Oligonukleotide 15

2.1.4 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien 15

2.1.5 Verwendete Chemikalien und Enzyme 16

2.1.6 Verwendete Lösungen und Puffer 17

2.2 Methoden 18

2.2.1 Hybrid Capture 18

2.2.2 Direkte Sequenzierung 19

2.2.3 Immunhistologie 23

3 Ergebnisse 27

3.1 Kollektiv 27

3.1.1 Histologie 27

3.1.2 Geschlechterverteilung 35

3.1.3 Altersverteilung 35

3.2 HPV-Nachweis 36

3.2.1 Hybrid-Capture 36

3.3 Sequenzen 37

3.4 HPV-Sequenzierung 38

3.5 Immunhistologie 41

3.6 Korrelation der Daten (p16 und HPV) 45

4 Diskussion 50

5 Zusammenfassung 55

Abbildungsverzeichnis 57

Tabellenverzeichnis 60

Abkürzungsverzeichnis 61

Literaturverzeichnis 62

Danksagung 72

Erklärung 73

Lebenslauf 74

1 Einleitung

BASALOIDES PLATTENEPITHELKARZINOM [BSCC]

Das basaloide Plattenepithelkarzinom ist eine Variante, die 1% aller Plattenepithelkarzinome umfasst. Es handelt sich dabei um einen hochmalignen, bimorphen Tumor. Im Kopf-Hals-Bereich sind seit der Erstbeschreibung von Wain et al. (1986) ungefähr 100 Fälle beschrieben worden. Hier kommt diese PEC-Variante hauptsächlich im Hypopharynx, am Zungengrund, im Larynx, sowie im parapharyngealen und supraglottischen Bereich vor. Das histologische Merkmal ist eine basaloide Komponente, die nicht nur bei Plattenepithelkarzinomen, sondern auch in einigen Dysplasien und fokalen plattenepithelialen Differenzierungen vorkommt. Der Begriff „basaloid" beschreibt einen soliden Verband von Zellen mit hyperchromatischen Kernen und spärlichem Zytoplasma. Dazwischen gibt es kleine zystische Räume und Nekroseareale (Wain et al., 1986). Der generell hohe Malignitätsgrad und ein häufig fortgeschrittenes Tumorstadium bedingen eine schlechte Prognose (Ihrler 2003).

Kopf-Hals-Karzinome sind generell neoplastische Erkrankungen von multifaktorieller Ätiologie, bei denen vorrangig das Zigarettenrauchen als Risikofaktor diskutiert wird, gefolgt vom Alkoholkonsum und ihren synergistischen Effekten. Zunehmend unterstützen epidemiologische Befunde eine ätiologische Rolle der HPV-Infektion als Risikofaktor zumindest bei einigen histologischen PEC-Subgruppen (Cann et al., 1985, Gillison et al., 2000).

Die Ergebnisse solcher Studien deuten darauf hin, dass der Nachweis von HPV im Tumorgewebe als prognostischer Marker hinsichtlich Krankheitsschwere und Krankheitsverlauf dienen könnte. Trotz überzeugender Belege aus epidemiologischen und experimentellen Studien ist für Kopf-Hals-Tumoren bisher noch nicht geklärt, über welchen Mechanismus diese Viren Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen.

Zur Abgrenzung des basaloiden Subtyps wurden in der Vergangenheit an PECs überwiegend immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Es galt, diesen Tumorsubtyp zunächst histologisch von ähnlichen Tumoren wie dem kleinzelligen,

undifferenzierten Karzinom und dem adenoid-zystischen Karzinom zu unterscheiden (Banks et al., 1992; Morice et al., 1998). BSCCs sind histologisch eher unauffällig, sind aber dennoch im Vergleich zu undifferenzierten SCCs mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert (Wain et al., 1986; Paulino et al., 2000).

Obwohl von den meisten Autoren das BSCC als eine eigenständige Variante des SCC akzeptiert wird, ist seine Histogenese noch weitgehend ungeklärt. Auch ist eine genaue Klassifikation basaloider SCC bislang nicht möglich, da ein allgemeingültiges Grading-System für diesen Tumortyp fehlt (Owonikoko et al., 2001).

Desweiteren sind Untersuchungen zur Protein-Expression und molekulargenetische Analysen, die die Pathogenese von BSCC erklären, selten. Dennoch lassen neuere Untersuchungen vermuten, dass dem BSCC und SCC unterschiedliche genetische Veränderungen zugrunde liegen (Coletta et al., 2001; Owonikoko et al., 2001).

Einen besonderen Befund, bei dem über den histologischen Subtyp auf die Ätiologie des Tumors rückgeschlossen werden konnte, stellen die Beobachtungen von Gillison et al. dar, die bei oropharyngealen Karzinomen das Vorliegen einer HPV-Infektionen mit einer basaloiden Morphologie in Verbindung bringen konnten (Gillison et al., 2000).

In weiterführenden Untersuchungen gilt es zu klären, inwieweit für SCC der Mundhöhle mit basaloidem Phänotyp eine HPV-assoziierte Pathogenese vorhersagbar ist. Von besonderem Interesse ist, in welcher Form sich diese morphologischen Veränderungen bereits in den als Präkanzerosen eingestuften Karzinomvorstufen darstellen lassen.

KARZINOGENESE/ONCOGENESE

Die Entstehung von Tumoren ist trotz jahrzehntelanger Forschung noch nicht in allen Einzelheiten geklärt und wirft auch heute noch viele unbeantwortete Fragen auf (Hanahan et al., 2000). Erwiesen ist, dass es sich bei der Entwicklung von Tumoren um einen mehrstufigen Prozess handelt, bei dem die einzelnen Stufen einzelne genomische Veränderungen reflektieren, die alle dazu dienen, der Zelle einen Selektionsvorteil zu verschaffen.

Verbreitet sind 2 Modelle für eine solche Mehrschritt-Theorie. Während bei der Adenom-Karzinom-Sequenz davon ausgegangen wird, dass sich aus einem gutartigen Tumor ein Malignom entwickelt, stellen bei der Dysplasie-Karzinom-Sequenz die verschiedenen Formen der intraepithelialen Neoplasien morphologische Vorläuferläsionen eines invasiven Karzinoms dar. Diese Form der Karzinogenese, die mit einer be-

stimmten Abfolge genetischer Veränderungen einhergeht, ist eingehend für das Cervix- und Colonkarzinom dargestellt worden (Vogelstein et al., 1990). Im Falle der Cervix uteri spielen im Verlauf der Tumorentstehung HPV-Infektionen eine wichtige Rolle und sie konnten als wichtigster ätiologischer Faktor identifiziert werden (zur Hausen 2000).

Ausgehend von epidemiologischen und molekularen Daten ist es naheliegend, dass ebenfalls in der Karzinogenese von Mundhöhlenkarzinomen HPV eine Rolle spielt, zumindest in einem Teil der Fälle. Für die Tumoren der Mundhöhle stehen umfassende Studien und beweiskräftige Daten noch aus, so dass erst zukünftige Untersuchungen dazu beitragen können, den Umfang der Beteiligung von HPV bei der Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen aufzuklären. Nach vorläufigen Ergebnissen zahlreicher Studien ist jedoch ein ähnlicher Verlauf denkbar.

HUMAN PAPILLOMA VIRUS [HPV]

Erstmals wurden 1933 Viruspartikel aus einer Papillomatose beim Kaninchen isoliert und als infektiöses Agens identifiziert (Shope 1933).

Bei dem HP-Virus handelt es sich um ein ca. 7,9 kb großes, hüllenloses, doppelsträngiges, zirkuläres DNA-Virus, das an einer Vielzahl von Erkrankungen im Anogenital- und Aerodigestivtrakt beteiligt ist. Gegenwärtig sind über 80 HPV Typen bekannt. Traditionell wurden die verschiedenen Typen nach Zugehörigkeit zur äußeren Haut oder zur Schleimhaut und in Abhängigkeit von ihrer Fähigkeit, Karzinome hervorzurufen, in high-risk- und low-risk-Typen unterteilt (Stammbaum-Tabelle) (zur Hausen, 1996). Diese Viren infizieren im Plattenepithel die Zellen der Basalzellschicht. Die HPV-assoziierten Erkrankungen erstrecken sich von gewöhnlichen Warzen über laryngeale Papillome bis hin zu zervikalen Karzinomen, wobei auch Papillome zu Karzinomen entarten.

Das HPV-Genom wird im wesentlichen in 3 Abschnitte unterteilt: die URR („up stream regulatory region“), der neun offene Leseraster (open-reading frames) folgen, die sich auf 7 Frühphasen Gene (E = early) und 2 Spätphasen Gene (L = late) verteilen. Die URR kodiert nicht für ein Protein, sondern besteht aus einer Reihe von Bindungsstellen für Aktivatoren und Suppressoren der Transkription. Sie ist insofern von Bedeutung, als sie die Transkription viraler Gene reguliert und somit die Translation viraler Proteine kontrolliert. Die Gene der „early region“ dienen unter anderem der Replikation der Virus-DNA. Sie kodieren für die viralen Onkoproteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7. Das E1-Protein bestimmter HPV-Typen besitzt ATP-ase und Helicase-Eigenschaften. E2 bindet an die HPV-URR und wirkt sowohl als Aktivator als auch

Suppressor der viralen Transkription (Milde-Langosch et al., 1999). Eine Bindung des E4-Proteins an das Zytoskelett induziert vermutlich die Destruktion der Zytokeratinfilamente, was für die Freisetzung der Virionen aus den Zellen von Bedeutung ist. Diese Veränderung kommt morphologisch in dem sogenannten zytopathischen Effekt zum Ausdruck, der für HPV-infizierte Zellen charakteristisch ist. Das E5-Protein erhöht die EGF-vermittelte Signalübertragung in der Zelle (Park et al., 1995; zur Hausen, 1994).

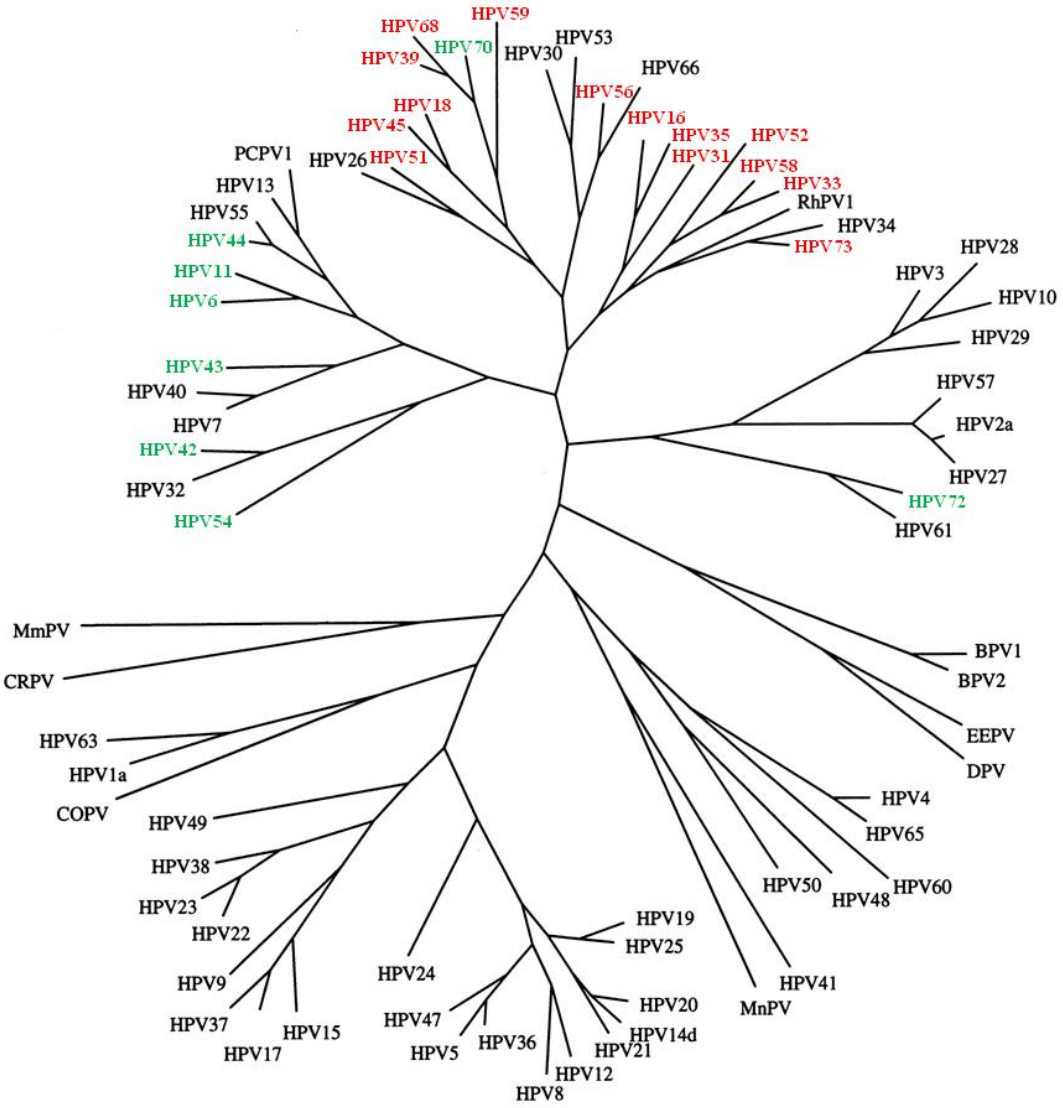


Abbildung 1: HPV-Dendrogramm (nach zur Hausen); HPV-high-risk Typen:rot,HPV-low-risk Typen: grün markiert. Der HPV-Stammbaum der genitalen HPV-Typen ist den oralen HPV-Typen gegenübergestellt.

Bei der viralen Replikation und für die neoplastischen Transformation der Wirtszelle spielen insbesondere die Onkoproteine E6 und E7 eine entscheidende Rolle. Sie binden an p53 und Rb, die ihrerseits an der Regulation des Wachstums beteiligt sind (Kim et al., 2005).

Die Gene der „late region“ kodieren für diejenigen Proteine, die der Virusverbreitung dienen. Die Gene L1 und L2 werden erst zu einem späten Zeitpunkt transkribiert und kodieren für die viralen Kapsidproteine (Milde-Langosch et al., 1999).

HPV UND DIE TUMORSUPPRESSORGENE

Das orale Epithel reagiert sensibel auf virus-induzierte Veränderungen, wie durch Einbringung des Virus in Keratinozyten gezeigt werden konnte (Eversole et al., 2000; Elamin et al., 1998). Normale Zellen des Plattenepithels verfügen über die Fähigkeit, Veränderungen in den Wachstumsmustern wieder zu erkennen. Diese Mechanismen dienen dazu, die zelluläre mitotische Unversehrtheit beizubehalten und damit eine Tumorentstehung zu unterdrücken. Diese Funktion wird von sogenannten Tumorsuppressor-Genen übernommen. Eines davon ist das p53-Gen, bei dem es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt, der die Zellproliferation blockieren kann. P53 reagiert auf DNA-Schäden, in dem es einen Stillstand in der G1-Phase hervorruft und so regulierend in die Zellproliferation eingreift.

Das pRb-Gen ist in der Lage, auf transkriptioneller Ebene die Genexpression zu unterdrücken. Rb kann durch Zyklin-abhängige Kinasen zu pRb phosphoryliert werden, so dass Rb seine Fähigkeit, die Genexpression zu unterdrücken, verliert und eine unkontrollierte Zellteilung stattfinden kann.

P16 gehört zu den INK4-Tumorsuppressor-Genen, die als Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitoren fungieren. Durch Hemmung derjenigen Zyklin-abhängigen Kinasen, die Rb phosphorylieren, ist es möglich, die Zellproliferation zu blockieren. Eine Blockierung der Zyklin-abhängigen Kinasen durch Gene der INK4-Familie ermöglichen es dem Rb-Genprodukt, das Zellwachstum zu unterdrücken. Es konnte gezeigt werden, dass in den meisten Kopf-Hals-Karzinomen p16 in hypermethylierter Form oder in verringerter Expression vorliegt, was einen Verlust der Funktion zur Folge hat (Yuen et al., 2002). Allerdings ist p16 gerade in HPV-assoziierten Karzinomen überexprimiert (Fregonesi et al., 2003). Dieses Phänomen ist nicht genau verstanden und bezieht sich evtl. auf den Verlust eines negativen Feedbacks, da das HPV Protein E7 pRb phosphoryliert und dieses damit inaktiviert. Diese Inaktivierung könnte zum Verlust eines negativen Feedbacks hinsichtlich der p16-Expression führen (Cunningham et al., 2006).

Obwohl eher der Funktionsverlust von p16 und die verringerte Expression in einer Vielzahl von Organsystemen (Chakravarti et al., 2003, Feakins et al., 2003, Kawaguchi et al., 2003, Leversha et al., 2003, Makitie et al., 2003, Mihic-Probst et al., 2003) mit der Entstehung von Tumoren assoziiert ist, sind zervikale Dysplasien und Karzi-

nome durch eine Überexpression von p16 charakterisiert. Zum Nachweis einer high-risk HPV-assoziierten und high-grade zervikalen intraepithelialen Neoplasie ist der immunhistologische Nachweis der p16-Expression als Ersatzmarker bereits akzeptiert (Kalof et al., 2006). Zwar wurde bereits vorgeschlagen, die Überexpresson von p16 auch bei oralen Neoplasien als Ersatzmarker für eine HPV-induzierte high-grade Dysplasie oder ein Karzinom einzusetzen, jedoch ist es bisher nicht gelungen, in diesen Tumoren eine Übereinstimmung zwischen p16-Expression und Präsenz von HPV-DNA mittels PCR-Analyse zu zeigen.

Auch andere Untersuchungen an malignen oralen Läsionen haben zeigen können, dass eine Verbindung zwischen HPV-Infektionen und einer Überexpression des p16 Gens existiert. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere die HPV-Subtypen 16 und 18 mit einer p16-Überexpression in maligen oralen Läsionen und oralen SCC in Verbindung stehen (Fregonesi et al., 2003). Dagegen interpretieren Nemes et al. (2006) ihre Versuchsergebnisse so, dass die Expressionen von p16, p53 and Rb in oralen Plattenepithelkarzinomen unabhängig sind von einer HPV-Infektion.

Mechanismen der Tumorentstehung durch HPV-Infektionen

Für das zervikale SCC ist der Mechanismus mit HPV-Infektion, insbesondere mit den high-risk Typen 16 und 18 eingehend untersucht. Weltweit gehen beim Zervix-Karzinom mehr als 90% mit einer HPV-Infektion einher. In den meisten Fällen sind die HPV-Typen 16 und 18 beteiligt (Walboomers et al., 1999). Untersuchungen an Zervixkarzinom-Zelllinien haben gezeigt, dass zelluläre Mutationen und genomische Integration von Virus-DNA für den negativen Effekt der HPV-Infektion verantwortlich sind (Havre et al., 1995; Liu et al., 1997; Hashida und Yasumoto, 1991; White et al., 1994). Die Onkoproteine E6 und E7 stehen normalerweise unter der Kontrolle der beiden Inhibitor-Gene E1 und E2. Diese Gene können durch Integration der Virus-DNA verloren gehen oder so verändert sein, dass eine unkontrollierte Transkription von E6 und E7 möglich ist (Baker et al., 1987). Diese Proteine sind ihrerseits in der Lage, die Funktion der Tumor-Suppressor-Gene Rb und p53 zu stören und die Zellzykluskontrollpunkte in der G1-Phase zu kontrollieren (Werness et al., 1990). Veränderungen im p53-Gen liegen bei einer großen Vielzahl verschiedener Tumoren vor (Hollstein et al., 1991) und es ist bekannt, dass p53 das Ziel verschiedener viraler Infektionswege ist (Levine, 1990). Im Falle einer Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen können sich die Zellen unkontrolliert vermehren und es ist zudem möglich,

dass genomische Mutationen akkumulieren, was im Zusammenhang mit Tumorentstehung und -entwicklung ebenfalls von Bedeutung ist.

Der Mechanismus der Inaktivierung läuft wie folgt ab: das E6 bindet an das E6 assoziierte Protein, dieser Komplex bewirkt eine ubiquitin-abhängige Veränderung am p53-Gen, wodurch p53 inaktiviert wird (Scheffner et al., 1993). E7 ist in der Lage, an das Gen-Produkt von Rb zu binden und damit zu interagieren (Dysen et al., 1989), indem es die Rb-Proteine phosphoryliert, was zu einer Degeneration des Proteins durch Ubiquinierung führt (Boyer et al., 1996). Die Folge ist eine E2F-Aktivierung, wodurch Transkriptionsfaktoren produziert werden, die die Zellproliferation unterstützen. Ferner steht das Tumor-Suppressor-Gen p16 in engem Zusammenhang mit dem Rb-Regulationsweg. So kann p16 in Zellen mit Rb-Verlust keine effektive Tumorsuppression mehr bewirken (Koh et al., 1995; Lukas et al., 1995; Medema et al., 1995). Die Funktion des p16 Gen-Produktes besteht darin, das Fortschreiten des Zellzyklus zu unterbinden. P16 bindet an die Zyklin-abhängigen Kinasen 4/6, die Phosphorylierung kann nicht erfolgen und das Retinoblastoma-Gen-Produkt (Rb) wird nicht aktiviert. Es kommt zur Ausschüttung des Transkriptionsfaktors E2F, der den Zellzyklus verlangsamt.

Es sind viele andere Mechanismen entdeckt worden, die die Beteiligung von HPV in der Karzinogenese sichern (zur Hausen, 2000). Viele davon sind auch bei Kopf-Hals-Tumoren wirksam.

In malignen Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches konnten vermehrt die HPV Typen 16 und 18 nachgewiesen werden. Daneben sind, wenn auch nur selten, viele andere HPV-Typen in Kopf-Hals-Tumoren gefunden worden, darunter die Typen 31, 33, 39, 45, 52, 58 und 69 (zur Hausen, 1996). Für den PCR-basierten Nachweis der unterschiedlichen HPV-Typen sind in den letzten Jahren vorrangig „consensus“ Primer entwickelt worden, die möglichst viele der genannten Typen erfassen sollen.

In der Mehrzahl der Untersuchungen, die sich mit oralen Läsionen befasst haben, ist die Lokalisation Mundhöhle nicht weiter spezifiziert worden. Dennoch ergibt sich, dass die am häufigsten betroffenen Regionen die Lippen, das anteriore Drittel der Zunge, der Mundboden, der harte Gaumen, die Gingiva und die Wangenschleimhaut sind. Hiervon ist der Oropharynx zu unterscheiden, welcher den weichen Gaumen, den Zungengrund, die Tonsillenregion und den hinteren Pharynx umfasst. Insbesondere für diese Karzinome ist die häufige Assoziation mit einer HPV-Infektion bekannt (Gillison et al., 2000).

Schon die Tatsache, dass HPV bevorzugt epitheliale Gewebe infiziert, macht die Vermutung einer Verbindung zwischen oralen Plattenepithelkarzinomen und HPV wahrscheinlich. Eine erste Bestätigung hierfür lieferten lichtmikroskopische Beobachtungen in oralen Läsionen, in denen sich ein zytopathischer Effekt (Koilocytose) zeigt, wie er für HPV-Infektionen charakteristisch ist (Syrjanen et al., 1983). Diese Beobachtungen konnten später durch In-Situ-Hybridisierungen bestätigt werden. HPV-DNA wurde in oralen Präkanzerosen (4/5 Leukoplakien) und invasiven Karzinomen (3/6 Karzinome) nachgewiesen, wodurch ein kausaler Zusammenhang von HPV und oraler Karzinogenese bestätigt wurde (Loning et al., 1985). Weitere zytologische Merkmale ergaben Übereinstimmungen mit einer HPV-Infektion. Hierzu zählt auch der Mangel an Keratin (Wilsczynski et al., 1998).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass humane Keratinozyten und auch orale Epithelzellen, die die HPV-Gene E6 und E7 exprimieren, gleichermaßen die Fähigkeit besitzen, in Kultur spontan zu immortalisieren (Munger et al., 1989; Park et al., 1991; Oda et al., 1996; Munoz, 2000). Diese Daten, die an Zelllinien gewonnen wurden, unterstützen ebenfalls die Vermutung, dass HPV-Infektionen nicht ausschließlich in anogenitalen epithelialen Läsionen vorkommen, sondern auch andere Epithelien betreffen können.

Die Mehrheit der Untersuchungen zur HPV-Infektion in Kopf-Hals-Tumoren haben sich auf den Nachweis der HPV-Typen 16 und 18 konzentriert, zumal diese Viren in zervikalen Karzinomen als high-risk identifiziert wurden. Interessanterweise wurden in oralen Karzinomen der Mundhöhle die HPV-Typen 6, 11 und 33 nicht gefunden (Mork et al., 2001), obwohl sie in anderen Kopf-Hals-Tumoren, wie z.B. in Larynx-Papillomen vorkommen.

1.1 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen einer HPV-high-risk Infektion und einem basaloiden Phänotyp in Läsionen des oralen Plattenepithels besteht. Im Fokus der Untersuchung waren dabei speziell die basaloiden Plattenepithelkarzinome.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob Veränderungen der p16-Expression auch bei oralen Läsionen Rückschlüsse auf das Vorliegen einer HPV-Infektion zulassen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsgut

Bei dem Untersuchungsgut handelte es sich ausschließlich um Archivmaterial aus dem Hamburger Institut für Oralpathologie. Die Gewebeproben wurden zwischen 2000 und 2006 sowohl aus dem UKE als auch von auswärtigen Einsendern an das Institut für Oralpathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur konsiliarischen Beurteilung eingesendet und anschließend dort archiviert.

Es wurden 34 Gewebeproben aus der Region des Kopf-Hals-Bereiches untersucht. Die Gewebeproben waren formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet.

Die Auswahl der basaloiden PECs der Mundhöhle wurde anhand der histologischen Befunde getroffen. Es fand eine Nachbegutachtung durch einen Pathologen statt.

Als Kontrollgruppe wurde ein Kollektiv von Papillomen und Dysplasien/ Hyperplasien der Mundhöhle untersucht. Zugleich wurde dieses Kollektiv genutzt, um zu überprüfen, ob in oralen Papillomen und Präkanzerosen eine mit den genitalen Läsionen vergleichbare Verteilung der HPV-Typen vorliegt.

Tabelle 1: Untersuchungsgut

Nr.	Alter	Geschlecht	Histologie	Lokalisation
basaloide Plattenepithelkarzinome				
1	61	m	basaloid	Mundschleimhaut
2	65	m	knöchernes Resektat (regio42-43)	Unterkiefer rechts
3	68	m	basaloid	Zungenrand links
4	82	m	basaloid	Parotis
5	65	w	basaloid	Unterkiefer rechts
6	81	w	basaloid	Parotis
7	40	w	Metastase	Hals
8	49	w	verrucös, hochdifferenziert	UK rechts
9	67	w	kondylomatös	Mundschleimhaut 35
10	74	w	basaloid (partiell)	kleine Speicheldrüsen
11	76	w	basaloid	Zungengrund
12	37	m	basaloid	Hals-LK
13	42	m	basaloid	Hals links
14	48	m	basaloid	Zungengrund
15	62	m	Metastase	Hals-LK
16	64	m	basosquamös, EBV-assoz.	weicher Gaumen
17	70	m	basaloid	Parotis
Papillome				
18	57	m	plattenepithelialer Typ	Nasengang rechts
19	80	m		Zungenrand links
20	20	m		Larynx
21	41	m	hyperkeratotisch	SH Gaumen
22	49	m		regio 31-32
23	56	m		Zunge/SH regio 37
24	64	w	fibroepithelial	Unterlippe/Wange
25	?	m	hyperkeratotisch	Unterlippe
26	61	w		Unterlippe/Wange
27	71	w	atypisch	WangenSH 47/48
Hyperplasien/Dysplasien				
28	42	m	parakeratotisch	WangenSH
29	47	m	verrucös	Speicheldrüse
30	92	w	papillär	Oberlippe
31	37	m	verrucös	WangenSH
32	54	m	Candidiasis	SH Zungenrücken
33	30	w		
34	76	w	verrucös	Mundwinkel links
Kontrollen				
35	19	m		Analkanal

2.1.2 Kontrollmaterial

Bei der p16-Immunhistochemie wurde ein Gewebeschnitt mit starker p16-Expression als Positivkontrolle genutzt. Für die Negativkontrolle wurde in der Immunhistologie ein Schnitt ohne Primärantikörper mitgeführt.

Bei dem Kontrollmaterial für die HPV-Sequenzierung handelt es sich um ein HPV-high-risk positives Plattenepithelkarzinom des Analkanals.

2.1.3 Oligonukleotide

Primer GP5+ :	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'
Primer GP6+ :	3'-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG-5'
Kontrollprimer B-Globin-F:	5'-GCCATCACTAAAGGCACCGAGC-3'

Die Sequenzen der Primer wurden von Jacobs et al. (1995) beschrieben. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

2.1.4 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Mikrotom HM 400	Mikrom GmbH, Walldorf
Hybridisierungsofen, Shaker	Amershan Biosciences, UK
Wasserbad Medax	Wilke & Witzel, Hamburg
Beschichtete Objektträger	Histobond Marienfeld, Deutschland
Kamera AxioCam MRc5	Zeiss Jena, Deutschland
Entparaffinator Shandon Varistain 24-4	Thermo Electron Cooperation
Mikrowelle Micromat Duo	AEG/Elektrolux, Stockholm
Mikrowellengefäße	Dako, Hamburg
Färbeküvetten mit Objektträgereinsatz	Assistent, Sondheim, Deutschland
Schüttlerwasserbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
Mikroskop Axiophot2	Zeiss Jena, Deutschland
Vortexer VF2	Janke & Kunkel, Staufen,Deutschland
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich Zentrifugen, Wesseling-Berzdorf
Photometer Smart Spec 3000	BioRad, München
Eppendorf Thermomixer HLC-HBT130	Wowenden, Deutschland
Thermocycler, Personal Cycler	Biometra, Göttingen

Minishaker, Minischüttler, MS2	IKA-Works,Inc., Wilmington, USA
Kühlschrank Comfort	Liebherr,Ochsenhausen
Gefrierschrank Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Luminometer	DML2000 Digene (6000-2240), Frankfur
UVP Transilluminator	Spectroline, Deutschland
DNA Sub Cell Electrophoresis System	Bio Rad, München
Geldokumentationseinheit Universal Hood	Bio Rad, München

2.1.5 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden folgende Chemikalien und Reagenzien verwendet:

ANTIKÖRPER

Maus anti-human p16 (Clon G175-405)	Pharmingen,USA, Kat. 554070
Normalserum Kaninchen	DAKO, X0902
Kaninchen anti-Maus IgG biotingekoppelt	Dako, E0413

SONSTIGE CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Diamino-di-benzidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D8001
Natriumchlorid	Merck,#101540, Darmstadt
Citronensäure	Merck, # 244
1 N HCl	Merck, #1.09057
Trizma-Base	Sigma, T1503
Citronensäure Monohydrat	Merck, #913349
Methanol	Merck,#106008
H_2O_2 30%	Merck, #107210
ABC-Vectastain Elite	PK-6100, Vector Lab. Inc., USA
Antibody Diluent	DAKO, S3022
Mayers Hämalaun	Merck,# 1.09249
Xylol	Merck, #818754
Ethanol	Merck, #100983

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen Hilden 51306,
Taq PCR Core Kit	Qiagen Hilden 201225

HYBRIDISIERUNGSSONDEN:

HPV Test Dual Probe	Digene (5101-1096)
HPV Test High Risk	Digene (5101-1190)
HPV Test Panel 6 member	Digene (5101-1024)
HPV Validation Panel	Digene (5101-1042)
Agarose (Nusieve 3:1)	Biozym, hess. Oldendorf 850090
Gene Ruler	MBI Fermentas, Lithuania SM0241

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von der Firma Merck bezogen.

2.1.6 Verwendete Lösungen und Puffer

Ethidiumbromid-Lsg:	10 mg/ml H_20
TAE (pH 7,8):	40 mM Tris
	1 mM EDTA
	1,6 mM $C_2H_4O_2$
TBS (pH 7,6):	7,4 mM Trishyroxymethylaminomethan
	43,5 mM Trishydrochlorid
	150 mM Natriumchlorid

VORBEHANDLUNG

Citratpuffer, pH 6,0	0,1 M Citronensäure
	0,1 M Natriumcitrat

PEROXIDASE-BLOCKIERUNG

Blockade:	9,756 mM Methanol
	24,39 mM H_2O_2
Kaninchen Normalserum:	1 : 10 in Dako-Antibody Diluent

PRIMÄRANTIKÖRPER

Maus anti-Human p16	1: 100 in Dako-Antibody Diluent

SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Kaninchen-Anti-Maus IgG/ Biotin	1 : 200 in Dako-Antibody Diluent

ABComplex:	1 Tropfen Lsg. A + 1 Tropfen Lsg. B in 2,5 ml TBS 30 min Vorinkubation, RT, Rüttler
DAB-Stocklösung:	100 mg Diaminobenzidin in 20 ml TBS (pH 7,6)
DAB-Gebrauchslösung:	1:10 in TBS verdünnt, portionieren, bei -20°C lagern
Detektionslösung:	1 ml DAB-Gebrauchslösung +60 µl 30 % H_2O_2

2.2 Methoden

2.2.1 Hybrid Capture

Alle Tumorproben wurden zunächst mit der Hybrid-Capture Methode auf das Vorliegen einer HPV-Infektion untersucht und nach HPV-high-risk oder HPV-low-risk Infektion selektiert. Dazu wurden die Proben entsprechend der Angaben des Herstellers aufgearbeitet (alle verwendeten Lösungen waren Bestandteil des Digene Hybrid-Capture HPV Kit.

DENATURIERUNG

Die Extraktion der DNA erfolgte in einer Kombination aus mechanischem und chemischem Gewebeaufschluss. Das Denaturierungsreagenz wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und zu den Tumor- und Kontrollproben pipettiert. Anschließend waren die Proben 5 sec bei hoher Geschwindigkeit im Schüttler. Die Lösung wies danach eine purpurrote Farbe auf. Zur Denaturierung der DNA erfolgte eine Inkubation bei 65°C für 45 min. In der Zwischenzeit wurde das HPV-Sondengemisch vorbereitet.

HYBRIDISIERUNG

Die Probe mit der denaturierten DNA wurde gut durchgemischt und es wurden 75 µl in das „LR“ Röhrchen und 75 µl in das „HR“-Röhrchen pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 20-25°C für 10 min. Danach wurden 25 µl low-risk-HPV-Sondenmischung in die „LR“-Röhrchen und 25 µl high-risk-HPV-Sondenmischung in die „HR“-Röhrchen pipettiert. Die Mikroröhrchen wurden ver-

schlossen und 3 min auf dem Kreisschüttler bei 1100 U/min geschüttelt. Der Erfolg der Hybridisierung zeigte sich in einer gelben Verfärbung der Lösung. Es folgte eine Inkubation bei 65°C für 60-65 min, währenddessen die Capture-Mikrotiterplatte vorbereitet wurde.

HYBRID-CAPTURE

Die Lösungen wurden aus den Mikroröhrchen mit einem 8-Kanal-Dispenser auf eine Capture-Mikrotiterplatte überführt. Die Platte wurde abgedichtet und bei 20-25°C bei 1100 U/min für 60 min geschüttelt. Während dieses Vorganges wurde der Waschpuffer vorbereitet. Danach wurde die Capture-Mikrotiterplatte dekantiert und Restflüssig wurde abgetropft.

HYBRIDENNACHWEIS

Zum Nachweis der entstandenen Hybride wurden 75 µl Nachweisreagenz 1 in die Vertiefungen der Capture-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Capture-Mikrotiterplatten wurden wieder verschlossen und bei 20-25 °C für 30-45 min inkubiert.

SPÜLVERFAHREN

Überschüssige Reagenzien und Farbpräzipitate wurden durch 6-maliges Spülen, Dekantieren und abschließendes Abtupfen der Platten entfernt.

SIGNALAMPLIFIKATION

Zur Verstärkung der Signale wurde in die Vertiefungen der Capture-Mikrotiterplatte 75 µl Nachweisreagenz 2 pipettiert und diese nochmals bei 20-25°C für 15-30 min inkubiert.

DETEKTION

Über die unterschiedliche Markierung der Sonden ließen sich die jeweiligen Hybride bestehend aus Tumor-DNA + Hybridisierungssonde (low-risk oder high-risk) unterscheiden. Die Messung erfolgte in einem DML 2000-Luminometer der Fa. Digene.

2.2.2 Direkte Sequenzierung

In den Fällen, die nach dem Hybrid-Capture Test eine HPV-high-risk Infektion aufwiesen und in Fällen mit zweifelhaften negativen Ergebnissen, z. b. bei nachge-

wiesener p16-Überexpression, wurde der HPV-Typ mit Hilfe von Konsensus-Primern über eine direkte Sequenzierung bestimmt.

DNA-EXTRAKTION

Für die DNA-Extraktion wurde der Qiagen Mini Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstelleranweisung, alle verwendeten Lösungen waren Bestandteil des Kits.

Vorbereitung:

Die DNA wurde aus 3-5 ca. 4 µm dicken Paraffinschnitten isoliert. Die Schnitte wurden in 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt.

Zuerst wurde eine Entparaffinierung durchgeführt (s. Standardprotokoll A, aus: Beilage im QiampDNA Mini Kit). Je Röhrchen wurden 1200 µl Xylol dazugegeben. Der Inhalt wurde auf dem Schüttler gemischt. Der Gewebeanteil wurde abzentrifugiert (5min, 13000 Upm (Universal 32R)). Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und verworfen. Anschließend wurden in jedes Röhrchen 1200 µl 100%-iges Ethanol gegeben, gemischt und zentrifugiert (s.o.). Der Überstand wurde entfernt und der Vorgang noch einmal wiederholt. Zum Trocknen der Gewebeproben wurden nach dem Abpipettieren des Ethanols die offenen Röhrchen bei 37°C im Inkubationsschrank für 10-15 min inkubiert. Das Gewebe wurde in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert.

DNA-ISOLIERUNG

Für die Isolierung der DNA wurden in die Röhrchen 20 µl Proteinkinase-K gegeben, vermischt und über Nacht bei 56°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Inkubation erfolgte solange, bis die Probe vollständig gelöst war.

Der Probeninhalt wurde kurz zentrifugiert. Es wurden 4 µl Rnase (100mg/ml) hinzugefügt und 15 sec gemischt, bevor für 2 min bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde wieder kurz zentrifugiert.

Es folgte die Zugabe von 200 µl AL-Puffer. Die Lösungen wurden für 15 sec geschüttelt und für 10 min bei 70°C inkubiert.

Nach kurzem Zentrifugieren wurden 200 µl 100%iges Ethanol dazugegeben, die Probe 15 sec geschüttelt und anschließend zentrifugiert.

Vorsichtig wurde die Probe auf die QIAamp Spin Säule in einem 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Kappe wurde geschlossen und das Ganze für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert.

Die Säule wurde nun in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß gesetzt und das Eluat verworfen.

Zum Spülen wurden 500 µl Puffer AW1 auf die Säule gegeben und die Probe 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule auf ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß überführt.

Es wurden 500 µl Puffer AW2 auf die Säule pipettiert und anschließend für 3 min bei max. Rotorgeschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Eluat verworfen.

Zum Eluieren der DNA wurden 200 µl Puffer AE auf die Säule gegeben und 1 min bei RT inkubiert. Danach wurde für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Das Eluat aufgefangen und der Schritt einmal wiederholt.

QUANTIFIZIERUNG DER DNA

Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Ein 1 µl-Aliquot wurde im Photometer Smart Spec 3000 der Fa. BioRad bei 260 nm gemessen.

PCR

Zur Amplifikation der HPV-DNA wurde der Qiagen Taq PCR Core Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die verwendeten Lösungen waren in dem Kit enthalten.

In die PCR-Reaktion wurden 1 ng DNA eingesetzt.

Es wurden folgende Primer verwendet (Jacobs et al. 1995):

Primer 1: GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3')

Primer 2: GP6+ (3'-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG-5')

Für die Polymerasekettenreaktion wurde ein Mastermix angesetzt, der alle Reagenzien enthielt mit Ausnahme der DNA-Probe (Template):

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mastermixes

Mastermix	µl	Konz.
10 x PCR Puffer	5 µl	
dNTP mix	1 µl	20µM
Primer Gp 5+	0,5 µl	50pmol
Primer Gp 6+	0,5 µl	50pmol
Taq DNA Polymerase	0,25 µl	1 U
A. bidest.	37,75 µl	-
Template DNA	5 µl	1ng
Gesamtvolumen	**50 µl**	-

Bei jeder PCR wurden sowohl eine Positivkontrolle (DNA eines bekannten HPV-high-risk Falles) und als auch eine Negativkontrolle (Aqua sterile) mitgeführt.

Für die PCR wurde der Thermocycler der Fa. Biometra (Trio Thermoblock) mit folgendem Programm verwendet:

Tabelle 3: PCR-Programm

Vorbehandlung			3 min	94°C
Denaturierung	0,5 – 1 min	94°C		
Annealing der Primer	0,5 – 1 min	50 – 68°C		
Kettenverlängerung	1 min	72°C		
Anzahl der Zyklen	25 - 35			
Nachbehandlung			10 min	72°C

Nach Programm-Ende wurden die Proben im Thermocycler auf 20°C abgekühlt und dann bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

NACHWEIS UND IDENTIFIKATION DES PCR-PRODUKTES

Der Erfolg der PCR wurde zunächst in einem 1,5%-igen Agarose-Gel überprüft.

Dazu wurde ein 1,5%-iges Agarosegel in 1x Tris-Ac-Puffer mit 0,05 µg/ml Ethidiumbromid eingesetzt. Zum Vorbereiten der Proben für die Elektrophorese wurden 1 µl einer 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas, Gene Ruler) und 10 µl PCR-Produkt zusammenpipettiert.

Als DNA-Molekulargewichtsmarker wurde die Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas) in folgender Zusammensetzung verwendet:

1µl Gene Ruler 100 bp DNA

1µl 6x Loading Dye Solution

9µl Aqua dest.

Nach Einbringen der Proben in die Geltaschen erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 80 Volt in 1x Tris-Ac-Puffer über 35 min. Ausgewertet wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator, wobei die Dicke der mit Ethidiumbromid sichtbar gemachten Banden direkt mit der DNA-Menge korrelierte. War für eine Probe die Bande nur sehr schwach oder gar nicht zu erkennen, musste die entsprechende PCR wiederholt werden. Das Kontrollgel wurde zur Dokumentation fotografiert.

SEQUENZIERUNG

Das PCR-Produkt wurde vor der Sequenzierung aufgereinigt und in die Sequenzreaktion eingesetzt. Das Alignement erfolgte mit dem Programm „BioEdit“ (Sequenzer der Fa. ABI).

2.2.3 Immunhistologie

Von den für die Untersuchung vorgesehenen Paraffinblöcken wurden für den immunhistologischen Nachweis der p16-Expression 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen.

Als Positivkontrolle wurde eine positive Tumorprobe und als Negativkontrolle ein Tumor aus dem Untersuchungsgut bei jeder Reaktion mitgeführt.

IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DER P16-EXPRESSION MIT DER DAB-METHODE

Als Detektionsverfahren wurde die DAB-Methode gewählt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin, einem Hühnereiweiß-Glykoprotein zu Biotin (Vitamin H). Der AB-Komplex besteht aus Avidin und einem biotinylierten Enzym, in diesem Fall einer Peroxidase. Dieser Komplex wird über einen biotinylierten Sekundärantikörper an den Primärantikörper gebunden, der wiederum gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch eine Enzym-Substratreaktion sichtbar gemacht. Durch Zugabe von Diaminobenzidin (Peroxidase-Substrat-Kit DAB) entsteht ein braunes Präzipitat, welches das Antigen spezifisch nachweist.

Herstellung der Paraffinschnitte

Am Mikrotom wurden 4-6 µm dicke Schnitte hergestellt. In einem handwarmen Wasserbad wurden die Schnitte gestreckt und auf beschichtete Objektträger (Marienfeld Histobond) aufgezogen. Danach wurden sie 20 min bei 60°C im Wärmeschrank getrocknet.

Entparaffinierung

Die Schnitte wurden im Entparaffinator im Xylol entparaffiniert und anschließend durch die absteigende Ethanolreihe (100% - 80%) bis zum 80%igen Ethanol geführt.

Demaskierung der Epitope (Mikrowellenbehandlung)

Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte in mikrowellengeeignete Küvetten mit 200 ml Citratpuffer (pH 6,0) überführt und bei 1000W Mikrowellenleistung für 2-3 min zum Kochen gebracht. Danach folgte eine Reduzierung der Mikrowellenleistung auf 500W für 2 min, ein Abstoppen des Kochvorganges und eine viermalige Wiederholung dieser beiden Schritte. Die Schnitte wurden in 20-25 min durch schrittweisen Austausch von heißem gegen kalten Puffer abgekühlt.

Danach folgte ein 2 x 5 minütiges Puffern mit TBS.

Methanolblockade

Die endogene Peroxydase wurde durch Inkubation der Schnitte für 20 min mit frisch angesetzter Methanol-H_2O_2-Lösung gehemmt. Anschließend wurden die Präparate in TBS gespült.

Absättigung unspezifischer Bindungen

Die Objektträger wurden in eine feuchte Kammer überführt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden auf jeden Objektträger Normalserum pipettiert. Die Inkubation der Schnitte erfolgte für 30 min in der feuchten Kammer bei RT.

Primärantikörperbehandlung

Nachdem das Normalserum dekantiert war, wurden jeweils 100 µl Primärantikörper (Maus anti-Human p16) auf die Schnitte pipettiert. Der Primärantikörper wurde in einer Endverdünnung von 1:80 eingesetzt. Die Inkubation der Schnitte erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 min in TBS gespült.

Inkubation mit Sekundärantikörper

Die Schnitte wurden mit dem biotinylierten Kaninchen-Anti-Maus IgG Sekundärantikörper in der Endverdünnung 1:200 (jeweils 100 µl pro Schnitt) für 30 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 min mit TBS gewaschen.

Inkubation mit Detektionsreagenz

Die Herstellung des ABComplexes Vectastain AP erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es folgte eine Vorinkubation über 30 min.

Der ABComplex Vectastain AP wurde auf die Objektträger pipettiert (100 µl pro Schnitt). Inkubiert wurde 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 min in TBS gespült.

Farbreaktion

Als Nachweisreagenz wurde DAB verwendet. Die Gebrauchslösung wurde nach der Stocklösung angesetzt. Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer für 5-10 min im Dunkeln bei RT mit jeweils 200 µl DAB-Gebrauchslösung inkubiert. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurden die Schnitte in Aqua dest. überführt.

Gegenfärbung

Die Schnitte wurden mit Hämalaun für 10 sec gegengefärbt. Das Bläuen erfolgte durch Spülen der Schnitte in fließendem Leitungswasser (2 min).

Dehydrierung

Vor dem Eindecken wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt. Danach wurden die Schnitte in Xylol überführt und mit Eukitt eingedeckt.

MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG UND DOKUMENTATION

Die gefärbten Präparate wurden im Lichtmikroskop Axiophot2 der Fa. Zeiss semiquantitativ ausgewertet.

Hierbei wurden die Anzahl positiver Zellen und die Farbintensität berücksichtigt. Obwohl es sich bei p16 um ein Kernprotein handelt, kommt es (speziell im Zusammenhang mit HPV-high-risk Infektionen) auch zu zytoplasmatischen Expressionen, so dass zwischen zytoplasmatischer und nukleärer Färbung unterschieden wurde.

Der Nachweis wurde als positiv (für HPV-high-risk, s.o.) gewertet, wenn mikroskopisch eine zytoplasmatische sowie nukleäre Färbung der Tumorzellen erkennbar war (Nielsen et al., 1999; Shintani et al., 2000).

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgte semiquantitativ am Lichtmikroskop.

- keine positive Färbung sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern
+ schwache positive Färbung im Zytoplasma oder im Zellkern
++ deutliche positive Färbung im Zytoplasma oder im Zellkern
+++ starke positive Färbung im Zytoplasma oder im Zellkern

Die Befunde wurden mit der AxioCam MRc5 der Fa. Zeiss dokumentiert.

3 Ergebnisse

Unter Verwendung der im Methodenteil beschriebenen Methoden wie der Hybrid-Capture, direkten Sequenzierung und Immunhistologie wurde das Gewebematerial von 34 Läsionen des oralen Plattenepithels hinsichtlich einer HPV-Infektion und einer veränderten p16-Expression untersucht.

3.1 Kollektiv

3.1.1 Histologie

Bei den untersuchten Läsionen handelte es sich um basaloide Plattenepithelkarzinome (n = 17), Papillome (n = 10) und Dysplasien (n = 7).

Die Tumoren wurden mikroskopisch nachbegutachtet und die charakteristischen Befunde fotografisch dokumentiert.

BASALOIDES PLATTENEPITHELKARZINOM

Beim basaloiden Plattenepithelkarzinom dominiert histologisch eine basaloide Zellkomponente, häufig mit ausgeprägter Kernpleomorphie und Nekrosen. Daneben sind Übergänge in nicht basaloide Karzinomareale nachweisbar.

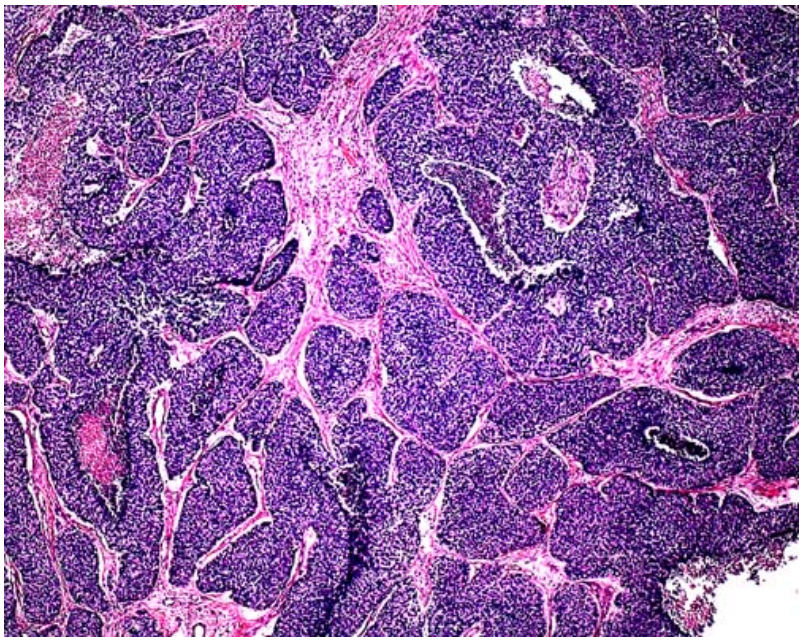


Abbildung 2: Nr.6: HPV-neg. / p16 +++cyt.: nesterförmig wachsendes Plattenepithelkarzinom, basaloides PEC; HE

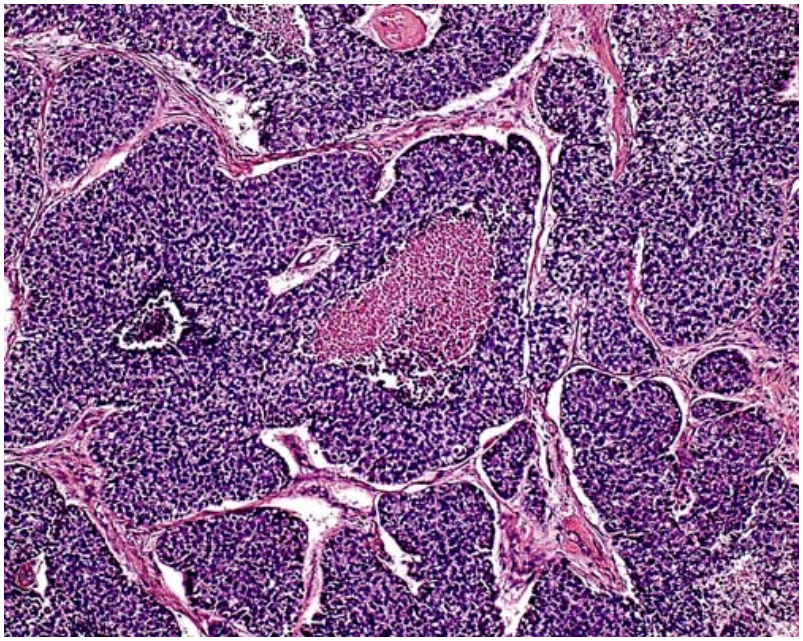


Abbildung 3: Nr.6: HPV-neg. / p16 +++cyt.: nesterförmig wachsendes Plattenepithelkarzinom, basaloides PEC; HE

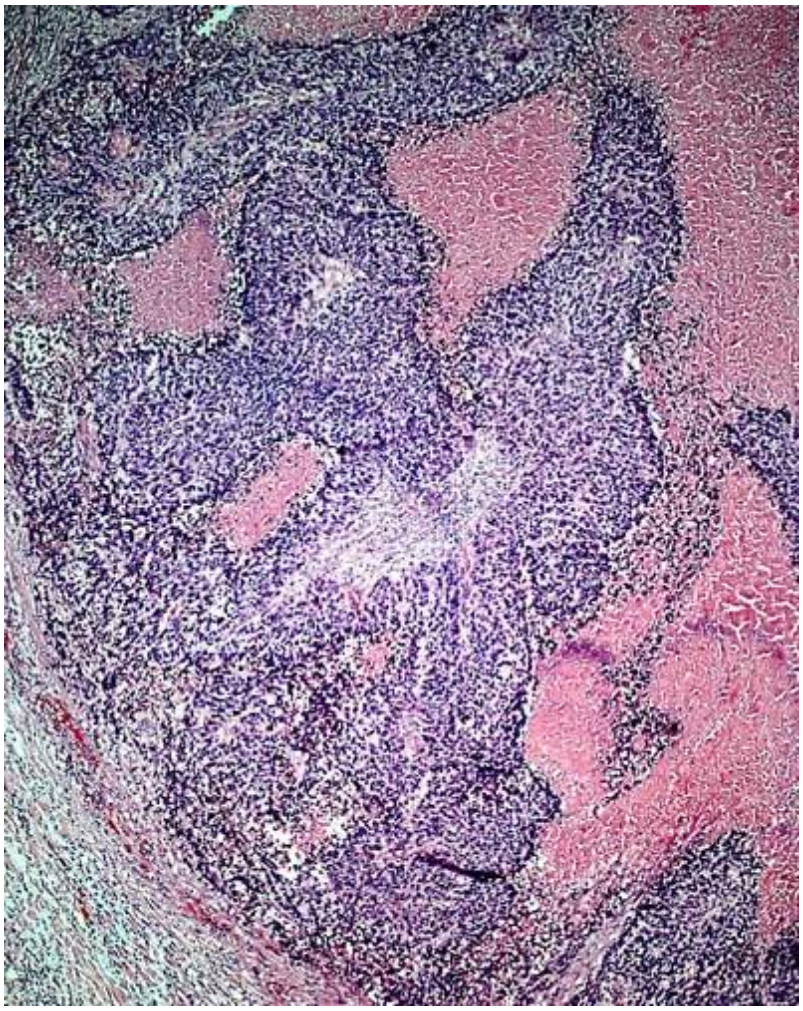


Abbildung 4: Nr.4: HPV-neg. (p16 ++): basaloides Plattenepithelkarzinom mit girlandenfömigen Tumorzellbändern mit ausgedehnteren komedoartigen Nekrosen als im vorherigen Fall; HE

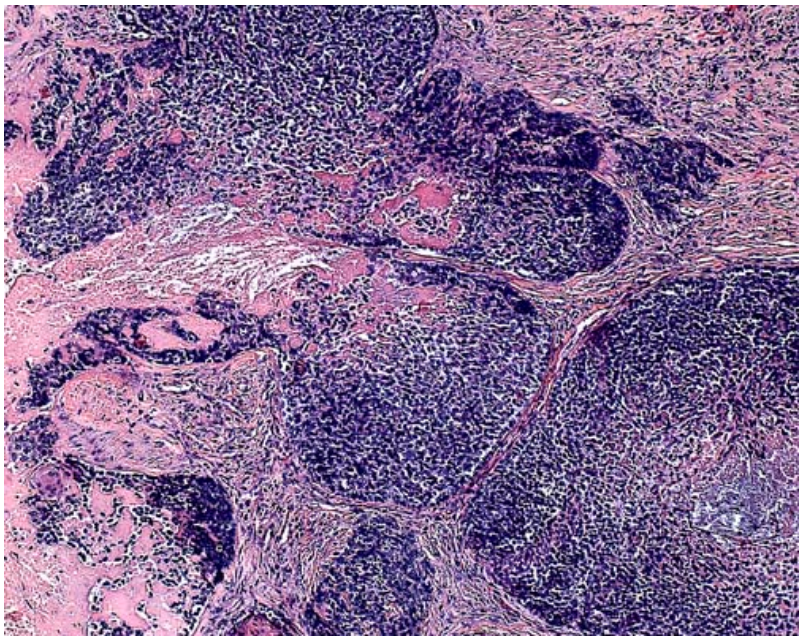


Abbildung 5: Nr.17: HPV high-risk / p16 +++: basaloides Plattenepithelkarzinom; herdförmige Hyalinisierung; HE

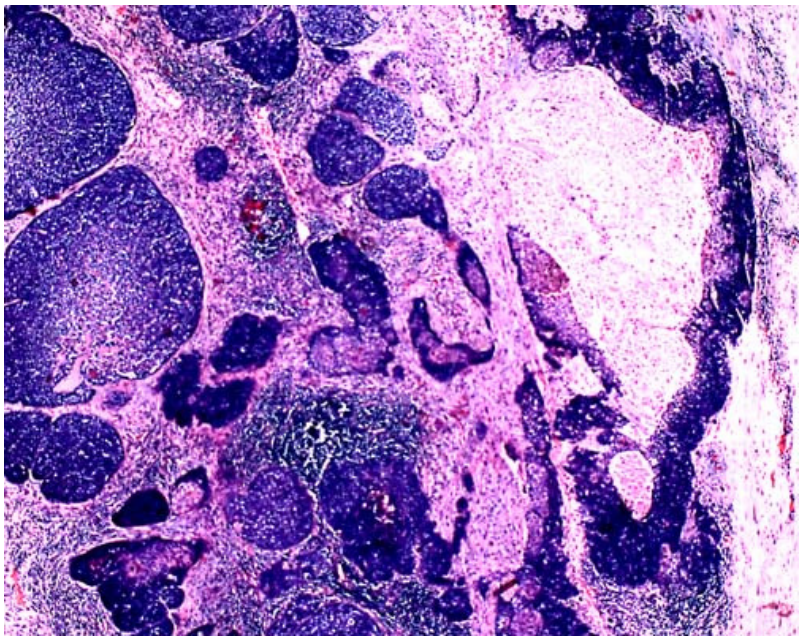


Abbildung 6: Nr.17: HPV high-risk / p16 +++: basaloides Plattenepithelkarzinom; herdförmige Hyalinisierung; HE

PAPILLOM

Es kommen benigne Epithelproliferationen zur Darstellung. Weiterhin zeigt sich eine aufgezweigte papillomatöse Epithelhyperplasie mit vorwiegend basalen Atypien.

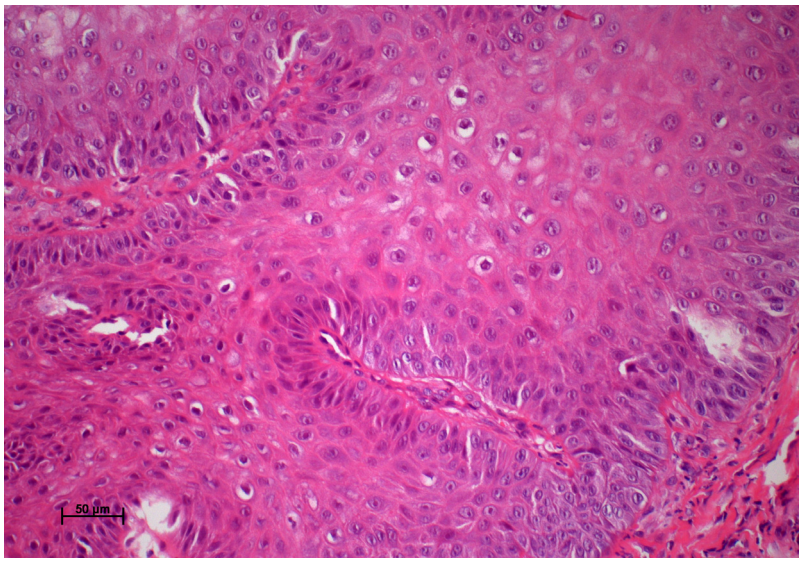


Abbildung 7: Nr.19: HPV high-risk / p16 -: Papillom mit Plattenepithel, Koilozyten, vorwiegend basale Atypien; HE

Abbildung 8: Nr.21: HPV low-risk, p16 ++: Papillom mit papillomatöser Hyperplasie, Hyper- und Parakeratosen, Koilozyten; HE

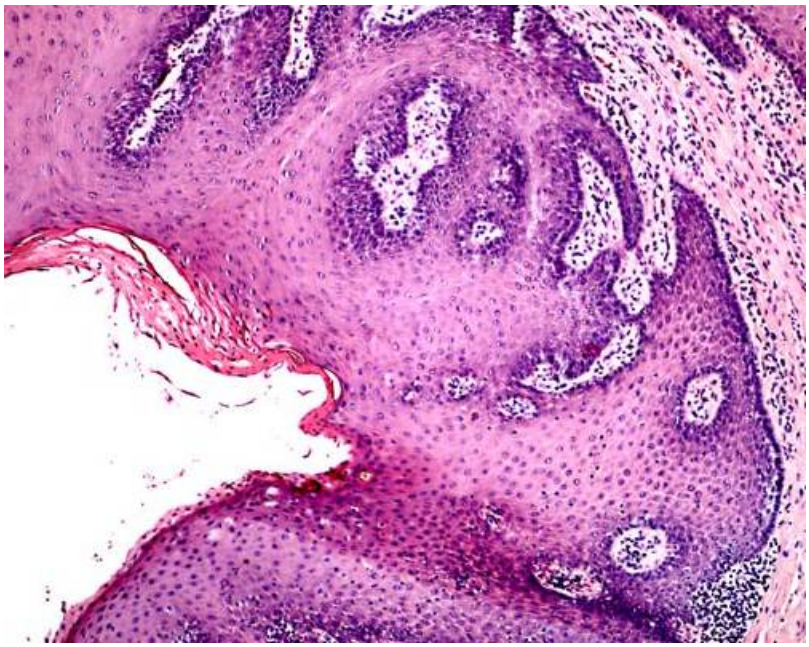


Abbildung 9: Nr.21: HPV low-risk, p16 ++: Papillom mit papillomatöser Hyperplasie, Hyper- und Parakeratosen, Koilozyten; HE

HYPERPLASIE/DYSPLASIE

Das Plattenepithel zeigt deutliche Veränderungen in Form von papillomatös-endophytisch, gering parakeratotisch und akanthotischer Verbreiterung des Epithels. Es finden sich vermehrt basale und parabasale, teils auch suprabasale Mitosefiguren.

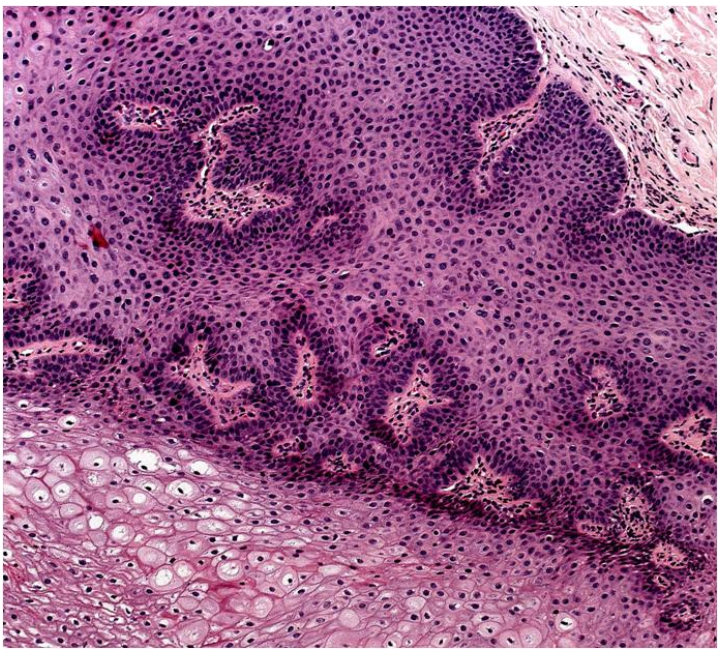


Abbildung 10: (Nr.28) HPV high-risk / p16 -: Dysplasie; Schleimhautstreifen mit papillomatös-endophytisch verbreitetem Plattenepithel. Leichte Schichtungsstörung und angedeutete Koilozytosen. Hyperplasie mit geringgradiger Dysplasie; HE

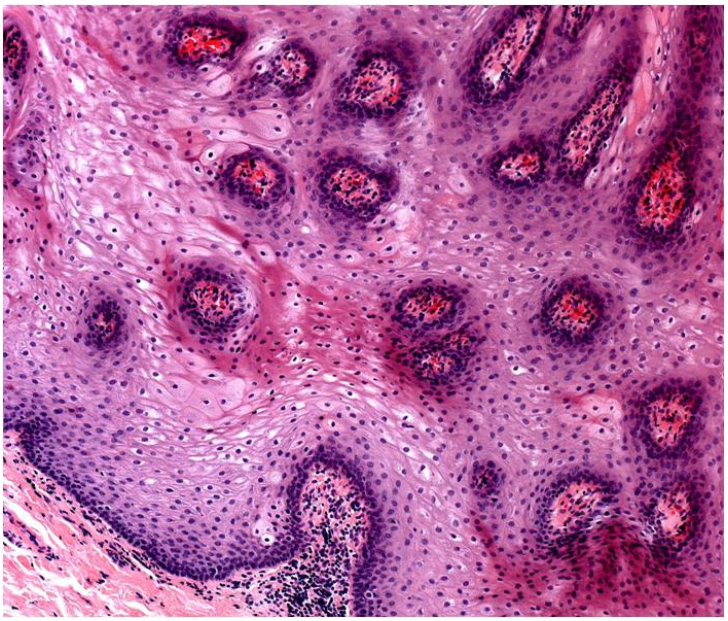


Abbildung 11: HPV-neg. / p16 -: Hyperplasie; leichte Akanthose und Koilozyten im Stratum spinosum;HE

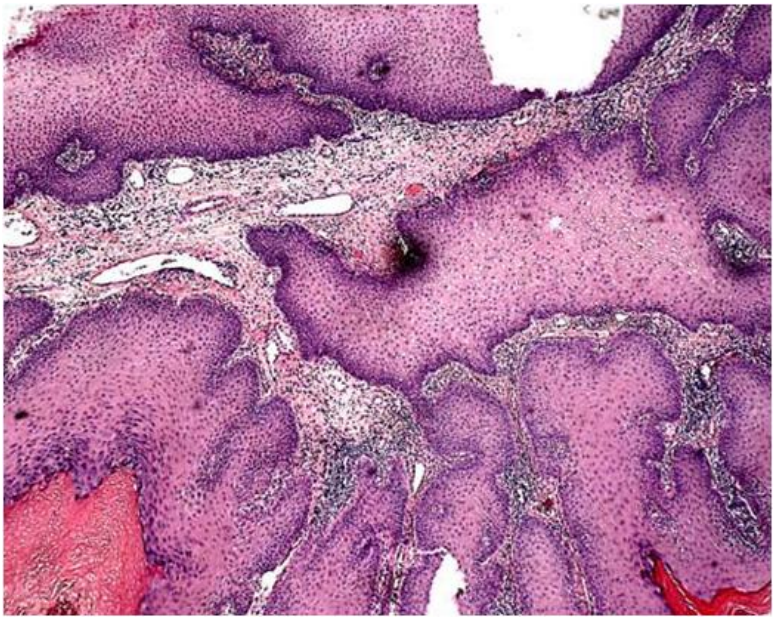


Abbildung 12: Nr.29: HPV high-risk / p16 -: verruköse Hyperplasie. Parakeratose und zytopathische Effekte; HE

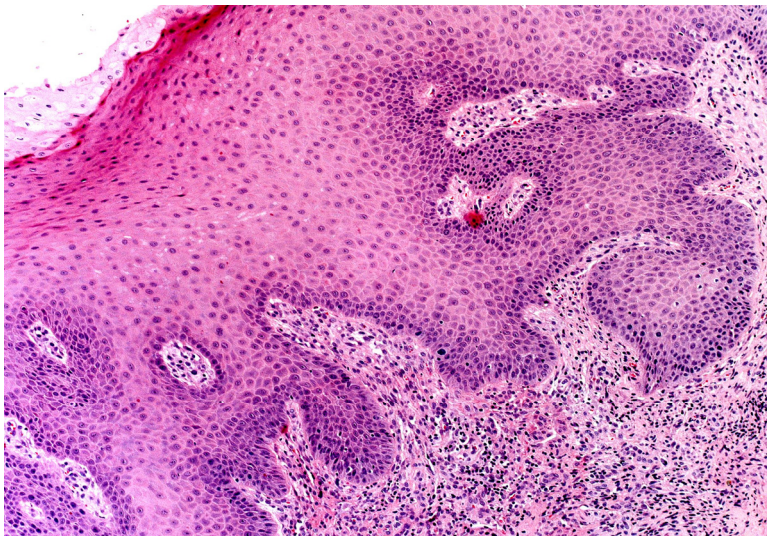


Abbildung 13: Nr.33: HPV-neg. / p16 -: Plattenepitheldysplasie, zum Teil endophytische papillomatöse Plattenepitheldysplasie; Parakeratose, vermehrte basale und parabasale, aber auch suprabasale Mitosen; HE

3.1.2 Geschlechterverteilung

Bei allen oralen Läsionen liegt der Anteil an männlichen Individuen höher als bei der weiblichen Vergleichsgruppe.

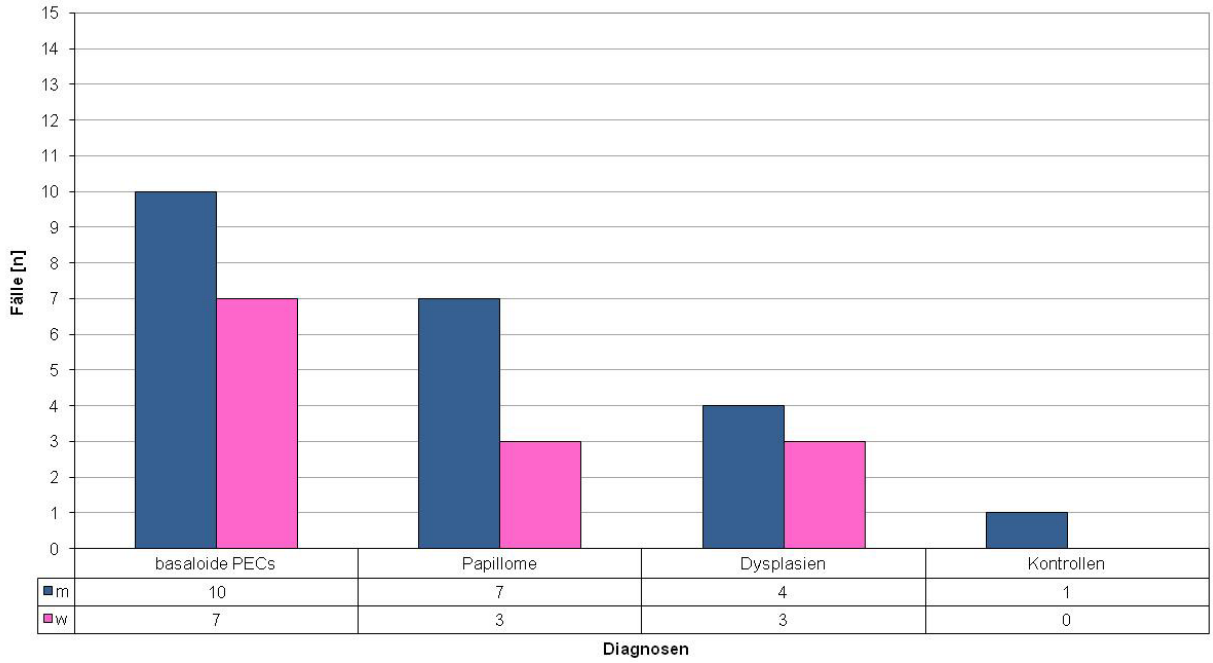


Abbildung 14: Geschlechterverteilung bezüglich der Diagnosen

3.1.3 Altersverteilung

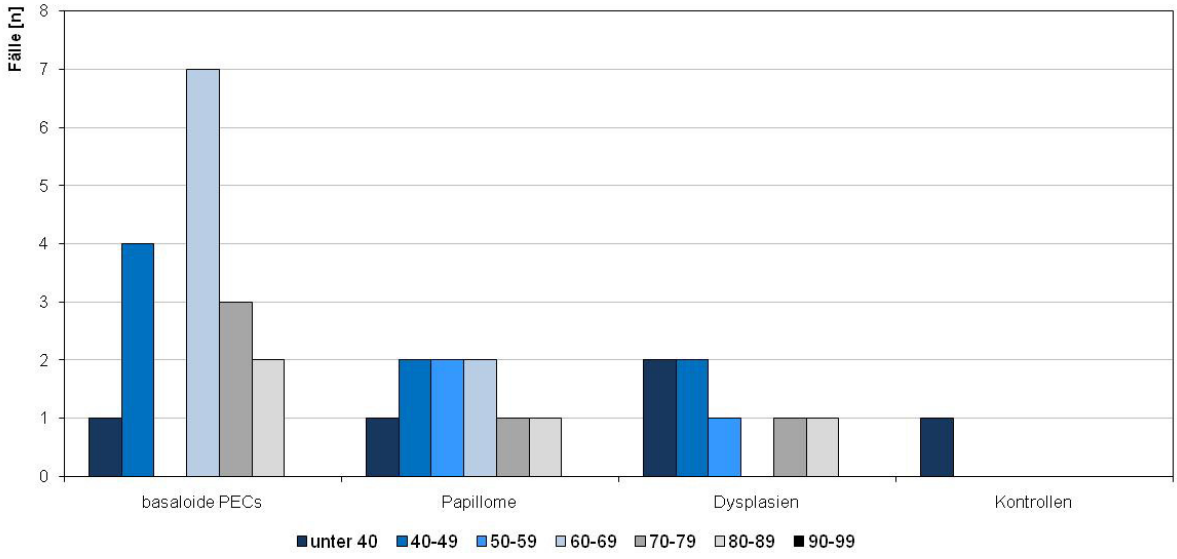


Abbildung 15: Altersverteilung bezüglich der Diagnosen

Die Altersverteilung unter den oralen Läsionen ist bei den Papillomen und Dysplasien homogen verteilt, während in der Gruppe der basaloiden PECs die Häufigkeit der Erkrankung im Alter von 60-69 Jahren auftrat, gefolgt von der Altersgruppe der 40-49 Jährigen.

3.2 HPV-Nachweis

3.2.1 Hybrid-Capture

Alle Gewebeproben wurden mittels Hybrid-Capture auf das Vorliegen einer HPV-Infektion voruntersucht. Diese Methode erlaubt eine Zuordnung in die Gruppen HPV-high-risk und HPV-low-risk ohne Nachweis spezifischer HPV-Typen.

Von den 34 untersuchten Proben waren 13 Proben HPV negativ (38%). 21 Fälle waren HPV positiv (62%). Hiervon konnten 15 Fälle einer HPV-high-risk (44%) und 6 Fälle einer HPV-low-risk Infektion (18%) zugeordnet werden.

Bezogen auf die verschiedenen Läsionen sah die Verteilung wie folgt aus:

Von den 17 basaloiden Plattenepithelkarzinomen waren 6 HPV-negativ (35%). 11 Fälle wiesen eine HPV-high-risk Infektion auf (65%).

Drei von 10 Papillome waren HPV-negativ (30%). In zwei Fällen konnte eine HPV-high-risk Infektion (20%) festgestellt werden. Fünf Papillome waren mit einer HPV-low-risk Typ (50%) assoziiert.

Vier von sieben Hyperplasien/ Dysplasien waren HPV-negativ (57%). Eine HPV-high-risk Infektion konnte in zwei Fällen (29%) nachgewiesen werden, wobei hier ein Fall zusätzlich eine HPV-low-risk Infektion aufwies. Ein Fall war HPV-low-risk positiv (14%).

3.3 Sequenzen

AMPLIFIKATION DER HPV-DNA

Nachweis und Identifikation des PCR-Produktes (Agarosegel)

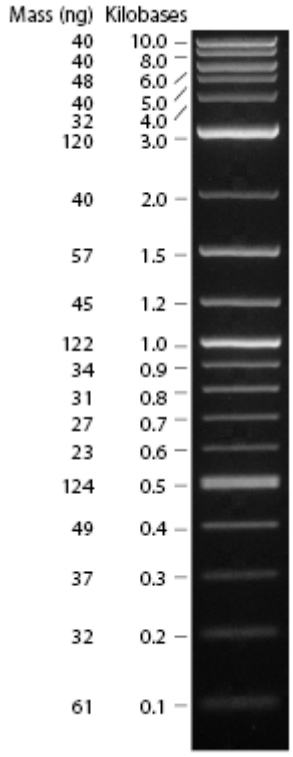


Abbildung 16: BioLabs N3200S,2-Log DNA ladder (0,1 -10kb)

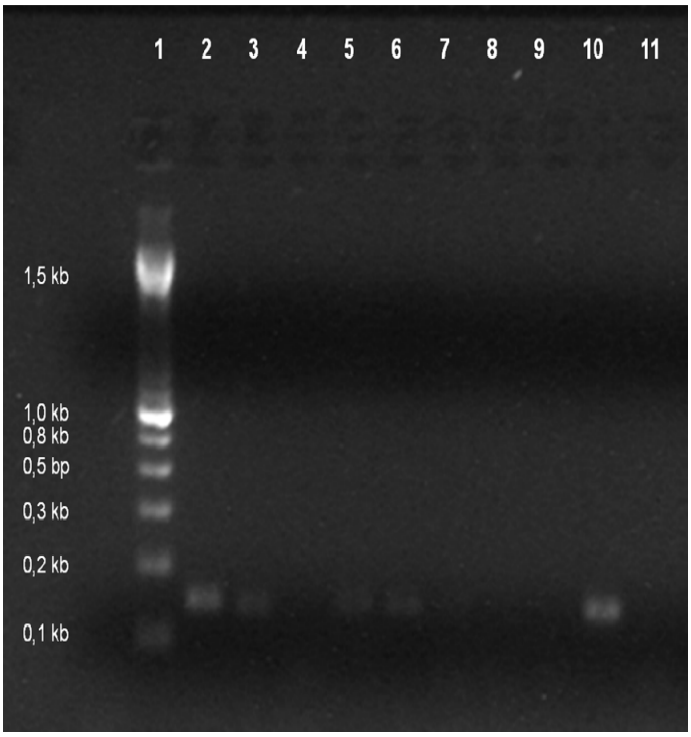
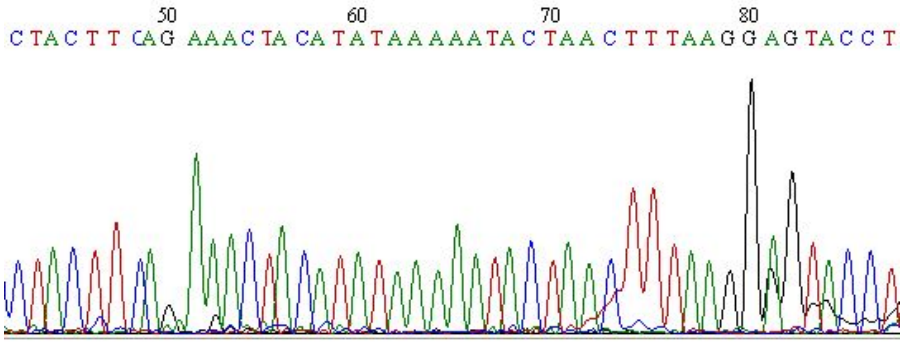


Abbildung 17: Agarose-Gelelektrophorese der PCR Produkte

Die 150 bp-Fragmente entsprechen dem Amplifikat der Primer GP 5+/GP 6+. 1,5%-iges Agarose-Gel. Aufgetragen jeweils 1µl Amplifikat in Spur 1 = DNA-Marker, Spur 2 – 11 = Fall Proben (2 = Fall-Nr.3, 3 = Fall-Nr.13, 4= Fall-Nr.4, 5 = Fall-Nr.6, 6 = Fall-Nr.32, 7 = Fall-Nr.11, 8 = Fall-Nr.16, 9 = Fall-Nr.5, 10 = Fall-Nr.18, 11 = Fall-Nr.17).



>gi|167996748|gb|EU430688.1| Human papillomavirus type 16 isolate CNE-q L1 protein (L1) gene, complete cds
Length=1596

Score = 91.7 bits (46), Expect = 2e-16
Identities = 46/46 (100%), Gaps = 0/46 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	CTACTTCAGAAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCT	46
Sbjct	1124	CTACTTCAGAAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCT	1169

Abbildung 18: DNA Sequenz des PCR Produktes "Downstream" von GP5+ zur Genotypisierung von HPV. Die BLAST Alignment Analyse der Sequenz dieser Region zeigt basierend auf der in der Genbank hinterlegten Sequenz Übereinstimmung mit dem HPV Genotyp 16.

Die Sequenzanalyse der gereinigten PCR-Produkte erfolgte in einem automatisierten System (ABI) und die Sequenzen wurden verglichen mit der HPV-Genbank (Gene-Bank HPV sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov)) unter Verwendung des using FASTA Sequenz and BLAST Programms. Die Analyse der Sequenzen ergab wie in Abbildung 18 für den Fall 17 demonstriert eine 99%-ige Übereinstimmung mit den jeweils angegebenen HPV-Typen.

3.4 HPV-Sequenzierung

Anhand der Sequenzen konnten für die einzelnen Proben die spezifischen HPV-Typen bestimmt werden, so dass die Zuordnung in die Gruppen high- und low-risk einerseits durch eine weitere Methode bestätigt und darüber hinaus auch noch weiter spezifiziert werden konnte.

Von den 15 HPV-high-risk Fällen konnte in 14 Fällen (93%) der HPV-Typ 16 nachgewiesen werden. Darunter war ein Fall, bei dem zusätzlich der HPV-Typ 6 nachgewiesen werden konnte, der zur low-risk Gruppe gehört. Ein weiterer Fall war positiv für den HPV- Typ 35 (7%).

Von den 6 HPV-low-risk Fällen wiesen 4 Fälle sowohl den HPV-Typ 6 als auch den HPV-Typ 11 auf (67%). In einem Fall konnte ausschließlich der HPV-Typ 6 (17%)

nachgewiesen werden und in einem weiteren Fall ausschließlich der HPV-Typ 11 (17%). Die Verteilung der HPV-Typen auf die verschiedenen Läsionen stellte sich wie folgt dar:

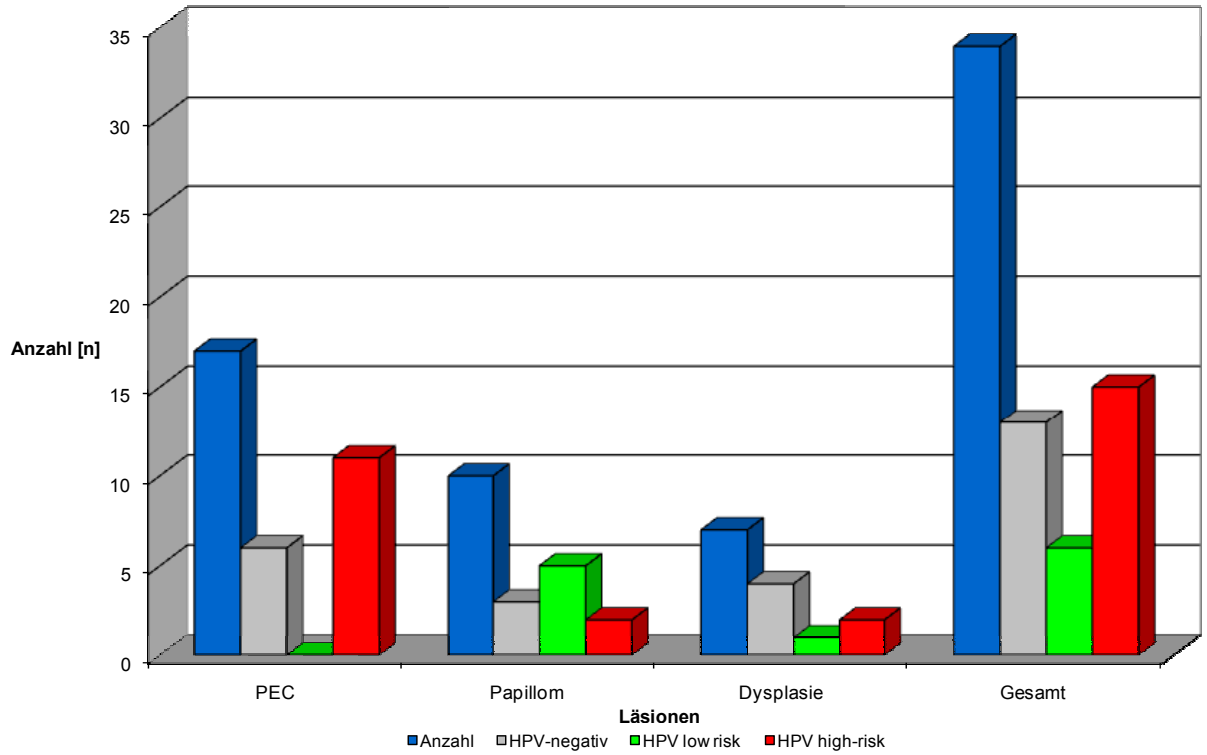


Abbildung 19: HPV-Infektionen bei oralen Läsionen des Plattenepithels

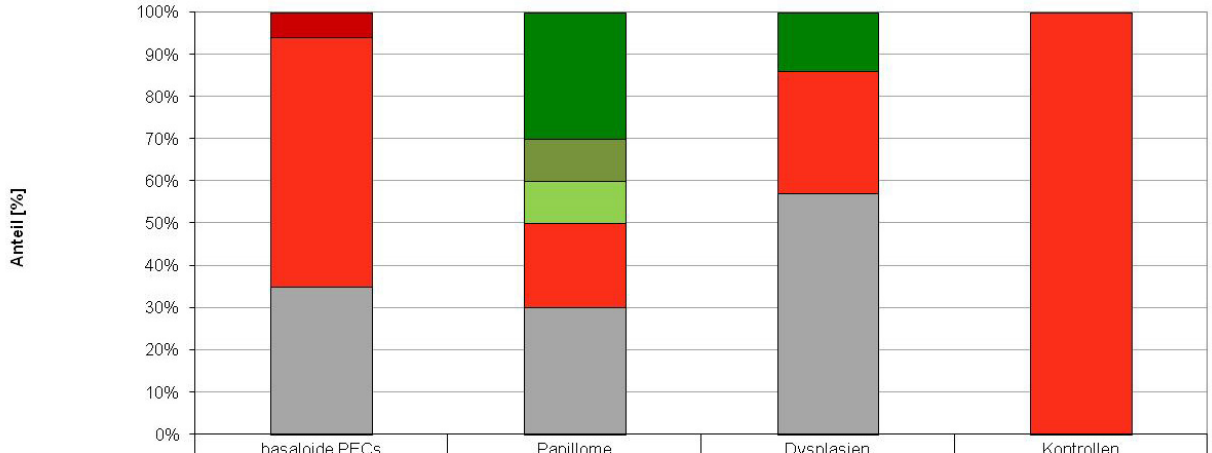
In der Gesamtheit der untersuchten oralen Läsionen überwiegt eine HPV-high-risk Infektion, gefolgt von oralen Läsionen ohne HPV Infektion. Bei den PECs fällt auf, dass es sich beim Vorliegen einer HPV- Infektion immer um HPV-high-risk Typen handelt. Die Papillome enthalten überwiegend HPV-low-risk. Die meisten Dysplasien sind nicht mit einer HPV-Infektion assoziiert. Bei den HPV-positiven Dysplasien treten in dem größeren Anteil HPV-high-risk Typen auf.

Von 11 HPV-high-risk infizierten basaloiden Plattenepithelkarzinomen waren 10 Fälle mit dem HPV-Typ 16 (91%) assoziiert, in einem Fall war der HPV-Typ 35 (9%) nachweisbar.

In den zwei HPV-high-risk infizierten Papillomen konnte der HPV-Typ 16 (100%) bestimmt werden. Von den 5 HPV-low-risk Infektionen in den Papillomen waren drei mit den HPV- Typen 6 und 11 (60%) assoziert, während die beiden anderen Fälle entweder mit dem HPV-Typ 6 (20%) oder dem HPV-Typ 11 (20%) assoziiert waren.

Beide HPV-high-risk positiven Dysplasien wiesen den HPV-Typ 16 (100%) auf. Die zusätzliche HPV-low-risk Infektion in dem einen Fall war mit dem HPV-Typ 6 asso-

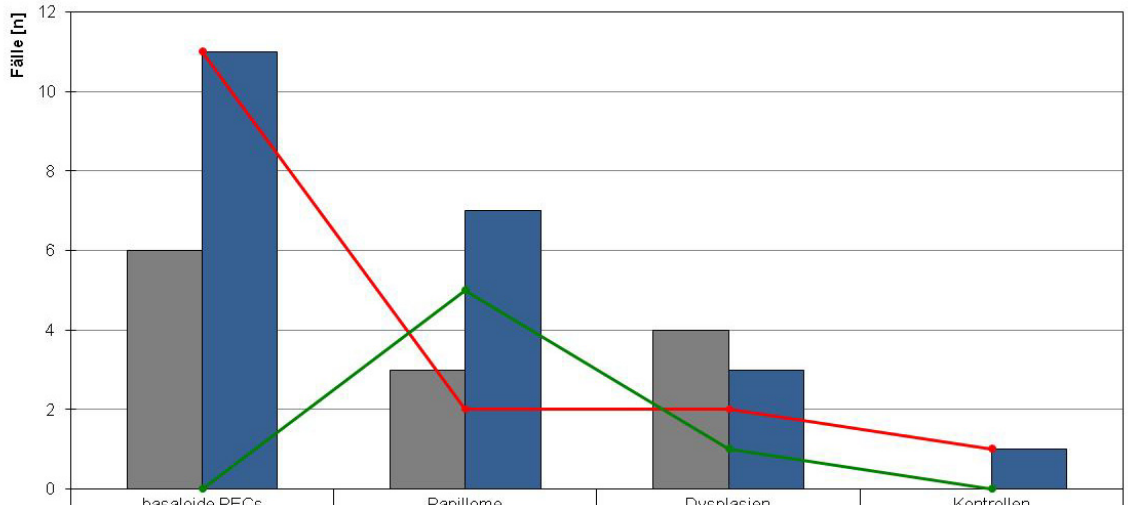
ziiert. In dem einen HPV-low-risk positiven Fall ließen sich die Typen 6 und 11 (100%) nachweisen.



	basaloide PECs	Papillome	Dysplasien	Kontrollen
low-risk (Typ 6/11)	0	30	14	0
low-risk (Typ 11)	0	10	0	0
low-risk (Typ 6)	0	10	0	0
high-risk (Typ 35)	6	0	0	0
high-risk (Typ 16)	59	20	29	100
No	35	30	57	0

Abbildung 20: Verteilung der HPV-Typen

In der Gruppe der basaloiden PECs gab es bei HPV-Positivität nur HPV-high-risk Infektionen (Typ 16, 1 x Typ 35). Die Papillome zeigten bei HPV-Positivität eine HPV-high-risk Typ 16 Infektion und bei HPV-low-risk Infektionen traten Typ 6 und Typ 11 ebenso wie die Kombination Typ 6/11 auf. Die Dysplasien hatten bei HPV-Positivität entweder die HPV-high-risk Infektion Typ 16, oder die HPV-low-risk Infektion Typ 6/11.



	basaloide PECs	Papillome	Dysplasien	Kontrollen
HPV-neg.	6	3	4	0
HPV-pos.	11	7	3	1
high-risk	11	2	2	1
low-risk	0	5	1	0

Abbildung 21: HPV-Infektionsraten

Die HPV-high-risk Infektionsrate hatte ihren Gipfel in der Gruppe der basaloiden PECs und lag auf gleichermassen relativ niedrigem Niveau in der Gruppe der Papillome und Dysplasien.

3.5 Immunhistologie

Eine mögliche Korrelation zwischen HPV-Infektion und p16-Expression sollte über den immunhistologischen Nachweis von p16 in den Gewebeproben gezeigt werden.

BASALOIDE PEC

Bei den basaloiden Plattenepithelkarzinomen fehlte in 4 von 17 Fällen eine p16-Expression (24%). Unter den 13 Fälle p16-positiven Fällen (76%) zeigten vier eine mittlere (++) p16-Expression (31%) und 9 Fälle (69%) eine starke (+++) p16-Expression. Die (++)-Fälle zeigten überwiegend eine zytoplasmatische Färbung, nur in einem Fall lag eine Kernfärbung vor. Von den 9 (+++)-Fällen zeigten 3 Fälle eine zytoplasmatische Färbung und in 6 Fällen lag eine Kernfärbung vor.

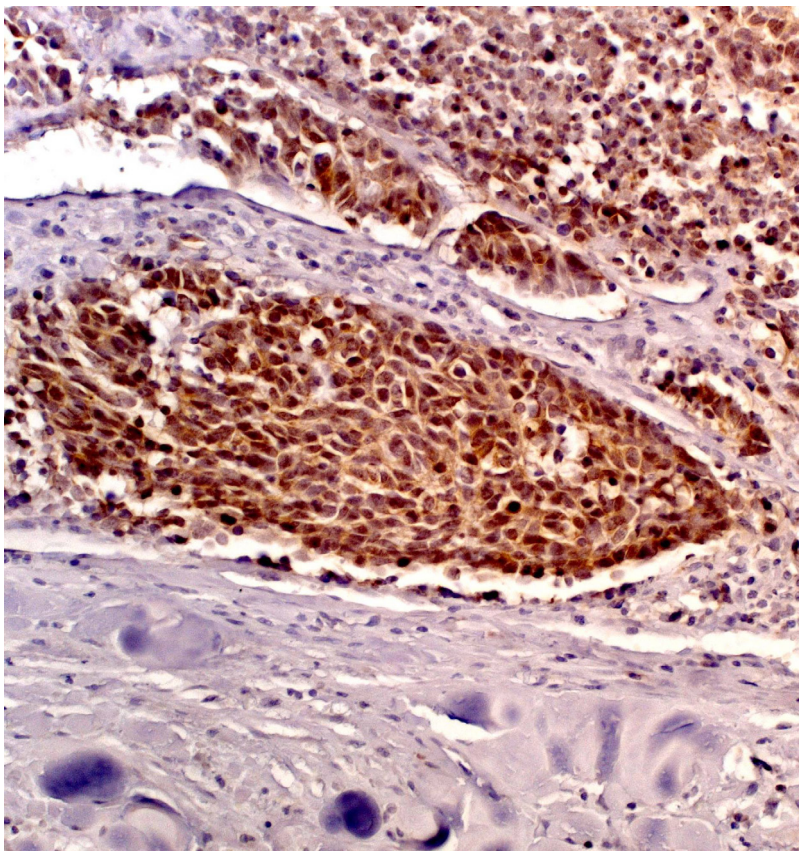


Abbildung 22: Nr.4: p16-Immunhistochemie. +++p16-Expression (Kernfärbung)

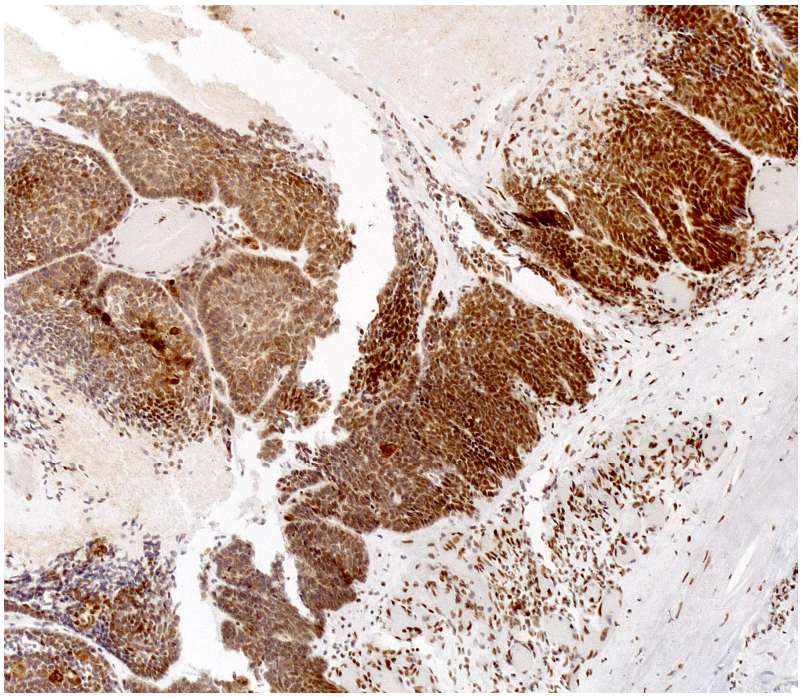


Abbildung 23: Nr.17: p16-Immunhistochemie. +++p16-Expression (starke nukleäre Färbung)

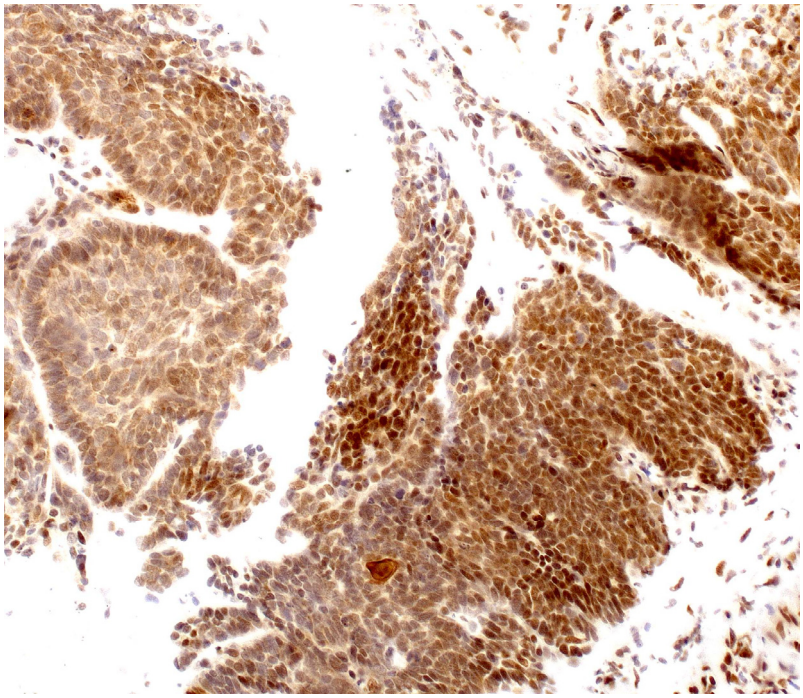


Abbildung 24: Nr.17: p16-Immunhistochemie. +++p16-Expression (starke nukleäre Färbung)

PAPILLOME

Bei den Papillomen fehlte in 4 von 10 Fällen die p16-Expression (40%). Die 6 p16-positiven Fällen zeigten eine starke (+++) Expression (60%). Davon zeigten 4 Fälle eine Kernfärbung und zwei Fälle eine zytoplasmatische Färbung.

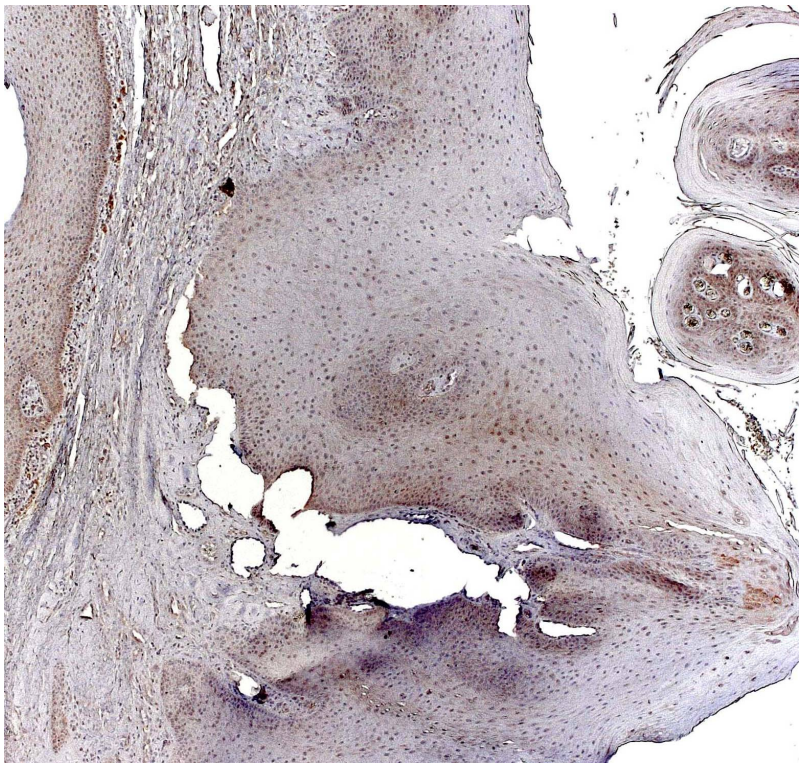


Abbildung 25: Nr.21: HPV low-risk, p16 +++: p16-Immunhistochemie. +++p16-Expression, partiell++p16-Expression (diffuse nukleäre Färbung)

HYPERPLASIEN/ DYSPLASIE

Bei den Hyperplasien/ Dysplasien fehlten in 7 von 5 Fällen eine p16-Expression (71%). Bei zwei Fällen konnte eine starke (+++) p16-Expression mit Kernfärbung beobachtet werden (29%).

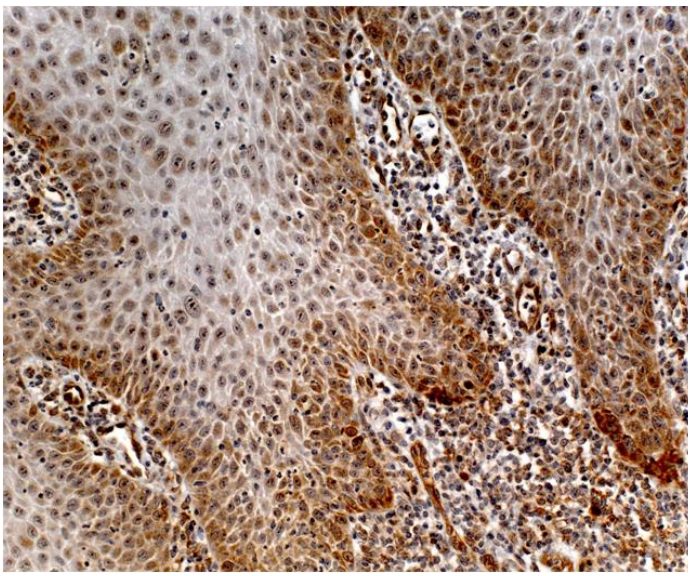


Abbildung 26: Nr.30: HPV low-risk / p16 ++: P16-Immunhistochemie. ++p16-Expression (diffuse p16-Expression, vor allem in den basaloiden Epithelanteilen)

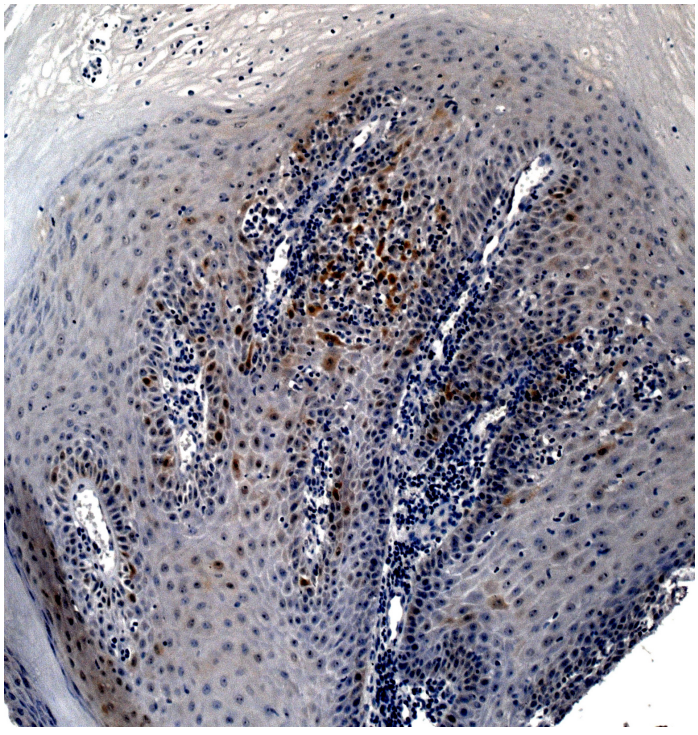


Abbildung 27: Nr.29: HPV high-risk / p16 -: P16-Immunhistochemie. Fehlende p16-Expression (schwache, einzelne Zellen gefärbt=als negativ gewertet)

3.6 Korrelation der Daten (p16 und HPV)

In Verbindung mit den HPV-Ergebnissen ergaben sich folgende Beziehungen:

Tabelle 4: Gesamttabelle

Nr.	Alter	Geschlecht	Histologie	Lokalisation	HPV-Status [HC]	HPV	p16
basaloide Plattenepithelkarzinome							
1	61	m	basaloid	Mundschleimhaut	No	-	-
2	65	m	knöchernes Resektat (regio42-43)	Unterkiefer rechts	No	-	++
3	68	m	basaloid	Zungenrand links	No	-	++
4	82	m	basaloid	Parotis	No	-	++
5	65	w	basaloid	Unterkiefer rechts	No	-	-
6	81	w	basaloid	Parotis	No	-	+++
7	40	w	Metastase	Hals	high-risk	+16	+++
8	49	w	verrucös, hochdifferenziert	UK rechts	high-risk	+16	-
9	67	w	kondylomatös	Mundschleimhaut 35	high-risk	+16	+++
10	74	w	basaloid (partiell)	kleine Speicheldrüsen	high-risk	+16	-
11	76	w	basaloid	Zungengrund	high-risk	+16	++
12	37	m	basaloid	Hals-LK	high-risk	+16	+++
13	42	m	basaloid	Hals links	high-risk	+16	+++
14	48	m	basaloid	Zungengrund	high-risk	+16	+++
15	62	m	Metastase	Hals-LK	high-risk	+35	+++
16	64	m	basosquamös, EBV-assoz.	weicher Gaumen	high-risk	+16	+++
17	70	m	basaloid	Parotis	high-risk	+16	+++
Papillome							
18	57	m	plattenepithelialer Typ	Nasengang rechts	high-risk	+16	+++
19	80	m		Zungenrand links	high-risk	+16	-
20	20	m		Larynx	low-risk	+6, +11/ +6	-
21	41	m	hyperkeratotisch	SH Gaumen	low-risk	+6, +11	+++
22	49	m		regio 31-32	low-risk	+6	+++
23	56	m		Zunge/SH regio 37	low-risk	+11	+++
24	64	w	fibroepithelial	Unterlippe/Wange	low-risk	+6,+11	-
25	?	m	hyperkeratotisch	Unterlippe	No	-	-
26	61	w		Unterlippe/Wange	No	-	+++
27	71	w	atypisch	WangenSH 47/48	No	-	+++
Hyperplasien/Dysplasien							
28	42	m	parakeratotisch	WangenSH	high-risk	+16	-
29	47	m	verrucös	Speicheldrüse	high-risk	+6, +16	-
30	92	w	papillär	Oberlippe	low-risk	+6,+11	+++
31	37	m	verrucös	WangenSH	No	-	-
32	54	m	Candidiasis	SH Zungenrücken	No	-	+++
33	30	w			No	-	-
34	76	w	verrucös	Mundwinkel links	No	-	-
Kontrollen							
35	19	m		Analkanal	high-risk	+16	+++

BASALOIDE PEC

3 HPV-negative Fälle wiesen eine mittlere (++) p16-Expression (50%), davon zeigten zwei Fälle eine zytoplasmatische Färbung und ein Fall eine nukleäre Färbung. Ein HPV-negativer Fall zeigte eine starke (+++) p16-Expression (17%), die im Zytoplasma lokalisiert war.

Zwei der HPV-high-risk Fälle waren p16-negativ (18%). Ein Fall zeigte eine mittlere (++) p16-Expression im Zytoplasma (9%). Acht Fälle gingen mit einer starken (+++) p16-Expression (73%) einher. Hiervon zeigten zwei Fälle eine zytoplasmatische Färbung und 6 Fälle eine Kernfärbung.

PAPILLOME

Von den 10 Papillomen waren drei Fälle HPV-negativ (30%). Davon war ein Fall mit einer fehlenden p16-Expression assoziiert. Die zwei weiteren HPV-negativen Fälle zeigten eine p16-Überexpression, davon einer zytoplasmatisch, der andere nukleär.

Fünf Fälle zeigten eine HPV-low-risk Infektion (50%). Dabei fehlte in zwei Fällen eine p16-Expression. In drei weiteren Fällen konnte eine p16-Überexpression nachgewiesen werden (2 x zytoplasmatisch, 1 x nukleär).

In zwei Fällen (20%) konnte eine HPV-high-risk Infektion Typ 16 nachgewiesen werden (1x fehlende p16-Expression, 1 x p16-Überexpression im Zellkern).

HYPERPLASIE/ DYSPLASIE

Vier (57%) der 7 Hyperplasien/ Dysplasien waren HPV-negativ. Davon zeigten drei auch eine fehlende p16-Expression. Ein HPV-negativer Fall zeigte eine p16-Überexpression im Zellkern.

Drei Fälle (43%) waren HPV-positiv. In einem Fall ließ sich eine HPV-high-risk Typ 16 Infektion nachweisen, es fehlte jedoch die p16-Expression. Ein Fall hatte sowohl eine HPV-high-risk Typ 16 Infektion als auch eine HPV-low-risk Typ 6 Infektion. Auch hier war keine p16-Expression nachweisbar. Der dritte Fall zeigte eine HPV-low-risk Typ 6 und 11 Infektion in Verbindung mit einer p16-Überexpression im Zellkern.

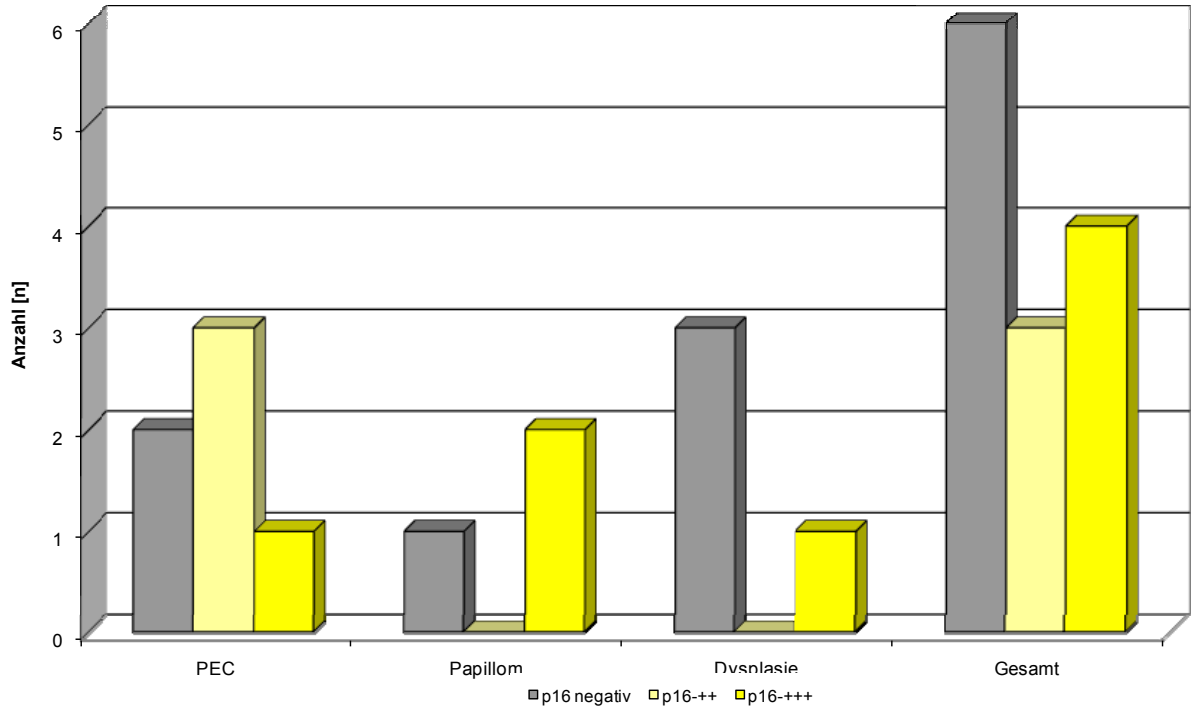


Abbildung 28: p16-Expression bei HPV-Negativität

In dem überwiegenden Anteil der untersuchten Fälle fiel auf, dass bei HPV-Negativität p16 nicht exprimiert wird (besonders auffällig bei Dysplasien). Zwei Drittel der HPV negativen Papillome zeigten eine p16-Überexpression, ein Drittel waren p16 negativ. In der Gruppe der HPV-negativen basaloiden PECs ließ sich keine Präferenz bzgl. der p16-Expression erkennen.

Eine HPV-low-risk Infektion (Abbildung 29) lag nur in der Untersuchungsgruppe der Papillome und Dysplasien vor. Sie war in zwei Drittel der untersuchten Fälle mit einer p16-Überexpression assoziiert. Die übrigen Fälle waren p16 negativ. In der Gruppe der Dysplasien zeigten alle Fälle mit HPV-low-risk Infekion eine p16-Überexpression.

Der überwiegende Anteil der Fälle mit HPV-high-risk Infektion (Abbildung 30) war mit einer p16-Überexpression assoziiert. Eine Ausnahme bildeten die Dysplasien, bei denen eine HPV-high-risk Infektion immer von einer fehlenden p16-Expression begleitet war. In der Untersuchungsgruppe der Papillome zeigte sich eine Gleichverteilung von p16-Überexpression und p16-Negativität bei Vorliegen einer HPV-high-risk Infektion. Viele basaloide PECs mit HPV-high-risk Infektion wiesen eine p16-Überexpression auf, es kamen aber auch mittlere p16-Expressionen und p16-Negativität vor.

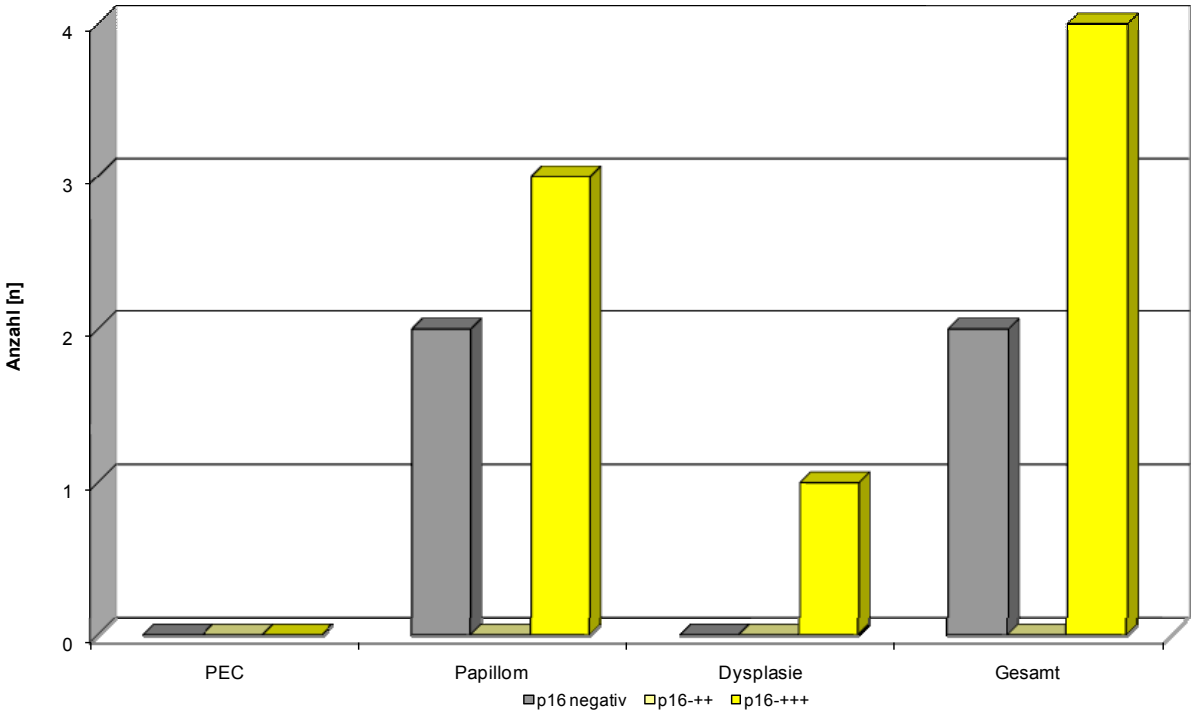


Abbildung 29: p16-Expression bei HPV low-risk Infektion

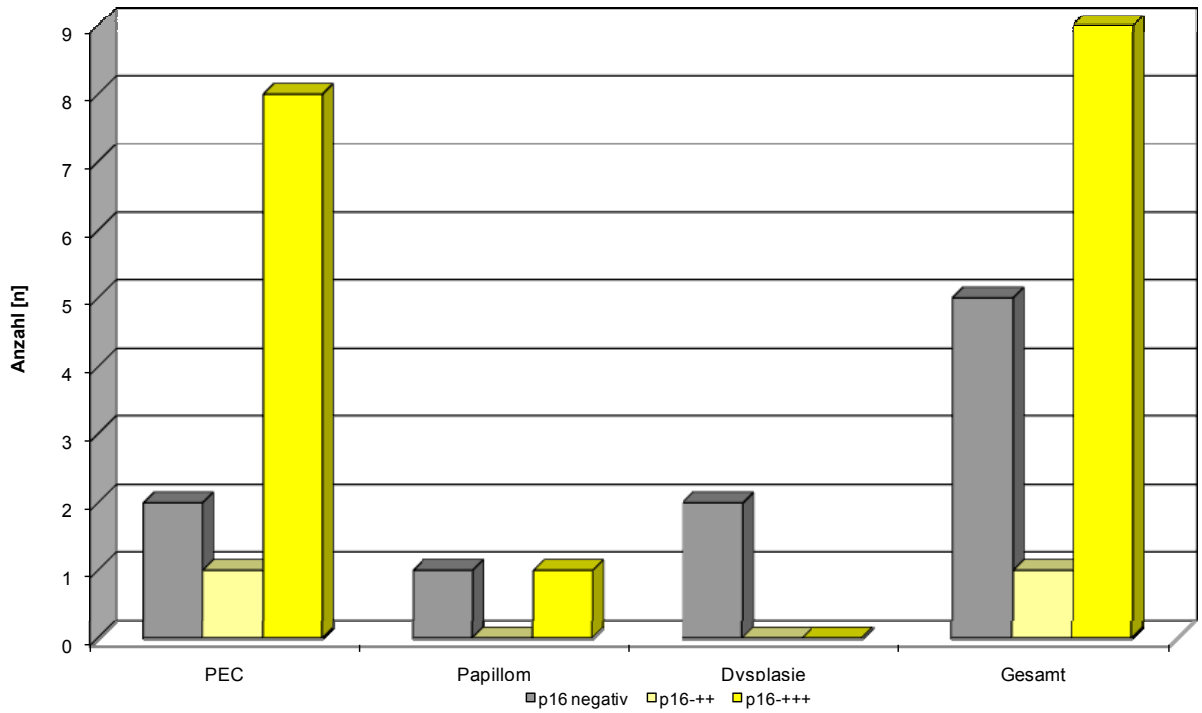


Abbildung 30: p16-Expression bei HPV high-risk Infektion

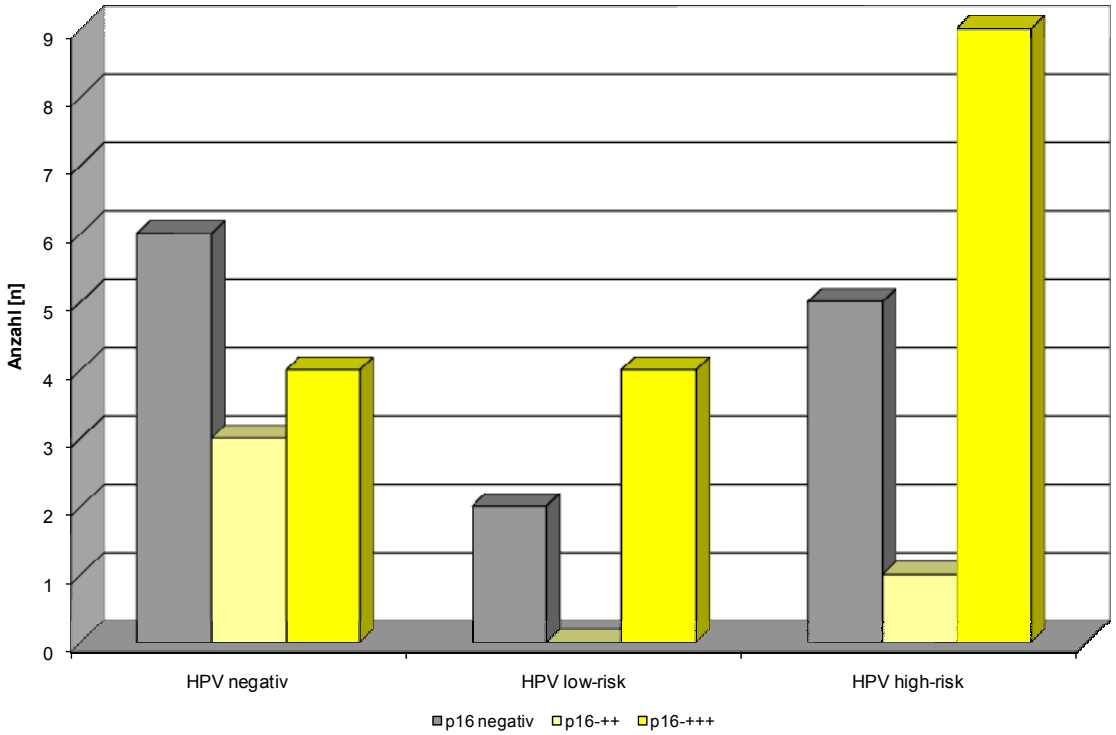


Abbildung 31: Korrelation p16-Expression zum HPV-Infektionsstatus

Zusammenfassend ergab sich, dass bei den untersuchten Fällen der HPV-Status keine enge Korrelation zur p16-Expression aufwies.

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 34 orale Läsionen untersucht. Verglichen wurden 17 basaloide Plattenepithelkarzinome (BSCC), 10 Papillome und 7 Hyperplasien bzw. Dysplasien. Dabei ist das Kollektiv von 17 basaloiden PECs durchaus repräsentativ, da es sich um eine seltene Subgruppe handelt, die auch in die Literatur bisher nur mit einer geringen Fallzahl eingegangen ist. So konnten Poetsch et al. (2003) nur 8 BSCC und Coppola et al. (1993) ebenfalls nur 8 Fälle untersuchen. Insgesamt waren es bis 1994 86 Fälle, die in der Literatur beschrieben wurden. Die Fälle wurden von Campman et al. (1994) zusammengetragen und konnten 2002 von Ide durch weitere 45 Fälle ergänzt werden. Aktuell ist es Begum et al. (2008) in einer NIH-Studie gelungen, ein Kollektiv von 53 basaloiden Plattenepithelkarzinomen zusammenzustellen.

BASALOIDES PLATTENEPITHELKARZINOM [BSCC]

Die basaloiden SCCs [BSCC] stellen eine Untergruppe des SCCs dar. Luna et al. (1990) fanden in dieser Subgruppe eine erhöhte Metastasierungsrate und Letalität. Campman et al. (1994) geben aufgrund ihrer Studien eine 70%-ige Metastasierungsrate an, Coppola et al. (1993) beschreiben das basaloide SCC als aggressive Variante des SCC.

Basierend auf Untersuchungen von Poetsch et al. (2003) lautete eine Arbeitshypothese der vorliegenden Studie, dass die basaloide Morphologie des PECs Ausdruck einer HPV-Infektion ist. In dieser Studie konnte HPV-DNA in 65% der untersuchten basaloiden Plattenepithelkarzinome nachgewiesen werden. Poetsch et al. (2003) fanden eine HPV-high-risk Infektion in allen Fällen und postulierten eine Assoziation zwischen HPV-Infektion und Ausbildung einer basaloiden Morphologie bei PECs.

Die in dieser Arbeit untersuchten BSCCs waren überwiegend im vorderen Mundbereich (Unterkiefer, Zungengrund) lokalisiert, einige aber auch im Halsbereich und den

Speicheldrüsen. In der Studie von Poetsch et al. (2003) waren die Hälfte der untersuchten BSCCs im Oropharynx lokalisiert, drei Fälle im Hypopharynx und ein Fall im Larynx. Interessanterweise unterteilten Begum et al. (2008) die BSCCs entsprechend ihrer Lokalisation in oropharyngeale und nicht-oropharyngeale basaloide PECs.

Das Durchschnittsalter der Patienten in dieser Studie lag bei 62 Jahren und war damit vergleichbar mit den Kollektiven anderer Studien, die ebenfalls ein Durchschnittsalter von 61 Jahren angaben (Ide et al., 2002).

Die Geschlechterverteilung sah in dieser vorliegenden Studie wie folgt aus: Männer bildeten gegenüber den Frauen die größere Gruppe (10:7), ähnlich wie in den Studien von Ide et al. (2002) und Luna et al. (1990), die ein leichtes Überwiegen an männlichen Patienten bestätigten. El-Mofty (2007) erfasste ein Verhältnis männlich gegenüber weiblich von 4:1.

HUMAN PAPILLOMA VIRUS [HPV]

In 65% der in dieser Studie untersuchten basaloiden Plattenepithelkarzinome konnte eine HPV-high-risk Infektion nachgewiesen werden. Diese 65% HPV-high-risk Infektionen repräsentieren gleichzeitig die gesamte HPV-Infektionsrate. Im Vergleich mit anderen Studien ist dies eine hohe Rate an HPV-high-risk Infektionen. Mit 81,4% fanden Miller et al. (1996) einen vergleichsweise hohen Anteil an HPV-high-risk Infektionen, allerdings von insgesamt nur 26,2% HPV-positiven Fällen in den untersuchten oralen SCCs. Zhang et al. (2004) konnten 74% HPV-high-risk Infektionen in oralen SCCs nachweisen. Nemes et al. (2006) fanden demgegenüber eine geringere Infektionsrate. Sie konnten 48% HPV-high-risk Infektionen in oralen SCC nachweisen. Für orale SCCs werden in der Literatur HPV-Gesamt-Infektionsraten von 20-30% angegeben (Furniss et al., 2007; Mishra et al., 2006; Smith et al., 2004; Slebos et al., 2006; Gillison et al., 2000; Fregonesi et al., 2003; de Oliveira et al., 2006).

Poetsch et al. untersuchten ausschließlich die Subgruppe der oralen basaloiden PECs (n=8) und kamen hier zu dem Ergebnis einer 100% HPV-high-risk Infektion.

Ebenfalls nur basaloide PECs wurden in der Studie von Begum et al. (2008) untersucht. Sie konnten auf ein relativ grosses Untersuchungsgut von 53 basaloiden PECs zurückgreifen. Mittels der *in situ*-Hybridisierung wurde gezielt nach dem HPV-high-risk Typ 16 gesucht. In 34% der Fälle lag eine HPV-high-risk Typ 16 Infektion vor. Auffällig in der Studie war die Verteilung der HPV-Infektion hinsichtlich der Lokalisati-

on. HPV-high-risk Typ 16 wurde zu 76% (16/21) im Oropharynx gefunden, während nur 6% (2/32) im nicht oropharyngealen Bereich detektiert wurden. Diese Korrelation von HPV-high-risk Typ 16 Infektion und der Lokalisation im Oropharynx wurde ebenfalls von El-Mofty beschrieben, und auch aus anderen Studien ist bekannt, dass gerade in der Mundhöhle die Assoziation von HPV-Infektionen bei den PECs in Abhängigkeit von der Lokalisation heterogen ist (Hobbs et al., 2006).

Von den in dieser Studie untersuchten 65% HPV-high-risk infizierten basaloiden PECs waren 91% für den HPV-high-risk Typ 16 positiv (zuzüglich 1 Fall mit HPV-high-risk Typ 35 Infektion). Das Auftreten der HPV-high-risk Typen 16 und 35 bei demselben Tumortyp ist nicht ungewöhnlich, zumal beide Typen große Strukturähnlichkeit aufweisen und einen hohen Verwandtschaftsgrad zueinander aufweisen, wie der HPV-Stammbaum erkennen lässt (Abbildung 1). So haben andere Autoren den HPV-high-risk Typ 35 in Tonsillenkarzinomen beschrieben (Hammarstedt et al., 2006).

Laut Begum et al. (2008) sind basaloide SCCs eine gemischte Gruppe von Tumoren, die, abgesehen von ihren morphologischen Gemeinsamkeiten, auf der Basis des HPV- Status unterteilt werden können. Sie kommen aufgrund ihrer Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass basaloide SCCs mit HPV-high-risk Typ 16 Infektion eine weniger aggressive Variante zu sein scheinen im Vergleich zu den nicht Virus-assoziierten Fällen von Kopf-Hals-Tumoren. Damit wäre der HPV-high-risk Typ 16 ein prognostisch günstiger Marker. Diese Aussage zur günstigeren Überlebensrate wird durch El-Mofty unterstützt (2007).

In der Vergleichsgruppe der Dysplasien/Hyperplasien und Papillome konnte solch eine eindeutige Korrelation mit einer HPV-Infektion nicht aufgezeigt werden. Innerhalb der Gruppe der Papillome konnte eine HPV-high-risk Typ 16 Infektion in 20% der Fälle nachgewiesen werden, während 50% der Papillome mit einer HPV-low-risk Infektion assoziiert waren. Aus diesen Ergebnissen lassen sich keine Verbindungen zwischen diesen Läsionen und HPV-high-risk Typ 16 herstellen. Andere Untersuchungen lassen ebenfalls vermuten, dass HPV-high-risk eine untergeordnete Rolle in der Ätiologie von oralen Papillomen spielt (Henley et al., 2004; Kansky et al., 2006).

Fregonesi et al. (2003) schlossen aus ihren Ergebnissen, dass orale Papillome überwiegend mit einer HPV-low-risk Infektionen assoziiert sind und deren prognostisches Verhalten gewöhnlich benigne ist. Immerhin fanden sie in ca. 20% der Papillome und (papillären) Hyperplasien aber auch HPV-high-risk Typ 16 Infektionen. Diese Befunde

erinnern an die ebenfalls recht häufigen HPV-high-risk Typ 16 Infektionen bei den gutartigen Papillomen/Kondylomen der Cervix uteri.

Lopez Amado et al. (1996) untersuchten ein enorm großes Kollektiv benigner Läsionen des Oropharynx (234 Papillome). In acht Fällen kam es metachron am Ort des zuvor entfernten Papilloms zur Karzinomentstehung, so dass sich daraus die interessante Fragestellung ergibt, ob sich in diesen Fällen in Folge einer HPV-Infektion aus einem benignen Papillom ein Karzinom entwickelt hat. Bisher hat es nur wenige Studien zu diesem Thema gegeben, da es sich bei squamösen Papillomen des Pharynx, des Nasenvorhofes und der Mundhöhle häufig um sehr kleine Läsionen handelt, die nach einfacher chirurgischer Entfernung weder ein Rezidiv ausbildeten, noch ergaben sich Hinweise auf eine Karzinomentwicklung.

Die Dysplasien/Hyperplasien konnten in 29% mit einer HPV-high-risk Typ 16 Infektion in Verbindung gebracht werden und zeigen damit ebenfalls keine enge Assoziation zu einer HPV-high-risk Typ 16 Infektion.

Ein Argument, dass HPV (selbst high-risk HPV) im oralen Epithel oft nur ein „Passagier“ ist, ist der Befund, dass in normalen Geweben, benignen Leukoplakien und intraepithelialen Neoplasien die HPV-Infektion ein ähnliches Verbreitungsmuster zeigt. Laut Miller et al. (1996) ist es vorstellbar, dass die Ähnlichkeit in der Verbreitung die lange Latenzperiode von HPV reflektiert, die erforderlich ist, um Zellen zu transformieren. Hierfür spricht die niedrige Rate an malignen Transformationen bei der Leukoplakie.

p16

Neben einer verminderten p53-Expression bei high-risk HPV-transformierten Zellen, die bei analen (Lu et al., 2003) und zervikalen Karzinomen beobachtet werden konnte (Koyamatsu et al., 2003; Salcedo et al., 2002), wurde in weiteren Untersuchungen gezeigt, dass andere Tumor-Suppressor-Gene, speziell p16INK4A, in HPV-high-risk assoziierten Karzinomen überexprimiert sind (Klaes et al., 2001; Milde-Langosch et al., 2001; Keating et al., 2001; Sano et al., 1998). Offensichtlich wird p16 infolge einer Rb Inaktivierung hochreguliert (Khleif et al., 1996; Li et al., 1994).

Bei den in dieser Studie untersuchten basaloiden HPV-high-risk PECs konnte keine Korrelation zu einer p16-Überexpression festgestellt werden. In 18% wurde p16 nicht exprimiert, 9% ergaben eine mittlere p16-Expression und 73% zeigten eine starke p16-Expression. Dagegen postulierten Poetsch et al. aufgrund ihrer Studie einen

kausalen Zusammenhang von HPV-high-risk Infektion und p16-Überexpression (Poetsch et al.,2003; Fregonesi et al., 2003). Damit korrespondiert auch die Studie von Begum et al. (2008), bei der eine HPV-high-risk Typ 16 Infektion mit einer p16-Überexpression in den oropharyngealen basaloiden PECs korrelierte.

Auch für die Vergleichsgruppe der Dysplasien/Hyperplasien und Papillome ergab sich keine Übereinstimmung von HPV-high-risk Typ 16 Infektion und p16-Überexpression. Hier lässt allerdings der Nachweis von HPV-high-risk Typ 16 in Verbindung mit einer p16-Überexpression bei oralen Hyperplasien vermuten, dass einige der als benigne klassifizierten Läsionen ein malignes Potential in sich tragen (Fregonesi et al., 2003). Nach Fregonesi et al. scheint eine p16-Dysfunktion nicht nur HPV-abhängig zu sein, so dass auch andere Mechanismen und Kofaktoren in Betracht gezogen werden sollten.

Bei den untersuchten Dysplasien lag in der Mehrzahl der Fälle keine HPV-Infektion vor, nur vereinzelt war eine HPV-high-risk Infektion nachweisbar. Auffälligerweise waren sowohl die Fälle mit fehlender HPV-Infektion als auch die mit HPV-high-risk Infektion mit einer p16-Negativität assoziiert. Einzig eine mit einer HPV-low-risk Infektion assoziierte Dysplasie zeigte eine p16-Überexpression.

Oralen Läsionen sind somit in dieser Hinsicht nicht mit denen des unteren weiblichen Genitaltraktes vergleichbar, der Einsatz von p16 als Surrogatmarker zum Nachweis einer HPV-high-risk-assozierten (Prä-)Neoplasie ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu empfehlen.

5 Zusammenfassung

Bei den basaloiden Plattenepithelkarzinomen handelt es sich um eine Variante von Plattenepithelkarzinomen, die bevorzugt in der Kopf-Hals-Region vorkommen. Da in der Literatur eine Assoziation dieser Variante mit HPV-Infektionen beschrieben wurde, kann eine Virus-bedingte Ursache für basaloide Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich vermutet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 34 orale Läsionen des Plattenepithels untersucht, darunter 17 basaloide Plattenepithelkarzinome, 10 Papillome und 7 Hyperplasien/Dysplasien. Der Nachweis der HPV-DNA erfolgte mittels der Hybrid Capture Methode, und die Bestimmung des HPV-Typs über eine direkte Sequenzierung. Eine mögliche Korrelation zur p16-Expression wurde immunhistochemisch überprüft.

Aus den Untersuchungen ergaben sich folgende Resultate:

1. Basaloide Plattenepithelkarzinome wiesen in fast 2/3 der Fälle (65%, 11/17) HPV-high-risk Infektionen auf, davon waren über 90% der Fälle (10/11) mit dem HPV-Genotyp 16 assoziiert. Damit unterschied sich diese Gruppe nach Frequenz der HPV-Infektion und nach Genotyp von der Vergleichsgruppe der plattenepithelialen Dysplasien/Hyperplasien und Papillome, und von „historischen“ Kontrollgruppen oraler Plattenepithelkarzinome.
2. Die p16-Expression erwies sich nicht als geeigneter Surrogatmarker der HPV-high-risk Infektion in den untersuchten oralen Läsionen, speziell nicht in den basaloiden Plattenepithelkarzinomen. Damit unterschied sich dieses Kollektiv oraler HPV-high-risk-assoziierter Karzinome von genitalen Karzinomen mit HPV-high-risk Infektion.

Zusammenfassend ergab sich aus den Untersuchungen eine im Vergleich zur Gesamtheit der oralen Karzinome enorm hohe Assoziation der basaloiden Plattenepithelkarzinome mit dem HPV-Typ 16. Aus dieser engen Phänotyp-Genotyp-Beziehung folgt zugleich eine diagnostische Perspektive, d.h. ein potentieller Nutzen der HPV-Analytik in der Differentialdiagnose basaloider „Malignome“ des Kopf-Hals-Bereiches.

Allerdings sind dazu Hybridisierungs- und/oder Sequenzierungsmethoden erforderlich. Der immunhistochemische p16-Test ist dagegen bislang nicht geeignet.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: HPV-Dendrogramm; HPV-high-risk Typen:rot,HPV-low-risk Typen: grün markiert. Die eingerahmten HPV-Typen wurden untersucht und zeigen eine hohe Sequenzübereinstimmung. 7

Abbildung 2: Nr.6: HPV-neg. / p16 +++cyt.: nesterförmig wachsendes Plattenepithelkarzinom, basaloides PEC; HE..... 28

Abbildung 3: Nr.6: HPV-neg. / p16 +++cyt.: nesterförmig wachsendes Plattenepithelkarzinom, basaloides PEC; HE..... 28

Abbildung 4: Nr.4: HPV-neg. (p16 ++): basaloides Plattenepithelkarzinom mit girlandenfömigen Tumorzellbändern mit ausgedehnteren komedoartigen Nekrosen als im vorherigen Fall; HE 29

Abbildung 5: Nr.17: HPV high-risk / p16 +++: basaloides Plattenepithelkarzinom; herdförmige Hyalinisierung; HE..... 30

Abbildung 6: Nr.17: HPV high-risk / p16 +++: basaloides Plattenepithelkarzinom; herdförmige Hyalinisierung; HE..... 30

Abbildung 7: Nr.19: HPV high-risk / p16 -: Papillom mit Plattenepithel, Koilozyten, vorwiegend basale Atypien; HE 31

Abbildung 8: Nr.21: HPV low-risk, p16 ++: Papillom mit papillomatöser Hyperplasie, Hyper- und Parakeratosen, Koilozyten; HE..... 31

Abbildung 9: Nr.21: HPV low-risk, p16 ++: Papillom mit papillomatöser Hyperplasie, Hyper- und Parakeratosen, Koilozyten; HE..... 32

Abbildung 10: (Nr.28) HPV high-risk / p16 -: Dysplasie; Schleimhautstreifen mit papillomatös-endophytisch verbreitetem Plattenepithel. Leichte Schichtungsstörung und angedeutete Koilozytosen. Hyperplasie mit geringgradiger Dysplasie; HE..... 33

Abbildung 11: HPV-neg. / p16 -: Hyperplasie; leichte Akanthose und Koilozyten im Stratum spinosum;HE 33

Abbildung 12: Nr.29: HPV high-risk / p16 -: verruköse Hyperplasie. Parakeratose und zytopathische Effekte; HE 34

Abbildung 13: Nr.33: HPV-neg. / p16 -: Plattenepitheldysplasie, zum Teil endophytische papillomatöse Plattenepitheldysplasie; Parakeratose, vermehrte basale und parabasale, aber auch suprabasale Mitosen; HE 34

Abbildung 14: Geschlechterverteilung bezüglich der Diagnosen 35

Abbildung 15: Altersverteilung bezüglich der Diagnosen 35

Abbildung 16: BioLabs N3200S,2-Log 37

Abbildung 17: Agarose-Gelelektrophorese der PCR Produkte 37

Abbildung 18: DNA Sequenz des PCR Produktes “Downstream“ von GP5+ zur Genotypisierung von HPV. Die BLAST Alignment Analyse der Sequenz dieser Region zeigt basierend auf der in der Genbank hinterlegten Sequenz Übereinstimmung mit dem HPV Genotyp 16. 38

Abbildung 19: HPV-Infektionen bei oralen Läsionen des Plattenepithels 39

Abbildung 20: Verteilung der HPV-Typen 40

Abbildung 21: HPV-Infektionsraten 40

Abbildung 22: Nr.4: p16-Immunhistochemie. +++p16-Expression (Kernfärbung) 41

Abbildung 23: Nr.17: p16-Immunhistochemie. +++p16-Expression (starke nukleäre Färbung) 42

Abbildung 24: Nr.17: p16-Immunhistochemie. +++p16-Expression (starke nukleäre Färbung) 42

Abbildung 25: Nr.21: HPV low-risk, p16 +++: p16-Immunhistochemie. +++p16-Expression, partiell++p16-Expression (diffuse nukleäre Färbung) 43

Abbildung 26: Nr.30: HPV low-risk / p16 ++: P16-Immunhistochemie. ++p16-Expression (diffuse p16-Expression, vor allem in den basaloiden Epithelanteilen) 44

Abbildung 27: Nr.29: HPV high-risk / p16 -: P16-Immunhistochemie. Fehlende p16-Expression (schwache, einzelne Zellen gefärbt=als negativ gewertet) 44

Abbildung 28: p16-Expression bei HPV-Negativität.....47

Abbildung 29: p16-Expression bei HPV low-risk Infektion.....48

Abbildung 30: p16-Expression bei HPV high-risk Infektion.....48

Abbildung 31: Korrelation p16-Expression zum HPV-Infektionsstatus 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchungsgut 14
Tabelle 2: Zusammensetzung des Mastermixes 22
Tabelle 3: PCR-Programm 22
Tabelle 4: Gesamttabelle 45

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
Aqua dest	destilliertes Wasser
Bp	Basenpaar
cm	Zentimeter
DAB	Diaminobenzidin
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
GfL	Gesellschaft für Labortechnik
HR	high risk
kDa	kiloDalton
min	Minuten
mM	Millimol
LR	low risk
PEC	Plattenepithelkarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
TBS	Tris-Puffer
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
Upm	Umdrehungen pro Minute
W	Watt
WHO	World Health Organisation
M	Mol
PEC	Plattenepithelkarzinom
BSCC	basaloid squamous cell carcinoma
SCC	squamous cell carcinoma
OSCC	oral squamous cell carcinoma
HNSCC	head neck squamous cell carcinoma
CCND1	Cyclin D1
LOH	loss of heterocygoty
IgG	Immunglobulin
HE	Hämalaun/Eosin
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
EDTA	Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat
TE	Tris-EDTA

Literaturverzeichnis

[1]	Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM (1987)	Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. J Virol 61:962-971
[2]	Banks ER, Frierson HF, Mills SE, George E, Zarbo RJ, Swanson (1992)	Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 40 cases. Am J Surg Pathol 16:939-946
[3]	Begum S, Westra WH (2008)	Basaloid Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck is a Mixed Variant That Can be Further Resolved by HPV Status. Am J Surg Pathol
[4]	Boyer SN, Wazer DE, Band V (1996)	E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. Cancer Res 56:4620-4624
[5]	Campman SC, Gandour-Edwards RF, Sykes JM (1994)	Basaloid squamous carcinoma of the head and neck. Report of a case occuring in the anterior floor of the mouth. Arch Pathol Lab Med 118(12):1229-32
[6]	Cann CI, Fried MP, Rothman KJ (1985)	Epidemiology of squamous cell cancer of the head and neck. Otolaryngol Clin North Am 18:367-388

[7]	Chakravarti A, Heydon K, Wu CL et al. (2003)	Loss of p16 expression is a prognostic significance in locally advanced prostate cancer: an analysis from the radiation therapy oncology group protocol 86-10. J Clin Oncol 21:3328-3334
[8]	Coletta RD, Cotrim P, Vargas PA, et al. (2001)	Basaloid squamous cell carcinoma of the oral cavity: report of 2 cases and study of AgNOR, PCNA, p53, and MMP expression. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 91:563-569
[9]	Coppola D, Catalano E, Tang CK, Elfenbein IB, Harwick R, Mohr R (1993)	Basaloid squamous cell carcinoma of floor of mouth. Cancer 72(8):2299-305
[10]	Cunningham LL, Pagano GM, Li M,Tandon R, Holm SW, White DK, Lele SM (2006)	Overexpression of p16INK4 is a reliable marker of human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 102(1):77-81
[11]	De Oliveira DE, Bacchi MM, Macarenco RS, Tagliarini JV, Cordeiro RC, Bacchi CE (2006)	Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. Am J Clin Pathol 126(2): 284-93
[12]	Dysen N, Howley PM, Munger K, Harlow E (1989)	The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 243:934-937
[13]	Elamin F, Steingrimsdottir H, Wanakulasuriya S, Johnson N, Tavassoli M (1998)	Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in UK subjects : a novel method of detection. Ral Oncol 34:191-7
[14]	El-Mofty SE (2007)	Human Papillomavirus – Related carcinomas of the upper aerodigestive tract. Head and Neck Pathology 1:181-185

[15]	Eversole LR (2000)	Papillary lesions of the oral cavity: relationship to human papillomaviruses. J Calif Dent Assoc 28:922-7
[16]	Feakins RM, Nickols CD, Bidd H, et al. (2003)	Abnormal expression of pRb, p16 and cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases: relationship with pathological features and survival. Hum Pathol 34:1276-1282
[17]	Fregonesi P, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de Oliveira M, Soares CP (2003)	p16 immunhistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. J Histochem Cytochem 51:1291-7
[18]	Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Nelson HH et al. (2007)	Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer 120:2386-2392
[19]	Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. (2000)	Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst 92:709-720
[20]	Hammarstedt L, Lingquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Onelöv L, Joneberg J, Creson N, Lindholm J, Ye W, Dalianis T, Munck-Wikland E (2006)	Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. Int J Cancer 119 :2620-2623
[21]	Hanahan D, Weinberg RA (2000)	The hallmarks of cancer. Cell 100(1):57-70
[22]	Hashida T, Yasumoto S (1991)	Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. J Gen Virol 72:1569-1577
[23]	Havre PA, Yuan J, Hedrick L, Cho KR, Glazer PM (1995)	p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. Cancer Res 55:4420-4424

[24]	Henley JD, Summerlin DJ, Tomich CE (2004)	Condyloma accuminatum and condyloma-like lesions of the oral cavity: a study of 11 cases with an intraductal component. Histopathology 44:216-221
[25]	Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ (2006)	Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. Clin Otolaryngol 31(4): 259-66
[26]	Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991)	p53 mutations in human cancers. Science 253:49-53
[27]	Ide F, Shimoyama T, Horie N, Kusama K (2002)	Basaloid squamous cell carcinoma of the oral mucosa: a new case and review of 45 cases in the literature. Oral Oncology 38: 120-124
[28]	Ihrler S (2003)	Pathologische Grundlagen. Manual Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München
[29]	Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers MJ (1995)	Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. J Clin Microbiol 33(4):901-5
[30]	Kalof AN, Cooper K (2006)	p16INK4A Immunoexpression: Surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Adv Anat Pathol 13:190-194
[31]	Kansky AA, Seme K, Maver PJ, Luzar B, Gale N, Poljak M (2006)	Human papillomaviruses (HPV) in tissue specimens of oral squamous cell papillomas and normal oral mucosa. Anticancer Res 26(4B): 3197-201
[32]	Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, et al. (2003)	Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcma of soft tissue : decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis. J Pathol 201:487-495

[33]	Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. (2001)	Ki-67, cyclin E, and p16INK4A are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. Am J Surg Pathol 25:884-91
[34]	Khleif SN, De Gregori J, Yee CL, Otterson GA et al. (1996)	Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. Proc Natl Acad Sci 93(9):4350-4
[35]	Kim YT und Zhao M (2005)	Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. Yonsei Medical Journal 46:597-613
[36]	Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. (2001)	Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. Int J Cancer 92:276-84
[37]	Koh J, Enders GH et al. (1995)	Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell cycle inhibition. Nature 375: 506-510
[38]	Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y, Fukuda K, Saito T, Matsukuma K et al. (2003)	A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. Gynecol Oncol 90:547-51
[39]	Leversha MA, Fielding P, Watson S, et al. (2003)	Expression of p53, pRB, and p16 in lung tumours: a validation study on tissue microarrays. J Pathol 200: 610-619
[40]	Levine AJ (1990)	The p53 protein and its interactions with the oncogene products of the small DNA tumor viruses. Virology 177:419-426
[41]	Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y (1994)	Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 bythe retinoblastoma susceptibility gene product pRb. Cancer Res. 54:6078-6082
[42]	Liu X, Han S, Baluda MA, Park NH (1997)	HPV-16 oncogenes E6 and E7 are mutagenetic in normal human oral keratinocytes. Oncogene 14:2347-253

[43]	Loning T, 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 Dermatol 84:417-420
[44]	Lopez Amado M,Castro Lareo I, Lozano Ramirez A, Caballero Torcuato L (1996)	Epidemiology of otolaryngologicalsquamous cell papillomas in a spanish subpopulation during a twenty year period. Rev Laryngol Otol Rhinol 117(2): 105-110
[45]	Lu DW, El-Mofty SK, Wang HL (2003)	Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. Mod Pathol 16:692-9
[46]	Lukas JD, Agaars L, Mann DJ, Bartkova J et al. (1995)	Rb-dependent cell cycle inhibition by p16 CDKN2A tumor surpressor. Nature 375: 503-506
[47]	Luna MA, Naggar AE, Parichatikanond P, Weber RS, Batsakis JG (1990)	Basaloid squamous carcinoma of the upper aerodigestive tract. Cancer 66:537-542
[48]	Makitie AA, Macmillan C, Ho J, et al. (2003)	Loss of p16 expression has prognostic significance in human nasopharyngeal carcinoma. Clin Cancer Res 9: 2177-2184
[49]	Medema RH, Herrera RE et al. (1995)	Growth suppression by p16 INK4A requires functional retinoblastoma protein. Proc Natl Acad Sci 92: 6289-93
[50]	Mihic-Probst D, Saremaslani P, Komminoth P, et al. (2003)	Immunstaining for the tumour suppressor gene p16 product is a useful marker to differentiate melanoma metastasis from lymph node nevus. Virchows Arch 443: 745-751
[51]	Milde-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Poppinghaus A, Riethdorf L, Loning T (2001)	Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21 WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. Virchows Arch 439:55-61

[52]	Milde-Langosch K, Riethdorf S, Park T-W (1999)	Natürlicher Verlauf der HPV-Infektion. Pathologe 20:15-24
[53]	Miller CS, White DK (1996)	Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 82(1): 57-68
[54]	Mishra A, Bharti AC, Varghese P, Saluja D, Das BC (2006)	Differential expression and activation of NF-kB family proteins during oral carcinogenesis : Role of high risk human papillomavirus infection. Int J Cancer 119 :2840-2850
[55]	Morice WG, Ferreiro JA (1998)	Distinction of basaloid squamous cell carcinoma from adenoid cystic and small cell undifferentiated car-cinoma by immunchemistry. Hum Pathol 29:609-612
[56]	Mork J, Lie AK, Glattre E, et al. (2001)	Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 344:1125-31
[57]	Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R (1989)	The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary huan keratinocytes. J Virol 63:4417-4421
[58]	Munoz N (2000)	Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. J Clin Virol 19:1-5
[59]	Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Marton IJ (2006)	Expression of p16INK4A, p53 and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 102:344-352
[60]	Oda D, Bigler L, Lee P, Blanton R (1996)	HPV immortalization of human oral epithelial cells: a model for carcinogenesis. Exp Cell Res 226:164-169

[61]	Owonikoko T, Loberg C, Gabbert HE, Sarbia M (2001)	Comparative analysis of basaloid and typical squamous cell carcinoma of the oesophagus: a molecular biological and immunohistochemical study. J Pathol 193:155-161
[62]	Park NH, Min BM, Li SL, Huang MZ, Cherick HM, Doniger J (1991)	Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human ppillomavirus. Carcinogenesis 12:1627-1631
[63]	Park T-W, Fujiwara H, Wright TC (1995)	Molecular biology of cervical cancer and its precursors. Cancer 76:1902-1913
[64]	Paulino AF, Singh B, Shah JP, Huvos AG (2000)	Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. Laryngoscope 110:1479-1182
[65]	Poetsch M, Lorenz G, Bankau A, Kleist B (2003)	Basaloid in contrast to nonbasaloid head and neck squamous cell carcinomas display aberrations especially in cell cycle control genes. Head Neck 25:904-910
[66]	Salcedo M, Taja L, Utrera D, Chavez P, Hidalgo A, Perez C, et al. (2002)	Changes in retinoblastoma gene expression during cervical cancer progression. Int J Exp Pathol 83:275-86
[67]	Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakayima T (1998)	Expression tatus of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. Am J Pathol 153:1741-8
[68]	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
[69]	Shope R (1933)	Infectious papillomatosis of rabbits. J Exp Med 58:607-624

[70]	Slebos RJC, Yi Y, Ely K, Carter J, Evjen A, Zhang X et al. (2006)	Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 12: 701-709
[71]	Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, Turek LP (2004)	Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. J Nat Cancer Inst 96(6): 449-455
[72]	Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J (1983)	Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. Int J Oral Surg 12:418-424
[73]	Vogelstein B(1990)	Morphological A deadly inheritance. Nature 348(6303): 681-2
[74]	Wain SL, Kier R, Vollmer RT, Bossen EH (1986)	Basaloid-squamous carcinoma of the tongue, hypopharynx, and larynx: report of 10 cases. Hum Pathol 17:1158-1166
[75]	Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. (1999)	Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 189:12-19
[76]	Werness BA, Levine AJ, Howley PM (1990)	Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science 248:76-79
[77]	White AE, Livanos EM, Tlsty TD (1994)	Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. Genes Dev 8:666-677
[78]	Wilsczinski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB (1998)	Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. Am J Pathol 152:145-156

[79]	Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL (2002)	Clinicalpathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. J Clin Pathol 55:58-60
[80]	Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT (2004)	Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. Int J Oral Maxillofac Surg 33(1): 71-74
[81]	zur Hausen H (1994)	Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. In: Current topics in microbiology and immunology 186:131-156
[82]	zur Hausen H (1996)	Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta 1288:F55-F78
[83]	zur Hausen H (2000)	Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 92:690-8

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Löning möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Kerstin Röser für die ausgezeichnete und herzliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Thorsten Jäkel möchte ich für die Hilfestellungen bei der histologischen Auswertung danken.

Für die Unterstützung bei der Ausführung experimenteller Arbeiten danke ich Frau Cornelia Ebisch, Frau Inge Brandt, Frau Bianca Kelp und Frau Tanja Karstens.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thorsten Rebehn für das Layout dieser Arbeit.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die 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.

Unterschrift:.....

Lebenslauf

Name	Carmen Sperber
Anschrift	Leonhardstr. 30 38102 Braunschweig

PERSÖNLICHE DATEN

Geboren	am 10.05.1976 in Salzgitter
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULLAUFBAHN

1982-1995	Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Salzgitter Allgemeine Hochschulreife
1995-1999	Ausbildung zur Zahntechnikerin in Salzgitter

STUDIUM

1999-2004	Studium der Zahnmedizin am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

seit 2003	Doktorarbeit im Institut für Oralpathologie
2004-2007	Assistenzzahnärztin am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg
Seit 2007	Zahnärztin in Wolfsburg