

Aus dem Labor Dr. Keeser, Prof. Arndt und Partner und dem Pathologischen Labor
Prof. Schröder und Dr. Beckmann, Hamburg

Nachweis und Typisierung humaner Papillomaviren mittels PCR.
Eine retrospektive Analyse dysplastischer und neoplastischer Läsionen
des genitalen Plattenepithels

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Daniela Andrea Dansmann
aus Hamburg
Hamburg, 2000

Angenommen von dem Fachbereich der Medizin
der Universität Hamburg am: 14. März 2000

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prrof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. S. Schröder

Korreferent: Prof. Dr. U. Helmchen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Epidemiologie und Historie	
1.2. Biologie des HPV	
1.3. Maligne Transformation	
1.4. Diagnostik	
1.4.1. HPV-DNA-Nachweis durch Hybridisierungsmethoden	
1.5. Zielsetzung der Dissertation	
2. <u>Material und Methoden</u>	12
2.1. Patientinnen und Untersuchungsmaterial	
2.2. Methodik	
2.2.1. Mikrotom	
2.2.2. Extraktion von DNA aus dem Portiogewebe	
2.2.3. Standard-PCR	
2.2.4. nested-PCR	
2.2.5. β -Globin Nachweis	
2.2.6. Maßnahmen zur Vermeidung von Kontamination	
2.2.7. Analyse der PCR Produkte	
2.2.8. Genotypisierung	
2.2.8.1. Restriktion	
2.2.8.2. Southern-Blot	
2.2.8.3. Prähybridisierung	
2.2.8.4. Hybridisierung	
2.2.8.5. Waschschritte	
2.2.8.6. Detektion	
3. <u>Ergebnisse</u>	
3.1. Vergleich von Standard- und nested-PCR im Rahmen der Analyse frischer und archivierter Proben	22
3.2. Vermeidung von Kontamination	
3.3. Spektrum der mit der nested-PCR erfaßten genitalen HPV-Typen	

3.4. Häufigkeitsverteilung der einzelnen Diagnosegruppen	
3.5. Altersverteilung der pathologischen Befunde	
3.6. Nachweis von HPV	
3.7. Prävalenz der HPV-Infektion bei unterschiedlichen histologischen Befunden	
3.8. Altersspezifische Prävalenz der HPV-Infektion	
3.9. Häufigkeit einzelner HPV-Typen	
3.10. Korrelation von HPV-Typ und Läsion	
3.11. Mehrfachinfektionen	
3.12. Verlaufsbeobachtungen bei HPV-positiven Dysplasien	
4. <u>Diskussion</u>	37
5. <u>Zusammenfassung</u>	49
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	51
7. <u>Anhang</u>	66
7.1. Materialien	
7.1.1. Geräte	
7.1.2. Laborbedarf	
7.1.3. Reagentien	
7.1.4. Enzyme	
7.1.5. Nukleotide, Oligonukleotide und Primer	
7.1.6. Puffer und Lösungen	
7.1.7. Mikrotomvorbereitung	
7.2. Auflistung aller Proben in untersuchter Reihenfolge	
7.3. Abkürzungsverzeichnis	
7.4. Lebenslauf	
7.5. Danksagungen	

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Epidemiologie und Historie

Infektionen, die durch das humane Papillomavirus hervorgerufen werden, gehören heute zu den häufigsten sexuell übertragbaren Krankheiten und stehen nach Angaben des „Center for Disease Control“ (Atlanta) an zweiter Stelle nach den Infektionen durch Chlamydien (1).

Unter den jungen, unverheirateten, sexuell aktiven Frauen kann die HPV-Infektion als epidemisch angesehen werden. Der HPV-Durchseuchungsgrad für die weibliche Normalpopulation beträgt, je nach Kollektiv und Region, aus der die Stichprobe entnommen wurde, bereits 30 % und mehr (2).

Tumoren der Cervix uteri gehören zu den häufigsten Tumorerkrankungen der Frau. Weltweit kommt es nach Angaben der WHO (3) jährlich zu 450.000 Neuerkrankungen. Eine Infektion mit HPV konnte in über 90 % dieser Tumoren nachgewiesen werden (4, 5). Die HPV-Infektion ist somit ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung genitaler Tumoren (6 - 14).

Seit über 25 Jahren werden in den meisten Industrieländern Vorsorgeuntersuchungen angeboten. Diese stützen sich überwiegend auf zytologische Untersuchungen und haben zu einer Abnahme der Mortalität durch das Zervixkarzinom geführt (15).

Bereits frühzeitig ergaben die epidemiologischen Studien von Rigoni-Stern (16) die Vermutung, daß ein Zusammenhang zwischen der Promiskuität und dem gehäuften Auftreten von Zervixneoplasien besteht. Bei Prostituierten zeigte sich eine wesentlich höhere Inzidenz des Zervixkarzinoms als bei Nonnen (16). Später wurde in anderen Studien darauf hingewiesen, daß frühe Sexualkon-

takte sowie hohe Promiskuität mit einem erhöhten Risiko einhergehen, an einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) zu erkranken (17, 18, 19).

Andere epidemiologische Studien wiesen daraufhin, daß infektiöse Faktoren an der Entstehung der Zervixkarzinome beteiligt sein könnten (20, 21).

In den letzten 10 Jahren wurde die Gruppe der HPV-Viren mit zunehmendem Interesse auf ihr kanzerogenes Potential hin untersucht. 1974 publizierte zur Hausen zum ersten Mal die Hypothese, daß HPV möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung des Zervixkarzinoms spielen könnte (22). Diese Vermutung basierte auf zweierlei Erkenntnissen. Einerseits war bekannt, daß Papillomaviren bei Cottontail-Kaninchen Karzinome der Haut hervorrufen können (23). Zum anderen wurden spezielle zytologische Veränderungen in Zervixabstrichen als spezifisches Zeichen der HPV-Infektion identifiziert (24).

Erst durch die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden wurde es jedoch möglich, den postulierten Zusammenhang von HPV-Infektion und Entstehung einer genitalen Neoplasie zu beweisen.

1982 gelang es erstmalig Dürst und Mitarbeitern, die DNA des HPV-Typ 16 aus Zervixkarzinomgewebe zu isolieren und zu charakterisieren (25). Boshart und Mitarbeiter konnten kurz darauf die DNA von HPV 18 isolieren (26). Die Untersuchungen von Bosch et al. 1995 (27) an 1000 Zervixkarzinomen ergaben, daß 93 % der Proben HPV-DNA enthielten.

Die ätiologische Bedeutung zumindest einiger HPV-Typen für die Entstehung derartiger Karzinome konnte durch weitere Studien unterstützt werden, in denen HPV-Infektionen als wichtiger Risikofaktor für neoplastische Veränderungen der Zervix identifiziert wurden (28, 29, 30).

Nach dem derzeitigen Wissensstand ist HPV vermutlich nicht der alleinige Auslöser für die Tumorentstehung. Vielmehr besteht ein Zusammentreffen von

Papillomavirusinfektion und anderen Faktoren, wie z.B. zusätzlichen Virusinfektionen (HSV, HIV), UV-Licht, Immunsuppression, Sexualverhalten oder Nikotin (31). Schon 1982 erkannte zur Hausen, daß die Anwesenheit von HPV in einer bestimmten Anzahl von Karzinomen nicht einen ursächlichen Zusammenhang beweist, aber möglicherweise dabei hilft, die Rolle bestimmter Einflüsse auf die Entstehung von Karzinomen zu erklären (32).

1.2. Biologie des HPV

Die humanen Papillomaviren sind unbehüllte, karyotrope, etwa 55-60 nm große Viruspartikel aus der Familie der Papovaviren. Sie besitzen ein ikosaedrisches Kapsid mit 42 Kapsomeren und einem doppelsträngigen, zirkulären, etwa 7500-8000 Basenpaare langen DNA-Molekül (33). Dieses Genom setzt sich aus einer nicht translatierten Kontrollregion (LCR) und den „early“(E)- und „late“(L)-Genen zusammen. Die L1 und L2 Gene codieren für virale Kapsid-Proteine, während die Produkte der „early“-Gene unter anderem für die Regulation der DNA-Replikation und Zelltransformation notwendig sind (34, 35).

Derzeit können über 80 verschiedene HPV-Typen differenziert werden, von denen 45 präferentiell Schleimhautepithelien infizieren (genitale HPV), während die übrigen vorwiegend in der Epidermis vorkommen (kutane HPV) (36). Vor kurzem konnten jedoch auch genitale HPV-Typen in kutanen Tumoren nachgewiesen werden, so daß zumindest für einige genitale Typen der Gewebetropismus weniger stringent zu sein scheint (37, 38, 39).

Prinzipiell können alle Typen des humanen Papilloma-Virus entweder in ihrem natürlichen oder experimentellen Wirt gut- oder bösartige Tumoren der Haut und der Schleimhäute induzieren (Warzen, Papillome, dysplastische- und neoplastische Läsionen) (40). Jedoch führt die große Mehrzahl von HPV-Infektionen nicht zu klinischen Manifestationen. Die HPV-Infektion kann außerdem auch latent verlaufen.

Der Virus infiziert die Basalzellen der Epidermis des Wirtes. Der Eintritt der Viren in die Basalzellen ist bei defektem Epithel bzw. einer Wunde erleichtert. Das Virusgenom liegt extrachromosomal in zirkulärer Form vor und kann dort jahre- bis jahrzehntelang persistieren (41, 42). In den Basalzellen ist eine Replikation von HPV nicht möglich. Erst wenn der Differenzierungsprozeß zum Keratinozyten weiter fortschreitet, wird die Initiierung der Replikation und die Synthese von strukturellen HPV-Proteinen möglich.

Lytische Infektionen kommen nur in differenzierten Zellen vor (43). Deshalb können reife Viruspartikel im Stratum granulosum und im Stratum corneum nachgewiesen werden. In Karzinomen hingegen können reife HPV-Partikel nicht mehr nachgewiesen werden. Es werden fast ausschließlich die für die Zelltransformation notwendigen Gene E6 und E7 exprimiert. Dies steht häufig in Zusammenhang mit der Integration des viralen Genoms in Chromosomen der Wirtszelle. Die Integration ist in der Regel mit einem Bruch des Genoms im Bereich der E1/E2-Region assoziiert, so daß die stromabwärts von E1 liegenden Gene nicht mehr exprimiert werden.

Die Integration des HPV-Genomes in das Wirtsgenom ist allerdings keine zwingend notwendige Voraussetzung für die maligne Transformation. Erforderlich ist lediglich eine erhöhte E6- und E7-Transkription.

Im Gegensatz zu den Karzinomen liegt in benignen und prä malignen zervikalen Läsionen die DNA immer in episomaler Form vor.

1.3. Maligne Transformation

Das onkogene Potential der Proteine E6 und E7 beruht auf der Interaktion mit den Produkten der Tumorsuppressorgene p53 (44) und pRB (10, 45).

Die Rb-Gene liegen auf dem Chromosom 13. Die Genprodukte (z.B. pRb 105kDa) sind über die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor E2F an der Regulation des Zellzyklus beteiligt.

Die Bindung von E7 an Rb führt zu einer funktionellen Inaktivierung von Rb. Dies bewirkt eine E2F-Aktivierung und ermöglicht die Induktion der Zellproliferation.

Das p53-Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert. Nach einem zellulären DNA-Schaden ist die Expression von p53 gesteigert. Das Produkt von p53 aktiviert die Expression bestimmter zellulärer Gene, welche entweder zu einem Arrest der Zelle in der G1-Phase oder zu einer Induktion der Apoptose (programmierter Zelltod) führen.

Das E6-Protein eines hoch-Risiko-HPV bildet mit p53 einen Komplex und führt zu dessen Degradation und damit zur Blockierung der Apoptose (35). Eine Interaktion mit dem entsprechenden Protein eines niedrig-Risiko-HPV führt nicht zu einer derartigen Veränderung (46).

Die Aktivität der viralen Onkogene ist eine wichtige Voraussetzung für die Immortalisierung infizierter Zellen. Diese Dysregulation ist allein aber nicht ausreichend für die Tumorgenese.

Die Koexpression von E6 und E7 und die damit verbundene Inaktivierung der beiden Tumorsuppressorgene p53 und pRb ermöglicht potentiell die Proliferation von Zellen mit DNA-Schäden (Mutationen). Konsequenz ist eine wachsende genetische Instabilität und das Akkumulieren onkogener Mutationen (47, 48). Für die funktionelle Bedeutung der E6- und E7-Proteine bei der Zellzyklusaktivierung spricht die unterschiedliche Ausprägung onkogener Eigenschaften bei den verschiedenen HPV-Typen. Die E7-Proteine von hoch-Risiko-HPV besitzen eine höhere Affinität zu Rb-Proteinen als die E7-Proteine von niedrig-

Risiko HPV. Dementsprechend werden HPV-Typen in Gruppen mit unterschiedlichem pathogenen bzw. onkogenen Potential eingeteilt (49).

Die Genotypen 6 und 11 sind meist mit gutartigen Läsionen wie z.B. den Condylomata acuminata assoziiert, wobei eine spontane Rückbildung möglich ist (50 - 54). Diese Typen sind nur selten an maligner Entartung beteiligt.

Ganz im Gegensatz hierzu treten die Genotypen 16, 18, 31 und 33 häufig in Verbindung mit prämaligen oder malignen Läsionen wie z.B. Zervixdysplasien und -karzinomen auf (55). Die HPV-Typen 31, 33 und 35 sind in Karzinomen nachweisbar und daher prinzipiell Karzinom-assoziiert. Relativ häufiger werden sie jedoch in CIN-Läsionen gefunden. Deshalb zählen diese Typen zu der Gruppe der HPV-Typen mit mittelgradigem Risiko für die Tumorinduktion.

HPV 16 und 18 findet man in bis zu 80 % aller Zervixtumoren (21, 32). Diese HPV-Typen besitzen ein hohes onkogenes Potential. Neben diesen bekannten Typen werden auch die teilweise erst in jüngerer Zeit identifizierten HPV-Typen 30, 45, 52, 56 und 58 den Typen mit hohem onkogenen Potential zugerechnet.

Für eine Reihe seltener bzw. neuer HPV-Typen ist das onkogene Potential noch weitgehend ungeklärt, da bislang erst wenige Berichte über die Assoziation mit bestimmten neoplastischen Läsionen vorliegen. Aufgrund einzelner Beschreibungen z.B. von HPV 66-, HPV 68-, HPV 73- oder HPV-MM4-Infektionen bei Zervixkarzinomen sollten diese aber als potentiell onkogene HPV-Typen betrachtet werden (48, 56, 57, 93).

1.4. Diagnostik

Bei mikroskopisch auffälligen und hinsichtlich ihrer Prognose unklaren Epithelläsionen insbesondere der Cervix uteri stellt sich die Indikation zum Nachweis und zur Typisierung von HPV. Das Vorhandensein HPV-spezifischer pa-

thognomischer mikroskopischer Befunde und die Einstufung der damit assoziierten Epithelveränderungen in das System der intraepithelialen Neoplasien (CIN bzw. VIN) erlauben allein keine ausreichende prognostische Abschätzung der Läsion hinsichtlich ihrer Progression. Bei Patientinnen mit identischen morphologischen Veränderungen können HPV-Typen mit unterschiedlichem onkogenen Potential vorliegen. Bei Nachweis eines HPV-Typs mit niedrigem onkogenen Potential in einer leichten Dysplasie ist eine abwartende Haltung vertretbar, während der Nachweis eines HPV-Typs mit hohem onkogenen Potential Anlaß zu weiteren diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen gibt.

Die Bedeutung der Typisierung liegt vor allem in der unterschiedlichen Onko- und Pathogenität einzelner Viren. Die Kenntnis des Risikos für die maligne Transformation einer HPV-Infektion ermöglicht Aussagen über die Prognose einer damit assoziierten Epithelläsion.

Die kulturelle Anzucht der Viren ist bislang nicht möglich. Der Nachweis von HPV-Viren im Elektronenmikroskop ist von geringer diagnostischer Bedeutung (58), da transformierte Zellen mit integriertem Virus keine viralen Partikel bilden. Die produktive Infektion ist auf die äußersten Epithelschichten begrenzt. Nur hier können HPV-Partikel nachgewiesen werden.

Der Nachweis einer HPV-Infektion durch Detektion viraler Antigene hat sich als ungeeignet erwiesen. Nach Integration der viralen DNA werden nur noch die onkogenen Proteine E6 und E7 in relativ geringer Menge produziert. Darauf beruht die relativ niedrige Sensitivität des Antigennachweises mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern.

Der Nachweis von HPV-spezifischen Antikörpern als routine-diagnostisches Verfahren ist wenig aussagekräftig. Die Virusreplikation läuft in den äußeren Epithelzellen ab, die dem Immunsystem kaum zugänglich sind. Eine Antikörperproduktion findet nur statt, wenn HPV-Proteine von dendritischen Zellen aufgenommen und in die regionalen Lymphknoten transportiert werden. Des-

halb bleibt eine ausreichend nachweisbare Bildung von Antikörpern häufig aus. Zudem können nachgewiesene Antikörper auch aus früheren Infektionen resultieren.

In der Diagnostik von HPV-Infektionen hat der Virus-DNA-Nachweis die größte Bedeutung. Die Sensitivität variiert zwischen ca. 10 HPV-Kopien für die Polymerasekettenreaktion und ca. 10.000 HPV-Kopien für die konventionellen Hybridisierungstechniken wie Southern blot, dot blot, sandwich und in situ Hybridisierung (ISH) (59, 60).

Die einzelnen Verfahren sind in ihrer Sensitivität, Spezifität und im Arbeitsaufwand sehr unterschiedlich. Vor- und Nachteile lassen sich für jedes Verfahren aufzeigen :

1.4.1. HPV-DNA-Nachweis durch Hybridisierungsmethoden

Bei der Hybridisierung ist die Spezifität und Sensitivität des Nachweises stark von der Temperatur und der Salzkonzentration abhängig. Bei hohen Temperaturen und niedrigen Salzkonzentrationen werden spezifische Ergebnisse gewonnen, allerdings mit relativ niedriger Sensitivität. Bei Hybridisierungen unter niedrig-stringenten Bedingungen wird die Sensitivität zwar erhöht, dies führt aber zu einem häufigen Auftreten unspezifischer Hybridisierungssignale.

Nachteil der Hybridisierung ist die Notwendigkeit des Einsatzes vieler typspezifischer Sonden, um das gesamte HPV-Spektrum zu erfassen. Hieraus ergeben sich hohe Kosten und ein intensiver Arbeitsaufwand.

Eine spezielle Methode der Hybridisierung stellt die in situ Hybridisierung (ISH) dar. Ihr großer Vorteil besteht darin, daß HPV-DNA oder HPV-RNS topographisch in spezifischen Zell- oder Gewebsregionen nachweisbar ist. Die Sensitivität ist vergleichsweise gering. Mit ISH kann eine virale Infektion nur dann erkannt werden, wenn die Nachweisgrenze von 1000-10.000 HPV-Genomkopien

je Zelle nicht unterschritten wird. Dies ist insbesondere für sog. „high grade lesions“ (schwere epitheliale Dysplasie und Carcinoma in situ, entsprechend CIN 3 bzw. VIN 3) bedeutsam, bei denen die Anzahl der HPV-Genomkopien zumeist niedrig ist (61).

Zur Zeit wird bei epidemiologischen und diagnostischen Studien die PCR als Technik der Wahl eingesetzt. Mit degenerierten sog. „broad range“-Primern kann eine große Anzahl verschiedener HPV-Typen amplifiziert werden (62, 63). Viele Studien haben bewiesen, daß die PCR ein spezifisches Verfahren zum hochsensitiven Nachweis von HPV-Infektionen ist. In 72 – 91 % der low grade-Läsionen, 90 – 100 % der high grade-Läsionen (64, 65, 66) und in 84 – 100 % der invasiven Tumoren (66 - 70) konnte HPV-DNA nachgewiesen werden.

Die HPV-Typisierung mittels PCR-Analyse kann durch die Verwendung typspezifischer Primer erfolgen (71). Aufgrund der Vielzahl verschiedener HPV-Typen und der entsprechend erforderlichen hohen Anzahl an typspezifischen Primerpaaren und Reaktionsbedingungen ist dieses Verfahren jedoch für die Routinediagnostik zu aufwendig.

Mit degenerierten Konsensus-Primerpaaren, wie z.B. MY09/MY11 (72, 73) können alle derzeit bekannten genitalen HPV-Typen (36) amplifiziert werden. Mit diesen Primern wird eine 448-454 bp lange Region aus dem konservierten Bereich des L1-Gens amplifiziert. Ein weiteres häufig verwendetes Konsensus-Primer-Paar aus der L1-Region (GP5+/Gp6+) wurde von der Arbeitsgruppe de Roda Husmann (74) entwickelt.

Die internen Bereiche der PCR-Produkte weisen typspezifische Sequenzvariationen auf, die eine nachfolgende HPV-Typisierung ermöglichen. Prinzipiell läßt sich der HPV-Typ durch Sequenzanalyse (75), Hybridisierung mit typspezifischen Sonden (73) oder RFLP - (Restriktionsenzym-fragment-Längenpolymorphismus) - Analyse identifizieren (73, 75, 76).

Die Sequenzierung wird als optimale und exakteste Methode angesehen, obwohl sie in Routinediagnostik-Laboratorien kaum durchführbar ist. Sie wird vornehmlich zur Identifikation bislang nicht bekannter HPV-Typen bzw. -Varianten verwendet. Die Sequenzierung ist bei Infektionen mit zwei oder mehr HPV-Typen wegen sich überlagernder Sequenzen ohne vorangehende Klonierung der einzelnen PCR-Produkte nicht möglich.

Die Identifikation des HPV-Typs durch Hybridisierung der PCR-Produkte mit typspezifischen Oligonukleotiden (73) erfordert eine umfangreiche Palette entsprechender Sonden und Hybridisierungsbedingungen, da potentiell ca. 45 verschiedene Typen in Betracht kommen.

Dagegen stellt die RFLP-Analyse der PCR-Produkte eine weniger aufwendige Alternative dar. Jedoch ist eine ausreichende Menge sauberer PCR-Produkte Voraussetzung für das Gelingen der RFLP-Analyse. Anderenfalls kann es zu nicht interpretierbaren Bandenmustern kommen.

Durch nachfolgende Hybridisierung der RFLP-Produkte mit einer generischen Oligonukleotidsonde ist dagegen auch in Anwesenheit unspezifischer PCR-Produkte eine eindeutige Typzuordnung möglich (77). Unter Verwendung von fünf bis sechs ausgewählten Restriktionsenzymen kann jeder der ca. 45 Typen identifiziert werden, da nur ein Restriktionsfragment in jedem Ansatz hybridisiert. Auch die in einer Doppelinfection vorliegenden HPV-Typen können durch das Auftreten von zwei Banden in einzelnen Restriktionsansätzen sicher identifiziert werden. Insbesondere mittels nested-PCR, zwei hintereinander geschalteter PCR-Reaktionen, wird ein Maximum an Sensitivität erreicht. Mit Hilfe einer zweiten Primerkombination, deren Bindungsstelle innerhalb des PCR-Produktes liegt, kann die Nachweisgrenze auf prinzipiell ein Virusgenom gesenkt werden.

1.5. Zielsetzung der Dissertation

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit einer Konsensus-nested-PCR HPV-Infektionen in histologisch verdächtigem Material nachzuweisen. Mit einem Typisierungsverfahren, das alle bekannten genitalen HPV-Typen erfasst, sollte insbesondere die Assoziation seltener/neuer HPV-Typen mit dysplastischen und neoplastischen Läsionen untersucht werden, um Aussagen bezüglich der Pathogenität bzw. Onkogenität dieser noch weitgehend unbekannt Typen zu machen.

Zusätzlich sollten Verlaufsbeobachtungen Auskunft über die Persistenz bestimmter HPV-Typen und über die Progression dysplastischer Läsionen in Abhängigkeit vom HPV-Typen geben.

2. Material und Methoden

2.1. Patientinnen und Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial stammte aus dem Paraffinarchiv der Praxis für Pathologie Dr. Beckmann, Prof. Schröder und Kollegen, Lademannbogen 61/63 in 22339 Hamburg. Für diese Studie wurde zurückgegriffen auf Archivmaterial des Zeitraums 1994 und 1995.

Analysiert wurden insgesamt 140 Gewebeproben aus dem Portio- und Vulvabereich von 128 Patientinnen im Alter zwischen 17 und 84 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 35,4 Jahren und einem Median von 32 Jahren. Bei 10 Patientinnen lagen zwei, bei einer Patientin drei Gewebeproben vor.

Eingeschlossen in diese Untersuchung wurden zervikale und vulväre Gewebeproben mit den mikroskopischen Befunden

- ◆ Dysplasie,
- ◆ Plattenepithelkarzinom oder
- ◆ Leukoplakie,

wobei in allen Fällen die Originaldiagnosen nochmals histologisch überprüft wurden.

Für die histologische Dignitätsbeurteilung genitaler dysplastischer Läsionen wurde die Klassifikation der WHO (78, 79) verwendet. Danach werden präkanzeröse Läsionen des weiblichen Genitalepithels in die drei Kategorien

- ◆ leichte Dysplasie,
- ◆ mittelgradige Dysplasie bzw.
- ◆ schwere Dysplasie und Carcinoma in situ

eingeteilt. Für die Zervix und die Vulva erfolgt gemäß dieser dreistufigen Kategorisierung eine Klassifikation der Veränderungen als CIN (zervikale intraepitheliale Neoplasie) bzw. VIN (vulväre intraepitheliale Neoplasie) 1, 2 oder 3.

Entsprechend der Einteilung dysplastischer Läsionen nach dem Bethesda-System (80) werden CIN 1-Läsionen als low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) bezeichnet. CIN 2- und CIN 3-Läsionen werden als high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) zusammengefaßt.

2.2. Methodik

2.2.1. Mikrotom

Vom formalinfixierten paraffineingebetteten Material wurden am Mikrotom jeweils drei bis fünf 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Aus der hohen Sensitivität der nested-PCR ergibt sich das Risiko falsch-positiver Ergebnisse durch kontaminierende virale DNA. Eine große Gefahr für die Übertragung viraler DNA (Carry-Over-Kontamination) besteht vor allem bei der Herstellung von Gewebeschnitten am Mikrotom. Das Gewebematerial wurde daher mit Hilfe aufwendiger Vorsichtsmaßnahmen geschnitten:

- ◆ Reinigung des gesamten Mikrotoms mit Deparaffinierungsmittel
- ◆ Reinigung mit absolutem Äthanol und Xylol
- ◆ Behandlung des Block- und Klingenhalters mit RNase Away (nukleolytische Substanz von Molecular Bio-Products, San Diego USA)
- ◆ jeweils Verwendung einer neuen sterilen Klinge
- ◆ jeweils Verwendung einer PVC-Folie. In diese wurde der Klingenhalter verpackt, um eine Kontaminierung durch anhaftendes Gewebematerial zu verhindern (siehe Abb. 1 im Anhang unter 7.1.7.).

2.2.2. Extraktion von DNA aus dem Portiogewebe

Die gewonnenen Schnitte wurden für 30 min bei 56°C in Xylol deparaffiniert. Nach Zentrifugation bei 15.000 rpm wurde das Xylol entfernt und der gesamte Vorgang wiederholt. Das Gewebe wurde nachfolgend mit absolutem Äthanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 15.000 rpm, wurde das Äthanol abgezogen und die Prozedur wiederholt, um alle Xylolreste vollständig zu entfernen.

Es folgte eine Trocknung des Gewebes für 20 min bei 56 °C. Anschließend wurde eine Resuspendierung und nachfolgende Lyse des Gewebes mit 150 µl Proteinase K-Lösung und 350 µl SDS-Lösung über Nacht bei 56°C vorgenommen. Nach leichter Abkühlung der Proben wurden diese mit 500 µl PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol)-Mix, im Verhältnis 25:24:1, versetzt, vermischt und für 3 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase wurde erneut mit dem PCI-Mix versetzt, um eine exakte Trennung der DNA von Proteinen und Zelltrümmern zu gewährleisten.

Der extrahierten DNA wurde nun 1/50 vol.% 5 molarer NaCl und 2 vol.% absoluten Äthanol hinzugefügt. Die Fällung der DNA geschah über Nacht bei -20°C. 12 bis 24 Stunden später wurden die Proben für 30 min bei 4°C und 15.000 rpm zentrifugiert. Nach Abzug des Äthanol wurde die DNA mit 70%igem Äthanol gewaschen und für 15 min bei 15.000 rpm zentrifugiert, um verbliebene Salze zu entfernen. Das Pellet wurde bei 56°C im Thermoblock getrocknet. Falls eine weitere Verarbeitung im Anschluß nicht sofort möglich war, konnte die getrocknete DNA bei -20°C gelagert werden.

2.2.3. Standard-PCR

Die getrocknete DNA wurde in 20 µl Aqua dest. für 5 min im Thermomixer bei 56°C gelöst. Die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wurde in 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Die Reagentien wurden als Mastermix angesetzt

und gut durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Jeweils 47 µl wurden in die PCR-Tubes überführt, außerdem 3 µl gelöster DNA und zwei Tropfen Paraffinöl, um eine Kondensation während der Denaturierungsphasen zu verhindern.

Pro Probe wurden 5 µl 10xPCR-Puffer (siehe unter 7.1.6), 1 µl 5'-Primer My 09 (1 µM), 1 µl 3'-Primer MY 11 (1 µM), 8 µl dNTP-Mix Konz (0,2 mM), 31,8 µl Aqua dest. und 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) pipettiert. Nach Ansatz der Proben im Eiswasserbad wurden diese sofort in den Thermocycler überführt.

Es wurden 40 der folgenden Reaktionsschritte durchgeführt :

- 1.) Denaturierung: 1 min bei 94°C
- 2.) Annealing: 1 min bei 55°C
- 3.) Synthese: 1 min bei 72°C

Die verwendeten Primer MY 09 und MY 11 (siehe unter 7.1.5. Tab. 11) haben jeweils eine Länge von 20 Nukleotiden und sind aus den konservierten Regionen des HPV-L1-Genes abgeleitet. Mit den Primern wird ein ca. 450 bp großes Fragment amplifiziert (73).

2.2.4. nested-PCR

Für die nested-PCR werden 3 µl Amplifikationsprodukt aus der Standard-PCR, in einen neuen Ansatz pipettiert. Die Zusammensetzung der Reagenzien änderte sich bis auf den Austausch der Primer nicht. Anstelle der Primer My 9 und My 11 werden die Primer MKP 9 und MKP 10 ebenfalls in einer Konzentration von jeweils 1 µM eingesetzt. Mit den Primern MKP 9 und MKP 10 wird ein ca. 370 bp großes PCR-Produkt amplifiziert.

Es wurden 25 der folgenden Reaktionsschritte durchgeführt :

- 1.) Denaturierung: 1 min bei 94°C
- 2.) Annealing: 1 min bei 50°C
- 3.) Synthese: 1 min bei 72°C

2.2.5. β -Globin Nachweis

Durch Fixierung des Gewebes in Formalin und Xylol kann es zu einer Destruktion bzw. Fragmentation der viralen DNA kommen. Das zur Einbettung der Proben verwendete Paraffin enthält möglicherweise inhibitorische Substanzen oder erhöht deren Aktivität. Daher wurde zum Ausschluß von Inhibitoren bzw. zur Überprüfung der Integrität der extrahierten DNA in den Geweben bei allen Proben der β -Globin-DNA Nachweis mittels PCR mit den Primern IR 01 und IR 02 (jeweils 1 μ M/ml) durchgeführt.

2.2.6. Maßnahmen zur Vermeidung von Kontamination

Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR-Technik besteht ein erhöhtes Risiko für falsch-positive Ergebnisse durch kontaminierende virale DNA. Zur Vermeidung der Übertragung von HPV-DNA aus positivem Gewebematerial und HPV-spezifischen PCR-Produkten auf andere Proben wurden folgende Sicherheitsvorkehrungen getroffen:

- ◆ strikte räumliche und apparative Trennung der Untersuchungsschritte vor und nach Amplifikation
- ◆ separater Raum für die Mastermixherstellung und Verteilung auf die PCR-Gefäße
- ◆ Trennung der Laborkittel in diesen Bereichen
- ◆ regelmäßiger Handschuhwechsel
- ◆ Verwendung gestopfter, steriler Einwegpipettenspitzen

- ◆ Zentrifugation der Reaktionsgefäße vor jedem Öffnen, um einer Aerosolbildung entgegenzuwirken.
- ◆ Mitführen von Negativkontrollen (Aqua dest., Rinderleber, reines Paraffin) während aller Untersuchungsschritte.

2.2.7. Analyse der PCR-Produkte

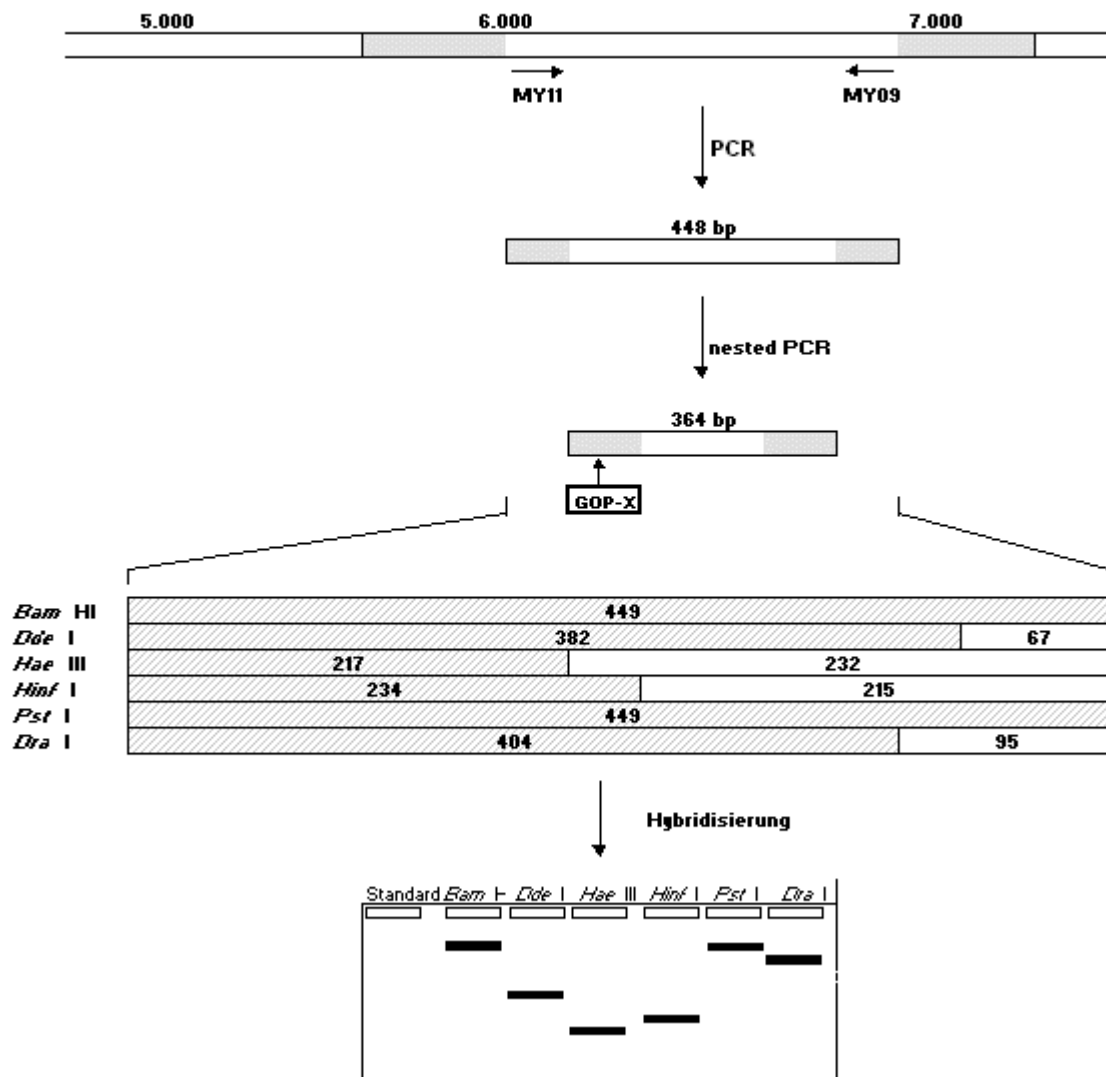
Von den Amplifikaten wurden jeweils 10 µl mit 3 µl Probenpuffer vermischt und in einem 8%igen Polyacrylamidgel (BioRad, München) analysiert. Die Auftrennung erfolgte durch Elektrophorese bei 110 Volt über 50 min. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und im UV-Licht (254 nm) visualisiert und fotografiert. HPV-positive Proben sind durch eine fluoreszierende Bande bei 450 bp bzw. 370 bp charakterisiert. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde GOPX überprüft (siehe unter 7.1.5. Tab. 11).

2.2.8. HPV-Typisierung

Die HPV-Typisierung bei positivem PCR-Ergebnis erfolgte durch RFLP-Analyse und Hybridisierung mit einer genusspezifischen Oligonukleotidsonde nach Meyer et al. 1995 (77). Die Vorgehensweise ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

Zunächst wurde die amplifizierte DNA mit 150 µl absolutem Äthanol über Nacht gefällt. Später wurden die Proben für 15 min bei 4°C und 15.000 rpm zentrifugiert. Dann erfolgte ein Waschschrift mit 75%igem Äthanol und nachfolgende Zentrifugation für weitere 10 min. Nach Abzug des Äthanol blieb ein gereinigtes DNA-Pellet zurück, welches für 10 min im Thermocycler getrocknet wurde.

HPV 6 L1 open reading frame (nt. 5678 - 7291)



2.2.8.1 Restriktion

Das Pellet wurde in 55 µl Aqua dest. gelöst. Die über mindestens 4 Stunden stattfindende Restriktion erfolgte bei 37°C im Inkubationsofen. Es wurden jeweils 1-5 µl DNA (ca. 0,5 µg PCR-Produkt), 4 µl Puffer, 2 µl Restriktionsenzym (10 U/µl) pro Probe eingesetzt und mit Aqua dest. bis auf ein Reaktionsvolumen von 36 µl aufgefüllt. Die folgenden Enzyme wurden verwendet: *Bam HI*, *HaeIII*, *Hinfl*, *EcoRI*, *PstI*, *DdeI* und in besonderen Fällen auch *DraI*.

Anschließend wurden die Restriktionsfragmente gelelektrophoretisch analysiert. Um die das Laufverhalten der Restriktionsfragmente beeinträchtigenden Salze aus den Proben zu eliminieren, wurde die DNA durch Zugabe von 100 µl absolutem Äthanol für 2 Stunden bei -20°C erneut gefällt. Nach 10 minütiger Zentrifugation, 15.000 rpm, folgte ein Waschschrift mit 75%igem Äthanol. Das Äthanol wurde abgesogen und das Pellet für 10 min im Thermocycler bei 56°C getrocknet und sofort wieder in 10 ml Aqua dest. gelöst. Die Gelelektrophorese erfolgte wie unter Punkt 2.2.7. angegeben.

2.2.8.2. Southern-Blot

Die DNA aus den Polyacrylamidgelen wurde durch Elektroblob (BioRad, München) bei 22 V für 2 Stunden auf eine Nylonmembran (Zetamembran) transferiert. Als Transferpuffer wurde ein 0,5M TBE-Puffer verwendet. Zur Denaturierung der DNA lagen die Membranen anschließend für 20 min auf einem mit Natronlauge getränkten Filterpapier. Die Fixierung der transferierten DNA fand bei 80°C in 30 min im Ofen mit Ventilatoreinschaltung statt. Die getrockneten Membranen sind wochenlang lagerfähig.

2.2.8.3. Prähybridisierung

Die Membran wurde mit 6 ml Prähybridisierungslösung luftblasenfrei in einen Plastikbeutel gegeben und anschließend verschweißt. In einem 250 ml Eiswasserbad wurden die eingeschweißten Membranen 2x für 72 sec auf höchster Stufe in der Mikrowelle erhitzt. Danach hatte das Wasser eine Temperatur von ca. 40°C. Die Prähybridisierung ist relevant für die Blockierung der positiven Ladungen der beschichteten Membran, damit bei der Hybridisierung die negativ geladene Sonde nicht unspezifisch an die Membran bindet.

2.2.8.4. Hybridisierung

Die Membran wurde zusammen mit jeweils 4 ml Prähybridisierungslösung und 10 µl der Sonde *GOPX* (siehe unter 7.1.5. Tab. 11) in einem neuen Plastikbeutel bei 37°C für mindestens 4 Stunden im bewegten Wasserbad inkubiert.

2.2.8.5. Waschschritte

Es folgte eine Reihe von verschiedenen Waschschritten, für jeweils 5 min auf dem Schüttler:

- ◆ 5 x SSC/0,2 % SDS bei Raumtemperatur
- ◆ 1 x SSC/0,2 % SDS bei Raumtemperatur
- ◆ 0,1 x SSC/0,2 % SDS bei Raumtemperatur
- ◆ 0,1 x SSC/0,2 % SDS bei 40°C im Wasserbad inkubieren
(1 x SSC = 15 mM TriNa-Citrat + 150 mM NaCl)

2.2.8.6. Detektion

Die Membranen wurden für 30 min in Prähybridisierungslösung auf dem Schüttler inkubiert und anschließend kurz mit Pufferlösung 1 gespült. Danach wurde die Membran in einen Plastikbeutel mit 5 ml Pufferlösung 1 und 5 µl Streptavidin und für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe für jeweils 5 min bei Raumtemperatur: 2x mit Pufferlösung 1 und 1x mit Pufferlösung 3 (Zusammensetzung siehe unter Punkt 7.1.6.).

Die Detektion gebundener Oligonukleotide erfolgt durch Inkubation der Membran mit frisch angesetzter Färbelösung (5 ml Pufferlösung 3, 33 µl Nitroblau-Tetrazolium und Indolylphosphat). Nach etwa 5-10 min stellen sich Hybridisierungssignale als lila-blaue Banden dar. Zuletzt wurden die Membranen mit Wasser abgospült. Die Abstopfung der Färbereaktion erfolgte mit 0,5 M EDTA, welches die für die Färberaktion notwendigen Magnesiumionen komplexiert. Die Membranen wurden erneut mit Wasser abgospült, getrocknet und gesammelt.

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich von Standard- und nested-PCR im Rahmen der Analyse frischer und archivierter Proben

Zur Charakterisierung der Sensitivität des HPV-DNA-Nachweises durch Standard-PCR und nested-PCR wurden formalinfixierte paraffineingebettete Gewebe sowie zusätzlich 10 nativ eingesandte Portiobiopsieproben untersucht. Bei den untersuchten Proben handelte es sich um CIN 2/CIN 3-Läsionen. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammenfassend dargestellt.

Als Verfahren mit höchster Sensitivität erwies sich die nested-PCR-Analyse, unabhängig davon, ob frisches oder formalinfixiertes paraffineingebettetes Gewebe untersucht wurde. Mit der Standard-PCR ergab sich insbesondere bei den archivierten Proben eine deutlich niedrigere Sensitivität.

Die 140 formalinfixierten paraffineingebetteten Portioproben wurden aufgrund der höheren Sensitivität mit der nested-PCR untersucht.

Tab. 1: Vergleich von Standard- und nested-PCR

Anzahl	Zustand	----- HPV-positiv -----		
		Standard PCR	nested PCR	β-Globin positiv
10	frisch	7	9	9
10	paraffiniert	3	8	8

3.2. Vermeidung von Kontamination

Aufgrund der hohen Sensitivität der nested-PCR weist dieses Nachweisverfahren eine relativ große Anfälligkeit für Kontaminationen auf. Daraus können falsch-positive Ergebnisse resultieren.

Wir vermuteten, daß die größte Gefahr für eine Kontamination HPV-negativer Proben durch verschlepptes HPV-positives Material während des Schneidevorgangs am Mikrotom liegen würde. Deshalb wurden im Vorfeld der eigentlichen Untersuchung mehrere Reihen paraffinfixierten HPV-positiven Portiogewebes und HPV-negativen Materials (paraffiniertes Schilddrüsengewebe und Rinderleber) abwechselnd am Mikrotom geschnitten und untersucht. Die Schilddrüse und Leber sind bisher nicht als HPV-Zielorgane bekannt.

Unter Anwendung verschiedener Schneidemethoden wurden jeweils 10 bis 30 Proben geschnitten und mit nested-PCR untersucht. Insgesamt umfaßte die Voruntersuchung eine Stichprobengröße von 109 paraffinierten HPV-negativen Gewebeproben. Unabhängig von der Schneidetechnik wurde in jedem Fall eine Äthanol- und Xylolbehandlung durchgeführt.

Die erzielten Ergebnisse unter Verwendung von selbstklebender Folie, Tesafilm, einfachem Klingenswechsel und die Kombination dieser Methoden zeigten eine fast ebenso hohe Kontaminationsrate wie bei dem Schneiden der Proben ohne jegliche Prophylaxe. Bei über 50 % der Proben lagen am Ende der PCR-Untersuchung falsch-positive Ergebnisse vor (siehe Tab. 2). Höchstwahrscheinlich kam es bei der Gewebeschnittpräparation bzw. der DNA-Extraktion zur Übertragung von DNA, da Kontrollansätze, die anstelle extrahierter DNA nur Wasser enthielten, stets negativ waren.

Die Desinfektion von Schlitten und Klingenthaler in Natriumhypochlorid-Lösung erwies sich dagegen als zuverlässige Kontaminationsprophylaxe; alle Proben waren kontaminationsfrei (siehe Tab. 2). Aufgrund starker Korrosion des Mi-

krotom-Schlittens war diese Methode allerdings nicht anwendbar. Eine weitere ebenso wirksame Methode zur Vermeidung von Kontamination war die Verwendung von Einmalskalpellen. Die Gewinnung von ausreichenden, aber nicht übermäßigen Gewebemengen war jedoch schwierig durchzuführen, ohne die Blöcke zu zerstören. Die Methode erwies sich somit als umständlich.

Als wesentlich praktischer stellte sich der Einsatz einer PVC-Folie heraus, die zwischen Schlitten und steriler Klinge gespannt wurde und den gesamten Schlitten umfaßte. 23 untersuchte Schilddrüsenschnitte erwiesen sich als eindeutig HPV-negativ. Durch Abdeckung des unsterilen Klingenhalters mit dieser Folie konnte das Kontaminationsrisiko minimiert werden. Zusätzlich wurde in weiteren Versuchen eine nukleinsäurespaltende Substanz, „RNAse Away“ (Molecular Bio-Products, San Diego), eingesetzt.

Tab. 2: Ergebnisse der Voruntersuchung zur Verhinderung von Kontamination am Mikrotom (n = 109)

Prophylaxe	Anzahl	kontaminierte Proben ²
keine	5	4 (80%)
Klingenwechsel/Folie ¹	67	30 (45%)
Desinfektion mit Extran und NaClO ³	5	0
Einmalskalpelle	9	0
PVC-Folie	23	0

¹ zusammengefaßte Darstellung prozentual sehr ähnlicher Ergebnisse bei selbstklebender Folie, Tesafilm, einfachem Klingenwechsel und Kombination dieser Methoden.

² Rinderleber und Schilddrüsengewebe mit falsch-positiver PCR

³ Korrosion !

3.3. Spektrum der mit der nested-PCR erfaßten HPV-Typen

Zur Ermittlung des Spektrums der mit den Primern MKP9 und MKP10 in der nested-PCR amplifizierbaren HPV-Typen wurden rekombinante DNA und DNA-Extraktionen aus klinischem Material analysiert. Die Standard- und nested-PCR-Primerpaare wurden separat und kombiniert untersucht. Außerdem wurde für alle HPV-Typen anhand des Sequenzvergleiches die Homologie zu den beiden nested-Primern ermittelt. Im L1-Gen des Virusgenoms wurden die den Primerbindungsstellen entsprechenden Basensequenzen aufgesucht. Diese Sequenz umfaßt jeweils 20 Basenpaare in 5´-3´Richtung und in 3´-5´Richtung.

Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Die HPV-Typen 13, 32, 39, 42, 51 und 54 wurden mit den nested-Primern MKP9 und MKP11 nicht nachgewiesen. In diesen Fällen lag die Sequenzhomologie zumindestens eines der beiden Primer bei 85% oder darunter.

Für die genitalen HPV-Typen 26, 30, 43, 44, 55, 59, 67, 69, 72, IS 39, Lux 100 und CP 8061 lagen keine Referenzproben vor. Aufgrund der Homologie von weniger als 90 % zu mindestens einem der beiden Primer werden die HPV-Typen 26, 43, 44, 55, 59, IS 39 und CP 8061 vermutlich nicht erfaßt.

Aus den Vergleichen ergab sich, daß die nested-PCR mit den Primern MKP9 und MKP10 etwa 31 von 44 genitalen Typen (70 %) erfaßt. Darin enthalten sind alle relativ häufig vorkommenden HPV-Typen.

Mit den Primern MY9 und MY11 lassen sich alle untersuchten genitalen HPV-Typen nachweisen (75). Jedoch ist die Sensitivität geringer.

Tab. 3: Spektrum der mit den Primern MY9/11 und MKP 9/10 nachweisbaren HPV-Typen

HPV-Typ	MY 9/11 Std PCR	MKP 9/10 Std PCR	MY 9/11 + MKP 9/10 n PCR	Homologie MKP 9	Homologie MKP 10
6	+	+	+	100 %	100 %
11	+	+	+	100 %	95 %
13	+	-	-	95 %	95 %
16	+	+	+	100 %	90 %
18	+	+	+	100 %	95 %
26	nd	nd	nd	85 %	95 %
30	nd	nd	nd	95 %	90 %
31	+	+	+	100 %	100 %
32	+	-	-	85 %	80 %
33	+	+	+	100 %	90 %
34	+	+	+	90 %	85 %
35	+	+	+	90 %	100 %
39	+	-	-	85 %	90 %
40	+	+	+	95 %	95 %
42	+	-	-	90 %	80 %
43	nd	nd	nd	95 %	80 %
44	nd	nd	nd	100 %	85 %
45	+	+	+	90 %	90 %
51	+	-	-	80 %	100 %
52	+	+	+	85 %	95 %
53	+	+	+	90 %	80 %
54	+	-	-	85 %	85 %
55	nd	nd	nd	100 %	85 %
56	+	+	+	95 %	90 %
57	+	+	+	80 %	80 %
58	+	+	+	95 %	95 %
59	nd	nd	nd	85 %	80 %
61	+	+	+	85 %	85 %

HPV-Typ	MY 9/11 Std PCR	MKP 9/10 Std PCR	MY 9/11 + MKP 9/10 n PCR	Homologie MKP 9	Homologie MKP 10
62	+	+	+	95 %	85 %
64	+	+	+	85 %	70 %
66 PAP 88	+	+	+	95 %	85 %
MM4, PAP W 13B	+	+	+	85 %	85 %
MM7, PAP 291, LVX82	+	+	+	95 %	100 %
MM8, PAP 155	+	+	+	85 %	95 %
73, MM9, PAP 238a	+	+	+	90 %	90 %
IS39, AE 2	nd	nd	nd	85 %	70 %
LVX 100, CD 4173, HPV 72	nd	nd	nd	90 %	90 %
70, AE1, CD 141, LVX 160	+	+	+	90 %	100 %
CP 8304	+	+	+	95 %	80 %
CP 6108	+	+	+	100 %	90 %
CP 8061	nd	nd	nd	75 %	95 %

nd = HPV-Typ ohne Referenzprobe

- Standard-PCR (Std PCR) MY9/11, wenn 450 bp Produkt nachweisbar
- Standard-PCR (Std PCR) MKP9/10, wenn 370 bp Produkt nachweisbar
- nested PCR (n PCR) MY 9/11 + MKP9/10, wenn 370 bp Produkt nachweisbar

Die Auflistung der Ergebnisse aller Einzelanalysen in der untersuchten Originalreihenfolge befinden sich im Anhang.

3.4. Häufigkeitsverteilung der einzelnen Diagnosegruppen

Mit knapp 60 % bzw. 80 Fällen stellten CIN 3 die am häufigsten untersuchte Gewebsläsion dar. Weniger häufig standen CIN 2 (14 %) und CIN 1 (5 %) für die Analyse zur Verfügung.

Aus allen anderen Gruppen wurden sämtliche im oben genannten Zeitraum diagnostizierte Läsionen untersucht, wobei nur fünf VIN 2, sieben VIN 3, acht Zervixkarzinome (CCA), zwei Vaginalkarzinome (VCA) und neun Leukoplakien zur Verfügung standen. Weiterhin wurden zwei unauffällige Portiogewebeproben untersucht.

Tab. 4: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Diagnosegruppen
(n = 140)

	Befund								
	CIN 1	CIN 2	CIN 3	VIN 2	VIN 3	CCA	VCA	Leuko- plakie	unauffällig
Anzahl der Proben	7	20	80	5	7	8	2	9	2
in % ¹	5	14	57	4	5	6	1	6	1

¹ Prozentangaben wurden in dieser und in allen nachfolgenden Tabellen auf- bzw. abgerundet

3.5. Altersverteilung der pathologischen Befunde

Mit zunehmendem Alter der Patientinnen nahm die Häufigkeit invasiver Karzinome zu. In der Gruppe zwischen 17 und 31 Jahren lag dieser Anteil bei ca. 2 %, zwischen 31 und 40 Jahren bei 4 %, zwischen 41 und 50 Jahren bei 16 % und in der Gruppe der über 50 Jährigen lag dieser Anteil schon bei ca. 30 %. Der Anteil an leichten und mittelgradigen Dysplasien war dafür in dieser Gruppe sehr gering, aber in der Gruppe der jüngsten Patientinnen besonders hoch. Schwere Dysplasien waren bei den Patientinnen bis 40 Jahren am häufigsten und nahmen dann in der Gruppe der älteren Patientinnen ab.

Tab. 5: Histologische Diagnosen in Abhängigkeit vom Alter der Patientinnen
(n = 138)

Alter in Jahren	Befund								gesamt
	CIN 1	CIN 2	CIN 3	VIN 2	VIN 3	CCA	VCA	Leuko	
< 31	6	11	38		1	1		3	60
31 – 40	1	4	31	2	1	2		4	45
41 – 50		4	9		2	3		1	19
> 50		1	2	3	3	2	2	1	14
gesamt	7	20	80	5	7	8	2	9	138

3.6. Nachweis von HPV

In 104 der 140 untersuchten Gewebeproben konnte HPV nachgewiesen werden. In 5 Proben war eine Amplifikation vermutlich aufgrund inhibitorischer Substanzen oder zerstörter DNA nicht möglich, da der β -Globin-DNA-Nachweis hier negativ verlief. In 11 Fällen lagen Infektionen mit mehr als einem HPV-Typ vor (10 Doppel- und eine Dreifach-Infektion). Das Spektrum der nachgewiesenen HPV-Typen ist in Tab. 6 dargestellt. In 3 der 104 HPV-positiven Proben war die Menge des PCR-

Produkts zu gering für eine nachfolgende Identifizierung des zugrundeliegenden HPV-Typs. Bei einer Probe konnte der HPV-Typ anhand des Restriktionsmusters nicht identifiziert werden. Das PCR-Produkt aus dieser Probe wurde durch DNA-Sequenzanalyse weiter analysiert. Die ermittelte Nukleinsäuresequenz war zu 98 % mit HPV-Typ 64 homolog (81). Es handelt sich vermutlich um eine HPV-Typ 64 Variante.

Tab. 6: Spektrum der nachgewiesenen HPV-Typen

HPV-Typ	Einzel-Infektion	Mehrfach-Infektion	Summe
6	8	2	10
11	-	1	1
16	53	9	62
18	8	2	10
31	5	3	8
33	8	2	10
35	3	3	6
53	1	-	1
58	1	-	1
64	1	-	1
66	-	1	1
73	1	-	1
MM7	1	-	1
n.i. ¹	3	-	3

¹ PCR-Produkt reichte nicht für eine eindeutige Typ-Identifizierung aus

3.7. Prävalenz der HPV-Infektion bei unterschiedlichen histologischen Befunden

Zur Bestimmung der Prävalenz der HPV-Infektionen bei unterschiedlichen histologischen Befunden wurden alle 135 β -Globin-DNA-positiven Proben herangezogen.

Von insgesamt 135 Patientinnen waren 104 Patientinnen HPV-positiv. Dies entspricht einer Prävalenz von 77 %. Die Rate der HPV-Infektionen war beim Zervixkarzinom (CCA) mit 88 % am höchsten, gefolgt von 84 % bei CIN 3-Läsionen. Bei CIN 1- und CIN 2-Läsionen lag nur in ca. 70 % der Fälle eine Infektion mit HPV vor.

Tab. 7: Häufigkeit der HPV-Infektion bei verschiedenen Epithelläsionen
(n = 135)

Histologie	n	HPV-negativ	----- HPV-positiv -----	
			n	%
CIN 1	7	2	5	71 %
CIN 2	20	6	14	70 %
CIN 3	79	13	66	84 %
CCA	8	1	7	88 %
VIN 2	5	1	4	88 %
VIN 3	6	3	3	50 %
VCA	2	1	1	50 %
Leukoplakie	7	3	4	57 %
sonstige	1	1	0	0 %
gesamt	135	31	104	100 %

3.8. Altersspezifische Prävalenz der HPV - Infektion

Alle Patientinnen mit einem positiven oder negativen HPV-DNA-Nachweis wurden entsprechend Tab. 8 in verschiedene Altersgruppen aufgeteilt.

Tab. 8: Prävalenz der HPV-Infektionen in Abhängigkeit zum Alter
(n = 135)

HPV -DNA Nachweis	Alter in Jahren					
	< 21	21 - 30	31 – 40	41 – 50	51 - 60	> 60
positiv	3	48	33	12	2	6
negativ	2	7	11	7	2	2
gesamt	5	55	44	19	4	8

In der Altersgruppe zwischen 21 und 30 Jahren war der Anteil HPV-infizierter Frauen mit 87 % am höchsten. In den Altersklassen darüber war die Prävalenz der HPV-Infektion etwas niedriger. In der noch jüngeren Altersklasse lag dieser Anteil bei 60 %, wobei die Anzahl der Probanden dieser Gruppe im Verhältnis zu den anderen Altersgruppen wesentlich geringer war.

3.9. Häufigkeit einzelner HPV-Typen

Eine HPV-Infektion wiesen 104 von 135 Proben auf, das entspricht einer Rate von 77 % (incl. der Patientinnen mit Mehrfachinfektionen). Es wurden 90 HPV-Infektionen mit solitären HPV-Typen nachgewiesen (siehe Abb. 3). Von diesen nahm HPV 16 mit 53 Fällen (60 %) den größten Anteil ein. HPV 6, 18 und 33 stellten jeweils einen Teil von 8 Fällen (9 %) dar. Es wurden 5 Fälle einer HPV 31-Infektion (6 %) und nur 3 Fälle einer HPV 35-Infektion nachgewiesen (3 %). Unter den „seltenen“ HPV-Typen wurden jeweils einmal HPV 53, 58, 64, 73 und MM7 gefunden. Dieser Anteil macht ca. 4 % aller 135 Proben bzw. 6 % aller HPV-positiven Proben mit einem nachweisbaren HPV-Typ aus.

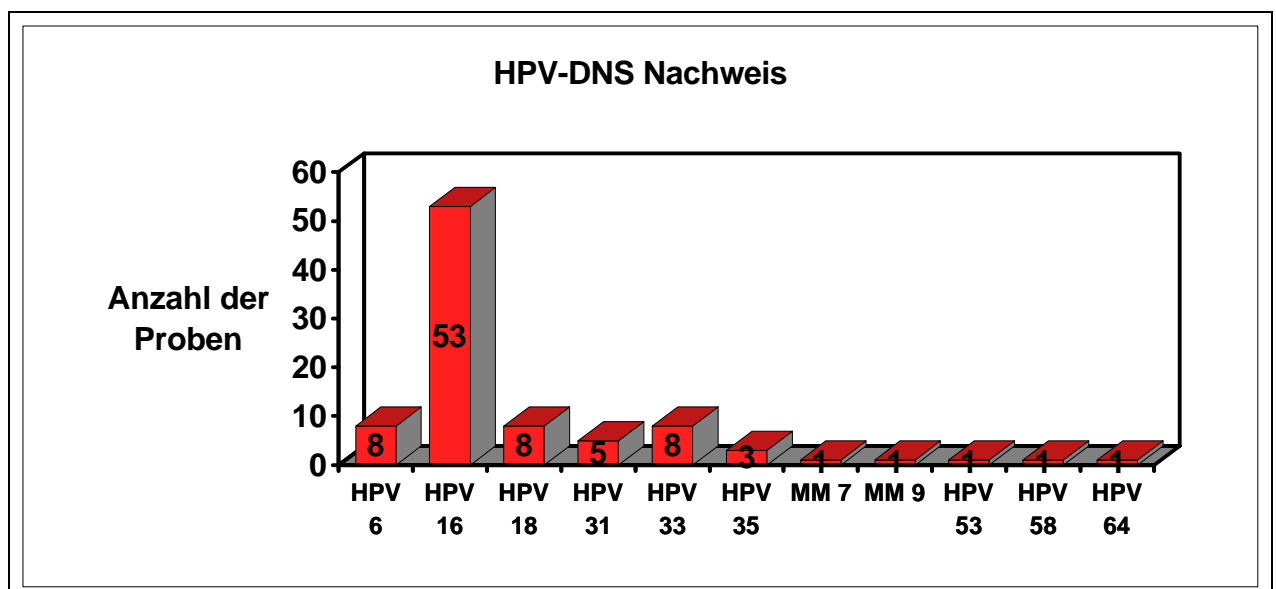


Abb. 3: Häufigkeitsverteilung solitärer HPV-Infektionen

(n = 90)

3.10. Korrelation von HPV-Typ und Läsion

In der Tab. 9 ist die Inzidenz verschiedener HPV-Typen in präkanzerösen Läsionen zusammengefaßt. Bei 10 Patientinnen lag eine Doppelinfection und bei einer Patientin eine Infektion mit 3 HPV-Typen vor. In diesen Fällen war es unklar, ob die entsprechende Läsion durch beide oder nur durch einen der beiden Typen verursacht wurde. Um die Assoziation eines HPV-Typs mit einer bestimmten Läsion besser beurteilen zu können, sind in Tab. 9 nur Infektionen mit einem solitären HPV-Typ berücksichtigt worden.

Tab. 9: Assoziation einzelner HPV-Typen mit bestimmten Epithel-läsionen (n = 121)

Läsion	HPV-Typ											HPV neg.	
	6	16	18	31	33	35	53	58	64	73	MM7		
	7 %	44%	7 %	4 %	7 %	3 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	26 %
CIN 1	2			1								1	2
CIN 2	2	5	2	1	1	1							6
CIN 3	2	39	2	3	5	2	1	1		1			13
CCA		2	3		1								1
VIN 2		2			1								1
VIN 3	1	2							1				3
VCA		1											1
Leuko.	1	2	1										3
insg.	8	53	8	5	8	3	1	1	1	1	1	1	31

In Proben von 130 Patientinnen mit abnormen histologischen Befunden wurde der HPV-Typ 16 am häufigsten nachgewiesen (44 % bei solitären Infektionen, 47 % incl. Mehrfachinfektionen). Mit zunehmendem Schweregrad der Dysplasie wurde ein Anstieg in der Infektionsrate mit HPV 16 registriert. So betrug dieser Anteil bei Patientinnen mit CIN 2 knapp 10 % und bei CIN 3 etwa 74 %. Die

HPV-Typen 16 oder 18 wurden in der Hälfte aller solitären Infektionen nachgewiesen. HPV-Typ 31, 33 oder 35 wurde in 13 % der Proben nachgewiesen. Seltene HPV-Typen (HPV 53, 58, 64, 73 und MM7) waren in 4 % der präkanzerösen Läsionen (CIN 1, CIN 3 und VIN 3) nachweisbar.

3.11. Mehrfachinfektionen

Insgesamt wurden 11 Mehrfachinfektionen gefunden. Es handelte sich um 10 Doppel-Infektionen und um eine Dreifach-Infektion. In der Mehrzahl war HPV 16 beteiligt (82 %). In einer CIN 1 wurde HPV-Typ 66 (High-Risk-Typ) und außerdem Typ 16 nachgewiesen. Die Kombination HPV 16 und 18 kam nur in zwei Fällen vor (18 %). Die HPV-Typen 31, 33 oder 35 kamen in 6 von 8 (75 %) CIN 3 vor. Insgesamt liegt die Prävalenz der Mehrfachinfektionen bei 11 %. Folgende Kombinationen wurden nachgewiesen :

CIN 1 : 16 und 66

CIN 2 : 11 und 16, 6 und 16

CIN 3 : 16 und 18, 16 und 18, 16 und 33, 31 und 35,
6, 16 und 31, 33 und 35, 16 und 35, 16 und 31

3.12. Verlaufsbeobachtungen bei HPV-positiven Dysplasien

Von 7 jüngeren Patientinnen (Alter 21 bis 33 Jahre) lagen mehrere zu unterschiedlichen Zeiten entnommene Proben vor, so daß eine Verlaufsbeobachtung möglich war. Die zweite Biopsie bzw. Konisation erfolgte binnen eines Jahres nach der ersten. Nur für die Patientin Nr. 1 (siehe Tab. 10) lagen drei Proben vor. Bei dieser Patientin mit einer sich nicht verändernden CIN 1 wurde zuerst eine HPV-Typ 6-Infektion nachgewiesen. In der zweiten Entnahme nach einem Jahr war keine HPV-DNA nachweisbar. In der dritten Entnahme lag wiederum HPV-Typ 6 vor. Jeweils eine HPV-positive (HPV-Typ 16 bzw. 31) Probe

und eine HPV-negative Probe bei gleichbleibender CIN 3 wurde bei den Patientinnen Nr. 2 und Nr. 6 gefunden.

Bei Patientin Nr. 3 war zuerst HPV-Typ 6 in einer CIN 2 nachweisbar, zwei Monate später wurde HPV-Typ 16 in einer CIN 3 identifiziert.

Bei den Patientinnen Nr. 4, Nr. 5 und Nr. 7 war in beiden Proben HPV 16, 31 bzw. keine HPV-DNA nachweisbar.

Tab. 10: Verläufe von Patientinnen mit HPV infizierten Dysplasien

Patientin Nr.	Alter (Jahre)	Proben Nr.	Eingang der Probe	Histologie	HPV-Typ
1	21	1.Probe	10.2.1994	CIN 1	HPV 6
		2.Probe	18.1.1995	CIN 1	HPV-negativ
		3.Probe	9.11.1995	CIN 1	HPV 6
2	28	1.Probe	10.6.1994	CIN 3	HPV-negativ
		2.Probe	4.7.1994	CIN 3	HPV 31
3	33	1.Probe	4.8.1994	CIN 2	HPV 6
		2.Probe	28.9.1994	CIN 3	HPV 16
4	29	1.Probe	31.1.1995	CIN 3	HPV 16
		2.Probe	21.11.1995	sonstige ¹	HPV-negativ
5	32	1.Probe	11.5.1995	CIN 3	HPV 16
		2.Probe	27.7.1995	CIN 3	HPV 16
6	25	1.Probe	23.6.1995	CIN 3	HPV16
		2.Probe	11.8.1995	CIN 3	HPV-negativ
7	30	1.Probe	19.7.1995	CIN 2	HPV 31
		2.Probe	25.9.1995	CIN 3	HPV 31

¹ entzündlich infiltrierte Portio

4. Diskussion

Die Inzidenz und Prävalenz sexuell übertragbarer Erkrankungen sind vielerorts rückläufig. Unverändert hoch bleibt jedoch die Infektionsrate des Genitaltrakts mit humanen Papillomaviren, wobei nicht nur Risikogruppen, sondern auch Populationen mit einem geringen Infektionsrisiko betroffen sind. Bei etwa einem Drittel aller jungen sexuell aktiven Frauen ist in einem einzigen Portio-Abstrich HPV nachweisbar. Die Prävalenz steigt mit zunehmender Anzahl der Abstriche. HPV-Infektionen kommen in steigender Häufigkeit in zytologisch unauffälligem Plattenepithel, in benignen Epithelläsionen, in niedriggradigen und hochgradigen intraepithelialen Plattenepithelneoplasien und in Plattenepithelkarzinomen vor (82). Ob präkanzeröse Läsionen eine spontane Regression erfahren oder ob eine Progression mit maligner Entartung eintritt, ist dabei u.a. von der Onkogenität der vorhandenen HPV-Typen abhängig.

Über 90 % aller plattenepithelialen Zervixkarzinome sind mit HPV assoziiert (4, 5). Diese Karzinome bilden den größten Anteil aller anogenitalen Tumoren (108) und stehen deshalb im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Dabei ist das Spektrum der HPV-Typen in malignen kleiner als in prämaligen dysplastischen Plattenepithelläsionen (14, 83 - 86), und verschiedene epidemiologische Studien konnten zeigen, daß bestimmte HPV-Typen besonders häufig in Plattenepithelkarzinomen angetroffen werden, während andere hier nur selten oder nie nachgewiesen werden können.

Wegen ihrer Assoziation mit verschiedenen klinischen Manifestationen lassen sich die genitalen HPV-Typen in Gruppen mit unterschiedlichem onkogenen Risiko einteilen (27, 74, 87, 117). Zu den Typen mit hohem Risiko der malignen Transformation zählen HPV 16, 18, 45, 52, 56 und 58. Insbesondere die häufiger vorkommenden HPV-Typen 16 und 18 sind Gegenstand zahlreicher Studien, die ihr im Vergleich zu anderen HPV-Typen besonders hohes

pathogenes bzw. onkogenes Potential belegen. Die Detektion dieser Hochrisiko-HPV besitzt eine große prognostische Bedeutung hinsichtlich der weiteren Entwicklung einer vorliegenden Läsion bis hin zum Karzinom (88).

Aufgrund der relativ niedrigen Prävalenz der HPV-Typen 6, 11, 42, 43 und 44 in plattenepithelialen Dysplasien und Tumoren ist das Risiko für die maligne Transformation bei Infektionen mit diesen HPV-Typen sehr niedrig. Ebenso wie die HPV-Typen 13, 32, 40, 53 und 54 zählen sie daher zur Gruppe mit niedrigem Risiko für eine Tumorinduktion. Besonders die HPV-Typen 6 und 11 sind oft mit benignen Läsionen wie z.B. den Condylomata acuminata assoziiert, welche sich spontan zurückbilden können. Zur malignen Transformation kommt es in benignen Läsionen wie z.B. lange bestehenden Warzen, falls die Läsionen mit einem Hochrisiko-HPV wie z.B. HPV 16 infiziert sind (89). Eine derartige Form der Infektion ist jedoch extrem selten. Zumeist kommen Infektionen mit Niedrigrisiko-HPV wie Typ 6 und 11 vor, und eine maligne Transformation bleibt aus. Nur im Ausnahmefall kann auch eine benigne, mit einem Niedrigrisiko-HPV infizierte Läsion maligne entarten. Als Beispiel anzuführen ist die Studie von Meyers et al. 1994 (90), es konnte gezeigt werden, daß lange bestehende HPV 6-assoziierte genitale Warzen eine Progression zum Buschke-Löwenstein Tumor erfuhren (90, 91) . Für diesen Vorgang wurden eine Beteiligung multipler HPV-Typen wie auch eine latente HPV 16-Infektion diskutiert.

Eine weitere Gruppe bilden die HPV-Typen 31, 33, 35, 39, 51, 55 und 57, die hinsichtlich ihrer Onkogenität eine Mittelstellung zwischen den Hoch- und Niedrigrisiko-HPV einnehmen. Man findet sie in dysplastischen und neoplastischen Plattenepithelläsionen sowie gelegentlich auch in benignen Plattenepithel-läsionen (27).

Zu einer vierten Gruppe lassen sich eine Reihe weiterer HPV-Typen zusammenfassen, die relativ spärlich vorkommen oder erst seit kurzer Zeit bekannt

sind. Obwohl jeder dieser Typen allein für sich gesehen nur außerordentlich selten diagnostiziert wird, repräsentieren sie zusammen eine Gruppe von etwa 10 % aller HPV-Infektionen (57). Aufgrund der begrenzten Anzahl von Berichten über ihre Assoziation mit bestimmten Epithelläsionen ist das onkogene Potential der seltene HPV-Typen vielfach nicht bekannt. Zumindest einige von ihnen scheinen aber ein erhöhtes onkogenes Potential zu besitzen, wie aus Verlaufsbeobachtungen z.B. von HPV 66-, HPV 68-, HPV 73- oder MM4-Infektionen bei Zervixkarzinomen hervorgeht (56, 57, 92, 93). Anderen Typen wie HPV 61, HPV 62, MM8 und CP8304 wird dagegen nur ein geringes onkogenes Risiko zugeschrieben (56, 90, 94). Für eine suffiziente prognostische Bewertung der mit diesen neuen HPV-Typen assoziierten Plattenepithelläsionen sind jedoch noch weitergehende epidemiologische Untersuchungen sowie molekulare Charakterisierungen der Typ-spezifischen Onkogene notwendig.

In einer Vielzahl auch aktuellerer Studien wurde häufig nur eine limitierte Zahl von HPV-Infektionen analysiert, da durch die angewandte Methode - z.B. durch den Einsatz typspezifischer Sonden in kommerziellen HPV-Tests – nur eine begrenzte Zahl von HPV-Typen detektierbar war. Entsprechend ist der Anteil seltener HPV-Typen unterschätzt worden. Demgegenüber ermöglicht die für die vorliegende Untersuchung gewählte Technik nicht nur die Erfassung eines breiteren, auch seltene Typen einschließenden HPV-Spektrums (95 - 98), sondern prinzipiell auch die Erfassung bislang noch nicht bekannter HPV-Typen bzw. -Varianten.

Wir verwendeten ausschließlich bereits histologisch klassifiziertes formalinfixiertes paraffineingebettetes Gewebe. Die daran in einer Pilotstudie mittels Standard-PCR erzielten Ergebnisse waren insofern unbefriedigend, als in HPV-verdächtigen Gewebeproben unterdurchschnittlich wenige HPV-Infektionen nachgewiesen werden konnten. Als Erklärung dieses Phänomens ins Feld zu führen ist einerseits die Destruktion und Fragmentation viraler DNA durch Fixantien wie Formalin und Xylol (99), weshalb die Anzahl erhaltener HPV-

Genome unter der Nachweisgrenze der Standard-PCR mit den Primern My9 und My11 liegt, andererseits die aus der Paraffineinbettung resultierende erhöhte Aktivität von Inhibitoren mit der Konsequenz einer Reduktion der Amplifikationseffektivität. Die genannten Beeinträchtigungen der Standard-PCR konnten wir durch den Einsatz der nested-PCR mit höherer Zyklenzahl kompensieren.

Dem mit der hohen Sensitivität der nested-PCR einhergehenden höheren Kontaminationsrisiko begegneten wir durch eine Reihe von Kautelen, die in mehreren Vorversuchsreihen optimiert wurden. Ohne derartige prophylaktische Maßnahmen lag die Kontaminationsrate bei 80 %. Die Verunreinigungen waren ausschließlich der Phase der DNA-Präparation und nicht der DNA-Amplifikation zuzuordnen, da bei der Amplifikation mitgeführte nicht-extrahierte Wasserkontrollen stets ein negatives Ergebnis erbrachten.

Insgesamt wurden am Mikrotom 109 paraffineingebettete humane Schilddrüsen- und bovine Lebergewebsproben abwechselnd mit HPV-infiziertem Gewebe geschnitten. Diese Proben können als Negativkontrollen angesehen werden, da bislang keinerlei Erkenntnisse über eine Infektion von Schilddrüsen- oder Lebergewebe durch HPV vorliegen. Verschiedene Prophylaxemethoden wurden nacheinander überprüft. Als von nur geringer Wirksamkeit erwies sich die bei allen Techniken zusätzlich angewandte Säuberung von Klinge und Klingenhalter mittels Äthanol und Xylol¹. Auch die Verwendung von sterilen Klingen oder ein Abkleben der Klingen durch Folien oder Folienstreifen konnte eine Kontamination HPV-negativer Testproben jeweils nur auf etwa 50 % reduzieren. Als sehr wirksam erwies sich das Eintauchen der Klinge und des Klingenhalters in Extran und Natriumhypochlorid. Aufgrund der massiven Korrosion des Mikrotomschlittens mußte diese Methode

¹ In der Studie von Lie et al. 1996 (101) wurde exakt diese - nach unseren Beobachtungen unzureichende - Vorgehensweise einer Reinigung der Mikrotomklinge zwischen den einzelnen Schneidvorgängen mittels Xylol und 96%igen Äthanol praktiziert. Insofern erscheint die von den genannten Autoren beschriebene 100%ige Prävalenz von HPV in formalinfixierten paraffineingebetteten Gewebeproben laryngealer Papillomatosen fragwürdig.

jedoch ebenso wieder verlassen werden wie der gleichfalls zu kontaminationsfreien Ergebnissen führende Versuch, die Gewebelöcke mit Einmalskalpellen zu schneiden, da es hierunter zu stark schwankenden Gewebemengen und zu einer Zerstörung der Blöcke kam.

Als erfolgreich erwies sich die Verwendung einer dünnen PVC-Folie in Kombination mit sterilen Klingen. Dazu wurde die Klinge in eine Folie gelegt und dann in den Mikrotomschlitten eingespannt, wobei die Folie auch den gesamten Schlitten umschloß. Durch den Wechsel der Folie nach jedem Schneidevorgang war eine Ablagerung von Geweberesten zwischen Klinge und Schlitten zu verhindern, welche bei einem alleinigen Austausch der sterilen Klinge zu einer *carry over*-Kontamination der nachfolgenden Probe hätte führen können.

Alle 140 zuvor histologisch untersuchten Gewebeproben wurden unter Verwendung der PVC-Folie und zusätzlicher Behandlung mit RNase Away® mit dem Mikrotom geschnitten. Von 135 Proben erwiesen sich 104 (77 %) als HPV-positiv. In 5 der HPV-negativen Proben verlief allerdings auch der Nachweis zellulärer DNA (β -Globin-Nachweis) negativ, so daß die negativen PCR-Ergebnisse vermutlich eher auf eine Zerstörung der DNA oder auf die Anwesenheit inhibitorischer Substanzen als auf die Abwesenheit von HPV-DNA zurückzuführen sind.

Die Rate HPV-positiver Fälle betrug in den Gruppen CIN 1/2, CIN 3 und Zervixkarzinom 70 %, 84 % und 88 %. Nach einer zusammenfassenden Darstellung von Wieland und Pfister (43) werden in der Literatur für die Gruppen CIN 1, CIN 2, CIN 3 und für das Zervixkarzinom Raten von 44 - 77 %, 69 - 91 %, 86 - 100 % bzw. 67 - 98 % mitgeteilt. Unterschiede zwischen den Ergebnissen verschiedener Serien können auf den teilweise differenten Nachweisverfahren (ISH, dot blot, PCR usw.) beruhen. Eine weitere Ursache stellen, wie auch von de Villiers und Mitarbeitern 1992 (100) betont, Unterschiede in der Zusammensetzung der Untersuchungskollektive dar, die in

einigen Studien nach bestimmten Faktoren (z.B. bestimmte zytologische oder histologische Befunden, Altersgruppen, sozioökonomischer Status) selektiert wurden.

Im eigenen Material wurde das folgende HPV-Spektrum nachgewiesen:

- ◆ Hochrisiko-HPV: Typen 16, 18 und 58,
- ◆ HPV mit mittlerem onkogenen Risiko: Typen 31, 33 und 35,
- ◆ Niedrigrisiko-HPV: Typen 6, 11 und 53 und
- ◆ HPV mit unbekanntem onkogenen Risiko: Typen 64, 66, 73 (= MM9) und MM7

Dabei wurde unter den HPV-assoziierten zervikalen Läsionen (solitäre und Mehrfachinfektionen) – in Übereinstimmung mit vielen vorangegangenen Studien (27, 43, 57, 74) – der Hochrisiko-Typ 16 mit 47 % am häufigsten angetroffen, darunter mit 76 % bei CIN 3 deutlich häufiger als mit 11 % bei CIN 2. In etwa der Hälfte der dysplastischen oder neoplastischen Gewebläsionen waren HPV-Infektionen mit den Typen 16 oder 18 nachweisbar. HPV 18 allein kam in einer Prävalenz von 8 %, dabei ganz überwiegend bei mittel- und hochgradigen Dysplasien und bei Zervixkarzinomen, vor. Die durch ein mittleres onkogenes Risiko ausgewiesenen Typen 31, 33 oder 35 waren an insgesamt 17 % der HPV-Infektionen beteiligt und traten jeweils mit einer Prävalenz von 6 %, 8 % bzw. 5 % fast ausschließlich in Assoziation mit mittel- und hochgradigen Dysplasien auf. HPV 33 wurde auch in einem Fall eines Zervixkarzinoms nachgewiesen. Aus der Gruppe der Niedrigrisiko-HPV war mit 8 % vorherrschend Typ 6 nachweisbar, wobei sich Solitärinfektionen gleichmäßig auf die zervikalen Dysplasien unterschiedlichen Grades verteilten. Die eigenen Befunde entsprechen damit weitgehend den Daten anderer Studien einschließlich der umfangreichen Analyse von Bosch et al. 1995 (27) an aus 22 verschiedenen Ländern zusammengetragenen etwa 1000 Proben, worunter in 93 % HPV-DNA nachweisbar war und in 50 % Typ 16, in 14 % Typ 18, in 5 % Typ 31 und in 0,1 bis knapp 3 % anderen Typen (HPV 6, 11, 26, 33,

35, 39, 51, 52, 55, 56, 58, 59 und 68) zu identifizieren war. Doppelinfectionen traten bei uns mit 8 % doppelt so häufig wie in der zitierten Studie auf.

In 6 Proben bzw. in 5 % der Fälle dieser Serie waren mit HPV 53, 58, 64, 66, 73 oder MM7 sogenannte seltene HPV-Typen nachweisbar. Darunter lagen HPV 53, 58 und 73 jeweils in einer CIN 3 als einziger HPV-Typ vor. Typ 58 konnte in einer japanischen Studie in einer Häufigkeit von 10 % bei Zervixkarzinomen nachgewiesen werden (102) und gilt daher als HPV-Typ mit hohem onkogenem Potential. Das onkogene Potential von HPV 73 ist bislang noch nicht ausreichend erforscht, weshalb dieser Typ zur Gruppe mit unbekanntem Risiko für die Tumorentstehung zählt. Die Studie von Volter et al. (103) belegt das Vorkommen dieses HPV-Typs in atypischen Warzen, während Manos et al. (56) und Meyer (persönliche Mitteilung) HPV 73 auch in Karzinomen nachweisen konnten.

In einer CIN 1 war der Typ MM7, in einer weiteren waren HPV 16 und 66 identifizierbar. Das onkogene Potential von HPV 66 ist unklar. Twaheed et al. beobachteten ihn neben anderen Typen in einem invasiven Karzinom (93), Meyer et al. (57) in einer CIN 3, aber auch in Abstrichmaterial ohne dysplastische Zellveränderungen. Auch über das onkogene Potential von MM7, das bislang kaum in höhergradigen Dysplasien oder in Karzinomen nachgewiesen wurde, kann kein abschließendes Urteil getroffen werden. Manos et al. (56) wiesen diesen HPV-Typ in histologisch unauffälligen Geweben und in einer CIN 1 nach. Meyer et al. (57) berichteten ebenfalls von einer MM7-Infektion bei normaler Zytologie. Christensen et al. (104) extrahierten MM7 neben HPV 40 aus einem analen Kondylom.

Zum onkogenen Potential von HPV 64 liegen bislang kaum Berichte vor. Sein Nachweis in einem Fall einer VIN 3 dieser Serie lässt ein erhöhtes onkogenes Potential vermuten. In einer weiteren VIN 3 konnten wir HPV 53 detektieren. Unseres Wissens ist bislang für diesen HPV-Typ noch keine Assoziation mit einem Karzinom beschrieben worden. Inwieweit die HPV 53-Infektion als

Auslöser für die dysplastische vulväre Plattenepithelläsion unserer Studie in Betracht kommt, muß durch weitere Untersuchungen, insbesondere in situ-Analysen, überprüft werden.

Mit einem Anteil von 5 % sind die eigenen Ergebnisse vergleichbar mit der Häufigkeit seltener HPV-Typen in anderen Studien. Meyer et al. (57) ermittelten eine Prävalenz von insgesamt 10 %, dabei von 7 % unter hochgradigen Dysplasien und Karzinomen und von etwa 12 % unter geringgradigen Dysplasien der Zervix. Der etwas niedrigere Anteil seltener HPV-Typen in dieser Serie beruht möglicherweise auf der hier angewendeten nested-PCR, die mit den Primern MKP9 und MKP10 nur einen Teil der mit MY9 und MY11 amplifizierbaren HPV-Typen, nicht jedoch die Typen 13, 32, 39, 42, 51 und 54 und aufgrund einer Homologie von weniger als 85 – 90 % vermutlich auch nicht die Typen 26, 43, 44, 55, 59, IS39 und CP8061 erfaßt.

Auch wenn die seltenen HPV-Typen im Gegensatz zu den etablierten Hochrisiko-Typen vergleichsweise häufiger in Proben mit unauffälliger Histologie vorkommen, deutet die Assoziation zumindest einiger dieser Typen mit schweren Dysplasien auf ein höheres onkogenes Potential als bisher angenommen. Zumeist handelt es sich in diesen Fällen um persistierende Infektionen. Ob auch spontane Remissionen auftreten, muß durch längerfristige Verlaufskontrollen geklärt werden. Wichtige weitere Informationen bezüglich der Assoziation dieser Virusinfektionen mit der Progredienz intraepithelialer Plattenepithelläsionen zum Plattenepithelkarzinom sind insbesondere von Folgeuntersuchungen zu erwarten, die den Nachweis von HPV-DNA, die Integration des viralen Genoms, die E6- und E7-Genexpression sowie die Histologie betreffen.

Auffällig war in dieser Studie die Assoziation von HPV 53 und HPV 6 mit höhergradigen dysplastischen Läsionen (CIN 3/VIN 3). Derartige Assoziationen solitärer HPV 6-Infektionen sind gelegentlich auch in anderen Serien

beschrieben worden². Sowohl HPV 6 wie HPV 53 wird generell ein niedriges onkogenes Potential zugeschrieben (105). Möglicherweise existieren aber Typvarianten mit gesteigerter Onkogenität. Zu Stützung dieser Hypothese wären Sequenzanalysen vor allem im Bereich der LCR und der Onkogene E6 und E7 erforderlich, deren Ergebnisse mit den Sequenzen der Prototypen von HPV 6 und HPV 53 zu vergleichen wären. Ob ggfs. vorhandene Sequenzabweichungen mit einer gesteigerten Onkogenität assoziiert sind, könnte dann z.B. durch in vitro-Bindungsassays u.a. mit Rb 105 und p53 überprüft werden. Denkbar wäre allerdings auch das Vorliegen einer Koinfektion von HPV 6 bzw. HPV 53 mit Hochrisiko-HPV-Typen, wobei letztere durch Integration die L1-Zielsequenz verloren haben könnten. Derartig integrierte Viren müssten aber durch Amplifikation der E6-/E7-Gene noch nachweisbar sein.

In dieser Studie zeigte sich eine charakteristische Altersverteilung der HPV-Infektionen mit einem Maximum in der dritten, gefolgt von der vierten Dekade. Davor und danach war eine geringere Prävalenz zu dokumentieren. Diese in ähnlicher Weise von zur Hausen et al. (7), de Villier et al. (106), Melkert et al. (107) und Manavi et al. (2) publizierte Zahlen mit einem Häufigkeitsgipfel der HPV-Infektionen zwischen dem 21. und 40. Lebensjahr innerhalb der sexuell aktivsten Lebensphase spiegeln den sexuellen Übertragungsweg der HPV-Infektion wider (108). Der anteilmäßig häufigste Nachweis einer HPV-Infektion gelingt somit ungefähr in der Altersklasse, in der auch Dysplasien und Carcinomata in situ am häufigsten vorkommen. Danach nimmt die Häufigkeit des HPV-Nachweises ab, während – wenngleich bei den ältesten und jüngsten Altersgruppen das Problem der kleinen Fallzahlen zu berücksichtigen ist - in der Gruppe der über 51jährigen Patientinnen, vermutlich bedingt durch die hier

² HPV 6 wurde von Kahn et al. (109) und von Bercovich et al. (110) (Subtyp 6a) in einem Tonsillenkarzinom, von Rando et al. (111) und von Kascha et al. (112) (Subtyp 6b) in einem Vulvakarzinom, von Zaki et al. (113) in einem Analkarzinom und von Meyer et al. (57) in einer hochgradigen Plattenepitheldysplasie und in in zwei Plattenepithelkarzinomen der Portio nachgewiesen. Von 300 von Wilczynski et al. (114) untersuchten invasiven Karzinomen des unteren Genitaltrakt enthielt drei als einzigen HPV-Typ HPV 6.

höhere Inzidenz des Zervixkarzinoms und die größere Zahl von ärztlichen Untersuchungen und Probenentnahmen, ein geringer Wiederanstieg der Infektionsrate zu verzeichnen ist. Auch im eigenen Material war mit zunehmendem Alter eine Zunahme höhergradiger Dysplasien und insbesondere invasiver Karzinome zu verzeichnen. Die Häufigkeit invasiver Karzinome lag in dieser Studie unter 31 Jahren bei 2 %, zwischen 31 und 40 Jahren bei 5 %, zwischen 41 und 50 Jahren bei 16 % und erreichte jenseits des 50. Lebensjahrs mit knapp 30 % ihr Maximum. Für diesen Altersgang könnten neben nachteiligen immunologischen Veränderungen auch im höherem Alter gehäuft auftretende Defekte von Reparaturmechanismen verantwortlich sein.

Voraussetzung für die Identifikation eines erhöhten onkogenen Potentials definierter HPV-Typen ist der Nachweis einer persistierenden Infektion bei fortschreitender Epitheldysplasie. Aus ethischen Gründen ist jedoch bei Epithelläsionen mit zu vermutendem Entartungspotential eine therapeutische Intervention z.B. durch Konisation indiziert, weshalb nur im Ausnahmefall der sog. natürliche Erkrankungsverlauf („natural history“) dokumentiert werden kann. Entsprechend waren auch im Rahmen der vorliegenden Studie nur für wenige Patientinnen hinsichtlich Histologie und HPV-Typisierung Verlaufsbeobachtungen möglich, wobei in keinem Fall eine solitäre Infektion mit einem HPV-Typ aus der Gruppe der seltenen HPV-Typen vorlag.

Bei zwei Patientinnen konnten persistierende Infektionen mit HPV 16 (jeweils mit dem histologischen Befund einer CIN 3) bzw. mit HPV 31 (mit der histologisch dokumentierten Progression einer CIN 2 zur CIN 3) nachgewiesen werden. Hier stand der Verlauf jeweils in Einklang mit dem generell als erhöht anzunehmenden onkogenen Potential der HPV-Typen.

Bemerkenswerte Verläufe zeigten sich bei zwei anderen, 25 bzw. 28 Jahre alten Patientinnen jeweils mit CIN 3, bei denen jeweils zwei innerhalb von 4 bzw. 7 Wochen gewonnene Proben sich als positiv für HPV 16 oder HPV 31

bzw. als HPV-negativ erwiesen. Während bei älteren Frauen häufiger persistierende Infektionen vorkommen (115), wurden im jüngeren Lebensalter mehrfach auch spontan ausheilende transiente Infektionen, vorzugsweise mit den Niedrigrisiko-Typen HPV 6 und HPV 11, beobachtet (107). Für die mit einem mittleren bzw. hohen onkogenen Risiko assoziierten HPV-Typen 16 und 31 erscheint eine derartige Viruselimination weniger wahrscheinlich als das Vorliegen für den Nachweis zu geringer HPV-DNA-Mengen, weshalb hier weitere Kontrollen empfohlen wurden. Eine ähnliche Problematik deutet sich bei einer weiteren 21 Jahre alten Patientin mit persistierender CIN 1 an, bei der von drei in jeweils etwa einjährigem Abstand entnommenen Proben die mittlere HPV-negativ, die zuerst und zuletzt gewonnenen hingegen positiv für HPV 6 waren.

Für die beiden übrigen, im Verlauf zweimal hinsichtlich Histologie und HPV-Infektion untersuchten Fälle lag bei der einen Patientin initial eine CIN 3 mit Positivität für HPV 16 und 2 Monate später eine dysplasiefreie HPV-negative Probeexzision, bei der anderen zunächst eine CIN 2 mit Positivität für HPV 6 und zwei Monate danach eine CIN 3 mit Positivität für HPV 16 vor. Diese zunächst widersprüchlich imponierenden Befunde konnten für die erste Patientin durch einen Zustand nach zwischenzeitlicher auswärtiger Portio-konisation bzw. -sanierung erklärt werden. Im zweiten Fall könnte die Erklärung darin bestehen, daß bei HPV-Doppel- bzw. Mehrfachinfektionen die Viren nicht über die gesamte Läsion gleichmäßig verteilt vorkommen (wobei ggfs. einzelne Areale der Portiooberfläche völlig von der Infektion ausgespart bleiben). In Einklang mit dieser Auffassung steht die Beobachtung von Christensen et al. (104), daß multiple HPV-Typen genitale Plattenepithelien simultan befallen können, jedoch in den hierdurch induzierten koilozytären Plattenepithelläsionen überwiegend regional getrennt vorkommen. Eine andere, hier aufgrund der kurzen Latenz von nur 2 Monaten nicht in Betracht kommende Deutung wäre die spontane Heilung einer Läsion mit Elimination des einen HPV-Typs und die Reinfektion mit einem anderen, wiederum dysplastische Plattenepithelveränderungen induzierenden HPV-Typ.

Diagnostische und epidemiologische Perspektiven

Voraussetzung für eine Optimierung HPV-Typ-abhängiger Vorsorgemaßnahmen mit dem Ziel bestmöglicher kurativer Ergebnisse wäre eine konsequente Fortsetzung der Analysen zur Assoziation aller HPV-Typen mit möglichen dysplastischen und neoplastischen Läsionen bzw. die Charakterisierung der onkogenen Eigenschaften der typspezifischen E6- und E7-Proteine. Darüberhinaus wäre eine zentrale Erfassung und Auswertung aller mit einem standardisierten Nachweisverfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität gewonnenen Typisierungsergebnisse in Abhängigkeit von den parallel erhobenen zytologischen und histologischen Befunden anzustreben. Dadurch wäre eine epidemiologische Bestimmung der Prävalenz aller HPV-Typen in niedrig- und hochgradig dysplastischen und in neoplastischen genitalen Plattenepithelläsionen möglich.

Bereits heute besitzt die HPV-Typisierung eine eminente Bedeutung für die Abschätzung einer möglichen Progression einer dysplastischen genitalen Plattenepithelläsion. Der Nachweis des für die Läsion verantwortlichen HPV-Typs bietet eine Entscheidungshilfe für das weitere Vorgehen. So gestattet im Fall einer leichten Dysplasie der Nachweis eines HPV-Typs mit niedrigem onkogenen Potential eine abwartende Haltung, während der Nachweis eines HPV-Typs mit hohem onkogenen Potential Anlaß zu weiteren diagnostischen (z.B. Biopsie) oder ggfs. auch therapeutischen Maßnahmen gibt. Chua und Hjerpe (115) plädieren daher für einen HPV-Test, der parallel zu jedem für die zytologische Beurteilung durchgeführtem Abstrich im Screening-Verfahren durchgeführt werden sollte. Um die Spezifität des Nachweises weiter zu erhöhen, empfehlen sie ein Screening-Programm, das alle Frauen ab 30 Jahren mit einer über 12 Monate persistierenden Dysplasie-assoziierten HPV-Infektion einschließt. Aufgrund des sehr unterschiedlichen onkogenen Potentials verschiedener HPV-Typen und der daraus resultierend erheblich differenten Prognose wäre, wie von Galloway (116) vorgeschlagen, bei jeder Patientin hinsichtlich weiterführender Diagnostik und Therapie individuell vorzugehen.

5. Zusammenfassung

Untersucht wurden insgesamt 140 formalinfixierte paraffineingebettete Biopsieproben überwiegend dysplastischer oder neoplastischer Plattenepithelläsionen, darunter mit 60 % vorherrschend CIN 3, des weiblichen Genitaltrakts, an denen über die histologische Beurteilung hinaus mittels nested-PCR und RFLP-Analyse Verfahren des HPV-Nachweises und der HPV-Typisierung angewandt wurden.

Hinsichtlich der Altersverteilung zeigte sich ein Überwiegen von CIN 3-Läsionen bei jüngeren und ein gehäuftes Auftreten invasiver Karzinome bei älteren Patientinnen. In 104 von 135 Proben (77 %), darunter in 79 % der invasiven Karzinome und in 84 % der CIN 3 dieser Studie und mit 87 % am häufigsten in der Altersgruppe zwischen 21 und 30 Jahren, konnte HPV nachgewiesen werden, wobei das Verfahren der nested-PCR höhere Sensitivität als die Standard-PCR besaß. Durch die Ummantelung des Mikrotoms mit PVC-Folie konnte die in Vorversuchen demonstrierte Kontamination der Proben durch DNA-Verschleppung während des Schneidevorgangs verhindert werden. Das aufgrund der verwendeten Primer MKP 9 und MKP 10 etwas eingeeengte Spektrum der in den diagnostischen Proben nachweisbaren Infektionen umfaßte die HPV-Typen 6, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 40, 45, 52, 53, 56, 57, 58, 61, 62, 64, 66, 68, 70, 73, MM4, MM7, MM8, MM9 und CP6108. Am häufigsten war mit einer Prävalenz von 47% HPV 16 nachweisbar, gefolgt mit einer Prävalenz von jeweils 7 % von HPV 6, 18 und 33.

Für die HPV-Typen 16 und 18 bestätigte sich die erwartete Korrelation mit einem hohen Risiko für maligne Transformation. In gleicher Weise fand sich die zu erwartende Assoziation der HPV-Typen 6, 11, 31, 33 und 35 mit einem niedrigen bzw. mittelgradigen Entartungsrisiko. Seltene HPV-Typen (HPV 53, 58, 64, 66, 73 und MM7) wurden nur vereinzelt nachgewiesen und machten 5 % aller Proben aus. Für einige dieser Typen konnte der nach

Einzelbeobachtungen zu vermutende Zusammenhang mit hohem onkogenen Potential bestätigt werden. Für andere Typen ergaben sich überraschend gegensätzliche Assoziationen, die u.a. durch das Vorkommen von Mehrfachinfektionen oder von Typvarianten mit verändertem onkogenen Potential begründet sein können. Diese Befunde bestätigen den Bedarf an weiteren epidemiologischen Erhebungen unter zentraler Erfassung mittels standardisierter Verfahren gewonnener Typisierungsergebnisse in Abhängigkeit von zytologischen und histologischen Daten und von Verlaufsbeobachtungen.

6. Literaturverzeichnis

1. Becker TM, Stone KM, Alexander ER (1987) Genital human papillomavirus infection. A growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 14:389-396
2. Manavi M, Czerwenka KF, Enzelsberger H, Knogler W, Seifert M, Raimann H, Reinold E, Kubista E (1992) Humane Papillomavirus DNA Infektionen an der Cervix uteri. *Gebh Frhkd* 52:283-286
3. Broker TR, Botchan M (1986) Papillomaviruses: Retrospectives and prospectives. *Cancer Cells 4 / DNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 17:134-139
4. zur Hausen H (1996) Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:3-13
5. Matsukara T, Sugase M (1995) Identification of genital human papillomaviruses in cervical biopsy specimens. Segregation of specific virus types in specific clinicopathologic lesions. *Int J Cancer* 61:13-22
6. Crum CP, Burkett BJ (1989) Papillomavirus and vulvovaginal neoplasia. *J Reprod Med* 34:566-571
7. zur Hausen H (1977) Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 78:1-30
8. zur Hausen H (1991) Viruses in human cancers. *Science* 245:1167-1173
9. zur Hausen H (1989) Papillomaviruses in anogenital cancer: a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 49:4677-4681

10. zur Hausen H (1994) Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 186:131-156
11. zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochem Biophys Acta* 1288:F55-F78
12. Mansur CP, Androphy FJ (1993) Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Biochem Biophys Acta* 1155:323-345
13. Androphy EJ (1994) Molecular biology of human papillomavirus infection and oncogenesis. *J Invest Dermatol* 103:248-256
14. Meyer T, Keeser D, Arndt R, Beckmann ER, Schröder S (1997) Identifizierung, Prävalenz und klinische Relevanz neuer genitaler HPV Typen. *Immun Infekt* 2:65-69
15. Hilfrich J, Cellé R (1986) Tumoren des weiblichen Genitales. In: Schneider J, Kaulhausen H (Hrsg.) *Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtsmedizin* Kohlhammer Verlag Stuttgart S 146-156
16. Rigoni-Stern D (1842) Fatti statistiche lativi alle malattie cancrose. *Giornale Service Prog Pathol Therap Ser* 2:507-517
17. Moghissi KS, Mack HC (1967) Epidemiology of cervical cancer. A study of a prison population. *Am J Obst Gynaecol* 100:607-612
18. Pfliederer A (1981) Entwicklungsgeschichte der zervikalen, intraepithelialen Neoplasie. *Gynäkologie* 14:194-198
19. Maas H (1986) Zervixkarzinom. Häufigkeit in der Dimension von Raum und Zeit. In: Friedberg V, Thomsen K, Hirsch HA, Kindermann G (Hrsg.) *Spezielle Gynäkologie 2*, Thieme Verlag, Stuttgart New York 14.45-14.62

20. Gissmann L (1985) Kondylome - Hinweise für die Beteiligung der Papillomaviren an der Entstehung des Zervixkarzinoms. *Gynäkologie* 18:160-162
21. Petersen EE, Clad A (1995) Klinische Bedeutung der Papillomaviren in der Gynäkologie. *Gynäkologie* 25:20-25
22. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW (1974) Attempts to detect virus specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 13:650-656
23. Syverton JT, Berry GP (1935) Carcinoma in the cottontail rabbit following spontaneous virus papilloma. *Proc Soc Exp Biol Med* 33:399-400
24. Meisel A, Fortin R, Roy M (1976) Condylomatous lesion of the cervix and vagina. I. Cytological patterns. *Acta Cytol* 20:505-509
25. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3812-3815
26. Bosshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J* 3:1151-1157
27. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Shermann M, Jansen AM, Peto J, Schiffmann MH, Moreno V, Kurmann R, Shah KV (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 87:796-802

28. Morrison EAB, Ho GYF, Vermund SH, Goldberg GL, Kadish AS, Kelley KF, Burk RD (1991) Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case control study. *Int J Cancer* 49:6-13
29. Reeves WC, Brinton LA, Garcia M (1991) Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *N Engl J Med* 320:1437-1441
30. Schneider A, Kraus H, Schuhmann R, Gissmann L (1985) Papillomavirus infection of the lower genital tract: detection of viral DNA in gynecological swabs. *Int J Cancer* 35:443-448
31. Phelps MC, Munger K, Yec CL (1992) Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 66:2418-2427
32. zur Hausen H (1982) Synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events ? *Lancet* 2:1370-1373
33. Pister H, Fuchs PG (1994) Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* 37:143-149
34. Scheffner M, Romanczuk H, Munger K, Huibregtse JM, Mietz JA, Howley PM (1994) Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 186:83-99
35. Mc Dougall JK (1994) Immortalization and transformation of human cells by human papillomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 186:101-119
36. Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU (1995) Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny and taxonomy. *J Virol.* 69:3074-3083
37. Shamanin V, Glover M, Rausch C, Proby C, Leigh IM, zur Hausen H, de Villiers EM (1994) Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Res.* 54:4610-4613

38. Stark LA, Arends MJ, McLaren KM, Benton EC, Shahidullah H, Hunter JA, Bird CC (1994) Prevalence of human papillomavirus DNA in cutaneous neoplasms from renal allograft recipients supports a possible viral role in tumor promotion. *Br J Cancer* 69:222-229
39. Euvrard S, Chardonnet Y, Pouteil-Noble C, Kanitakis J, Chignol MC, Thivolet J, Touraine J (1993) Association of skin malignancies of various and multiple carcinogenic and noncarcinogenic human papillomavirus in renal transplant recipients. *Cancer* 72:2198-2206
40. Giardi F, Fuchs P, Haas J (1989) Die klinische Bedeutung der HPV-Infektionen. *Gynäk Rdsch* 29:61-66
41. Knebel Doberitz Mv, Oltersdorf T, Schwarz E, Gissmann L (1988) Correlation of modified human papillomavirus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 48:3780-3786
42. zur Hausen H (1986) Hypothesis: Intracellular surveillance of persisting viral infections. *Lancet* 2:489-491
43. Wieland U, Pfister H (1997) Papillomaviruses in human pathology: Epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. In: Gross/Barrasso Human Papillomavirus Infection. A clinical atlas. Ullstein Mosby Wiesbaden Germany pp 1-18
44. Werness BA, Levine A, Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76-79
45. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E (1989) The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934-937

46. Schaffner M, Werness BA, Huibregtze JM, Levine AJ, Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63:1129-1136
47. Tlsty TD, White A, Livanos E, Sage M, Roelofs H, Briot A, Poulouse B (1994) Genomic integrity and the genetics of cancer. In: *The molecular genetics of cancer*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 59:265-275
48. Moyret-Lalle C, Marcais C, Jacquemier J (1995) ras, p53 and HPV status in benign and malignant prostate tumors. *Int J Cancer* 64:124-129
49. Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD (1992) Phylogenetic classification of human papillomavirus: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* 73:2653-2660
50. Scott GM, Csonka GW (1979) Effect of injections of small doses of human fibroblast interferon into genital warts: A pilot study. *Br J Vener Dis* 55:442-445
51. Schonfeld A, Nitke S, Schattner A (1984) Intramuscular human interferon-beta injections in treatment of condylomata acuminata. *Lancet* 1:1038-1042
52. Eron LJ, Judson F, Tucker S (1986) Interferon therapy for condylomata acuminata. *New Engl J Med* 315:1059-1064
53. Keny S, Teng N, Eisenberg M, Story B, Sellers PW, Merigan TC (1988) Topical interferon for treating condylomata acuminata in women. *J Infect Dis* 158:934-939
54. Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC (1990) Papillomavirus and human cancer. *Hum Pathol* 21:686-698

55. Nuovo GJ, Darfler MM, Imprain CC, Bromley SE (1991) Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. *Am J Pathol* 138:53-58
56. Manos MM, Waldmann J, Zhang TY (1994) Epidemiology and partial nucleotide sequence of four novel genital human papillomaviruses. *J Infect Dis* 170:1096-1099
57. Meyer T, Arndt R, Christophers E, Beckmann ER, Schröder S, Gissmann L, Stockfleth E (1998) Association of rare HPV types with genital premalignant and malignant lesions. *J Infect Dis* 178:252-255
58. Schneider A (1987) Methods of Identification of human papilloma viruses. In: Syrjänen K, Gissmann I, Koss LG (Hrsg) *Papillomavirus and human diseases*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York pp 19-39
59. Lorincz A (1992) Detection of human papillomavirus DNA without amplification: Prospects for clinical utility. In: Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A (eds) *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon IARC pp 135-145
60. Gravitt PE, Manos MM (1992) Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA. In: Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A (eds) *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, IARC pp 121-133
61. Nuova GJ, Darfler MM, Imprain CC (1991) Occurrence of multiple types of human papilloma virus in genital tract lesions analysis by in situ hybridisation and the polimerase chain reaction. *Am J Pathol* 139:518-523
62. Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM (1990) The use of general primers in the polimerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 71:173-181

63. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989) The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7:209-214
64. Bergeron C, Barrasso R, Beaudenon S, Flamant P, Croissant O, Orth G (1992) Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia: Great diversity and distinct distribution in low- and high-grade lesions. *Am J Surg Pathol* 16:641-649
65. Lungu O, Sung XW, Felix J, Richard RM, Silverstein S, Wright T (1992) Relationship of human papillomavirus type to grade of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 267:2493-2496
66. van den Brule AJ, Wallboomers JM, Du-Maine M, Kenemans P, Meijer C (1991) Difference in prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologically normal cervical smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 48:404-408
67. Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, Eichinger DH, Fox HS, ter-Schegget J, Manos MM (1990) Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 82:1477-1484
68. Das BC, Sharma JK, Gopalkrishna V, Das DK, Singh V, Gissmann L, zur-Hausen H, Luthra UK (1992) A high frequency of human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinomas of Indian women as revealed by Southern blot hybridization and polymerase chain reaction. *J Med Virol* 36:239-245
69. ter-Meulen J, Eberhardt HC, Luande J, et al (1992) Human papillomavirus (HPV) infection, HIV infection and cervical cancer in Tanzania, East Africa. *Int J Cancer* 51:515-521

70. Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Le-Doussal, Orth G (1990) Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet* 335:1171-1174
71. van den Brule AJ, Claas HC, du Maine M (1989) Use of anti-contamination primers in the polymerase chain reaction for the detection of human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and biopsies. *J Med Virol* 29:20-27
72. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989) The use of polymerase chain reaction amplification for detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7:209-222
73. Ting Y, Manos MM (1990) Detection and typing of genital human papillomaviruses. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T, (eds) *PCR protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press San Diego pp 356-367
74. de Roda Husmann AM, Walboomers JM, Meijer CJ, Risse EK, Schipper ME, Helmerhost TM, Bleker OP, Delius H, van den Brule AJ, Snijders PJ (1994) Analysis of cytomorphologically abnormal cervical scrapes for the presence of 27 mucosotropic human papillomavirus genotypes, using polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 56:802-806
75. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM (1994) Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 170:1077-1085
76. Lungu O, Wright TC, Silverstein S (1992) Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Mol Cell Probes* 6:145-152

77. Meyer T, Arndt R, Stockfleth E, Flamman HT, Wolf H, Reischl U (1995) Strategy for typing human papillomavirus by RFLP analysis of PCR products and subsequent hybridisation with a generic probe. *BioTechniques* 19:632-639
78. Poulsen HE, Taylor CW, Sobin L (1975) Histological typing of female genital tract tumors. WHO Geneva
79. Scully RE, Poulsen HE, Sobin L (1994) Histological typing of female genital tract tumors. (2nd Ed) WHO International histological classification of tumors. Springer Verlag Berlin
80. National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA* 1989; 262:931-934
81. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipmann DJ (1997) Grapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402
82. Majewski S, Jablonska S (1997) Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *J Am Acad Dermatol* 36:659-660
83. Goldsborough, MD, Mc Allister P, Reid R, Temple G, Lörincz AT (1992) A comparison study of human papillomavirus prevalence by the polymerase chain reaction in low risk women and in gynaecology referral group at elevated risk for cervical cancer. *Mol Cell Probes* 6:451-457
84. Kiviat NB, Koutsky LA, Critchlow CW, Lorincz AT, Cullen AP, Brockway J, Holmes KK (1992) Prevalence and cytologic manifestations of human papilloma virus (HPV) types 6,11,16,18,31,35,42, 43,44,45,51,52, and 56 among 500 consecutive women. *Int J Gynecol Pathol* 11:197-203

85. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen R, Beckmann J, DeRouen AM, Galloway DA, Vernon D, Kiviat NB (1992) A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327:1272-1278
86. Lörincz AT, Reid R, Jenson AB, Greeberg MD, Lancaster WD, Kurmann RJ (1992) Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79:328-337
87. de Villiers EM (1994) Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* 186:1-12
88. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurmann RJ, Wacholder S (1993) Epidemiological evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 85:958-964
89. Scholefield JH, Wage H, Smith JH (1992) Anal intraepithelial neoplasia part of a multifocal disease process. *Lancet* 340:1271-1273
90. Meyers G, Delius H, Icenogel J (1994) Compilation and Analysis of HPV Nucleic Acids and Amino Acid Sequences. Theoretical Biology and Biophysics. Los Alamos National Laboratory, New Mexico
91. Schwartz RA (1995) Verrucous carcinoma of the skin and mucosa. *J Am Acad Dermatol* 32:1-21
92. Reuter S, Delius H, Kahn T, Hoffmann B, zur Hausen H, Schwarz E (1991) Characterisation of a novel papillomavirus DNA in the cervical carcinoma cell line ME 180. *J Virol* 65:5564-5568
93. Tawheed AR, Beaudenon S, Favre M, Orth E (1991) Characterisation of human papillomavirus type 66 from an invasive Carcinoma of the uterine cervix. *J Clin Microbiol* 29:2656-2660

94. Peyton CL and Wheeler CM (1994) Identification of five novel human papillomavirus sequences in the New Mexico triethnic population. *J Infect Dis* 170:1089-1092
95. Herrington CS, Evans MF, Gray W, Mc Gee J (1995) Morphological correlation of human papillomavirus infection of matched cervical smears and biopsies from patients with persistent mild cervical cytological abnormalities. *Hum Pathol* 26:951-955
96. Milde-Langosch K, Schreiber C, Becker G, Löning T, Stegner HE (1993) Human papillomavirus detection in cervical adenocarcinoma by polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 24:590-594
97. Brisson J, Bairati I, Morin C, Fortier M, Bouchard C, Christen A, Bernard P, Roy M, Meisels A (1996) Determinants of persistent detection of human papillomavirus DNA in the uterine cervix. *J Infect Dis* 173:794-799
98. Berumen J, Unger E, Casas L, Figueroa P (1995) Amplification of human papillomavirus Types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Hum Pathol* 26:676-681
99. Matsuo N, Iwasaka T, Hayashi Y (1993) Polymerase chain reaction analysis of human papillomavirus in adenosquamous carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Obstet* 41:251-256
100. de Villiers EM, Wagner D, Schneider A, Wesch H, Miklaw H, Wahrendorf J, Papendick U, zur Hausen H (1992) Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities: Results a 5-Year follow-up study. *Gynecol Oncol* 44:33-39
101. Lie ES, Heyden A, Johannesen MK, Boysen M, Brandtzaeg P (1996) Detection of human papillomavirus in routinely processed biopsy specimens from laryngeal papillomas: Evaluation of reproducibility of polymerase chain reaction and DNA in situ hybridization procedures. *Acta Otolaryngol Stockholm* 116:627-632

102. Fujita M, Shroyer KR, Markham NE, Inoue M, Iwamoto S, Kyo S, Enomoto T (1995) Association of human papillomavirus with malignant and premalignant lesions of the uterine endometrium. *Hum Pathol* 6:650-657
103. Volter C, He Y, Delius H, Roy-Burmann A, Greenspan JS, Greenspan D, de Villiers EM (1996) Novel HPV-Types present in oral papillomatous lesions from patients with HIV infection. *Int J Cancer* 66:453-456
104. Christensen ND, Koltun WA, Cladel NM, Budgeon LR, Reed CA, Kreider JW, Welsh PA, Patrick SD, Yang H (1997) Coinfection of human foreskin fragments with multiple human papillomavirus types produces regionally separate HPV infections within the same athymic mouse xenograph. *J Virol* 71:7337-7344
105. Astori G, Arzese A, Pipan C, de Villiers EM, Botta GA (1997) Characterization of a putative new HPV genomic sequence from a cervical lesion using L1 consensus primers and RFLP. *Virus Res* 50:57-63
106. de Villiers EM, Wagner D, Schneider A, Wesch H, Miklaw H, Wahrendorf J, Papendick U, zur Hausen H (1987) Human papilloma virus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet* 2:703-706
107. Melkert PW, Hopman E, van den Brule AJ, Risse EK, van Diest PJ, Bleker OP, Helmerhorst T, Schipper ME, Meijer CJ, Walboomers JM (1993) Prevalence of HPV in cytomorphologically cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction is age-dependent. *Int J Cancer* 53:919-923
108. Stegner HE (1996) Geschwülste der weiblichen Fortpflanzungsorgane. In: Stegner HE, Gynaekologie und Geburtshilfe Enke Verlag Suttgart S 283-302

109. Kahn T, Turazza E, Ojeda R, Bercovich A, Stremlau A, Lichter P, Poustka A, Grinstein S, zur Hausen H (1994) Integration of human papillomavirus type 6a DNA in a tonsillar carcinoma: chromosomal localization and nucleotide sequence of the genomic target region. *Cancer Res* 54:1305-1312
110. Bercovich JA, Centeno CR, Aguilar OG, Grinstein S, Kahn T (1991) Presence and integration of human papillomavirus type 6 in a tonsillar carcinoma. *J Gen Virol* 72:2569-2572
111. Rando RF, Groff DE, Chirikjian JG, Lancaster WD (1986) Isolation and characterisation of a novel human papillomavirus type 6 DNA from an invasive vulvar carcinoma. *J Virol* 57:353-356
112. Kasher MS, Roman A (1988) Characterization of human papillomavirus type 6b DNA isolated from an invasive squamous carcinoma of the vulva. *Virology* 165:225-233
113. Zaki SR, Judd R, Coffield LM, Greer P, Rolston F, Evatt BL (1992) Human papillomavirus infection and anal carcinoma. Retrospective analysis by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 140:1345-1355
114. Wilczynski SP, Oft M, Cook N, Liao SY, Iftner T (1993) Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. *Hum Pathol* 24:96-102
115. Chua KL, Hjerpe A (1996) Persistence of human papillomavirus infections preceding cervical carcinoma. *Am Cancer Soc* 77:121-127
116. Galloway DA (1994) Editorial: Navigating the descent into papillomavirus hell. *J Infect Dis* 170:1075-1076

117. Herrington CS (1994) Human papillomaviruses and cervical neoplasia. I. Classification, virology, pathology, and epidemiology. *J Clin Pathol* 47:1066-1072

7. Anhang

7.1. Materialien

7.1.1. Geräte

Blot-Kammern	BioRad, München
Eismaschine	Brema
Elektrophoresekammern	BioRad, München
Hybridisierungsöfen (Wasserbad)	GFL, Burgwedel
Inkubationsofen	Heraeus, Harnau
Kühlplatte	Axel Johnson Lab System, Dänemark
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Mikrotom	Mikrotom GmbH, Walldorf
Mikrowellenofen	Sharp
Pipettierhilfe	Technomara
Polaroid	Renner GmbH, Dannstadt
Reinstwassersystem	Gelman Sciences
Schüttelgerät	GFL, Burgwedel
Sequenzierapparatur	Applied Biosystems, Perkin Elmer
Spannungsquelle	BioRad, München
Thermal Cycler	Perkin Elmer, Norwalk U.S.A.;
	Techne, Cambridge England
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühltruhe	Siemens
Tisch- und Kühlzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Trocknungsofen	Biometra, Göttingen
Vortex	Heidolph, Nürtingen

7.1.2. Laborbedarf

Ejakulationsröhrchen	Greiner, Nürtingen
Filterpapier	Schleicher & Schüll, Dassel

Mikroliterpipetten	Greiner, Nürtingen
Parafilm	American National Can, Chicargo
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Techne, Cambridge England;
(0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, safe-seal, steril	Biozym, Hess. Oldendorf
Standardspitzen	Greiner, Kremsmünster Österreich
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg;
Standard und safe-lock	Greiner, Nürtingen
Spitzbodenröhrchen (12 ml)	Greiner, Nürtingen
Zeta-Membran	BioRad, München

7.1.3. Reagentien

Acrylamid	BioRad, München
APS	BioRad, München
Bromo-Chlor-Indolyl-Phosphat	Sigma, Steinheim
Bromphenol Blau	Sigma, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid (DMF)	Sigma, Steinheim
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendinitrotetraessigsäure-	Merck, Darmstadt
Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Tritriplex
Ficoll	Serva, Heidelberg
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycogen	Boehringer, Mannheim
Mineralöl	Sigma, Steinheim
Molekulargewichtsmarker	Boehringer, Mannheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhypochlorid	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Nitro Blue Tetrazolium	Sigma, Steinheim

PCI-Solution (Phenol-Chloroform – Isoamylalkohol 25:24:1)	Biomol, Hamburg
RNAse Away	Molecular Bio-Products, San Diego USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, St. Louis USA; BioRad Hercules USA
Streptavidin	Dianova, Hamburg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad, München
Tris 1 M/100 mM EDTA ph 8.0	Sigma, St. Louis USA
Xylol	Merck, Darmstadt

7.1.4. Enzyme

Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Perkin Elmer, custom synthesis Germany
Restriktionsendonukleasen :	Boehringer, Mannheim
jeweils 10 U/ μ l	
Bam HI	
Hae III	
Hinf	
Eco RI	
Pst I	
Dde I	
Dra I	
zugehörige Puffer H, M, B	Boehringer, Mannheim
10 x konz.	

7.1.5. Nukleotide, Oligonukleotide und Primer

dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Boehringer, Mannheim
GopX (0,05 μ mol/ml)	Biomol, Hamburg

Alle nachfolgend aufgeführten PCR-Primer bzw. Sonden wurden von Perkin Elmer, Custom Synthesis Germany bezogen.

Tab. 11: Sequenzen der Oligonukleotide, die als PCR-Primer oder Hybridisierungssonde verwendet wurden.

Primer	Sequenz
My 09	5'-CgT CCM ARR ggA WAC TgA TC
MY 11	5'-gCM Cag ggW CAT AAY AAT gg
MKP 09	5'-gTT ACT gTK gTW gAY ACY AC
MKP 10	5'-TCY TTT ARA TYA ACM TYC CA
IR 01	5'-CAA CTT CAT CCA CgT TCA CC
IR 02	5'-gAA gAg CCA Agg ACA ggT AC
GopX*:	
X1	5'-Bio-TTT gTW ACY gTK gTR gAY AC
X2	5'-Bio-TTT RTT ACY TgT gTT gAY AC
X3	5'-Bio-TTT KTR ACW gTW gTW gAT AC
X4	5'-Bio-TTT gTY ACW gTK gTK gAT AC
X5	5'-Bio-TTT CTA ACW gTK gTR KAY AC

* : **GopX** ist ein Gemisch aus 5 Biotin-markierten Sonden.

7.1.6. Puffer und Lösungen

PK-SDS-Lyse-Lösung :

10 mM Tris/HCL

1 mM EDTA pH 8.0

100 mM NaCl

0,5 % SDS

0,5 mg/ml PK

Ladepuffer-Lösung (1 ml) :

0,25 % Bbp (Bromphenolblau)

15,0 % Ficoll

Aqua dest.

10 x TBE (= 0,89 M Tris + 0,89 M

Borsäure + 0,025 M EDTA)

Prähybridisierungslösung (1 l):

20 x SSC (250 ml)

Blocking-Reagenz (10 g)

N-Laurylsaccosine (1 g)

10 % SDS (200 µl)

Aqua dest.

PCR - Mix (47 µl) :

10 x PCR Puffer (pH 8,3) = 500 mM KCl

+ 100 mM Tris + 0,1%iges Gelatin + HCL

0,2 mM d NTP

1 µM Primer My 09

1 µM Primer My 11

5 U/µl Taq-Polymerase

Aqua dest.

Indolyl-Phosphat-Lösung :

100 % Dimethylformamid (DMF)

5% 5-Bromo4-Chloro3-Indolylphosphat
(BCIP)

NBT-Lösung :

7,5 % Nitro Blue Tetrazolium

70 % DMF

Puffer 1 (pH 7,5) :

100 mM Tris

150 mM NaCl

HCl

nach Bedarf zur pH-Einstellung

Puffer 3 (pH 9,5) :

100 mM Tris

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

HCl

nach Bedarf zur pH-Einstellung

TE-Puffer :

10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 1 mM EDTA

Blot-Transferpuffer (10xTBE) :

0,089 M Tris + 0,089 M Borsäure + 2,5

mM EDTA

7.1.7. Mikrotomvorbereitung

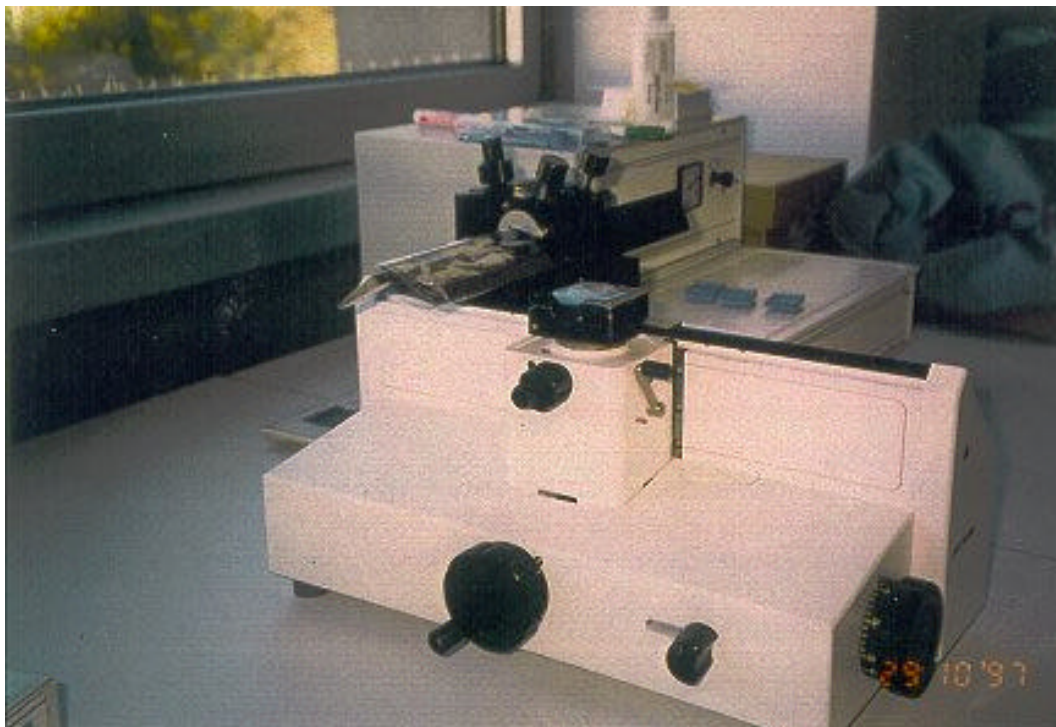


Abb. 1: Ummantelung des Mikrotomschlittens mit einer PVC-Folie um Kontaminationen während des Schneidevorganges zu verhindern.

7.2. Auflistung aller Proben in der untersuchten Reihenfolge

	PT - Nr. / Jahr	Alter	Befund (mit Hinweis auf weitere Konisate)	HPV-Typ	Eingang
1.	2098 / 94	24	Dysplasie (CIN 1)	16,66	18.1.94
2.	2845 / 94	21	Dysplasie (CIN 1) PT 583/95,PT19391/95	6	10.2.94
3.	4306 / 94	76	Dysplasie (CIN 3)	33,35	29.3.94
4.	4847 / 94	50	Dysplasie (CIN 3)	16	22.4.94
5.	5236 / 94	27	Dysplasie (CIN 2)	16	4.5.94
6.	6336 / 94	39	Dysplasie (CIN 3)	16	3.6.94
7.	6410 / 94	36	Dysplasie (CIN 3)	0	7.6.94
8.	6411 / 94	58	Dysplasie (VIN 2)	0	7.6.94
9.	6617 / 94	28	Dysplasie (CIN 3) PT 7476/94	0	10.6.94
10.	6623 / 94	43	Dysplasie (VIN 3) PT 7404/94	β-Glob. neg	10.6.94
11.	6919 / 94	34	Dysplasie (CIN 3)	0	17.6.94
12.	7084 / 94	36	Dysplasie (CIN 3) PT 7706/94	16	22.6.94
13.	7236 / 94	24	Dysplasie (CIN 3)	16,18	27.6.94
14.	7307 / 94	38	Dysplasie (CIN 3)	0	28.6.94
15.	7476 / 94	28	Dysplasie (CIN 3) s. 6617/94	31	4.7.94
16.	7695 / 94	41	Dysplasie (CIN 3)	18	8.7.94
17.	7705 / 94	25	Dysplasie (CIN 3)	16	8.7.94
18.	8207 / 94	21	Dysplasie (CIN 2)	31	22.7.94
19.	8215 / 94	36	Dysplasie (VIN 3)	0	22.7.94
20.	8248 / 94	28	Dysplasie (CIN 2)	6,16	25.7.94
21.	8303 / 94	21	Dysplasie (CIN 3)	0	26.7.94
22.	8374 / 94	26	Dysplasie (CIN 3) PT 10033/94	16	28.7.94
23.	8487 / 94	34	Dysplasie (CIN 3)	16	1.8.94
24.	8639 / 94	33	Dysplasie (CIN 2) PT 10348/94	6	4.8.94
25.	8700 / 94	31	Dysplasie (VIN 2)	16	8.8.94
26.	8813 / 94	28	Dysplasie (CIN 3)	16	12.8.94
27.	9099 / 94	79	Dysplasie (VIN 2)	16	26.8.94
28.	9294 / 94	34	Dysplasie (CIN 2)	6	1.9.94
29.	9297 / 94	25	Dysplasie (CIN 1)	MM7	1.9.94
30.	9303 / 94	41	Dysplasie (CIN 2) s.7629/94	0	2.9.94
31.	9738 / 94	45	Dysplasie (CIN 2)	33	13.9.94
32.	10033 / 94	26	Dysplasie (CIN 3) s. 8374/94	16	20.9.94
33.	10348 / 94	33	Dysplasie (CIN 3) s. 8639/94	16	28.9.94
34.	12153 / 94	32	Dysplasie (CIN 3)	16	9.11.94
35.	12444 / 94	29	Dysplasie (CIN 2)	0	15.11.94
36.	12700 / 94	37	Dysplasie (CIN 3)	0	22.11.94
37.	12737 / 94	27	Dysplasie (CIN 3)	16	23.11.94
38.	12831 / 94	25	Dysplasie (CIN 3)	MM9	24.11.94
39.	12935 / 94	27	Dysplasie (CIN 3)	18	28.11.94
40.	13116 / 94	23	Dysplasie (CIN 3)	16,18	1.12.94
41.	14261 / 94	45	Dysplasie (CIN 3)	16	30.12.94

	PT - Nr. / Jahr	Alter	Befund (mit Hinweis auf weitere Konisate)	HPV-Typ	Eingang
42.	583 / 95	22	Dysplasie (CIN 1) s. 2845/94 & s.19391/94	0	18.1.95
43.	746 / 95	29	Dysplasie (CIN 3)	33	20.1.95
44.	920 / 95	46	Dysplasie (CIN 3)	0	24.1.95
45.	1159 / 95	54	Dysplasie (VIN 3)	6	27.1.95
46.	1245 / 95	31	Dysplasie (VIN 2)	33	27.1.95
47.	1352 / 95	29	Dysplasie (CIN 3) PT 20564/95	16	31.1.95
48.	2134 / 95	19	Dysplasie (CIN 2)	0	13.2.95
49.	2454 / 95	33	Dysplasie (CIN 3)	0	16.2.95
50.	2497 / 95	31	Dysplasie (CIN 3)	6	17.2.95
51.	2692 / 95	46	Dysplasie (CIN 2)	0	21.2.95
52.	2797 / 95	38	Dysplasie (CIN 3)	16	22.2.95
53.	4058 / 95	39	Dysplasie (CIN 3)	16	15.3.95
54.	4153 / 95	27	Dysplasie (CIN 3)	35	16.3.95
55.	4233 / 95	34	Dysplasie (CIN 3)	β-Glob.neg	17.3.95
56.	4473 / 95	25	Dysplasie (CIN 3) PT 10275/95	16	22.3.95
57.	4829 / 95	26	Dysplasie (CIN 3)	16	27.3.95
58.	5712 / 95	25	Dysplasie (CIN 3)	16	12.4.95
59.	5791 / 95	28	Dysplasie (CIN 2)	35	13.4.95
60.	5858 / 95	20	Dysplasie (CIN 3) PT 6804/95	33	18.4.95
61.	5997 / 95	58	Dysplasie (VIN 3)	0	20.4.95
62.	7079 / 95	32	Dysplasie (CIN 3) PT 11433/95	16	11.5.95
63.	7446 / 95	33	Dysplasie (CIN 1)	0	16.5.95
64.	7710 / 95	25	Dysplasie (CIN 3)	16	19.5.95
65.	7772 / 95	26	Dysplasie (CIN 2)	16	19.5.95
66.	7910 / 95	28	Dysplasie (CIN 3)	6	23.5.95
67.	8217 / 95	37	Dysplasie (CIN 3)	16,35	29.5.95
68.	8321 / 95	30	Dysplasie (CIN 3)	16,33	30.5.95
69.	8499 / 95	31	Dysplasie (CIN 3)	31,35	1.6.95
70.	9285 / 95	42	Dysplasie (CIN 3)	0	15.6.95
71.	9388 / 95	51	Dysplasie (CIN 3)	NWnm	16.6.95
72.	9556 / 95	19	Dysplasie (CIN 1)	31	20.6.95
73.	9783 / 95	25	Dysplasie (CIN 3) PT 12138/95	16	23.6.95
74.	9978 / 95	36	Dysplasie (CIN 3)	16	27.6.95
75.	10117 / 95	64	Dysplasie (CIN 2)	0	29.6.95
76.	10534 / 95	35	Dysplasie (CIN 3)	33	6.7.95
77.	10551 / 95	28	Dysplasie (CIN 3)	16	6.7.95
78.	11135 / 95	29	Dysplasie (CIN 3) PT 15472/95	31	19.7.95
79.	11221 / 95	32	Dysplasie (CIN 3)	33	20.7.95
80.	11433 / 95	32	Dysplasie (CIN 3) s.7079/95	16	27.7.95
81.	12138 / 95	37	Dysplasie (CIN 3) s. 9783/95	0	11.8.95
82.	12181 / 95	32	Dysplasie (CIN 3)	0	11.8.95
83.	12371 / 95	75	Dysplasie (VIN 3)	16	15.8.95
84.	13105 / 95	23	Dysplasie (CIN 3)	16	25.8.95
85.	13198 / 95	31	Dysplasie (CIN 3)	16	28.8.95
86.	13245 / 95	24	Dysplasie (CIN 2) PT 13766/95	11,16	29.8.95
87.	13369 / 95	44	Dysplasie (CIN 3) PT 14238/95	16	30.8.95

	PT - Nr. / Jahr	Alter	Befund (mit Hinweis auf weitere Konisate)	HPV-Typ	Eingang
88.	13531 / 95	26	Dysplasie (CIN 3) s. 13467/95	0	31.8.95
89.	13618 / 95	26	Dysplasie (CIN 3) PT 17564/95	NWnm	1.9.95
90.	13993 / 95	17	Dysplasie (CIN 3) PT 16324/95	33	7.9.95
91.	14052 / 95	47	Dysplasie (VIN 3)	16	7.9.95
92.	14083 / 95	32	Dysplasie (CIN 2)	16	8.9.95
93.	14228 / 95	30	Dysplasie (CIN 3)	16	11.9.95
94.	14325 / 95	25	Dysplasie (CIN 3)	16	12.9.95
95.	14326 / 95	29	Dysplasie (CIN 3) PT 15473/95	16	12.9.95
96.	14399 / 95	34	Dysplasie (CIN 3)	35	12.9.95
97.	14404 / 95	42	Dysplasie (CIN 3)	0	12.9.95
98.	14557 / 95	24	Dysplasie (CIN 3)	16	14.9.95
99.	14761 / 95	33	Dysplasie (CIN 3)	53	15.9.95
100.	14963 / 95	35	Dysplasie (CIN 3) PT 16884/95	16	19.9.95
101.	15116 / 95	34	Dysplasie (CIN 3)	16	20.9.95
102.	15472 / 95	30	Dysplasie (CIN 3) s. 11135/95	31	25.9.95
103.	15633 / 95	36	Dysplasie (CIN 3)	16	26.9.95
104.	15634 / 95	28	Dysplasie (CIN 3) PT 1389/96	16	26.9.95
105.	15694 / 95	26	Dysplasie (CIN 2)	16	27.9.95
106.	16181 / 95	30	Dysplasie (CIN 3)	58	5.10.95
107.	16319 / 95	26	Dysplasie (CIN 2)	16	6.10.95
108.	16342 / 95	26	Dysplasie (CIN 3) s. 13993/95	16	6.10.95
109.	16345 / 95	45	Dysplasie (CIN 3)	16	6.10.95
110.	16491 / 95	52	Dysplasie (VIN 2)	64	10.10.95
111.	16790 / 95	37	Dysplasie (CIN 2)	18	12.10.95
112.	16969 / 95	24	Dysplasie (CIN 3)	6,16,31	16.10.95
113.	17108 / 95	38	Dysplasie (CIN 3) PT 18158/95	16,31	17.10.95
114.	17193 / 95	48	Dysplasie (CIN 3)	16	17.10.95
115.	17290 / 95	40	Dysplasie (CIN 3)	16	18.10.95
116.	17486 / 95	41	Dysplasie (CIN 2)	0	20.10.95
117.	17573 / 95	19	Dysplasie (VIN 3)	0	20.10.95
118.	19391 / 95	23	Dysplasie (CIN 1) s. 2845/94 s. 583/94	6	9.11.95
119.	1389 / 96	29	Dysplasie (CIN 2) s. 15634/95	18	18.1.96

	PT - Nr. / Jahr	Alter	Befund : Karzinom	HPV-Typ	Eingang
--	--------------------	-------	-------------------	---------	---------

120.	5877 / 94	45	Cervix CA	18	25.5.94
121.	9001 / 94	50	Cervix CA	16	23.8.94
122.	10597 / 94	38	Cervix CA	0	5.10.94
123.	13052 / 94	84	Vaginal CA	16	30.11.94
124.	13569 / 94	48	Cervix CA	NWnm	12.12.94
125.	14218 / 94	35	Cervix CA	16	29.12.94
126.	11 / 95	76	Cervix CA	33	2.1.95
127.	7557 / 95	30	Cervix CA	18	17.5.95
128.	9028 / 95	68	Vaginal CA	0	13.6.95
129.	13159 / 95	65	Cervix CA	18	25.8.95

	PT-Nr. / Jahr	Alter	Befunde : Leukoplakie der Portio und andere	HPV-Typ	Eingang
--	------------------	-------	--	---------	---------

130.	2816 / 94	29	Leukoplakie	16	9.2.94
131.	4046 / 94	26	Leukoplakie	β-Glob.neg	18.3.94
132.	5982 / 94	28	Leukoplakie	0	27.5.94
133.	11622 / 94	35	Leukoplakie	18	28.10.94
134.	5505 / 95	59	Leukoplakie	β-Glob.neg	7.4.95
135.	7655 / 95	35	Leukoplakie	6	18.5.95
136.	8078 / 95	37	Leukoplakie	16	24.5.95
137.	13987 / 95	50	Leukoplakie	0	7.9.95
138.	15435 / 95	38	Leukoplakie	0	22.9.95
139.	3559 / 95	25	papillomatöse Epithelhyperplasie	β-Glob.neg	7.3.95
140.	20564 / 95	30	enzündlich infiltrierte Portio s. 1352/95	0	21.11.95

7.3. Abkürzungsverzeichnis

CCA	Zervixkarzinom
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
HPV	Humanes Papilloma Virus
PCR - Std PCR - n PCR	Polymerase Chain Reaction - Standard PCR - nested-PCR
SIL -HSIL -LSIL	low grade squamous intraepithelial lesion High grade squamous intraepithelial lesion
STD	„sexually transmitted disease“, sexuell übertragbare Erkrankungen
VCA	Vulvakarzinom
VIN	vulväre intraepitheliale Neoplasie

Chemikalien

DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure-Dinatriumsalz Dihydrat
NaCL	Natriumchlorid
PK	Proteinase K

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Trinatriumcitrat-Natriumchlorid
TBE	Tris Borsäure EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin

7.4. Lebenslauf

Daniela Andrea Dansmann

Geburtsdatum:	15.09.1973	
Geburtsort:	Hamburg	
Vater:	Jürgen Dansmann, Kaufmann	
Mutter:	Ingeborg Greve, verw. Dansmann, Stewardess	
Geschwister:	Martina Greve, Studentin (Lehramt)	
Schulbildung	1980 – 1984	Grundschule Strenge, Hamburg
	1984 – 1988	Albert Schweizer Gymnasium, Hamburg
	1988 – 1993	Gymnasium Grootmoor, Hamburg
Schulabschluß	1993	Allgemeine Hochschulreife
Medizinstudium	SS 1993	Immatrikulation an der Universität Hamburg
	SS 1995	Physikum
	SS 1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	WS 1996	Amerikanisches Staatsexamen USMLE 1
	WS 1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	WS 1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

7.5. Danksagungen

Mein Dank gilt allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Sören Schröder, für die außerordentlich gute Betreuung und Herrn Dr. rer. nat. Thomas Meyer für seine kritischen Anregungen bei der Manuskriptgestaltung.