

Aus dem
Institut für Pathologie und Neuropathologie
Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie

**Der immunhistochemische Nachweis des humanen
Papillomavirus (HPV)-Onkoproteins E6 mittels
der Antikörperklone C1P5 und BF7, des
HPV-Onkoproteins E7 mittels des Antikörperklons
8E2 und des HPV-Hauptkapsidproteins L1 mittels
des Antikörperklons K1H8 bei HPV-induzierter
cervicaler intraepithelialer Neoplasie (CIN) und
invasiven Cervixcarcinomen bei unterschiedlichen
HPV-Subtypen mit Vergleich zur Expression
von p16 und Korrelation zu den CIN-Stadien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Siehr, Emelie Julia**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. Vogel

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. O. Kagan

Tag der Disputation: 07.11.2025

Meiner Tante Brigitte

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	XXVI
Geräte- und Materialliste	XXVIII
1 Einleitung	1
1.1 Cervicale intraepitheliale Neoplasie (CIN)	1
1.1.1 Definition und Einteilung	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Diagnostik	2
1.1.4 Prognose	4
1.1.5 Ätiologie und Pathogenese	5
1.2 Adenocarcinoma in situ (AIS)	7
1.2.1 Definition und Einteilung	7
1.2.2 Epidemiologie	7
1.2.3 Ätiologie und Pathogenese	7
1.2.4 Diagnostik	7
1.2.5 Prognose	8
1.3 Cervixcarcinome	8
1.3.1 Definition und Einteilung	8
1.3.2 Epidemiologie	11
1.3.3 Ätiologie und Pathogenese	13
1.3.4 Diagnostik	14
1.3.5 Prognose	17
1.4 Humane Papillomaviren	18
1.4.1 Einteilung der HPV-Typen	18
1.4.2 Epidemiologie	19
1.4.3 Kausale Pathogenese der HPV-Infektion	20
1.4.4 Mechanismen der malignen Transformation	23
1.5 Nachweismethoden für HPV	26

1.5.1	Immunhistologie _____	27
1.5.2	In situ Hybridisierung (ISH) _____	34
1.5.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) _____	35
1.6	Fragestellung und Zielsetzung _____	36
2	Material und Methoden _____	37
2.1	Material _____	37
2.1.1	Materialgewinnung _____	37
2.1.2	Standardfärbungen _____	38
2.1.3	Antikörper _____	38
2.1.4	Reagenzien _____	40
2.1.5	Optiview Detection Kit _____	42
2.2	Methoden _____	44
2.2.1	HE-Nachbegutachtung _____	44
2.2.2	Herstellung der Tissue Microarrays (TMAs) _____	44
2.2.3	Durchführung der immunhistochemischen Färbungen _____	46
2.2.4	Auswertungsmethode _____	52
2.2.5	Kontrollgewebe _____	55
3	Ergebnisse _____	57
3.1	Validierung der angewandten TMA-Technik _____	57
3.1.1	Zelllinien HeLa, SKBR3 und MCF7 _____	57
3.1.2	TMA K01 _____	57
3.1.3	Validität der angewandten TMA-Technik für die Studien-TMAs an den mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnittpräparaten _____	61
3.2	Antikörperklon C1P5 zum Nachweis des HPV 16/18-Onkoproteins E6 74	
3.2.1	Zelllinien HeLa, SKBR3 und MCF7 _____	74
3.2.2	TMA K01 Vergleich der unterschiedlichen Vorbehandlungen und Verdünnungen _____	75
3.2.3	Studien-TMAs _____	87
3.3	Antikörperklon BF7 zum Nachweis des HPV-Onkoproteins E6 ____	96
3.3.1	Zelllinien HeLa, SKBR3 und MCF7 _____	96
3.3.2	TMA K01 Vergleich der unterschiedlichen Verdünnungen ____	98

3.3.3	Studien-TMAs _____	106
3.4	Antikörperklon 8E2 zum Nachweis des HPV-Onkoproteins E7 ____	110
3.4.1	Zelllinien HeLa, SKBR3 und MCF7 _____	110
3.4.2	TMA K01 Vergleich der unterschiedlichen Verdünnungen ____	112
3.4.3	Studien-TMAs _____	124
3.5	Antikörperklon K1H8 zum Nachweis des HPV-Hauptkapsidproteins L1 138	
3.5.1	Zelllinien HeLa, SKBR3 und MCF7 _____	138
3.5.2	Negativkontrolle mit einem TMA mit malignen Mesotheliomen	138
3.5.3	TMA K01 Vergleich der unterschiedlichen Verdünnungen ____	141
3.5.4	Studien-TMAs _____	141
4	Diskussion _____	156
4.1	Validität der TMA-Technik _____	156
4.2	Bedeutung der Präanalytik _____	160
4.3	Wechselwirkung zwischen dem HPV Onkoprotein E6 und dem Tumorsuppressorprotein p53 und daraus resultierender Einfluss auf die IHC 162	
4.3.1	Relevanz der Gewebeherkunft bei der p53-Expression _____	163
4.4	Antikörper _____	163
4.4.1	Antikörperklon C1P5 _____	164
4.4.2	Antikörperklon BF7 _____	166
4.4.3	Antikörperklon 8E2 _____	167
4.4.4	Antikörperklon K1H8 _____	169
4.4.5	Vergleich der Antikörperklone C1P5, BF7, 8E2 und K1H8 mit der p16-Expression _____	173
5	Zusammenfassung _____	174
6	Literaturverzeichnis _____	177
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	188
8	Danksagung _____	189

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der CIN mit histologischen Merkmalen	3
Tabelle 2: pTNM-Klassifikation des Cervixcarcinoms 2020 (Tabelle nach : Horn et al. 2022 ; Kellner et al. 2019).....	10
Tabelle 3: HPV-assoziierte Adenocarcinome (Park 2020)	16
Tabelle 4: HPV-unabhängige Adenocarcinome (Park 2020).....	17
Tabelle 5: Übersicht p16 Antikörper	29
Tabelle 6: Übersicht Ki-67 Antikörper.....	30
Tabelle 7: Übersicht über die laut Literatur am formalinfixierten paraffinierten Material verwendbaren Antikörper zum Nachweis des E6-Onkoproteins.	31
Tabelle 8: Übersicht über die laut Literatur am formalinfixierten paraffinierten Material verwendbaren Antikörper zum Nachweis des E7-Onkoproteins.	32
Tabelle 9: Übersicht über die laut Literatur und Hersteller am formalinfixierten paraffinierten Material verwendbaren Antikörper zum Nachweis des L1-Hauptkapsidproteins.....	34
Tabelle 10: in der Studie verwendete Antikörper.....	39
Tabelle 11: Spezifität der in der Studie verwendeten Antikörper	39
Tabelle 12: Reagenzien	41
Tabelle 13: Optiview Detection Kit.....	42
Tabelle 14: Reagenzien des Optiview Detection Kits	43
Tabelle 15: Kategorisierung der p16-Expressionsmuster	52
Tabelle 16: Kategorisierung der Expression mit den Antikörperklonen C1P5, BF7, 8E2	54
Tabelle 17: Kategorisierung der Expression mit dem Antikörperklon K1H8	54
Tabelle 18: Vergleich der p16-, p53- und MIB-1-Expression bei dem TMA K01 zur Kontrolle der Immunogenität des Gewebes; PLECA= Plattenepithelcarcinom, AC= Adenocarcinom, wt= Wildtyp, VM= Verdacht auf Mutation im p53-Gen.....	59
Tabelle 19: An den Cores der TMAs erstellte histopathologische Diagnosen mit Angabe ihrer Häufigkeit	62
Tabelle 20: Anhand der HE-Färbung erhobene pathologische Diagnosen in Korrelation zur p16-Expression	63

Tabelle 21: HPV-Typen in Korrelation zur p16-Expression	67
Tabelle 22: Anhand der HE-Färbung erhobene pathologische Diagnosen in Korrelation zur p53-Expression	68
Tabelle 23: HPV-Typen in Korrelation zur p53-Expression	69
Tabelle 24: Anhand der HE-Färbung erhobene pathologische Diagnose in Korrelation zur MIB-1-Expression.....	71
Tabelle 25: HPV-Typen in Korrelation zu der MIB-1-Expression.....	73
Tabelle 26: HPV-Typen in Korrelation zur Expression von C1P5.....	89
Tabelle 27: pathologische Befunde in Korrelation zu der Expression von C1P5	92
Tabelle 28: HPV-Typen in Korrelation zur 8E2-Expression.....	129
Tabelle 29: pathologische Befunde in Korrelation zu der 8E2-Expression	133
Tabelle 30: HPV-Typen in Korrelation zu der K1H8-Expression	147
Tabelle 31: Übersicht der Fallzahl der einzelnen nach Herstellerangaben von K1H8 detektierten HPV-Typen	149
Tabelle 32: von K1H8 zu detektierende HPV-Typen in Korrelation zur K1H8- Expression.....	149
Tabelle 33: pathologische Befunde in Korrelation zur K1H8-Expression	153

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TMA 01: Mit Paraffingewebestanzzyklindern bestückter Probenhalter (Röntgenfilm mit doppelseitigem Klebeband) in einer Stahlmodel zur Erstellung des Paraffin-TMAs vor dem Überschichten mit Paraffin und vor dem anschließenden Aufschmelzen.....	46
Abbildung 2: TMA 01: Erkalteeter Paraffin-TMA mit Probenhalter auf der Oberfläche nach Herausnahme des TMA aus der Stahlmodel.....	46
Abbildung 3: TMA 01: Fertiger Paraffin-TMA nach Abziehen des Probenhalters.	46
Abbildung 4: TMA K01, Negativkontrolle ohne Zugabe von C1P5. Kein Nachweis einer unspezifischen Färbung. CC1, DAB, x5.....	57
Abbildung 5: TMA K01, Negativkontrolle ohne Zugabe von C1P5. Kein Nachweis einer unspezifischen Färbung. CC1, DAB, x290.....	58
Abbildung 6: TMA K01. p16-Färbung, DAB, x5.....	60
Abbildung 7: TMA K01, Core 01-03, Plattenepithelcarcinom, HPV 18. Links: p16-Färbung, Mitte: MIB-1-Färbung, Rechts: p53-Färbung. x10.....	60
Abbildung 8: CIN I. p16-Färbung, DAB, 15-fache Vergrößerung.....	64
Abbildung 9: VIN II. p16-Färbung, DAB, 15-fache Vergrößerung.....	64
Abbildung 10: CIN III. p16-Färbung, DAB, 20-fache Vergrößerung.....	64
Abbildung 11: CIN III, HPV 74, möglicherweise herabgesetzte Immunogenität des Gewebes. p16-Färbung, DAB, x40.....	65
Abbildung 12: CIN III, superfizielle Epithelschichten mit ausbleibender Färbung. p16-Färbung, DAB, 20-fache Vergrößerung.	65
Abbildung 13: VAIN II, möglicherweise herabgesetzte Immunogenität des Gewebes. p16-Färbung, DAB, 15-fache Vergrößerung.	65
Abbildung 14: CIN III, möglicherweise herabgesetzte Immunogenität des Gewebes. p16-Färbung, DAB, 25-fache Vergrößerung.	65
Abbildung 15: CIN III, HPV 18, keine Färbung. p16-Färbung, DAB, x40.....	66
Abbildung 16: keine Dysplasie, HPV 6, schwache p16-Expression. p16-Färbung, DAB, x20.....	66
Abbildung 17: keine Dysplasie, HPV 18, keine Färbung. p16-Färbung, DAB, x20.	66

Abbildung 18: CIN III, PCR negativ, p16-Färbung kräftig positiv. p16-Färbung, DAB, 15-fache Vergrößerung.	67
Abbildung 19: CIN III, PCR negativ, p16-Färbung kräftig positiv. p16-Färbung, DAB, 20-fache Vergrößerung.	67
Abbildung 20: CIN I, basale Epithelschicht gefärbt. MIB-1-Färbung, DAB, 20-fache Vergrößerung.	70
Abbildung 21: CIN II, mittleres Epitheldrittel gefärbt. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.	70
Abbildung 22: CIN III, superfizielle Epithelschicht gefärbt. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.	70
Abbildung 23: PLECA, nukleäre Färbung einzelner Zellen. MIB-1-Färbung, DAB, 40-fache Vergrößerung.	70
Abbildung 24: CIN II, ausbleibende MIB-1-Färbung in den superfiziellen Epithelschichten. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.	72
Abbildung 25: CIN III, ausbleibende MIB-1-Färbung in superfiziellen Epithelschichten. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.	72
Abbildung 26: Links: HeLa -Zellen mit starker nukleärer und zytoplasmatischer Färbung, Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen mit starker nukleärer und zytoplasmatischer Färbung. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], x440.	74
Abbildung 27: Markercore Leber, keine Färbung. C1P5-Färbung, Pronase [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	75
Abbildung 28: TMA K01, spärliche Zellen positiv. C1P5-Färbung, Pronase [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	76
Abbildung 29: TMA K01, spärliche Zellen positiv. C1P5-Färbung, Pronase [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	76
Abbildung 30: TMA K01, Plattenepithelcarcinom, HPV 18, keine Färbung. C1P5-Färbung, Pronase [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	77
Abbildung 31: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, keine Färbung. C1P5-Färbung, Pronase [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	77
Abbildung 32: Markercore Leber, punktförmige zytoplasmatische Färbung der Hepatozyten. C1P5-Färbung, CC2 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	78

Abbildung 33: TMA K01, PLECA, HPV 18, Tumorzellen fokal sehr schwach zytoplasmatisch positiv, Endothel positiv. C1P5-Färbung, CC2 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	78
Abbildung 34: TMA K01, PLECA, HPV 18, Tumorzellen fokal schwach positiv, Endothel und Erythrozyten schwach positiv. C1P5-Färbung, CC2 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	79
Abbildung 35: Markercore Leber, leichte zytoplasmatische unspezifische Färbung granulär. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	79
Abbildung 36: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, Fibroblasten, Endothel und glatte Muskulatur positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	80
Abbildung 37: TMA K01, glatte Muskulatur der Gefäßwand positiv, Endothel positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	80
Abbildung 38: TMA K01, PLECA, HPV 18, Endothel zytoplasmatisch positiv, Tumor fokal zytoplasmatisch schwach positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	81
Abbildung 39: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, Adenocarcinomzellen zytoplasmatisch schwach positiv, Stromazellen positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	81
Abbildung 40: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, zytoplasmatische Positivität. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	82
Abbildung 41: Markercore Leber, leichte zytoplasmatische unspezifische Färbung granulär. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.	82
Abbildung 42: TMA K01, PLECA, HPV 18, Endothel zytoplasmatisch positiv, Tumor fokal zytoplasmatisch schwach positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.	83
Abbildung 43: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, Adenocarcinom fokal positiv, Stromazellen positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.	83

Abbildung 44: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, Adenocarcinom und Stroma fokal zytoplasmatisch positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.	84
Abbildung 45: TMA K01, PLECA, HPV 16, Carcinom fokal schwach zytoplasmatisch positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.	84
Abbildung 46: Markercore Leber, leichte zytoplasmatische unspezifische Färbung granulär. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.	85
Abbildung 47: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, Adenocarcinom unterschiedlich stark positiv, Stromazellen ebenfalls positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:300], DAB, 40-fache Vergrößerung.	85
Abbildung 48: TMA K01, PLECA, HPV 16, PLECA fokal schwach zytoplasmatisch positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:300], DAB, 40-fache Vergrößerung.	86
Abbildung 49: Plattenepithel, keine Dysplasie, HPV 16, Zylinderepithel fast nicht gefärbt, Stroma und Endothel unspezifisch positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	88
Abbildung 50: Verruca vulgaris, HPV 2a, spärliche Plattenepithelzellkerne kräftig positiv, fraglich spezifische Färbung. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	88
Abbildung 51: CIN III, HPV 35, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	88
Abbildung 52: CIN III, Mischinfektion HPV 6, 11, 16, Epithel und Stroma gleichermaßen unspezifisch gefärbt. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	88
Abbildung 53: CIN I, PCR negativ, Epithel und Stroma stark positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	90
Abbildung 54: CIN III, PCR negativ, Epithel und Stroma stark positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB; 20-fache Vergrößerung.	90
Abbildung 55: CIN III, PCR negativ, Epithel und Stroma positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	90

Abbildung 56: Keine Dysplasie, HPV 16, Stroma und Endothel positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.....	91
Abbildung 57: CIN I, HPV 70, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.	91
Abbildung 58: CIN II, HPV 6, Epithel und Stroma gleichermaßen gefärbt. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 10-fache Vergrößerung.....	91
Abbildung 59: CIN III, HPV 33, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	91
Abbildung 60: CIN I, HPV 73, starke Färbung von Endothel und Stroma; schwache Epithelfärbung. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.	93
Abbildung 61: CIN II, HPV 56, partiell starke Färbung des Oberflächenepithels. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	93
Abbildung 62: CIN III, Mischinfektion HPV 6, 11, 16, 35, 44, starke Färbung von Endothel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.	93
Abbildung 63: VIN I, Mischinfektion HPV 33, 42. Schwache Färbung von Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.	93
Abbildung 64: VIN II, HPV 6, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.	94
Abbildung 65: VIN III, HPV 33, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB. 15-fache Vergrößerung.	94
Abbildung 66: VAIN II, HPV 56, Epithel und Stroma gleichermaßen gefärbt. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.	94
Abbildung 67: PLECA, HPV 45, unspezifische Färbung im Tumor und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	94
Abbildung 68: Condyloma acuminatum, HPV 2, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	95
Abbildung 69:Plattenepitheliale Hyperplasie, Mischinfektion HPV 31, 33, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	95

Abbildung 70: Verruca vulgaris, HPV 2a, spärliche Plattenepithelzellkerne kräftig positiv, fraglich regelhafte Färbung. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	95
Abbildung 71: Links: HeLa -Zellen, keine Färbung, Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen, schwache zytoplasmatische Positivität. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, x440.	96
Abbildung 72: Links: HeLa -Zellen, keine Färbung, Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, x440.....	96
Abbildung 73: Links: HeLa -Zellen, keine Färbung, Mitte und rechts: SBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:200], DAB, x440.....	97
Abbildung 74: Links: HeLa -Zellen, keine Färbung, Mitte und rechts: SBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:500], DAB, x440.....	97
Abbildung 75: Markercore Leber, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.	98
Abbildung 76: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, unspezifische Färbung im Stroma. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	99
Abbildung 77: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, Carcinom negativ, Plasmazellen positiv. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.	99
Abbildung 78: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, unspezifische Färbung im Carcinom. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	99
Abbildung 79: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, Stroma unspezifisch gefärbt. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	99
Abbildung 80: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ für HPV, sehr schwache, kaum erkennbare Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.	100
Abbildung 81: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, sehr schwache, kaum erkennbare Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 20-fache Vergrößerung.	100
Abbildung 82: TMA K01, Adenocarcinom, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.	100

Abbildung 83: TMA K01, HPV 16, PLECA, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.	100
Abbildung 84: Markercore Leber, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	101
Abbildung 85: TMA K01, Plattenepithelcarcinom, HPV 16, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	101
Abbildung 86: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	101
Abbildung 87: Markercore Leber, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.	102
Abbildung 88: TMA K01, PLECA, HPV 18, keine Färbung der Tumorzellen. BF7-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 20-fache Vergrößerung.	103
Abbildung 89: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, keine Färbung des Adenocarcinoms. BF7-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 20-fache Vergrößerung.	103
Abbildung 90: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ für HPV, keine Färbung des Carcinoms. BF7-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 20-fache Vergrößerung. ...	103
Abbildung 91: Markercore Leber, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.	104
Abbildung 92: TMA K01, PLECA, HPV 18, keine Färbung der Tumorzellen. BF7-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 20-fache Vergrößerung.	105
Abbildung 93: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, keine Färbung des Adenocarcinoms. BF7-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 20-fache Vergrößerung.	105
Abbildung 94: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ für HPV, keine Färbung des Carcinoms. BF7-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 20-fache Vergrößerung. ...	105
Abbildung 95: TMA 5, Core 02-01, keine Dysplasie, HPV 66, schwache nukleäre Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	106
Abbildung 96: TMA 5, Core 02-01, keine Dysplasie, HPV 66. 40-fache Vergrößerung. Links: p16-Färbung, Mitte: p53-Färbung, Rechts: MIB-1-Färbung.	107
Abbildung 97: VIN II, HPV 6, Makrophagen unspezifisch zytoplasmatisch positiv. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	108

Abbildung 98: VIN II, HPV 6, Makrophagen unspezifisch zytoplasmatisch positiv. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	108
Abbildung 99: CIN I, HPV 56, Kollagen fokal zytoplasmatisch positiv. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	108
Abbildung 100: CIN III, HPV 18, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	109
Abbildung 101: PLECA, HPV 18, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	109
Abbildung 102: Links: HeLa -Zellen, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung mit hoher Intensität, Mitte und rechts: SBR3- und MCF7-Zellen mit schwacher unspezifischer zytoplasmatischer Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, x440.	110
Abbildung 103: Links: HeLa -Zellen, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung mit hoher Intensität, Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen mit fokal unspezifischer zytoplasmatischer Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, x440.	111
Abbildung 104: Links: HeLa -Zellen, zytoplasmatische Färbung. Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, x440.	111
Abbildung 105: Links: HeLa -Zellen, zytoplasmatische Färbung. Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, x440.	111
Abbildung 106: Markercore Leber, unspezifische zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.	112
Abbildung 107: TMA K01, Core 03-04, Adenocarcinom, PCR negativ für HPV, Epithel stark positiv, Stroma schwach positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 20-fache Vergrößerung.	112
Abbildung 108: TMA K01, Core 03-01, Adenocarcinom, HPV 18, Tumor zytoplasmatisch positiv, unspezifische Färbung des Stromas. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 20-fache Vergrößerung.	113

Abbildung 109: TMA K01, Core 03-01, Adenocarcinom, HPV 18, unspezifische Färbung des Stromas. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 20-fache Vergrößerung.	113
Abbildung 110: TMA K01, Core 02-03, PLECA, PCR negativ, Epithel, Endothel und Entzündungszellen unspezifisch positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.	113
Abbildung 111: TMA K01, Core 02-01, PLECA, HPV 16, unspezifische Tumorepithel- und Stromafärbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.	113
Abbildung 112: Markercore Leber, fokale unspezifische zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	115
Abbildung 113: TMA K01, Core 03-04, Adenocarcinom, PCR negativ, Tumorzellen positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	115
Abbildung 114: TMA K01, Core 02-04, PLECA, HPV 56, Verhornung schwach positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	115
Abbildung 115: TMA K01, Core 02-01, PLECA, HPV 16, randständige relativ starke nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	116
Abbildung 116: TMA K01, Core 01-02, PLECA, HPV 18, starke Färbereaktion. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	116
Abbildung 117: TMA K01, Core 03-02, Adenocarcinom, HPV 18, unspezifische Färbung des Stromas. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	116
Abbildung 118: TMA K01, Core 03-03, PLECA, PCR negativ, unspezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	117
Abbildung 119: TMA K01, Core 02-02, Adenocarcinom, PCR negativ, wohl unspezifische Färbung im Stroma. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	117
Abbildung 120: TMA K01, Core 03-04, glatte Muskulatur zytoplasmatisch schwach gefärbt. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	117

Abbildung 121: TMA K01, Core 02-04, PLECA, HPV 56, Tumor negativ, unspezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	117
Abbildung 122: Markercore Leber, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.	119
Abbildung 123: TMA K01, Core 01-02, PLECA, HPV 18, starke zytoplasmatische Positivität der Tumorzellen. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.	119
Abbildung 124: TMA K01, Core 03-01, Adenocarcinom, HPV 18, leichte zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 20-fache Vergrößerung.	119
Abbildung 125: TMA K01, Core 03-04, Adenocarcinom, PCR negativ, wohl unspezifische Färbung des Carcinoms. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.	120
Abbildung 126: TMA K01, Core 02-01, PLECA, HPV 16, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	120
Abbildung 127: TMA K01, Core 02-04, PLECA, HPV 56, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	120
Abbildung 128: Markercore Leber, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	122
Abbildung 129: TMA K01, Core, 01-02, PLECA, HPV 18, starke zytoplasmatische Positivität. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.	122
Abbildung 130: TMA K01, Core 02-01, PLECA, HPV 16, randständige schwache nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.	122
Abbildung 131: TMA K01, Core 03-01, Adenocarcinom, HPV 18, zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 20-fache Vergrößerung.	123
Abbildung 132: TMA K01, Core 03-04, Adenocarcinom, PCR negativ, wohl unspezifische Färbung des Carcinoms. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.	123

Abbildung 133: TMA K01, Core 02-04, PLECA, HPV 56, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	123
Abbildung 134: CIN III, Mischinfektion HPV 6, 11, 16, 35, 42, schwache nukleäre basalständige Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	125
Abbildung 135: keine Dysplasie, HPV 73, mäßige, nukleäre Färbung der basalen und superfiziellen Epithelschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.	125
Abbildung 136: CIN III, HPV 18, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung durch alle Epithelschichten. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	125
Abbildung 137: keine Dysplasie, HPV 66, fraglich spezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	126
Abbildung 138: Verruca vulgaris, HPV 2a, fraglich spezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	126
Abbildung 139: CIN I, HPV 6, Koilozyten stark positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	126
Abbildung 140: Unklare Diagnose, vermutlich CIN II, HPV 42, fraglich spezifische nukleäre superfizielle Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	126
Abbildung 141: CIN III, PCR negativ, sehr schwache basalständige nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	126
Abbildung 142: CIN III, HPV 18, Färbung der Dysplasie, Stroma ebenfalls positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	126
Abbildung 143: CIN III, Mischinfektion HPV 6, 11, 16, fraglich spezifische nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.	126
Abbildung 144: Condyloma acuminatum, HPV 2, starke superfizielle und schwache basale zytoplasmatische Färbung, fraglich spezifisch. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.....	127

Abbildung 145: CIN III, HPV 56, nukleäre Färbung über alle Epithelschichten, Stroma negativ, fraglich spezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	127
Abbildung 146: CIN III, HPV 18, nukleäre und zytoplasmatische Färbung über alle Epithelschichten mit schwacher Intensität, Stroma negativ, fraglich spezifisch. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	127
Abbildung 147: PLECA, HPV 18, spezifisch erscheinende Färbung im Tumor, Stroma negativ. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung. ...	127
Abbildung 148: VIN II, HPV 6, Makrophagen stark positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	128
Abbildung 149: PLECA, HPV 18, PLECA stark zytoplasmatisch und nukleär positiv, Stroma zytoplasmatisch positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	128
Abbildung 150: CIN III, HPV 18, Stroma und Zylinderepithel positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.....	128
Abbildung 151: PLECA, HPV 16, Blut und Endothel positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	128
Abbildung 152: keine Dysplasie, HPV 56, glatte Muskulatur der Gefäßwand positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	129
Abbildung 153: keine Dysplasie, HPV 73, schwache nukleäre Färbung der basalen und starke nukleäre Färbung der superfiziellen Zellschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.....	130
Abbildung 154: CIN I, PCR negativ, schwache nukleäre basalständige und superfizielle Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	130
Abbildung 155: CIN I, HPV 91, partiell starke nukleäre Färbung der basalen und superfiziellen Schicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.	130
Abbildung 156: CIN III, Mischinfektion 6, 11, 16, nukleäre Färbung durch alle Epithelschichten. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	130

Abbildung 157: CIN III, Mischinfektion HPV 6, 11, 16, 35, 44, nukleäre Färbung der basalen Epithelschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	130
Abbildung 158: CIN III, PCR negativ, schwache nukleäre Färbung der basalen Epithelschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	130
Abbildung 159: CIN III, HPV 18, nukleäre und zytoplasmatische Färbung über alle Epithelschichten mit schwacher Intensität, fraglich spezifisch. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	131
Abbildung 160: CIN III, HPV 31, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung durch alle Epithelschichten. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	131
Abbildung 161: CIN III, HPV 56, schwache nukleäre Färbung durch alle Epithelschichten. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	131
Abbildung 162: CIN III, HPV 16, schwache nukleäre Färbung in der basalen Epithelschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	131
Abbildung 163: Unklare Diagnose, HPV 6, starke nukleäre Färbung in der superfiziellen Epithelschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.	131
Abbildung 164: PLECA, HPV 18, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung, fraglich spezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	131
Abbildung 165: CIN III, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	132
Abbildung 166: PLECA, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	132
Abbildung 167: PLECA, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	132
Abbildung 168: CIN III, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	132
Abbildung 169: CIN III, HPV 18, mäßiges Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	133

Abbildung 170: keine Dysplasie, HPV 18, schwaches basalständiges Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung. ...	133
Abbildung 171: CIN III, HPV 56, schwache Färbung in den superfiziellen Epithelschichten. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB; 40-fache Vergrößerung.	134
Abbildung 172: CIN I, HPV 6, mäßige Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.	134
Abbildung 173: CIN I, HPV 91, starke nukleäre Färbung des oberen Epitheldrittels und schwache basale Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.	134
Abbildung 174: PLECA, HPV 18, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	135
Abbildung 175: PLECA, HPV 16, mittelstarke zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	135
Abbildung 176: PLECA, HPV 45, mittelstarke zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	135
Abbildung 177: keine Dysplasie, HPV 18, schwaches Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	136
Abbildung 178: keine Dysplasie, HPV 18, mäßiges Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	136
Abbildung 179: CIN III, HPV 18, mäßiges Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	136
Abbildung 180: CIN III, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	136
Abbildung 181: PLECA, HPV 18, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB; 40-fache Vergrößerung.	136
Abbildung 182: PLECA, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.	136
Abbildung 183: VIN I, Mischinfektion HPV 33,42, schwache basalständige nukleäre Färbung des Epithels. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	137
Abbildung 184: VIN III, HPV 16, starke Färbung des Epithels, Stroma ebenfalls positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.	137

Abbildung 185: Links: HeLa -Zellen, keine Färbung, Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, x440.	138
Abbildung 186: TMA Meso, Markercore Leber, wohl eher kein Lipofuszin der Leber, sondern eher eine unspezifische Färbung des HPV-Antikörpers. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	139
Abbildung 187: TMA Meso, Mesotheliom, wenige Zellen mit braunem granulärem Zytoplasma. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	139
Abbildung 188: TMA Meso, Mesotheliom, Braune Granula im Zytoplasma einzelner Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	139
Abbildung 189: TMA Meso, Mesotheliom, Blut mit fraglich unspezifischer Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	139
Abbildung 190: TMA Meso, Mesotheliom, fraglich unspezifische Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	140
Abbildung 191: TMA Meso, Mesotheliom, Plasmazelle zytoplasmatisch positiv. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	140
Abbildung 192: TMA Meso, Mesotheliom, fokal wenige Zellen mit zytoplasmatischer Positivität. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	140
Abbildung 193: TMA Meso, Mesotheliom, wenige Tumorzellen mit feinen braunen Granula. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	140
Abbildung 194: Keine Dysplasie, HPV 16, sehr schwache oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	141
Abbildung 195: Keine Dysplasie, PCR negativ, schwache nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	141
Abbildung 196: CIN I, HPV 35, starke nukleäre Expression in den superfiziellen Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	142

Abbildung 197: CIN I, PCR negativ, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	142
Abbildung 198: CIN I, HPV 6, spärliche Einzelzellularfärbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	142
Abbildung 199: CIN I, HPV 11, starke nukleäre Expression in den superfiziellen Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	142
Abbildung 200: CIN II, HPV 58, oberflächliche Färbung fraglich spezifisch. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	143
Abbildung 201: CIN III, HPV 11, schwache nukleäre Färbung der superfiziellen Epithelschicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	143
Abbildung 202: CIN I, HPV 56, oberflächliche Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	143
Abbildung 203: CIN I, Mischinfektion HPV 18,31, spärliche Zellen oberflächlich positiv. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	143
Abbildung 204: CIN III, HPV 16, schwache oberflächliche Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	143
Abbildung 205: CIN III, HPV 18, starke nukleäre Anfärbung der Zellen der mittleren und superfiziellen Schicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	143
Abbildung 206: Plattenepitheliale Hyperplasie, Mischinfektion HPV 31,33, spärliche schwache oberflächliche Färbung im Epithel, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	144
Abbildung 207: Condyloma acuminatum, Mischinfektion HPV 6, 11, nukleäre Färbung weniger Zellen der superfiziellen Epithelschicht, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	144
Abbildung 208: CIN II, Mischinfektion HPV 16, 43, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.	144
Abbildung 209: Condyloma acuminatum, HPV 6, Färbung der Koilozyten, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 10-fache Vergrößerung.	144

Abbildung 210: VAIN II, HPV 56, starke nukleäre Zellen der superfiziellen Schicht, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.	145
Abbildung 211: CIN I, HPV 91, schwache nukleäre Färbung der superfiziellen Epithelschichten, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	145
Abbildung 212: CIN III, HPV 58, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.	145
Abbildung 213: keine Dysplasie, HPV 16, Verschmutzung, fraglich unspezifische Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	146
Abbildung 214: CIN III, HPV 18, einzelne Zellen im Stroma positiv. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	146
Abbildung 215: keine Dysplasie, HPV 73, oberflächliche Färbung im Zylinderepithel. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	146
Abbildung 216: keine Dysplasie, HPV 56, möglicherweise unspezifische Färbung im Zylinderepithel. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	146
Abbildung 217: keine Dysplasie, HPV 11, fraglich unspezifische Färbung im Stroma. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	147
Abbildung 218: CIN I, HPV 33, wohl unspezifische Färbung in Entzündungszellen des Stromas; im Epithel nur hauchdünne strichförmige, wohl unspezifische Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	147
Abbildung 219: CIN III, HPV 18, starke nukleäre Zellen der mittleren und superfiziellen Schicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	148
Abbildung 220: CIN I, PCR negativ, nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	148

Abbildung 221: keine Dysplasie, PCR negativ, schwache nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	148
Abbildung 222: CIN I, PCR negativ, spärliche oberflächliche Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	148
Abbildung 223: Condyloma acuminatum, Mischinfektion HPV 6, 11, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	150
Abbildung 224: keine Dysplasie, HPV 16, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	150
Abbildung 225: CIN III, Mischinfektion, HPV 18, 33, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	150
Abbildung 226: CIN I, HPV 6, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	150
Abbildung 227: CIN III, HPV 11, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	151
Abbildung 228: CIN I, HPV 16, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	151
Abbildung 229: CIN II, HPV 56, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.....	151
Abbildung 230: CIN III, HPV 56, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	151
Abbildung 231: VIN I, Mischinfektion HPV 33, 42, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.	151
Abbildung 232: Unklare Diagnose, vermutlich CIN II, HPV 42, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	151
Abbildung 233: CIN III, HPV 58, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.....	152
Abbildung 234: CIN II, Mischinfektion HPV 16, 43, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.	152

Abbildung 235: CIN III, HPV 18, starke nukleäre Färbung der mittleren und superfiziellen Schicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.	152
Abbildung 236: CIN I, HPV 6, nukleäre Färbung von Zellen der superfiziellen Epithelschichten. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 25-fache Vergrößerung	152
Abbildung 237: CIN I, HPV 11, starke nukleäre Zellen der superfiziellen Schicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.....	152
Abbildung 238: VAIN II, HPV 56, starke nukleäre Zellen der superfiziellen Schicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.	152
Abbildung 239: PLECA, HPV 16, keine Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	154
Abbildung 240: PLECA, HPV 18, keine Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	154
Abbildung 241: PLECA, HPV 45, leichte zytoplasmatische und nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	154
Abbildung 242: CIN III, HPV 16, keine Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	154
Abbildung 243: CIN III, HPV 35, keine Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	154
Abbildung 244: VIN III, HPV 16, schwache zytoplasmatische Färbung, fraglich unspezifisch. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.	155
Abbildung 245: VIN I, Mischinfektion HPV 33, 42, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.	155
Abbildung 246: VIN II, HPV 6, zytoplasmatische Färbung, Makrophagen gefärbt. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.....	155
Abbildung 247: VIN I, HPV 55, zytoplasmatische Färbung fraglich unspezifisch. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.....	155
Abbildung 248: CIN III, ausbleibende p16-Expression in superfiziellen Epithelschichten. p16-Färbung, DAB, 20-fache Vergrößerung.....	160

Abbildung 249: CIN III, ausbleibende MIB-1-Färbung in superfiziellen Epithelschichten. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.	160
Abbildung 250: CIN III, Expressionsmuster einer MIB-1-Färbung bei CIN III, superfizielle Epithelschicht gefärbt. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.	161

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenocarcinom
AG	Antigen
AIS	Adenocarcinoma in situ
AK	Antikörper
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CIN	Cervicale intraepitheliale Neoplasie
DD	Differentialdiagnose
DLG1	Disc large homolog 1
E6-AP	Syn. Ubiquitinligase UBE3A
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPV	Humane Papilloma Viren
HQ	Proprietäres Hapten, das kovalent an die Ziegen-An- tikörper gebunden ist
HR	High-risk
HSIL	High-grade squamöse intraepitheliale Läsion
hTERT	Humane Telomerase reverse Transkriptase
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IECC	International Endocervical Adenocarcinoma Classification
IHC	Immunhistochemie
ISH	In situ Hybridisierung
LCR	Long control region
LR	Low-risk
LSIL	Low-grade squamöse intraepitheliale Läsion
MIB	Molecular Immunology Borstel

MKI67	Marker of proliferation Ki-67
N:C	Nucleus:Cytoplasma
NOS	Not otherwise specified
p16	Syn. p16INK4a
PAP	Papanicolaou
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	Zusammensetzung namensgebender Proteine: P = Postsynaptisches Protein PSD95 D = Tumorsuppressor Disks large 1 (dlg1) in Drosophila melanogaster Z = Tight-Junction-Protein ZO-1
PLECA	Plattenepithelcarcinom
pRB	Retinoblastomprotein
pTNM	P = Erkenntnis aus histopathologischer Untersuchung T = Tumor N = Nodus M = Metastasen
RB	Retinoblastom
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
rtu	Ready to use
SIL	Squamöse intraepitheliale Läsion
TMA	Tissue microarray
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VAIN	Vaginale intraepitheliale Neoplasie
VIN	Vulväre intraepitheliale Neoplasie
WHO	World Health Organization

Geräte- und Materialliste

Antikörper

Mouse monoclonal Anti-HP-18-E6, Clone **BF7**,
Abcam, Cambridge, UK

Mouse monoclonal Anti-HPV-16-E6 + HPV-18-E6,
Clone **C1P5**, Abcam, Cambridge, UK

Mouse monoclonal Anti-HPV-18-E7, Clone **8E2**,
Abcam, Cambridge, UK

Mouse monoclonal Anti-HPV, Clone **K1H8**,
Abcam, Cambridge, UK

Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen,
Clone **MIB-1**, Aglient DAKO, Santa Clara, USA

p16, Clone **INK4a**, Cintec/Roche, Basel, Schweiz

p53, Clone **DO-7**, Novocastra, Nussloch, Deutsch-
land

Computer

ACER Spin 3, Acer, SP314-21-R529

Doppelseitiges Klebe- band

Tesafix 4934, Tesa, 35mm x 25m

Epredia Cool-Cut

Epredia™ 771120, Art.-Nr.: 12617886
Epredia Europe GmbH,
Basel, Schweiz

Epredia Microtom	Epredia™ H355S Epredia Europe GmbH, Basel, Schweiz
Epredia Section Transfer System	Epredia™ 771200 , Art.-Nr.: 11321820 Epredia Europe GmbH, Basel, Schweiz
Hautbiopsiestanze	3mm Durchmesser 5mm Durchmesser
Kälteplatte	Typ: MPS/C SN: I1200034 SLEE medical GmbH, Mainz, GER
Kassette	Bionet cassettes in stripped stacks (white) 25x40 Fa-Tech Diagnostics Europe BV, Duiven, Netherlands
Objektträger	Microscope KP frost Slider orange (Klinipath) REF KP-3044 (59 Stk.) TOMO IHC Adhesive Glass Slide REF TOM- 1190 SN: 31592176 MT Promedt Consulting GmbH, St. Ingbert, GER

Paraffinausgießgerät	Typ: MPS/P, SN: G1200028 SLEE medical GmbH, Mainz, GER
Pas.Net Patientendatei	Firma Nexus AG Krankenhausinformationssysteme, Medizin Software, Villigen-Schwenningen, GER
Röntgenfolie	
Stift	Multimark 1525 permanent , Faber Castell
Ventana BenchMark ULTRA	Firma Ventana/ Roche Basel, Schweiz
Wärmeplatte	Typ: MPS/P, SN: G1200028 SLEE medical GmbH, Mainz, GER
Wasserbad	pmf Waterbath 100 REF: 041010, SN: 310342 pmf medical ag, Köln, GER
Zeiss Mikroskop	Axioskop 40, SN: 3308001057 Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, GER,
Zeissmikroskop Kamera	Typ: ProgResC10plus, SN: 1807-00-1053 Jenoptix, Laser Optik Systems GmbH, Jena, GER

1 Einleitung

1.1 Cervicale intraepitheliale Neoplasie (CIN)

1.1.1 Definition und Einteilung

Die cervicale intraepitheliale Neoplasie (CIN) ist eine Vorstufe des malignen epithelialen Tumors der Cervix, die durch die Störung der normalen Epithelarchitektur gekennzeichnet ist. Charakteristisch sind atypische, dysplastische Zellen und Reifungsanomalien, die das regelrecht geschichtete Plattenepithel verdrängen (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Im Gegensatz zum Cervixcarcinom durchbricht das dysplastische Epithel dabei nicht die Basalmembran. Eine CIN geht nicht zwingend in ein Cervixcarcinom über.

Die CIN wird in drei Grade eingeteilt. Man unterscheidet zwischen einer gering-, mittel- und hochgradigen Dysplasie (CIN I, II, III). Die hochgradige Dysplasie wird mit einem Carcinoma in situ gleichgesetzt und weist atypische Zellen in allen Epithelschichten auf. Analog erfolgt diese Einteilung im Bereich der Vulva (VIN I-III) und der Vagina (VAIN I-III) (Kellner et al. 2019). Die durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) erstellte neue einheitliche Klassifikation der Präkanzerosen im anogenitalen Bereich unterscheidet zwischen einer low-grade squamösen intraepithelialen Läsion (LSIL) und einer high-grade squamösen intraepithelialen Läsion (HSIL). Die LSIL ist einer CIN I gleichzusetzen, während die HSIL einer CIN II und III entspricht (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit eines zweistufigen Systems wird mittlerweile die Terminologie nach der WHO-Klassifikation bevorzugt.

1.1.2 Epidemiologie

Deutschlandweit erkranken jährlich rund 300000 Frauen an einer CIN (Kellner et al. 2019). In der gescreenten Bevölkerung liegt die Prävalenz einer LSIL im Querschnitt bei 5-10 %, während die einer HSIL bei 0,5-1 % liegt (WHO 2020).

In 68 % der prämaligen Läsionen kann eine HPV-Infektion nachgewiesen werden (Anderson et al. 2016). Bei jungen Frauen Anfang 20 ist die HPV-Prävalenz am größten (WHO 2020). Obwohl die Häufigkeit einer HPV-Infektion mit zunehmendem Lebensalter sinkt, steigt das Risiko einer HSIL.

Eine HSIL manifestiert sich überwiegend im vierten Lebensjahrzehnt (Kellner et al. 2019). Dennoch kann eine HSIL auch bei jüngeren Frauen im zweiten Lebensjahrzehnt vorkommen (WHO 2020)

1.1.3 Diagnostik

Makroskopisch können die Läsionen der CIN mittels Essigsäure unter kolposkopischer Betrachtung sichtbar gemacht werden und erscheinen weißlich (WHO 2020). Der Essigsäuretest ist allerdings ungenau und sollte daher durch weitere Untersuchungen ergänzt werden. Klassischerweise wird eine CIN durch Zytologie oder Histologie nachgewiesen (Riede, Werner & Schaefer 2004). Eine Untersuchungsmethode zur Früherkennung einer CIN ist der jährliche Papanicolaou- (PAP) Zellabstrich. Die PAP-Befunde werden in fünf Stufen eingeteilt, wobei bei einem PAP-Befund ab Stufe drei eine weitere histopathologische Abklärung indiziert ist. Die Diagnostik ist bei Frauen ab der Menopause erschwert. Dies liegt an der postmenopausalen Retraktion der Transformationszone von der Ekto- in die Endocervix. In fast 50 % der Abstrichzytologien bleiben Cervixcarcinome unentdeckt (Hoefer, Kreipe & Moch 2019). Die Abstrichzytologie ist somit als alleinige Screeningmethode ungenau.

Nach einer EU-Empfehlung aus dem Jahr 2015 sollte daher ein RNA-basiertes HPV-Screening, durch das die mRNA viraler Onkoproteine wie E6 und E7 nachgewiesen werden kann, der Zytologie vorangestellt werden (European Commission et al. 2015; WHO 2021).

Die Einteilung der CIN erfolgt nach dem Ausmaß der Dysplasie. Tabelle 1 soll eine Übersicht über die möglichen Einteilungen der CIN in Korrelation zu den histologischen Merkmalen geben.

CIN-Klassifikation	CIN I	CIN II	CIN III
PAP-Korrelation	PAP IID1	PAP IID2	PAP IV
WHO-Klassifikation	LSIL	HSIL	
		HSIL (CIN II)	HSIL (CIN III)
Histologische Merkmale	<ul style="list-style-type: none"> • Atypien (=Hyperchromasie, grobes Chromatin, unregelmäßige Membranen) in voller Epithelbreite • Mitosen auf das untere Epitheldrittel beschränkt • Koilozyten mit deutlich erhaltenen Differenzierungsmerkmalen • niedriges N:C-Verhältnis 	<ul style="list-style-type: none"> • Atypien in voller Epithelbreite • Mitosen bis in die oberen zwei Drittel des Epithels • Koilozyten • oberflächliche Zellschichtung noch gut differenzierbar • erhöhtes N:C-Verhältnis 	<ul style="list-style-type: none"> • Atypien in voller Epithelbreite (kein Reifungsunterschied in den Schichten) • Mitosen in allen Epithelschichten • Koilozyten • erhöhtes N:C-Verhältnis (v. a. in den oberen Epithelschichten) • Zytoplasma variiert von zart dicht bis metaplastisch

Tabelle 1: Einteilung der CIN mit histologischen Merkmalen

Die Klassifizierung der Läsionen ist auch für geübte Patholog:innen schwer. Dies zeigt sich vor allem bei LSILs und bei moderaten HSILs (CIN II). Die Hälfte der Biopsien, die zunächst als LSIL eingestuft werden, stellen sich bei zweiter Beurteilung als gutartige entzündliche Plattenepithelien heraus (WHO 2020). Nicht nur die Differenzierung zwischen reaktiver Entzündung und LSIL ist schwer, sondern auch diejenige zwischen LSIL und einer moderaten HSIL (CIN II).

Atypien in oberen Epithelschichten sind bei signifikanter Menge an Zytoplasma dennoch einer LSIL zuzuordnen, was zu häufigen Fehlern in der Routinepathologie führt (WHO 2020).

Eine immunhistochemische Färbung von p16 ist für die Diagnostik in den beiden oben genannten Fällen nicht sinnvoll. Zum einen wird bei vielen LSILs p16 nicht hochreguliert. Zum anderen kommt es bei der Unterscheidung zwischen einer LSIL und einer moderaten HSIL zu falsch positiven Ergebnissen, wenn die HSIL p16 exprimiert. Auf den Mechanismus der Expression von p16 wird in Kapitel 1.4.4 eingegangen. Bereits hier kann vorweggenommen werden, dass p16 Charakteristika eines Tumorsuppressors aufweist, indem es das Fortschreiten des Zellzyklus von der G1-Phase in die S-Phase verhindert. Direkte HPV-Tests könnten in den Fällen, bei denen p16 keine weiteren Erkenntnisse für die Diagnostik bieten kann, eine Schlüsselrolle spielen (WHO 2020).

Bei ausgedehnten HSILs, bei denen eine Beteiligung der drüsenartigen Krypten der Endocervix und gegebenenfalls nekrotische oder keratinisierte Areale erkennbar sind, muss differentialdiagnostisch ein Cervixcarcinom ausgeschlossen werden (WHO 2020).

1.1.4 Prognose

Die Progressionswahrscheinlichkeit einer CIN zu einem invasiven Tumor steigt mit dem Grad der Läsion. Eine LSIL bildet sich in 90 % der Fälle zurück (WHO 2020). Eine Progression ist in 10 % der Fälle zu erwarten, von denen weniger als 2 % ein Cervixcarcinom entwickeln (Hoeffler, Kreipe & Moch 2019; Kellner et al. 2019). Der Versuch, Biomarker für die prognostische Progressionswahrscheinlichkeit einer LSIL zu entwickeln, scheiterte bisher (WHO 2020).

Die Progressionsrate einer HSIL in ein Carcinom ist mit 20-70 % somit wesentlich höher als die einer LSIL. Aufgrund ihrer hohen und schnelleren Progression werden höhergradige CIN-Läsionen daher als obligate Präkanzerosen gewertet (Hoeffler, Kreipe & Moch 2019). HSILs persistieren in 35-70 % der Fälle und bilden sich in 20-40 % zurück (Hoeffler, Kreipe & Moch 2019). Die Rückbildung einer HSIL ist vom Alter der Patientinnen, dem HPV-Typ und der Größe der Läsion abhängig.

Dabei ist die Regressionswahrscheinlichkeit bei jüngeren Patientinnen, einem LR-HPV-Typ und einer geringen Läsionsgröße höher (WHO 2020). Ohne therapeutische Intervention liegt die Wahrscheinlichkeit einer Progression einer HSIL zu einem Carcinom bei 0,5-1 % jährlich, was auf einen Zeitraum von 30 Jahren gerechnet 30 % ergibt (WHO 2020).

Ein Therapieansatz bei einer hochgradigen HSIL ist die Konisation, eine kegelförmige Entfernung von dysplastischem Gewebe der Cervix uteri. Weitere therapeutische Methoden sind die Kryotherapie, Laserablation oder die elektrochirurgische Loop-Exzision. Das Auftreten eines HSIL-Rezidivs ist mit 1 – 2 % sehr gering (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Allerdings spielen Faktoren wie die Größe der Läsion, die Vollständigkeit der Exzision und eine HPV-DNA-Testung eine entscheidende Rolle bei dieser Prognose (WHO 2020).

1.1.5 Ätiologie und Pathogenese

Die am häufigsten sexuell übertragene Krankheit ist die durch HPV induzierte SIL (Dunne & Park 2013). In einer SIL muss definitionsgemäß zwar eine HPV-Infektion vorliegen, jedoch ist diese allein nicht hinreichend, um eine SIL auszulösen (Hoefler, Kreipe & Moch 2019; WHO 2020). Weitere Faktoren sind chronische, mechanische oder chemische Reize sowie rezidivierende Entzündungen (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Darüber hinaus sind genetische und immunsuppressive Faktoren wie eine HIV-Infektion, Promiskuität und Nikotinabusus prädisponierend (Kellner et al. 2019).

Die Transformationszone der Cervix uteri, in der das Zylinderepithel der Endocervix in das mehrschichtig unverhornte Plattenepithel der Ektocervix übergeht, ist aufgrund einer gesteigerten Epithelproliferation besonders vulnerabel für dysplastische Veränderungen (WHO 2020; Riede, Werner & Schaefer 2004). Diese Zone stellt einen leichten Zugangsweg für Viren, insbesondere HPV, dar (Kellner et al. 2019). Ausgangspunkt der metaplastischen Umwandlung sind die Basalzellen des endocervicalen Drüsenepithels beziehungsweise des ektocervicalen Plattenepithels.

Etabliert sich dort eine HPV-Infektion, heilt diese in der Regel innerhalb von zwei Jahren folgenlos aus (Schiffman et al. 2016). Bei persistierender Infektion entstehen dort rund 90 % der SILs und der daraus resultierenden Carcinome (Hoefler, Kreipe & Moch 2019).

Eine LSIL resultiert aus einer produktiven HPV-Infektion in reifenden Zellen, während eine HSIL durch eine virusinduzierte Proliferation infizierter Zellen im gesamten Epithel entsteht (WHO 2020).

Von den über 100 bekannten HPV-Typen unterscheidet man zwischen low-risk-Typen (LR-Typen) und high-risk-Typen (HR-Typen), die nicht alle mit der gleichen Wahrscheinlichkeit zu einer SIL führen (Kellner et al. 2019).

HSILs und Carcinome sind selten auf eine Infektion mit LR-HPV zurückzuführen (WHO 2020). LR-HPV-Typen rufen überwiegend exophytisch wachsende LSILs (sog. Condylomata acuminata) hervor. Alle LSILs, die von HR-HPV Typen ausgehen, haben jedoch das Risiko einer Progression in eine HSIL (WHO 2020).

Verantwortlich für die maligne Transformation ist die Expression der viralen Proteine E6 und E7 der humanen Papillomaviren (Kellner et al. 2019). Auf den genauen Mechanismus der beiden Proteine wird in Kapitel 1.4.4 eingegangen. Letztlich führt die Expression beider Proteine zu einer autonomen Proliferation und dysplastischen Veränderung der infizierten Zellen.

Das Virusgenom ist bei einer HSIL meist in das zelluläre Genom integriert und kann in zelluläre Prozesse eingreifen; es kommt zur klonalen Expansion in allen Epithelschichten (Kellner et al. 2019; WHO 2020). Frauen, bei denen es zu einer Persistenz der Virus-DNA im Epithel kommt, haben daher ein erhöhtes Risiko, eine HSIL und ein invasives Carcinom zu entwickeln.

1.2 Adenocarcinoma in situ (AIS)

1.2.1 Definition und Einteilung

Das AIS ist eine Präkanzerose des Adenocarcinoms. Es hat seinen Ursprung im endocervicalen Drüsenepithel. Eine Einteilung des AIS erfolgt im Gegensatz zu den Läsionen der CIN lediglich in HPV-assoziierte und nicht-HPV-assoziierte AIS (Hoehn et al. 2021).

1.2.2 Epidemiologie

Die höchste Prävalenz des AIS liegt in der vierten Lebensdekade und ist in den meisten Fällen mit einer Infektion mit HR-HPV-Typen assoziiert (Cerny & Karlin 2023; Teoh et al. 2020). Im Jahr 2016 wurden der Kassenärztlichen Bundesvereinigung 637 Frauen mit AIS gemeldet (AWMF 2021).

Präkanzerosen der Cervix uteri betreffen häufiger das Plattenepithel als das Drüsenepithel. In 50% der Fälle wird bei einem AIS gleichzeitig eine plattenepitheliale Präkanzerose diagnostiziert (Hoeffler, Kreipe & Moch 2019; Teoh et al. 2020).

1.2.3 Ätiologie und Pathogenese

Ursächlich für ein Adenocarcinoma in situ ist in 80 % der Fälle eine Infektion mit HR-HPV-Typen, die eine glanduläre Dysplasie hervorrufen (Cerny & Karlin 2023; Kellner et al. 2019; Stolnicu & McCluggage 2020).

1.2.4 Diagnostik

Die Diagnosestellung eines AIS ist aufgrund der endocervicalen Lage und einem klinisch asymptomatischen Bild erschwert (Cerny & Karlin 2023). In der Abstrichzytologie sind atypische glanduläre Zellen schwieriger identifizierbar als atypisches Epithel einer SIL (Cerny & Karlin 2023).

Mikroskopisch zeigt sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung dysplastisches Zylinderepithel ohne invasives Wachstum. Die Zellen sind vor allem durch eine säulenförmige Architektur mit sich überlappenden Zellkernen gekennzeichnet (Kuhn et al. 2018).

1.2.5 Prognose

Die Therapie richtet sich nach dem Alter der Patientinnen. Sowohl die Konisation als auch die Hysterektomie sind probate Therapieansätze, wobei vor allem bei jüngeren Patientinnen mit Kinderwunsch eine Konisation präferiert wird. Die Rezidivwahrscheinlichkeit eines AIS nach einer Konisation ist gering (Cerny & Karlin 2023). Sind nach pathologischer Untersuchung die Resektionsränder nach wie vor dysplastisch, muss eine Hysterektomie durchgeführt werden.

1.3 Cervixcarcinome

1.3.1 Definition und Einteilung

Carcinome der Cervix uteri werden größtenteils in Plattenepithelcarcinome (PLECA) und Adenocarcinome (AC) aufgeteilt. Plattenepithelcarcinome nehmen einen Anteil von 70-80 % aller Cervixcarcinome, Adenocarcinome einen Anteil von circa 10-15 % ein (Beckmann et al. 2021; Hoefler, Kreipe & Moch 2019; Riede, Werner & Schaefer 2004). Plattenepithelcarcinome sind maligne Tumoren, die von dem Epithel der Haut oder Schleimhäute ausgehen. Adenocarcinome sind ebenfalls maligne Tumoren, die jedoch von Drüsengewebe abstammen (Mullangi & Lekkala 2024). Neben Plattenepithel- und Adenocarcinomen gibt es eine kleine Gruppe selten vorkommender kleinzelliger neuroendokriner Carcinome, die die restlichen 10-20 % der Cervixcarcinome bilden (Riede, Werner & Schaefer 2004). Das Microcarcinom ist eine Sonderform der Carcinome. Es ist durch eine maximale Stromainvasion von 5 mm unabhängig von der horizontalen Ausbreitung gekennzeichnet (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Die kleinzelligen neuroendokrinen Carcinome und das Microcarcinom werden hier zur Vollständigkeit erwähnt, werden aber aufgrund ihrer geringen Prävalenz in dieser Arbeit nicht weiter gesondert aufgeführt. In diesem Kapitel werden zunächst die Cervixcarcinome im Allgemeinen beschrieben. Die Unterschiede zwischen Plattenepithelcarcinomen und Adenocarcinomen werden anschließend getrennt betrachtet.

Die verschiedenen Tumortypen erhielten von der WHO unterschiedliche ICD-Codes. Zur Kategorisierung der Carcinome hinsichtlich ihrer Ausdehnung kann die Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO)-Einteilung, die nur die prätherapeutischen klinischen Befunde berücksichtigt, herangezogen werden (Buehling, Lепенies & Witt 2008). Die Ausdehnung eines Carcinoms kann ebenfalls gemäß der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) mittels der pTNM-Klassifikation in Stadien eingeteilt werden. Sie schließt pathohistologische Befunde nach Exzision ein, wobei „T“ die lokale Tumorausbreitung, „N“ den Lymphknotenbefall und „M“ die Metastasierung beschreibt (Buehling, Lепенies & Witt 2008). Das Grading beschreibt den Malignitätsgrad eines Tumors und ist von seiner Differenzierung abhängig.

Die Einteilung erfolgt in vier Graden von G1 (=hoch differenziert) bis G4 (=keine Differenzierung). Der Malignitätsgrad steigt mit abfallender Differenzierung und verschlechtert die Prognose (Kellner et al. 2019).

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die pTNM-Einteilung der Cervixcarcinome.

Kategorie	Kriterien
pTis	Carcinoma in situ = CIN III
pT1	Carcinom ist auf die Cervix begrenzt
pT1a	Diagnose nur durch Mikroskope
pT1a1	Stromainvasion ≤ 3 mm tief, horizontale Ausdehnung < 7 mm
pT1a2	Stromainvasion $> 3-5$ mm tief, horizontale Ausdehnung ≤ 7 mm
pT1b	Makroinvasiver Tumor, der auf die Cervix beschränkt ist oder mikroinvasiver Tumor $> T1a2$
pT1b1	Klinisch sichtbar, Tumor ≤ 4 mm in seinem größten Durchmesser
pT1b2	Klinisch sichtbar, Tumor > 4 cm in seinem größten Durchmesser
pT2	Ausbreitung über den Uterus hinaus, aber weder zur Beckenwand noch zum unteren Vaginaldrittel
pT2a	Tumorausdehnung in die Scheide, Parametrium frei
pT2a1	Klinisch sichtbar, Tumor ≤ 4 mm in seinem größten Durchmesser
pT2a2	Klinisch sichtbar, Tumor > 4 cm in seinem größten Durchmesser
pT2b	Parametrium befallen, kein Beckenwandbefall
pT3	Ausbreitung bis zum unteren Vaginaldrittel oder bis zur Beckenwand, ggf. Hydronephrose
pT3a	Unteres Vaginaldrittel befallen, kein Beckenwandbefall
pT3b	Beckenwand befallen und / oder Hydronephrose, stumme Niere
pT4	Befall der Harnblasen-/Rektumschleimhaut; Ausdehnung über das kleine Becken hinaus
pN1	Regionale Lymphknoten befallen
pM1	Fernmetastasen

Tabelle 2: pTNM-Klassifikation des Cervixcarcinoms 2020 (Tabelle nach : Horn et al. 2022 ; Kellner et al. 2019)

1.3.1.1 Plattenepithelcarcinom (PLECA)

Das Plattenepithelcarcinom der Cervix uteri nimmt mit circa 80 % den größten prozentualen Anteil der Cervixcarcinome ein (Beckmann et al. 2021). Es geht aus dem mehrschichtig unverhornten Plattenepithel der Ektocervix hervor und ist in 95 % der Fälle mit einer HPV-Infektion assoziiert (Arafah et al. 2021, WHO 2020). Per definitionem findet sich eine Stromainvasion; ein exophytisches Wachstum ist möglich (WHO 2020).

1.3.1.2 Adenocarcinom (AC)

Histologisch hat das Adenocarcinom seinen Ursprung im Drüsengewebe der Endocervix (Mullangi & Lekkala 2024). Es werden HPV-assoziierte von HPV-unabhängigen Adenocarcinomen (AC) unterschieden (WHO 2020). HPV-bedingte Adenocarcinome sind wesentlich häufiger als HPV-unabhängige ACs (Kerwin et al. 2023). Die aktuelle Einteilung richtet sich nach der „International Endocervical Adenocarcinoma Classification“ (IECC). Zu den HPV-unabhängigen ACs zählen das gastrische, das klarzellige, das mesonephrische, das endometrioides und das unklassifizierte Adenocarcinom (Horn et al. 2022, Kerwin et al. 2023). Die mit einer HPV-Infektion assoziierten ACs lassen sich in den sogenannten usual-type und den muzinösen Typ mit seinen Subtypen unterteilen. Zum usual-type gehören das AC mit villoglandulärem oder mikropapillärem Wachstum und der endometrioides Typ (Horn et al. 2022). Zum muzinösen Typ zählen der intestinale, der siegelringzellige, der i-SMILE (invasive stratified mucin-producing intraepithelial lesion) und der nicht klassifizierte Typ (Horn et al. 2022).

1.3.2 Epidemiologie

Gebärmutterhalskrebs hatte 2018 eine weltweite Inzidenz von 569847 (WHO 2020). Im Jahr 2018 betrug die Anzahl der Todesfälle 311365 (WHO 2020). Somit ist das Cervixcarcinom der vierthäufigste Tumor bei Frauen (WHO 2020).

Die Prävalenz ist insbesondere in Ländern mit niedrigem Einkommen und geringeren Bildungsstandards hoch. Dies ist auf das schlechtere Angebot von Screenings und fehlende HPV-Impfprogramme zurückzuführen (WHO 2020).

Demgegenüber sinkt die Prävalenz in den Industrieländern.

Dort konnte die Prävalenz von Cervixcarcinomen in den vergangenen 40 Jahren um die Hälfte reduziert werden (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Vorreiter sind die skandinavischen Länder, Österreich, die Schweiz und das Vereinigte Königreich.

Cervixcarcinome sind somit durch bessere Präventionsmaßnahmen größtenteils vermeidbar sind (WHO 2020). In über 90 % der Cervixkarzinome können HPV-Viren nachgewiesen werden (Walboomers et al. 1999). In lediglich 1 % der Plattenepithelcarcinome und in weniger als 10% der Adenocarcinome konnte kein HPV nachgewiesen werden (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Dies verdeutlicht einen Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion und der Entstehung des Karzinoms (Walboomers et al. 1999). Daraus ergibt sich, dass HPV-Tests als ergänzende Maßnahme bei Vorsorgeuntersuchungen und bei einer SIL sinnvoll sind (Walboomers et al. 1999).

1.3.2.1 Plattenepithelcarcinom

Die Inzidenz der neu registrierten Fälle von Plattenepithelcarcinomen der Cervix betrug bei Frauen weltweit circa 500000 im Jahr 2018 (WHO 2020). In Deutschland liegt die Inzidenz bei 7000 Frauen (Kellner et al. 2019). Klinisch manifestieren sich die Carcinome zwischen der vierten und fünften Lebensdekade (Kellner et al. 2019). Damit ist das PLECA der Cervix uteri der häufigste Genitalkrebs bei Frauen unter 50 Jahren (Riede, Werner & Schaefer 2004).

1.3.2.2 Adenocarcinom

Das Adenocarcinom der Cervix nimmt mit circa 10 % einen wesentlich geringeren Anteil der Cervixcarcinome ein. Im Durchschnitt liegt das Erkrankungsalter bei 55 Jahren (Kellner et al. 2019; Cerny & Karlin 2023). Verglichen zum PLECA etabliert sich das Adenocarcinom folglich etwas später. Im Gegensatz zu den plattenepithelialen Tumoren steigt die Inzidenz der Adenocarcinome (Gadducci, Guerrieri & Cosio 2019).

1.3.3 Ätiologie und Pathogenese

Cervixcarcinome gehen in der Regel aus einer HSIL hervor. Eine Infektion mit HPV ist essenziell für die Progression einer HSIL in ein Cervixcarcinom (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Die HR-HPV-Typen 16 und 18 sind in 70 % aller Cervixcarcinome die Ursache für die Progression (Wild, Weiderpass & Stewart 2020; WHO 2020). Begünstigende Faktoren sind ähnlich der CIN hohe Promiskuität, Nikotinabusus und die Einnahme oraler Kontrazeptiva (Buehling, Lепенies & Witt 2008).

1.3.3.1 Plattenepithelcarcinom

In 87,3 % der Plattenepithelcarcinome der Cervix können HPV nachgewiesen werden (Clifford et al. 2003). Der Progression einer HSIL in ein PLECA liegt eine transformierende Infektion zugrunde. Die Transformation wird dabei durch die Onkoproteine E6 und E7 hervorgerufen. Die Proteine rufen epigenetische und genetische Veränderungen hervor, die in einer Zeitspanne von bis zu 30 Jahren die Progression vorantreiben.

Das Wachstumsverhalten von PLECAs erfolgt aggressiv-infiltrativ (Kellner et al. 2019). Während eine hämatogene Metastasierung spät erfolgt und daher klinisch vernachlässigbar ist, erfolgt die lymphogene Invasion in die paracervicalen, hypogastrischen und paraaortalen Lymphknoten früh (Kellner et al. 2019; Riede, Werner & Schaefer 2004).

1.3.3.2 Adenocarcinom

Die Vorläuferläsion des Adenocarcinoms ist das in Kapitel 1.2 beschriebene AIS (Kellner et al. 2019). Das AC wächst wie das PLECA invasiv und auf den gleichen Ausbreitungswegen (Kellner et al. 2019). Humane Papillomaviren sind auch bei endocervicalen Adenocarcinomen der häufigste Grund für die maligne Transformation (Stolnicu et al. 2018; Kellner et al. 2019). HPV werden in 76,4 % der Adenocarcinome der Cervix nachgewiesen (Clifford et al. 2003).

Ein geringer Anteil von 15 % der ACs ist unabhängig von einer HPV-Infektion (Cerny & Karlin 2023). Im fortgeschrittenen Stadium sind klinisch Blutungsstörungen und eine große Carcinomausdehnung charakteristisch (Cerny & Karlin 2023).

Durch die langjährige Einnahme gestagenhaltiger Kontrazeptiva wird das endocervicale Drüsenepithel für HPV leichter zugänglich (Riede, Werner & Schaefer 2004). Die Einnahme stellt jedoch einen eher untergeordneten Risikofaktor dar (Winer et al. 2003).

1.3.4 Diagnostik

Je nach Größe der Tumoren sind diese asymptomatisch oder symptomatisch. Da das Frühstadium eines Cervixcarcinoms asymptomatisch verläuft, sollten – wie für die CIN – im Rahmen gynäkologischer Untersuchungen jährlich Früherkennungsmaßnahmen vorgenommen werden. Die Prävalenz ist zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr am größten (WHO 2021). Deshalb empfahl die WHO ein Screening ab dem 30. Lebensjahr (WHO 2021). Bei bereits größeren Tumoren kommt es häufig zu vaginalen Blutungen, vermehrtem Ausfluss und Schmerzen (WHO 2020). Durchbricht der Tumor in seinem Wachstumsprozess das Parametrium, kann dies zu weiteren Komplikationen führen. Unter anderem zählen dazu eine Obstruktion der Harnleiter mit daraus resultierender Urämie, Hämaturie, Tenesmus und vesikovaginale oder rektovaginale Fisteln (WHO 2020).

Makroskopisch kann zunächst eine visuelle Inspektion mittels Essigsäuretest unter kolposkopischer Betrachtung durchgeführt werden. Der PAP-Test ist ebenfalls eine gängige Screeningmethode. Die unzulängliche Genauigkeit erfordert jedoch weitere histologische Untersuchungen. Allen voran ist die klassische Hämatoxylin-Eosin-Färbung zu nennen, die eine Carcinomdiagnose weitestgehend sicher ermöglicht und in der pathologischen Routine am weitesten verbreitet ist. Durch die geschilderte enge Verknüpfung der Cervixcarcinome mit HPV ist es möglich, mit Hilfe immunhistochemischer Darstellung einer p16-Expression die Carcinomherkunft von der Cervix zu sichern.

Die in-situ-Hybridisierung und immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern, die spezifische Onkoproteine humaner Papillomaviren detektieren, sind Methoden, die bisher nur in der Forschung ihre Anwendung finden, jedoch in der Zukunft als Untersuchungsmethode denkbar sind (WHO 2021).

1.3.4.1 Plattenepithelcarcinom

Makroskopisch sind PLECAs typischerweise unscharf begrenzte und zur Oberfläche hin erosive, unverhornte Tumoren (Kellner et al. 2019). In fortgeschrittenen Tumorstadien weisen sie exophytische oder endophytische Wachstumsmuster auf. Häufig sind zudem fokal nekrotische Bereiche (WHO 2020).

Mikroskopisch zeigen die Plattenepithelcarcinome ein infiltratives ballenartiges Wachstum. Zwischen den Tumorballen findet sich entweder Bindegewebe, das durch den Tumor induziert von Fibroblasten gebildet wird, oder ein entzündliches Stroma. Mitosefiguren mit nukleären Pleomorphismen sind ebenso diagnostische Merkmale (WHO 2020).

Eine differenziertere histologische Einteilung erfolgt nach unterschiedlichen Wachstumsmustern. Dazu gehört das nicht-keratinisierende, das keratinisierende, das basaloide, das papilläre, das kondylomatöse und das lymphoepitheliom-ähnliche Muster (WHO 2020). Eine Kombination aus nicht-keratinisierendem und basaloidem Wachstum wird am häufigsten bei HPV-induzierten PLECAs beobachtet (WHO 2020). Kennzeichnend für diesen Wachstumstyp sind die typischen Wachstumsmuster aus polygonalen Plattenepithelzellen und unreifen basalen Plattenepithelzellen mit einem hohen N:C-Verhältnis. Charakteristisch sind unregelmäßige Kernkonturen mit grobem Chromatin. Darüber hinaus sind interzelluläre Brücken oder die Verhornung einzelner Zellen erkennbar (WHO 2020).

Da die meisten PLECAs durch HR-HPV induziert sind und diese HPV-Infektionen mit einer sowohl nukleären als auch zytoplasmatischen Überexpression von p16 in Verbindung gebracht werden, kann in der Diagnostik p16 als Surrogatmarker für HPV Verwendung finden (WHO 2020).

1.3.4.2 Adenocarcinom

ACs wachsen exo- oder endophytisch (Cerny & Karlin 2023). Die verschiedenen Subtypen weisen unterschiedliche mikroskopische Merkmale auf. Die Heterogenität der morphologischen Wuchsmuster erschwert die histologische Diagnostik (Kuhn et al. 2018). Für ein mit einer HPV-Infektion assoziiertes Adenocarcinom sind luminale Mitosefiguren und nekrotische Bereiche charakteristisch (Stolnicu et al. 2018). Eine starke p16-Färbung spricht ebenfalls für eine Assoziation mit humanen Papillomaviren (Park 2020). Eine negative p16-Färbung spricht für ein HPV-unabhängiges Carcinom (Hodgson et al. 2019; Park 2020).

Die Tabellen 3 und 4 geben eine kurze Übersicht über die histologischen Merkmale der verschiedenen Typen.

HPV-assoziierte Adenocarcinome	
„Usual Type“	<ul style="list-style-type: none"> • große säulenförmige Zellen • wenig Muzin • viele apoptotische Zellkörper • luminale mitotische Figuren, die bei geringer Vergrößerung sichtbar sind
Villoglandulärer Typ	<ul style="list-style-type: none"> • exophytische und destruktive Stromainvasion • lange schlanke Zotten
Mikropapillärer Typ	<ul style="list-style-type: none"> • papilläre Ausläufer • lymphatische Invasion
Muzinöser NOS Typ	<ul style="list-style-type: none"> • viel endocervicales Muzin
Muzinöser intestinaler Typ	<ul style="list-style-type: none"> • viele Becherzellen, die an Drüsen im GI-Trakt erinnern
i-SMILE-Typ	<ul style="list-style-type: none"> • Nester aus schleimigen Zellen, die sich durch die gesamte Tumorbreite ziehen

Tabelle 3: HPV-assoziierte Adenocarcinome (Park 2020)

HPV-unabhängige Adenocarcinome	
Gastrischer Typ	<ul style="list-style-type: none"> • diffuse, tiefe Invasion der Cervixwand mit Drüsen von verschiedenen Formen und Größen • schaumiges Zytoplasma, pyknotische Zellkerne, keine Mitosen oder apoptotische Bereiche
Klarzelliger Typ	<ul style="list-style-type: none"> • klares Zytoplasma • tubulozystisches Muster
Mesonephrischer Typ	<ul style="list-style-type: none"> • drüsige, papilläre und solide Invasion in die Cervixwand • einheitliche Zellkerne mit offenem Chromatin
Endometrioider Typ	<ul style="list-style-type: none"> • tief liegender Tumor ohne Schleimhautbeteiligung • säulenförmige Zellen mit offenem Chromatin • eosinophiles Zytoplasma mit vielen Lymphozyten

Tabelle 4: HPV-unabhängige Adenocarcinome (Park 2020)

1.3.5 Prognose

Die Prognose ist abhängig vom Tumorstadium. Lymphknotenmetastasen und die Beteiligung der Parametrien und der Nachbarstrukturen sind hierfür ausschlaggebend. Fasst man die Plattenepithelcarcinome und Adenocarcinome der Cervix uteri zusammen, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium I der UICC-Einteilung 90 bis 95 % (Hoefer, Kreipe & Moch 2019). Im Stadium III sinkt sie auf 30 % (Hoefer, Kreipe & Moch 2019).

1.3.5.1 Plattenepithelcarcinom

Die Prognose eines PLECAs der Cervix ist abhängig von dessen Ausbreitungsstadium (Kellner et al. 2019). Die genaueste Beurteilung ist über das FIGO-Stadium und die Lymphknotenbeteiligung möglich (WHO 2020). Die unterschiedlichen histologischen Muster sowie der HPV-Typ spielen bei dem bereits etablierten PLECA eine untergeordnete Rolle (WHO 2020).

Die 5-Jahres-Überlebensrate, mit welcher die Prognose angegeben werden kann, beträgt ohne vorliegende Metastasierung in Nachbarorgane bei Diagnosestellung 60 % (Kellner et al. 2019). Ist das PLECA bereits in Nachbarorgane infiltriert, sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf 10 % (Kellner et al. 2019).

1.3.5.2 Adenocarcinom

Das Ausbreitungsstadium eines ACs ist wie auch bei den Plattenepithelcarcinomen relevant für dessen Prognose (Kellner et al. 2019). Die 5-Jahres-Überlebensrate des ACs im UICC-Stadium I beträgt ähnlich zum PLECA der Cervix 50 bis 65 % (Cerny & Karlin 2023; Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Die Prognose bei nicht HPV-assoziierten Adenocarcinomen ist ungünstiger als bei HPV-assoziierten Adenocarcinomen (Hoehn et al. 2021).

Im Jahr 2021 wurde das sogenannte Silva-System zur prognostischen Evaluation von HPV-assoziierten Adenocarcinomen eingeführt. Die auf histologischen Merkmalen basierende dreistufige Einteilung gibt Auskunft über das Risiko von Lymphknotenmetastasen und Rezidiven und erlaubt somit eine bessere Einschätzung des Krankheitsverlaufs (Alvarado-Cabrero et al. 2021).

1.4 Humane Papillomaviren

1.4.1 Einteilung der HPV-Typen

Humane Papillomaviren sind unbehüllte, zirkuläre doppelsträngige DNA-Viren, die von einem Kapsid umgeben sind (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Die Größe des Genoms variiert zwischen 5.000 bis 8.000 Basenpaaren (Van Doorslaer et al. 2018). Das Papillomavirusgenom wird in drei Regionen aufgeteilt: die Long-Control-Region (LCR), die frühe E- und die späte L-Region (Yu, Majerciak & Zheng 2022). Papillomaviren besitzen einen einzigen Replikationsursprung (Ori), der in der LCR liegt und für die virale Replikation verantwortlich ist (Yu, Majerciak & Zheng 2022). Das Genom kodiert auf seinen frühen Regionen für die Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7, die für die Transkription und Replikation der viralen DNA verantwortlich sind und die zelluläre Homöostase beeinflussen (Van Doorslaer et al. 2018). Die Kapsidproteine L1 und L2 werden auf den späten Regionen des Genoms kodiert (Sotlar 2008). Die LCR kodiert selbst für keine viralen Proteine, enthält jedoch Bindungsstellen für die Proteine E1 und E2 sowie für Transkriptionsfaktoren für die Initiierung der Transkription (Yu, Majerciak & Zheng 2022).

Um die Vielzahl der humanen Papillomaviren zu beschreiben, werden diese in verschiedene Gattungen und Typen eingeteilt. Man unterscheidet zwischen Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- und Nu-HPV. Die Alpha-Gattung umfasst die HPV-Typen, die vorwiegend Schleimhäute und Epithelien der Genitalien infizieren, während die anderen Genera asymptomatische Infektionen von Epithelien hervorrufen (Mattosco et al. 2021). Die Einteilung der Alpha-HPV-Typen erfolgt anhand ihres onkogenen Potenzials in LR-Typen und HR-Typen (Robert Koch Institut 2018). Zu den HR-HPV werden die Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66 gezählt (WHO 2020). Als wahrscheinlich risikobehaftete Typen (intermediäre Typen) gelten die Genotypen 26, 53, 67, 68, 73 und 82 (WHO 2020). HPV-Typen mit einem niedrigen onkogenen Risiko sind die Typen 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 71, 72, 74, 81 und 83 (Wild, Weiderpass & Stewart 2020). LR-HPV-Typen kennzeichnen sich klinisch durch benigne Epithelproliferationen zum Beispiel im Sinne von Papillomen und entarten in der Regel selbst unbehandelt nicht (Muenger et al. 2004). Die viralen Onkoproteine E6 und E7 der HR-HPV-Typen sind ausschlaggebend für die maligne Transformation (Egawa et al. 2015).

1.4.2 Epidemiologie

Eine Infektion mit humanen Papillomaviren ist aktuell die weltweit am häufigsten sexuell übertragene Krankheit (Serrano et al. 2018). Die Prävalenz ist bei jungen Frauen mit häufig wechselnden Sexualpartnern am größten (Schiffman 1992). In den drei Jahren nach dem ersten Sexualkontakt zeigte sich eine Inzidenz von 45 % (Woodman et al. 2001). Die unterschiedlichen HPV-Genotypen, verschiedene regionale Bedingungen, die Studienpopulation und der anatomische Lokus der Läsion sind der Grund für abweichende Zahlen der Inzidenz und Prävalenz der Infektionen (Kombe Kombe et al. 2021).

HP-Viren verursachen neben Condylomen (*Condylomata acuminata*) und Papillomen, Präkanzerosen bis hin zu Carcinomen der Anogenitalregion (Hoefler, Kreipe & Moch 2019; Serrano et al. 2018). In den meisten Fällen ist eine HPV-Infektion nach zwei Jahren ausgeheilt (Schiffman et al. 2016).

Es wurde jedoch beobachtet, dass mit zunehmender Dauer der Virusinfektion die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Heilung sinkt (Plummer et al. 2007). Zudem ist die Wahrscheinlichkeit einer persistierenden Infektion bei einer gleichzeitigen Infektion mit mehreren HPV-Typen erhöht (Ho et al. 1998).

Bei einer Infektion mit einem HR-HPV-Typ besteht ein 30-fach höheres Risiko einer Entartung hin zu einer HSIL und ein 200-fach höheres Risiko einer Entartung hin zu einem Cervixcarcinom (Hoefer, Kreipe & Moch 2019). Obwohl Cervixcarcinome nicht zwingend mit einer HPV-Infektion assoziiert sind, wurde in 90 % der Cervixcarcinome HPV nachgewiesen (Kombe Kombe et al. 2021). Dabei sind die HPV-Typen 16 und 18 weltweit in 70 % der Fälle für die Pathogenese von Cervixcarcinomen verantwortlich (Wild, Weiderpass & Stewart 2020).

Weitere Risikofaktoren sind immunologische Faktoren wie eine Koinfektion mit HIV. Bei infizierten Frauen steigt die Wahrscheinlichkeit der Viruspersistenz mit fortschreitender Immunsuppression (Pérez-González et al. 2022). Darüber hinaus wirken sich Mangelernährung und Rauchen ebenso negativ auf die Viruspersistenz aus.

1.4.3 Kausale Pathogenese der HPV-Infektion

HP-Viren werden meist über kleine Mikrotraumata des Epithels während des Geschlechtsverkehrs übertragen. Epitheliale Kampfzonen, wie an der Cervix uteri zwischen Zylinder- und Plattenepithel, sind aufgrund ihrer hohen proliferativen Aktivität Prädilektionsstellen für HPV-Infektionen. Weitere Zugangswege sind beispielsweise Haarfollikel, die einen leichten Zugang zur Basalzellschicht bieten (Doorbar 2007). Infektionen sind nicht nur im Anogenitalbereich, sondern ebenso über orogenitale Sexualpraktiken in den Mund- und Rachenraum möglich (Robert Koch Institut 2018). Ein weiterer Übertragungsweg kann in seltenen Fällen eine Schmierinfektion ohne penetrativen sexuellen Kontakt sein (Winer et al. 2003). Die Inkubationszeit einer HPV-Infektion beträgt zwei Wochen bis zu acht Monaten (Robert Koch Institut 2018).

Es wird zwischen einer produktiven und einer nichtproduktiven HPV-Infektion unterschieden. Die nichtproduktive HPV-Infektion ist durch das Vorhandensein viraler DNA in Abwesenheit einer differenzierungsabhängigen Virionenproduktion definiert (Stubenrauch & Laimins 1999). Bei der nichtproduktiven Infektion verbleibt die HPV-DNA episomal mit einer geringen Kopienzahl in den Basalzellen des Epithels (Sotlar 2008). Darüber hinaus treten keine morphologischen Epithelveränderungen auf (Sotlar 2008). Nichtproduktive Infektionen stellen den Großteil der HPV-Infektionen dar (Sotlar 2008).

Der Grund für den Übergang einer nichtproduktiven in eine produktive Infektion ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird eine T-Zell-vermittelte Immunschwäche vermutet (Sotlar 2008). Bei einer produktiven HPV-Infektion ist die Virusreplikation gesteigert und die HPV-DNA über die gesamte Epithelbreite nachweisbar (Sotlar 2008). In diesem Stadium können HPV-typische morphologische Epithelveränderungen, wie Epithelhyperplasien, Koilozyten und cervicale intraepitheliale Neoplasien beobachtet werden (Sotlar 2008). Der Schweregrad einer Dysplasie hängt von der Verteilung der viralen Genprodukte im Epithel und von der Fähigkeit des Virus ab, den Produktionszyklus vollständig abzuschließen (Middleton et al. 2003). Die Vollendung des viralen Lebenszyklus wird bei der produktiven Infektion durch die Expression der Kapsidproteine L1 und L2 und eine gesteigerte Expression des E4-Virusproteins möglich (Sotlar 2008).

Die Replikation ist vom Differenzierungsgrad der Wirtszelle abhängig (Mc Bride 2008; Stubenrauch & Laimins 1999). Die initiale Infektion findet ausschließlich in der undifferenzierten, proliferierenden basalen Epithelschicht statt, während die Virusproduktion ausschließlich auf die superfizielle Epithelschicht beschränkt ist (Pyeon et al. 2009; Sotlar 2008; Wentzensen 2011). Die Voraussetzung für eine persistierende HPV-Infektion ist die Infektion der Basalzellen des Epithels (Stubenrauch & Laimins 1999; Vinther & Norild 2003; Wentzensen 2011). Nach der Infektion und Teilung einer Basalzelle, verbleibt eine Tochterzelle in der Basalzellschicht und bildet ein Reservoir für virale DNA (Stubenrauch & Laimins 1999).

Die andere Tochterzelle beginnt sich zu differenzieren und wandert Richtung Epitheloberfläche (Laimins 1996). Die Viren verbleiben während der Differenzierung in den infizierten Zellen (Wentzensen 2011).

Produktiv infizierte Zellen exprimieren die viralen Genprodukte auf ihrem Weg hin zur Epitheloberfläche in einer spezifischen Reihenfolge (Doorbar 2007). Dies ist notwendig, um infektiöse Virionen an der Oberfläche des Epithels freisetzen zu können (Doorbar 2007). Eine infizierte Wirtszelle exprimiert in den unteren Epithelschichten vor allem die frühen Virusproteine E1, E2, E6 und E7 (Stubenrauch & Laimins 1999; Vande Pol & Klingelutz 2013). Die Replikationsproteine E1 und E2 sind nur für die vorübergehende Replikation von HPV-Genomen nötig, während für die Aufrechterhaltung einer HPV-Infektion die Onkoproteine E6 und E7 erforderlich sind (Stubenrauch & Laimins 1999). In HPV-16-infizierten Läsionen, die aktiv Viren produzieren, erfolgt die Expression der Onkoproteine E6 und E7 gleichmäßig im gesamten infizierten Epithel, während die Expression der Kapsidproteine L1 und L2 sowie des E4-Proteins in den suprabasal gelegenen Zellen deutlich zunimmt (Laimins 1996).

Die Genprodukte L1, L2 und E4 werden - wie bereits beschrieben - vor allem in den oberen Epithelschichten exprimiert (Przybylski et al. 2023). Die viralen Genome werden durch die Kapsidproteine L1 und L2 verpackt (Buck, Day & Trus 2013; Doorbar 2007; Van Doorslaer 2018). Das Virusprotein E4 unterstützt die Freisetzung der Virionen von der Epitheloberfläche, indem es das zelluläre Zytoskelett zerstört (Doorbar 2007; Yu, Majerciak & Zheng 2022). Mit der Freisetzung der Virionen ist der virale Replikationszyklus abgeschlossen (Van Doorslaer 2018).

1.4.4 Mechanismen der malignen Transformation

Humane Papillomaviren gehören zu den Tumoviren. Das bedeutet, dass sie nicht nur die Zellen als Wirt nutzen, sondern zusätzlich virale Onkoproteine produzieren. Zu diesen Onkoproteinen gehören die bereits genannten Proteine E6 und E7, die direkt in den Zellzyklus eingreifen und zur Zelltransformation und Tumorgenese beitragen (Basukala & Banks 2021; Schiffman et al. 2016). Durch alternatives Spleißen produzieren HR-HPV-Typen RNA-Transkripte, um E6 und E7 zu exprimieren (Yu, Majerciak & Zheng 2022). Es wurde nachgewiesen, dass Zellen, die durch integrierte HPV-Sequenzen E6 und E7 produzieren, einen erheblichen Wachstumsvorteil haben (Muenger et al. 2004).

Die Aktivität der Onkoproteine E6 und E7 bestimmt die Kanzerogenität der unterschiedlichen HPV-Typen (Schiffman et al. 2016).

1.4.4.1 Onkoprotein E6

Die variablen Genregionen des Onkoproteins E6 unterscheiden sich bei den verschiedenen HPV-Typen und entscheiden über die Potenz eines HPV-Typs hinsichtlich seiner malignen Transformation. Es wird zwischen LR- und HR-HPV-E6 unterschieden (Basukala & Banks 2021). Die daraus resultierenden Unterschiede zwischen LR- und HR-HPV-E6 werden im Weiteren erläutert.

Die wichtigste Rolle aller E6-Proteine ist die Interaktion mit dem Protein p53 (Nominé et al. 2006). In gesunden Zellen fungiert p53 als Tumorsuppressor, der bei DNA-Schäden durch die Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) -Kinase phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Wird eine genomisch entartete Zelle erkannt, wird p53 kurzfristig durch das TP53-Gen hochreguliert und leitet einen Zellzyklusarrest ein (Blum & Mueller-Wieland 2018; Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Dadurch können DNA-Schäden repariert werden oder es kann gegebenenfalls der programmierte Zelltod über das Bax-Gen eingeleitet werden (Blum & Mueller-Wieland 2018; Hoefler, Kreipe & Moch 2019).

Das Eingreifen des Proteins E6 in diesen physiologischen Ablauf funktioniert wie folgt: HR-HPV-E6 bildet einen Komplex mit der Ubiquitinligase E6AP (Harden & Munger 2017). Dieser Komplex bindet spezifisch an das Tumorsuppressorprotein p53 (Scheffner et al. 1993).

Durch die Bindung von E6AP mit p53 kommt es zu einem Ubiquitin-abhängigen proteolytischen Abbau von p53 (Scheffner et al. 1993). Dies hat zur Folge, dass die Zellen weder DNA-Reparaturmechanismen aktivieren noch Apoptose einleiten können (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Vom Virus befallene Zellen können ungehindert proliferieren und es kommt zu zunehmender genomischer Instabilität (Riede, Werner & Schaefer 2004; Silbernagel & Lang 2020).

LR-HPV-E6 Proteine binden im Gegensatz zu HR-HPV-E6 mit einer geringeren Affinität an E6AP (Doorbar 2007). Dadurch haben LR-HPV-E6 Proteine ein geringeres onkogenes Potenzial.

Ein weiterer Mechanismus, der zur genomischen Instabilität führt, ist die Aktivierung der katalytischen Untereinheit der Telomerase-Reverse-Transkriptase (hTERT) mittels HR-HPV-E6 (Doorbar 2007; Moody & Laimins 2010). Dadurch werden die Telomerenden durch Hexamere verlängert. Dies hemmt den physiologischen Abbau der Telomere und das Einleiten der Apoptose wird verhindert (Klingelutz, Foster & McDougall 1996).

Sowohl bei HR-HPV-E6 als auch LR-HPV-E6 finden sich an den C-Termini der Proteine spezifische PDZ-Sequenzen, durch die eine Interaktion mit Proteinen erfolgen kann und die die zelluläre Polarität kontrollieren (Vats et al. 2021). Die meisten E6-Typen können das Protein disc large homolog 1 (DLG1) binden (Vats et al. 2021). DLG1 wird an Zell-Zell-Kontakten exprimiert und kann das Zellwachstum bremsen (Massimi et al. 2003). Die Bindung von DLG1 fördert die onkogene Aktivität, indem sie die Zellwachstumsbremse hemmt und somit zu einer autonomen Proliferation führt (Thomas et al. 2016).

Auffällig ist der Unterschied zwischen LR- und HR-HPV-E6. HR-HPV-Typen haben eine deutlich höhere Flexibilität der E6-PDZ-Bindungsdomäne (Thomas et al. 2016). Dies erklärt das erhöhte kanzerogene Potenzial von HR-E6 (Thomas et al. 2016).

1.4.4.2 Onkoprotein E7

Die wichtigste Interaktion im kanzerogenen Prozess von E7 ist die Interaktion mit dem Retinoblastomprotein (pRB). Das pRB, das zu den Tumorsuppressoren zählt, beeinflusst den Zellzyklus und ist in seinem dephosphorylierten Zustand aktiv (Buchkovich, Duffy & Harlow 1989). In gesunden Zellen bindet pRB an den nukleären Transkriptionsfaktor E2F und inaktiviert diesen dadurch (Silbernagel & Lang 2020). E2F transkribiert spezifische Gene, die für den Übergang von der G1- in die S-Phase erforderlich sind (Blum & Mueller-Wieland 2018; Riede, Werner & Schaefer 2004). Durch die Hemmung der Aktivität von E2F verweilen die Zellen in der G1-Phase; pRB fungiert somit als wachstumshemmender Faktor (Silbernagel & Lang 2020). Die Phosphorylierung und damit die Inaktivierung des pRB erfolgt über einen Komplex aus Cyclin E und der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) 2, sowie Cyclin D, das an CDK4 und 6 gebunden ist (Silbernagel & Lang 2020). Wird das Rb-Protein durch Cyclin-abhängige Kinasen phosphoryliert, wird es inaktiviert, bindet nicht mehr E2F und der Zellzyklusarrest ist aufgehoben.

Das Onkoprotein E7 interagiert mit dem pRB auf zwei Arten: Zum einen führt die Bindung zwischen E7 und dem pRB zur Ubiquitin-abhängigen Proteolyse des Retinoblastomproteins (Blum & Mueller-Wieland 2018; Boyer, Wazer & Band 1996). Zum anderen phosphoryliert E7 das Rb-Protein. Durch beide Mechanismen wird die Bindung des Retinoblastomproteins an den Transkriptionsfaktor E2F gestört (Stiasny et al. 2016).

Über die Wechselwirkung der Cyclin-abhängigen Kinasen mit dem Retinoblastomprotein ist auch das Protein p16 in die zellulären Prozesse involviert (Lukas et al. 1995). Physiologisch inhibiert p16 als Folge zellulärer Stresssignale den CyclinD-CDK4/6-Komplex, um die Phosphorylierung des pRB zu verhindern und so den Zellzyklus zu arretieren (Lukas et al. 1995).

In virusbefallenen Zellen mit E7-Expression wird das pRB jedoch weiterhin durch E7 phosphoryliert und abgebaut (Blum & Mueller-Wieland 2018; Boyer, Wazer & Band 1996). Es kommt zu einer Anhäufung von p16 in der infizierten Zelle. Die erhöhte p16-Konzentration kann mithilfe von Antikörpern als Surrogatmarker für E7 nachgewiesen werden (Doorbar 2007).

Auch im Fall der E7-Proteine ist der Unterschied zwischen HR-HPV-E7 und LR-HPV-E7 hervorzuheben. Die Bindung der E7-Proteine mit dem pRB erfolgt über ein LXCXE-Bindungsmotiv (Muenger et al. 1989). Die Affinität eines LR-HPV-E7-Proteins zu dem Rb-Protein ist wesentlich schwächer und erklärt somit das geringere onkogene Potenzial eines LR-HPV-Typen im Vergleich einem HR-HPV-Typen (Barbosa et al. 1991; Gage, Meyers & Wettstein 1990).

LR-HPV-E7 und HR-HPV-E7 können darüber hinaus den Zellzyklus über die Cyclin-abhängigen Kinasen 2 und 6 beeinflussen. CDK 2 und CDK 6 sind über das pRB maßgeblich am Übergang der G1- in die S-Phase beteiligt. CDK 2 und CDK 6 werden direkt von dem Protein p21 inhibiert, dessen Expression auf den Stimulationsreiz von p53 erfolgt (Silbernagel & Lang 2020). P21 fungiert somit als wachstumshemmender Faktor (Silbernagel & Lang 2020). HR-E7 bindet mit einer hohen Affinität an p21, LR-E7 mit einer niedrigeren. Durch die Bindung von E7 an p21 kann dieses nicht mehr die Cyclin-abhängigen Kinasen binden. Als Resultat treiben die CDKs den Zellzyklus voran und sorgen für eine ungehinderte Proliferation (Funk et al. 1997). Zudem können E7-Proteine direkt an CyclinA/CDK2 und Cyclin E/CDK2 Komplexe binden und den gleichen Effekt hervorrufen (Nguyen & Muenger 2008).

1.5 Nachweismethoden für HPV

Bereits etablierte immunhistochemisch zuverlässig nachweisbare Marker zur Bestimmung und Einteilung von Dysplasien sind p16 und MIB-1. Durch die sehr sensitive Färbung der überexprimierten Proteine p16 und Ki-67 erlauben sie Rückschlüsse über die Zellproliferation und die damit verbundene Regulierung des Zellzyklus (Petry et al. 2011).

Weitere molekulare Marker können Antikörper gegen HPV sein, die aktuell nur in der Forschung angewendet werden. Wie bereits im vorherigen Kapitel geschildert, ist eine HPV-Infektion zwar nicht zwingend ursächlich für eine CIN oder ein Cervixcarcinom, allerdings wird in 90 % der Cervixcarcinome HPV nachgewiesen (Kombe Kombe et al. 2021).

Daher können Gensequenzen humaner Papillomaviren als molekulare Biomarker verwendet werden (Lordick, Krauss & Jäger 2008). Die verschiedenen HPV-Typen unterscheiden sich in bestimmten DNA-Sequenzen. Jedoch finden sich in einigen Sequenzen Homologien, die eine typunabhängige HPV-Identifizierung möglich machen und bei PCR-Analysen genutzt werden (Resnick et al. 1990; Sotlar 2008).

1.5.1 Immunhistologie

1.5.1.1 Technik

Die Immunhistologie beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion (Hussaini, Seo & Rich 2023). Um das gesuchte Protein sichtbar zu machen, wird zunächst ein primärer Antikörper verwendet, der spezifisch an ein Epitop des Antigens bindet (Hoefler, Kreipe & Moch 2019).

Für die eigentliche Färbung unterscheidet man die direkte und die indirekte Methode. Bei der direkten Methode ist an den primären AK ein Markermolekül gekoppelt. Markermoleküle können Enzyme (beispielsweise Peroxidase oder alkalische Phosphatase) oder Fluorochrome sein. Nach der AG-AK-Reaktion wird der Farbstoff hinzugegeben, der an das Enzym bindet und so das gesuchte Protein färbt. Die indirekte Methode beruht auf einem Zwei-Schritt-Verfahren. Nach der Bindung des primären Antikörpers wird ein zweiter Antikörper, der Sekundärantikörper, hinzugegeben, der über sein Fc-Fragment an den Primärantikörper bindet. Der Sekundärantikörper ist wiederum mit einem Enzym markiert, das mithilfe eines Farbstoffs sichtbar gemacht werden kann (Hoefler, Kreipe & Moch 2019).

Werden die Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, spricht man von Immunfluoreszenz.

1.5.1.2 Antikörper

Die Spannweite an Antikörpern, die für die immunhistochemische Färbung bei cervicalen intraepithelialen Neoplasien und Cervixcarcinomen verwendet werden können, ist groß. Im Folgenden wird daher eine Auswahl der in der Forschungsliteratur am häufigsten verwendeten Antikörper genannt.

1.5.1.2.1 p16

Der Grund für den Anstieg der p16 Konzentration in der Zelle in Verbindung mit einer HPV-Infektion wurde bereits in Kapitel 1.4.4.2 erläutert. Humane Zellen exprimieren unter verschiedensten Arten von Stress p16; somit kann eine HPV-Infektion bei einer erhöhten p16-Expression nur vermutet, jedoch nicht mit Gewissheit diagnostiziert werden (Hoffmann et al. 2012). Die immunhistochemische p16-Färbung erwies sich speziell in Studien, bei denen eine HPV-Infektion nachgewiesen wurde, als sehr hilfreich. Somit bietet sie einen deutlichen Vorteil gegenüber der konventionellen Zytodiagnostik (Carozzi et al. 2008; Gustinucci et al. 2012). Daher wird bei unsicheren Diagnosen (Grenzfällen) hinsichtlich einer Dysplasie in der Zytodiagnostik eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen p16 durchgeführt. Dieses Prozedere empfiehlt u.a. das Standardisierungsprojekt „Lower Anogenital Squamous Terminology“ (LAST).

Die p16-Expression nimmt in der Regel mit zunehmendem Schweregrad der Dysplasie zu (Masumoto et al. 2003; Sangwaiya et al. 2018).

Tabelle 5 zeigt eine Auswahl der in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper für p16. Im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen ist hierfür der vorverdünnte Antikörper p16 (Klon: E6H4™; Bestellnummer: 06594441001) der Firma Roche (in Tabelle 5 gelistet) etabliert. Die immunhistochemische p16-Färbung wurde in dieser Studie mit diesem AK durchgeführt.

Antikörper	Clone	Bestellnummer	Antigen	Verdünnung	Hersteller
Anti-CDKN2A/p16INK4a antibody	Mouse monoclonal [1D7D2A1]	ab201980	CDKN2A/p16 ^{INK4a}	1:300	Abcam, Cambridge, UK
CinTec p16	Monoclonal mouse [E6H4]	705-4713	p16 ^{INK4a}	1:3	Ventana/Roche Basel, Schweiz
CinTec Plus	monoclonal mouse antibody clone [E6H4], primary recombinant rabbit antibody clone [274-11AC3V1]	760-100	p16 ^{INK4a} , Ki-67	rtu	Roche, Basel, Schweiz
p16	E6H4™	065944-41001	p16 ^{INK4a}	rtu	Roche, Basel, Schweiz

Tabelle 5: Übersicht p16 Antikörper

1.5.1.2.2 MIB-1

Die Expression des Proliferationsmarkers *MKI67* (marker of proliferation Ki-67), welcher mit den Antikörper Ki-67 und MIB-1 immunhistochemisch nachgewiesen werden kann, nimmt bei dysplastischen Veränderungen im Epithel zu. In 97 % der Proben, in denen eine CIN nachgewiesen wurde, konnte Ki-67 nachgewiesen werden (Sangwaiya et al. 2018). Die dauerhafte Expression von *MKI67* während des gesamten Zellzyklus macht die Antikörper MIB-1 und Ki-67 zu aussagekräftigen Markern für die Zellproliferation und für die Prognose maligner Erkrankungen (Gerdes et al. 1984; Gerdes 1990). Während der G0-Phase (ruhende Zellen) wird *MKI67* nicht exprimiert (Gerdes et al. 1984).

Immunhistochemisch lässt sich die p16- mit einer MIB-1-Färbung kombinieren. Studien haben gezeigt, dass eine Kombination der beiden Marker eine bessere Risikoratifizierung bietet als die reine Zytologie (Clarke et al. 2019; Iaconis et al. 2007).

Die Ki-67-Färbung des Instituts für Pathologie in Tübingen erfolgt mit dem monoclonal mouse AK MIB-1 der Firma Agilent/Dako (Klon: Monoclonal mouse MIB-1; Bestellnummer: M7240) in einer Verdünnung von 1:400. Mit diesem wurde auch die immunhistochemische Ki-67-Färbung in dieser Studie durchgeführt. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über in der Routine verwendeten Antikörper verschiedener Hersteller zum Nachweis von Ki-67.

Antikörper	Clone	Bestellnummer	Antigen	Verdünnung	Hersteller
Ki-67-Antigen	Monoclonal mouse anti-human IgG1 [MIB-1]	GA626	Ki-67	1:200	Agilent DAKO, Santa Clara, USA
Ki-67 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody	Monoclonal rabbit IgG [SP6]	#MA5-14520	Ki-67	1:250	Invitrogen (Thermo Fisher), Waltham, USA
Ki-67-Antigen	Monoclonal mouse MIB-1	M7240	Ki-67	1:400	Agilent DAKO, Santa Clara, USA

Tabelle 6: Übersicht Ki-67 Antikörper

1.5.1.2.3 Onkoprotein E6

Das Onkoprotein E6 ist ein Indikator für das Risiko der Entwicklung einer Dysplasie und somit auch eines Carcinoms und könnte daher diagnostisch und prognostisch genutzt werden (Doorbar 2007; Wentzensen 2011). Laut Wentzensen wird die Entwicklung von Anti-E6-Antikörpern durch die geringe Immunogenität von E6 erschwert (Wentzensen 2011). Der E6-Nachweis beruht aktuell weitgehend auf aufwändigeren sowie kostspieligeren Verfahren wie z.B. die in situ Hybridisierung (ISH), die weitgehend auf Forschungslabore beschränkt sind (Schipper & Zielinski 2020). In Tabelle 7 finden sich gegen E6 gerichtete Antikörper, welche laut Literatur für den E6-Nachweis am formalinfixierten paraffinierten (FFPE) Material geeignet sind. Eine Studie der Ludwig-Maximilians-Universität München zeigte mit dem Antikörperklon C1P5 der Firma Abcam vielversprechende Ergebnisse: Immunhistochemisch ließ sich am formalinfixierten Paraffinmaterial mittels des Klons C1P5 das Onkoprotein E6 mit einer kräftigen zytoplasmatischen Färbung in HPV-infizierten Zellen nachweisen (Stiasny 2018; Stiasny et al. 2016). Darüber hinaus ließ sich eine Abstufung der Expression differenzieren (Stiasny et al. 2016).

Antikörper	Clone	Bestellnummer	Antigen	Verdünnung	Hersteller
Anti-HPV-18-E6-antibody	Mouse monoclonal [BF7]	ab20192	HPV 18 E6	assay dependent dilution	Abcam, Cambridge, UK
HPV-16-E6-Protein-antibody	Rabbit polyclonal	orb10837	HPV16 E6	0,5 mg/ml	Biorbyt, Cambridge, UK
Anti-HPV-16-E6 + HPV-18-E6-antibody	Mouse monoclonal [C1P5]	ab51931	HPV 16 + 18 E6	prediluted	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 7: Übersicht über die laut Literatur am formalinfixierten paraffinierten Material verwendbaren Antikörper zum Nachweis des E6-Onkoproteins.

1.5.1.2.4 Onkoprotein E7

Das Onkoprotein E7 gilt als vielversprechender Marker für die Detektion von HPV-Infektionen (Shi et al. 2018). Das für HPV spezifische Onkoprotein E7 könnte p16 als Surrogatmarker für eine HPV-Infektion ablösen, da die Expression von p16 nicht HPV-spezifisch erfolgt (Shi et al. 2018; Stiasny et al. 2016). Ebenso wie bei E6 wird die Entwicklung von Antikörpern gegen E7 durch die geringe Immunogenität erschwert (Wentzensen 2011). In Tabelle 8 finden sich die bislang laut Literatur am formalinfixierten paraffinierten Material geeigneten Antikörper zum E7-Nachweis. Hierbei fällt auf, dass die Antikörper weitestgehend gegen das E7-Onkoprotein vom HPV-Typ 16 gerichtet sind.

Antikörper	Clone	Bestellnummer	Antigen	Verdünnung	Hersteller
HPV-16-E7	Mouse monoclonal [8C9]	#28-0006	HPV 16 E7	0,1µg/ml	Invitrogen (Thermo Fisher), Waltham, USA
HPV-16-E7/ E7 antibody	Rabbit polyclonal	orb10839	HPV 16 E7	0,5mg/ml	Biorbyt, Cambridge, UK
Anti-Human Papilloma virus type 16 E7	Rabbit monoclonal [HL1647]	ab308180	HPV 16 E7	assay dependent dilution	Abcam, Cambridge, UK
HPV-16-E7-Antikörper	Mouse monoclonal IgG1 [ED17]	sc-6981	HPV 16 E7	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany
Anti-HPV-18-E7 antibody	Mouse monoclonal [8E2]	ab100953	HPV 18 E7	assay dependent dilution	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 8: Übersicht über die laut Literatur am formalinfixierten paraffinierten Material verwendbaren Antikörper zum Nachweis des E7-Onkoproteins.

1.5.1.2.5 Hauptkapsidprotein L1

Die immunchemische Expression des L1-Hauptkapsidproteins ist mit der produktiven Phase einer HPV-Infektion und damit der Produktion viraler Partikel verbunden (Hoshikawa et al. 2010). Die Expression des Kapsidproteins L1 erfolgt vor allem in den superfiziellen Epithelschichten (Laimins 1996, Przybylski et al. 2023). Dort werden die viralen Genome unter anderem durch das Hauptkapsidprotein L1 verpackt (Buck, Day & Trus 2013; Doorbar 2007; Van Doorslaer 2018). Die L1-Expression nimmt mit zunehmendem Dysplasiegrad ab (Hoshikawa et al. 2010). In Kombination mit der immunhistochemischen p16-Färbung könnte die L1-Expression nach Hoshikawa et al. hilfreich zur Risikoeinstufung geringgradiger Dysplasien sein (Hoshikawa et al. 2010).

In Tabelle 9 finden sich gegen L1 gerichtete Antikörper, welche laut Literatur oder Hersteller für den L1-Nachweis am formalinfixierten paraffinierten (FFPE) Material geeignet sind.

Antikörper	Clone	Bestellnummer	Antigen	Verdünnung	Hersteller
Anti-HPV-antibody	Mouse monoclonal [K1H8]	ab 75574	HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 51, 52, 56, 58 L1	rtu	Abcam, Cambridge, UK
Anti-HPV16 L1 antibody	Rabbit recombinant Monoclonal VL1 antibody	HPV16/2058 R	HPV 16 L1	0.2 mg/mL	Abcam, Cambridge, UK
HPV 16 L1 Antikörper	Maus monoklonales IgG _{2a} K [CAMVIR-1]	sc-47699	HPV 16 L1	200 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany
HPV pan-specific L1 Monoclonal Antibody	[5307]	MA5-33266	HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 L1	Assay-Dependent	Invitrogen (Thermo Fisher), Waltham, USA

Tabelle 9: Übersicht über die laut Literatur und Hersteller am formalinfixierten paraffinierten Material verwendbaren Antikörper zum Nachweis des L1-Hauptkapsidproteins.

1.5.2 In situ Hybridisierung (ISH)

Die ISH ist eine molekularbiologische Methode, bei der Nukleotidsonden an ihre komplementären DNA- oder RNA-Sequenzen binden (Mabruk 2004). Die Hybridisierung erfolgt durch Basenpaarung zwischen Adenin und Thymin (bzw. Uracil) sowie Cytosin und Guanin (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Diese spezifische Bindung ermöglicht den Nachweis chromosomaler Veränderungen in der DNA bzw. RNA eines Gewebes.

Die Visualisierung der genomischen Zielsequenz erfolgt mit DNA- oder RNA-Sonden, welche aus radio-, fluoreszenz- oder antigenmarkierten Basen aufgebaut und mittels Autoradiographie, Fluoreszenzmikroskopie oder Immunhistochemie detektiert werden können (IHC) (Jensen 2014). Wird eine fluoreszierende Markierung verwendet, spricht man von Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Die ISH gilt als Goldstandard im Nachweis viraler Onkogene, da sie präzise und zuverlässige Ergebnisse liefert (Outh-Gauer et al. 2019). Die Hybridisierungssignale ermöglichen eine direkte Korrelation zwischen histopathologischen Veränderungen und HPV-DNA (Hara et al. 1990).

1.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine molekularbiologische Technik, die zur Vervielfältigung von DNA verwendet wird, wenn die zu untersuchenden Nukleinsäuresequenzen in niedriger Kopienzahl vorliegen und eine hochempfindliche Methode zum Nachweis erforderlich ist (Sotlar 2008). Ziel der PCR ist es, spezifische DNA-Sequenzen, wie beispielsweise HPV-DNA, zu amplifizieren. Die PCR-Produkte können anschließend durch elektrophoretische Fragmentanalyse und Sequenzierung sichtbar gemacht werden (Hoefler, Kreipe & Moch 2019). Die PCR-Methode liefert in 92 % der CINs und in 96 % der Cervixcarcinome zuverlässige Ergebnisse beim Nachweis von HPV-DNA. (Yoshikawa et al. 1991). Weitgehende Sequenzhomologien zwischen den verschiedenen HPV-Typen ermöglichen die Identifikation spezifischer Virusvarianten (Resnick et al. 1990; Sotlar 2008). PCR-Primer, die auf die E6- oder E7-Regionen abzielen, werden bevorzugt, da die L1- oder E1-Regionen häufig bei der Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom verloren gehen und somit fortgeschrittene Erkrankungen übersehen werden könnten (Williams, Kostjuk & Biron 2022). Die reverse-transkriptase-PCR (RT-PCR) erweitert die herkömmliche PCR um den Schritt der reversen Transkriptionsreaktion, bei der aus RNA eine komplementäre DNA (cDNA) erzeugt wird (Bachman 2013). Anschließend wird die cDNA mittels PCR amplifiziert (Bachman 2013). Diese Methode wird zum Nachweis von RNA-Viren und zur Analyse von mRNA verwendet. Die RT-PCR kann zum Nachweis der viralen m-RNA insbesondere bei Spleißvarianten genutzt werden (Hsu et al. 1993).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Eine HPV-Infektion ist in den meisten Fällen einer cervicalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) oder eines Cervixkarzinoms nachweisbar; jedoch damit nicht zwingend assoziiert (Kombe Kombe et al. 2021). Die derzeit in der Diagnostik der CIN und des Cervixkarzinoms verwendeten Antikörper gegen p16 und Ki-67 sind sensitiv für zelluläre Stresssignale und Proliferation, liefern jedoch keine gesicherte Information über eine HPV-Infektion.

Es stellt sich somit die Frage, ob mittels Immunhistologie mit Antikörpern gegen HPV-Proteine ein spezifischer HPV-Nachweis gelingen könnte. Hierfür könnten sich insbesondere Antikörper gegen die E6- und E7-Onkoproteine von HPV und in geringerem Maß Antikörper gegen das Hauptkapsidprotein L1 eignen.

Ziel dieser Studie ist die Etablierung eines oder mehrerer Antikörper zum routinemäßigen immunhistochemischen Nachweis der HPV-Onkoproteine E6 und E7 und des HPV-Hauptkapsidproteins L1 am formalinfixierten paraffinierten Gewebe zum Ersatz des HPV-unspezifischen p16-Nachweises.

Hierzu sollen die Antikörperklone C1P5, BF7, 8E2 und K1H8 an Paraffinschnitten von Tissue Microarrays von CINs und Cervixkarzinomen ausgetestet werden. Insbesondere soll geprüft werden, ob die Antikörper auch bei anderen als den bislang von den Herstellern validierten und in der Literatur beschriebenen HPV-Typen binden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialgewinnung

Die Studie wurde der Ethik-Kommission zur Beratung vorgelegt und es bestanden seitens der Kommission keine Bedenken gegen die Durchführung der Studie (Aktenzeichen: 723/2022BO2). Die für die Studie benötigten Fälle wurden mithilfe des Programms „NX_Pasnet_Patientendatei“ des Instituts für Pathologie Tübingen ermittelt. Über den Reiter „Erweiterte Suche“ dieses Programms wurden mithilfe der Parameter „Kandolf“ und „HPV“ im Zeitraum vom 01.01.2002 bis zum 31.12.2009 nach geeigneten Fällen gesucht. Es wurde angestrebt, 300 bis 400 Fälle zu identifizieren, um ein möglichst breites Spektrum verschiedener HPV-Typen zu erfassen. Es ließen sich 365 Fälle identifizieren, die im Institut befundet und mittels PCR im Rahmen der Routinediagnostik analysiert wurden. Hierbei handelte es sich weitgehend um Cervixbiopsien. Die Anzahl der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31 und 33 wurde auf je 30 Fälle begrenzt, da diese im Gegensatz zu den restlichen HPV-Typen wesentlich häufiger identifiziert wurden. Die Fälle wurden chronologisch sortiert und in eine Excel Tabelle überführt. In der Tabelle wurden die Eingangsnummer, das Alter der Patientinnen, die Materialart, die Diagnose (CIN-Stadium, Cervixcarcinom), HPV-Typ und die für die Studie relevanten Paraffinblöcke erfasst.

Im nächsten Schritt wurden die Paraffinblöcke der Fälle – die späteren Donorparaffinblöcke zur Erstellung der Tissue Microarrays - dem Archiv des Institutes entnommen. Bei Begutachtung der Blöcke stellte sich heraus, dass auf den mittels PCR untersuchten Blöcken der Cervixbiopsien nur noch spärliches Gewebematerial vorhanden war. Daher wurde eine neue Suche über das Programm „NX_Pasnet_Patientendatei“ gestartet, um Fälle zu identifizieren, bei denen unmittelbar nach der positiven PCR-Untersuchung auf HPV Konisationen durchgeführt wurden. Um das dysplastische Cervixepithel in den Konisaten identifizieren zu können, wurden für diese Fälle die mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitte dem Archiv entnommen.

Ferner wurden sog. Paraffinzellblöcke von einer cervicalen Plattenepithelcarcinom-Zelllinie (HeLa) und zwei Mammacarcinomzelllinien (SKBR3, MCF7) in der vorliegenden Studie verwendet.

2.1.2 Standardfärbungen

2.1.2.1 Hämatoxylin Eosin

Hämatoxylin-Eosin Ventana HE 600

2.1.3 Antikörper

Tabelle 10 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper.

Anti-körper	Clone	Bestellnummer	Antigen	Verdünnung	Hersteller
Anti-HPV16 E6 + HPV18 E6 antibody	Mouse monoclonal [C1P5]	ab70	HPV16 E6 + HPV18 E6. HPV-18 E6-beta galactosidase fusion protein	1:100 (in Antikörper Diluent, Ventana)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-HPV18 E6 antibody	Mouse monoclonal [BF7]	ab20192	HPV 18 E6	1:100 (in Antikörper Diluent, Ventana)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-HPV18 E7 antibody	Mouse monoclonal [8E2]	ab100953	HPV 18 E7	1:100 (in Antikörper Diluent, Ventana)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-HPV-antibody	Mouse monoclonal [K1H8]	ab 75574	HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 51, 52, 56, 58 L1	rtu	Abcam, Cambridge, UK

Anti-körper	Clone	Bestell-nummer	Antigen	Verdün-nung	Hersteller
MIB-1	Mouse monoclonal MIB-1	M7240	Ki-67	1:400 (in Antikörper Diluent, Ventana)	Agilent DAKO, Santa Clara, USA
p16	INK 4a	0659444 1001	p16	rtu	Cintec/Roche, Basel, Schweiz
p53	DO-7	nclp53do 7	p53	1:400 (in Antikörper Diluent, Ventana)	Novocasttra, Nussloch, Deutschland

Tabelle 10: in der Studie verwendete Antikörper

2.1.3.1 Lokalisation der Zielstruktur der Antikörper

Tabelle 11 zeigt eine Übersicht über spezifische Zielstrukturen der jeweiligen Antikörper.

Antikörper	Spezifität
C1P5	Zytoplasma
BF7	Zellkern
8E2	Zytoplasma (Sun et al. 2021)
K1H8	Zellkern und Zytoplasma (Iwasaki et al. 1992)
MIB-1	Zellkern
p16	Zellkern
p53	Zellkern

Tabelle 11: Spezifität der in der Studie verwendeten Antikörper

2.1.4 Reagenzien

Tabelle 12 zeigt die verwendeten Reagenzien.

Reagenz	Firma & Bestellnummer	Herstellerhinweise	Verwendungszweck
Antibody Diluent	Ventana (Bestell-Nr. 251-018)	Eiweißhaltige Lösung; ready-to-use, 1L Flasche	Antikörperverdünnung
Bluing Reagent	Ventana (Bestell-Nr. 760-2037)	250 Tests	Nach Gegenfärbung
EZ Prep	Ventana (Bestell-Nr. #950-102)	In wässriger Lösung pH 7; 2L Flasche, 10x Konzentrat	Entparaffinierung (lösungsmittelfrei)
Hematoxylin	Ventana (Bestell-Nr. 760-2021)	250 Tests	Gegenfärbung
OptiView™ Peroxidase Inhibitor	Ventana (Bestell-Nr. 760-700)	3 % H ₂ O ₂ 25mL Spender	Endogene Peroxidase

Reagenz	Firma & Bestellnummer	Herstellerhinweise	Verwendungszweck
Protease 1	Ventana (Bestell-Nr. 760-2018)	0,5U/min Ähnlich der Pronase	Antigendemaskierung
Reaction Puffer	Ventana (Bestell-Nr. #950-300)	Tris Puffer mit pH 7.6-7.8 2L Flasche, 10x Konzentrat	Waschpuffer & Inkubationslösung
SSC (sodium salt citrate)	Ventana (Bestell-Nr. #950-110)	pH 6,95-7,05 2L Flasche, 10x Konzentrat	Stringenter Waschpuffer
ULTRA CC1 (cell conditioner)	Ventana (Bestell-Nr. #950-124)	Tris/Borat/EDTA Puffer (leicht basisch zur Zellvorbehandlung, pH 8,4) rtu, 2L Flasche	Mit Hitzevorbehandlung verbesserte Immunreaktion zwischen Primär-AK und Zielantigen erreichen
ULTRA CC2 (cell conditioner)	Ventana (Bestell-Nr. #950-123)	Leicht saurer Citratpuffer mit pH 6,0 rtu, 1L Flasche	Mit Hitzevorbehandlung eine verbesserte Immunreaktion zwischen Primär-AK und Zielantigen erreichen
ULTRA LCS (liquid coverslip)	Ventana (Bestell-Nr. #650-010)	Aliphatisches Öl mit niedriger Dichte; bei hohen Temperaturen verwendbar; rtu, 2L Flasche	Verhindert das Austrocknen der Reagenzien

Tabelle 12: Reagenzien

2.1.5 Optiview Detection Kit

Das für die IHC verwendete Detection Kit mit den dazu gehörigen Reagenzien wird in den Tabellen 13 und 14 dargestellt.

Detection Kit	Firma & Bestell-nummer	Herstellerhinweise	Verwendungszweck
OptiView DAB Detection Kit	Cintec/Roche, (Bestell-Nr. 06396500001) (Katalog-Nr. 760-700)	Enthält je 25 mL -OptiView HQ Universal Linker -OptiView HRP Multi-mer -OptiView DAB -OptiView H2O2 -OptiView Copper	indirect, biotin-free system for detecting mouse IgG, mouse IgM, and rabbit primary antibody

Tabelle 13: Optiview Detection Kit

Reagenz	Firma & Bestell-nummer	Herstellerhinweise	Verwendungszweck
OptiView™ HQ Universal Linker	Ventana (Bestell-Nr. 760-700)	Mischung aus 3 polyclonalen HQ-markierten Antikörpern (HQ-Ziege-Anti-Kaninchen Ig, HQ-Ziege-Anti-Maus IgG, HQ-Ziege-Anti-Maus IgM) in einem Puffer, der Protein mit 0,05 % ProClin 300 (Konservierungsmittel) enthält; 12-15 Haptene pro AK, die mit den AK konjugiert sind; 25mL Spender	Spezifischer Sekundärantikörper

Reagenz	Firma & Bestellnummer	Herstellerhinweise	Verwendungszweck
OptiView™ HRP Multimer	Ventana (Bestell-Nr. 760-700)	Monoklonaler tertiärer HRP-markierter Maus-Anti-HQ-AK (circa 40 µg/mL) in einem Puffer, der Protein mit 0.05 % ProClin 300 (Konservierungsmittel) enthält; 7 HRP-Enzyme pro AK konjugiert; 25mL Spender	Enzymmarkierter Tertiärantikörper
OptiView™ DAB	Ventana (Bestell-Nr. 760-700)	0.2 % w/v 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) in einer Stabilisatorlösung mit einem Konservierungsmittel; 25mL Spender	Chromogen (brauner Niederschlag wird sichtbar)
OptiView™ H ₂ O ₂	Ventana (Bestell-Nr. 760-700)	0.04 % H ₂ O ₂ in einer phosphatgepufferten Lösung; 25mL Spender	Katalysator
OptiView™ Copper	Ventana (Bestell-Nr. 760-700)	5.0 g/L Kupfersulfat in einem Acetatpuffer mit einem Konservierungsmittel; 25mL Spender	Metallische Verstärkung der Färbung

Tabelle 14: Reagenzien des Optiview Detection Kits

2.2 Methoden

2.2.1 HE-Nachbegutachtung

Aufgrund der nach der PCR nur noch spärlich vorhandenen Gewebereste der archivierten Paraffinblöcke der Cervixbiopsien wurde bei diesen Blöcken auf eine HE-Nachbegutachtung verzichtet. Bei den Blöcken der Konisate, bei denen im Gegensatz zu den Biopsien noch reichlich Material vorhanden war, wurden zur sicheren Identifizierung des dysplastischen Epithels die HE-gefärbten Routinepräparate aus dem Archiv hinzugezogen. Zunächst wurde hierfür jeder Schnitt am Mikroskop in einer Übersichtsvergrößerung (2,5-fach) nach dysplastischen Arealen abgesucht. Zur Verifizierung der Dysplasie wurde zumeist noch eine höhere Vergrößerung gewählt (5-fach, 10-fach, 20-fach und 40-fach) gewählt. Um den Stanzbereich für die spätere Erstellung der Tissue Microarrays (TMA) zu markieren, wurden mit einem Permanentmarker die dysplastischen Areale auf dem Deckglas des Schnittpräparats gekennzeichnet.

2.2.2 Herstellung der Tissue Microarrays (TMAs)

Zur Herstellung der TMAs wurde die von Wilkens patentierte Technik (Patentnummer: DE 102 03 524 A 1) angewandt (Wilkens 2003). Hierzu wurden aus einer Röntgenfolie 33 x 21 mm große Stücke – die späteren Probenträger – ausgeschnitten und auf einer Seite mit doppelseitigem Klebeband versehen. Die Maße dieser Stücke ergaben sich aus den vorher ausgemessenen Stahlmodellen, in die der Probenträger nach Bestückung des Klebebandes mit Gewebezylindern gelegt wird, um einen Paraffinblock, den sogenannten Tissue Mikroarray zu gießen. Die mittels doppelseitigen Klebebands modifizierte Röntgenfolie war essenziell, um die später hergestellten Paraffingewebestanzylinder in einem rechtwinkligen Koordinatensystem eindeutig platzieren zu können. Das Klebeband stellte sicher, dass die Gewebestanzylinder aufrecht auf dem Klebeband standen. Zudem gewährleistete die Röntgenfolie eine plane, knickstabile und schmelzfeste Fläche, sodass nach dem Gießen, dem Erkalten des Paraffin-Mikroarrayblocks und dem Abziehen des Probenträgers vom Paraffinblock alle Gewebeproben auf der Blockoberfläche zu liegen kamen.

Mithilfe einer Hautstanze von $d=3$ mm und $d=5$ mm wurden die Gewebeproben in Form von Gewebezylindern aus den Donorparaffinblöcken gestanzt, um sie in einen Multiblock zu überführen.

Der ausgestanzte Paraffingewebezylinder wurde mit einer konventionellen Hohl- nadel aufgenommen und umgedreht auf die mit doppelseitigem Klebeband be- stückte Röntgenfolie gesetzt und festgedrückt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis alle Probenplätze des jeweiligen TMAs mit Stanzzylindern bestückt waren. Die TMAs mit einem Stanzdurchmesser von $d=3$ mm wurden mit 10×6 Proben bestückt, die TMAs mit einem Durchmesser von $d=5$ mm mit 6×4 Proben. Die Orientierung in den Gewebemicroarrays erfolgte mit Hilfe von zwei 1 mm durch- messenden Leberstanzzylindern, welche seitlich an den Gewebezylinder der Po- sition 01-01 (x-y) gestellt wurden. Für die Fälle, bei denen genügend repräsentatives Gewebe in den Paraffinblöcken vorhanden war, wurden pro Block mehrere Stanzzylinder entnommen. Daher kam es zu Abweichungen der Anzahl der in dem Programm „NX_Pasnet_Patientendatei“ identifizierten Fälle und den in den TMA eingestellten Stanzzylindern. Insgesamt wurden 598 Stanz- zylinder den Donorparaffinblöcken entnommen.

Um die anschließende Auswertung der TMAs zu gewährleisten, wurde parallel zum Stanzen und Einstellen eines Gewebezylinders auf das doppelseitige Kle- beband die Position des Gewebezylinders im Koordinatensystem des TMAs mit seiner K-Nummer in einer Excel-Datei erfasst.

Nach dem Besetzen der Positionen auf dem Klebeband mit den Gewebestanz- zylindern wurde der Probenträger samt doppelseitigem Klebeband und auf ihm aufrechtstehenden Stanzzylindern in ein Ausgießförmchen gelegt und mit $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ heißem Paraffin überschichtet. Die Ausgießmulden wurden daraufhin mit einer Aluminiumfolie abgedeckt und auf eine $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ warme Wärmeplatte gelegt, bis das Paraffin der Gewebestanzzylinder aufgeschmolzen war und sich mit dem über- schichteten Paraffin verbinden konnte. Anschließend wurde die Metallmulde auf eine Kälteplatte geschoben und die Röntgenfolie mithilfe einer heißen Präparier- nadel auf den Boden des Ausgießförmchens gedrückt.

Nach Erstarrung des Paraffins im Bereich des Probenträgers konnte der entstehende Paraffin-TMA nochmals mit 80 °C heißem Paraffin überschichtet werden. Das Abkühlen erfolgte zunächst für 5 Minuten auf einer Kälteplatte bei -15 °C, anschließend über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dem Auskühlen und der damit zusammenhängenden Schrumpfung des Paraffins, konnten die TMAs aus der Metallmulde genommen werden. Danach wurde die mit Klebeband bestückte Röntgenfolie entfernt.

Zur Dokumentation wurden direkt nach dem Abziehen des Klebebands Fotos angefertigt, um Unklarheiten bezüglich der Zuordnung der Cores beim Mikroskopieren zu vermeiden. Insgesamt wurden ein Kontroll-TMA mit einer Stanzgröße von $d = 5 \text{ mm}$ und 21 TMAs, davon drei TMAs mit einer Stanzgröße von $d = 3 \text{ mm}$ und 18 TMAs mit einer Stanzgröße von $d = 5 \text{ mm}$ erstellt.



Abbildung 1: TMA 01: Mit Paraffingewebestanzzylindern bestückter Probenhalter (Röntgenfilm mit doppelseitigem Klebeband) in einer Stahlmulde zur Erstellung des Paraffin-TMAs vor dem Überschichten mit Paraffin und vor dem anschließenden Aufschmelzen.



Abbildung 2: TMA 01: Erkalte Paraffin-TMA mit Probenhalter auf der Oberfläche nach Herausnahme des TMA aus der Stahlmulde.

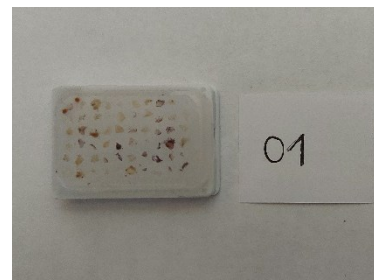


Abbildung 3: TMA 01: Fertiger Paraffin-TMA nach Abziehen des Probenhalters.

2.2.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden am Kontrollblock und an den TMAs 1 – 6 durchgeführt. Zum Erstellen der Schnitte am Rotationsmikrotom wurden die TMAs auf der Kälteplatte bei -9 °C gekühlt. Nach dem sogenannten Anschneiden des TMA-Blockes zum Erhalt aller TMA-Stanzzyylinder auf einem Schnitt wurden $2,5 \mu\text{m}$ dicke Gewebeschnitte angefertigt. Von jedem TMA wurden mindestens 10 Schnitte erstellt.

Die am Mikrotom erstellten Paraffinschnitte wurden auf die Oberfläche eines heißen Wasserbades (48-50°C) zur Streckung des Schnittes und damit zur Entfernung von Schnittfalten gelegt und auf silanisierte Objektträger (OT) (TOMO 75x25x1mm) aufgezogen. Diese Objektträger wurden daraufhin bei Raumtemperatur für 15 Minuten in aufrechter Position getrocknet. Die besten Schnitte wurden immunhistochemisch und mittels Hämatoxylin-Eosin untersucht. Auf die Schnitte des Kontrollblockes wurden zusätzlich Schnitte von den Zellblöcken der Carcinomzelllinien aufgezogen.

Die Gewebeschnitte wurden im vollautomatischen Färbeautomaten BenchMark ULTRA (Ventana) vorbehandelt und mit dem Primärantikörper und dem OptiView DAB IHC Detection Kits (indirekte, biotinfreie Methode) gefärbt. Um die gefärbten Paraffinschnitte vor Verkratzen zu schützen, wurden diese im letzten Schritt mit einem Deckglas und einem Einbetttharz eingedeckelt.

2.2.3.1 OptiView Detection Kit

Die Firma Ventana verwendet bei ihrem OptiView DAB IHC Detection Kit (OptiView) ein indirektes und biotinfreies System zum Nachweis des Primärantikörpers, welcher ein Maus-IgG, Maus-IgM und Kaninchen-Primärantikörper sein kann. Die Visualisierung des Primärantikörpers erfolgt bei diesem System mittels Sekundär- und Tertiärantikörpern. Die Tertiärantikörper sind mit einem Enzym gekoppelt, welches einen bestimmten Farbstoff (z.B. DAB) zu einem Niederschlag (z.B. braun) umsetzt.

2.2.3.2 Backen und Entparaffinierung der Objektträger

Um die Gewebehaftung auf dem OT zu optimieren, werden die frisch erstellten und auf einem silanisierten Objektträger aufgezogenen Schnittpräparate zum sogenannten Backen auf eine Heizplatte bei 60°C für mindestens 10 min gelegt. Anschließend werden die Schnittpräparate auf die sogenannten Thermopads des immunhistochemischen Färbeautomaten BenchMark ULTRA (Ventana) gelegt. Auch hier erfolgt vor dem Entparaffinieren ein Backschritt. Die Entparaffinierung erfolgt auf den Thermopads bei einer Temperatur von 75 °C. Das Paraffin schmilzt und wird mittels EZ Prep (Ventana) aus dem Gewebe entfernt und vom Objektträger gewaschen.

Die Vorgehensweise erfolgt in folgenden Schritten.

1. Aktivierung des Mixers
2. Erwärmen des OT auf 60°C und Inkubation für 4 Minuten (Backen)
3. Deaktivieren des Mixers
4. Erhöhen der Temperatur des OT auf 72°C (Entparaffinierung) und Inkubation für 4 Minuten
5. Spülung des OTs mit EZ Prep™
6. Coverslip mittels ULTRA LCS
7. Spülung des OTs mit EZ Prep™
8. Coverslip mittels ULTRA LCS
9. Aktivieren des Mixers
10. Heizung des OTS ausschalten
11. Spülung des OTs mit EZ Prep™

2.2.3.3 Spezielle Vorbehandlung der Schnitte

Die Vorbehandlung der Schnitte hängt insbesondere von dem verwendeten Antikörper und der Einbettung des Gewebes ab.

Die Vorbehandlung für die AK C1P5, BF7, 8E2, K1H8, MIB-1, p16 und p53 erfolgte mittels EDTA Puffer (ULTRA CC1). Durch die Vorbehandlung werden die Verbindungen, die durch das Formalin bei der Fixierung des Gewebes entstanden sind, gelöst und damit das Gewebe wieder renaturiert. Dadurch wird es möglich, dass der Antikörper mit dem Antigen binden kann.

1. CC1 langsam auftragen
2. Cell Conditioner und Coverslip auftragen
3. Erhitzen des OT auf 100°C und Inkubation für 4 Minuten mit ULTRA CC1
4. Inkubation für 4 Minuten
5. Inkubation für 8 Minuten
6. Auftragen von ULTRA CC1
7. Cell Conditioner und Coverslip auftragen
8. Inkubation für jeweils zweimal 8 Minuten
9. Auftragen von ULTRA CC1
10. Cell Conditioner und Coverslip auftragen

11. Inkubation für jeweils zweimal 8 Minuten
12. Auftragen von ULTRA CC1
13. Cell Conditioner und Coverslip auftragen
14. Inkubation für 8 Minuten
15. Auftragen von ULTRA CC1
16. Cell Conditioner und Coverslip auftragen
17. Auftragen von ULTRA CC1
18. Cell Conditioner und Coverslip auftragen
19. Auftragen von ULTRA CC1
20. Cell Conditioner und Coverslip auftragen
21. Ausschalten der OT-Heizung
22. Auftragen von ULTRA CC1
23. Cell Conditioner und Coverslip auftragen
24. Spülung mit dem Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
25. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
26. Coverslip auftragen
27. ULTRA CC1 für insgesamt 64 Minuten

2.2.3.4 Applikationsschema der Reagenzien des OptiView Detection Kits

Die Reagenzien wurden nach folgendem Applikationsschema aufgetragen.

1. Erwärmen des OT auf 36°C
2. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
3. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
4. Einen Tropfen OptiView Peroxidase Inhibitors (OV PEROX IHBTR) zur Hemmung der endogenen Peroxidase und Coverslip auftragen
5. Inkubation für 4 Minuten
6. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
7. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
8. Coverslip auftragen
9. OT auf 37°C erwärmen
10. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
11. Coverslip auftragen

12. Hand Apply Antikörpertitration des Primärantikörpers (Monoclonal mouse C1P5, Abcam, UK; BF7, Abcam, UK; 8E2, Abcam, UK; K1H8, Abcam, UK; monoclonal mouse MIB-1 DAKo/Agilent, USA; INK 4a (p16), Cintec/Roche, Schweiz; DO-7 (p53), Novocastra, Deutschland) und Inkubation für 32 Minuten
13. OT auf 36°C erwärmen
14. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
15. 230 μ l + zufügen VA reaction buffer
16. Coverslip auftragen
17. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
18. 230 μ l + zufügen VA reaction buffer
19. Coverslip auftragen
20. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
21. Auftragen eines Tropfens (entspricht einer Reagenzienabgabe) von Opti-View HQ Universal Linker
22. Coverslip mit ULTRA LCS um Verdunsten der Reagenzien zu vermeiden
23. Inkubation für 8 Minuten
24. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
25. 230 μ l + zufügen VA reaction buffer
26. Coverslip auftragen
27. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
28. 230 μ l + zufügen VA reaction buffer
29. Coverslip auftragen
30. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
31. Auftragen eines Tropfens OptiView HRP Multimer
32. Coverslip mit ULTRA LCS um Verdunsten der Reagenzien zu vermeiden
33. Inkubation für 8 Minuten
34. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
35. 230 μ l + zufügen VA reaction buffer
36. Coverslip auftragen
37. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
38. 230 μ l + zufügen VA reaction buffer

39. Coverslip auftragen
40. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
41. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
42. Auftragen jeweils eines Tropfens des OptiView DAB Cromogens , Opti-View H2O2 als Katalysator und ULTRA LCS zur Verhinderung der Verdunstung für eine Inkubationszeit von 8 Minuten
43. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
44. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
45. Als metallischer Verstärker einen Tropfen OptiView Copper und Coverslip auftragen und 4 Minuten inkubieren
46. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
47. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

2.2.3.5 Gegenfärbung

1. Einen Tropfen Hematoxylin auftragen
2. Auftragen von ULTRA LCS
3. Inkubation für 20 Minuten
4. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
5. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
6. Coverslip auftragen
7. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
8. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
9. Für die Nach-Gegenfärbung einen Tropfen Bluing Reagent auftragen
10. Auftragen von ULTRA LCS
11. Inkubation für 8 Minuten
12. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)
13. Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
14. Coverslip auftragen
15. OT-Heizung ausschalten
16. Spülung mit Reaction Puffer (Ventana, pH 7,6-7,8)

Am Ende der Gegenfärbung wurden die Schnitte eingedeckelt.

2.2.4 Auswertungsmethode

Die Auswertung der immunhistologischen Färbungen erfolgte qualitativ und semiquantitativ. Hierzu wurde je nach verwendetem Antikörper die Lokalisation der Färbung in der Zelle (nukleär, zytoplasmatisch), die Zahl der gefärbten Epithelzellen und die Lage der gefärbten Epithelzellen im Epithelverband (basalständig, basales Drittel, Zwei-Drittel-Färbung, vollständige Epithelfärbung (3/3)) erfasst. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Mikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss Microimaging GmbH, GER) mit unterschiedlichen Vergrößerungsstufen (x1,25; x2,5; x5; x10; x20; x40).

2.2.4.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbung von p16

Bei der immunhistochemischen p16-Färbung wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Epithelzellen, die Intensität und Lokalisation der Färbung in der Zelle erfasst. Diese drei Kriterien wurden zu folgenden Kategorien zusammengefasst: Leichte Färbung, mäßiggradige Färbung, starke Färbung, nicht vorhandene Färbung, nicht auswertbare Färbung.

Einteilung der Farbe-ergebnisse	Prozentualer Anteil	Intensität der Färbung	Lokalisation der Färbung
Leichte Färbung	Bis zu 10 % der Epithelzellen gefärbt	Schwach bis gut sichtbar	Färbung zytoplasmatisch, nukleär, basal bis in die mittlere Epithelschicht
Mäßiggradige Färbung	Bandartige Färbung bis zu 50 % der Epithelzellen	Gut sichtbar bis ausgeprägt	Färbung zytoplasmatisch, nukleär bis in die mittlere Epithelschicht, teils in superfizielle Epithelschichten
Starke Färbung	Bandartige Färbung bis zu 100 % der Epithelzellen	Stark ausgeprägt	Färbung zytoplasmatisch, nukleär bis in superfizielle Epithelschichten

Tabelle 15: Kategorisierung der p16-Expressionsmuster

2.2.4.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung von p53

Bei der immunhistochemischen p53-Auswertung wurde zwischen 3 Färbemustern unterschieden. Als mutationstypische Färbemuster wurden eine Überexpression sowie ein Ausfall der p53-Expression gewertet. Das für einen Wildtyp von *TP53* sprechende Färbemuster zeigte eine inhomogene Expression in den Epithelzellen.

2.2.4.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung von MIB-1

Bei der Auswertung der immunhistochemischen MIB-1-Färbung wurde zwischen Dysplasien und Carcinomen unterschieden.

Die nukleäre Expression von MIB-1 im Epithel wurde zur Diagnostik und insbesondere zur Graduierung der Dysplasie herangezogen. Epithel mit einer nur basalständigen und inhomogenen Expression von MIB-1 wurde als dysplasiefrei gewertet. Eine bandartige Expression von MIB-1 im Epithel wurde je nach Breite der Expression im Vergleich zur Epithelhöhe als Dysplasie Grad 1 (basalständiges Epitheldrittel), als Dysplasie Grad 2 (2/3 der Epithelhöhe) und als Dysplasie Grad 3 (volle Epithelhöhe) eingestuft. Eine Expression von MIB-1 in nur vereinzelten Epithelzellen auf unterschiedlicher Epithelhöhe wurde nicht als dysplasieverdächtig gewertet. Eine fehlende Expression von MIB-1 im Epithel wurde als negatives Färbeergebnis beurteilt.

Bei den Carcinomen wurde der Anteil der nukleär gefärbten Carcinomzellen am Gesamttumor bestimmt.

2.2.4.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit den Antikörpern C1P5 (Anti-HPV-E6), BF7 (Anti-HPV-E6) und 8E2 (Anti-HPV-E7)

Bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörperklonen C1P5, BF7 und 8E2 wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Epithelzellen, die Intensität und Lokalisation der Färbung in der Zelle erfasst. Diese drei Kriterien wurden zu folgenden Kategorien zusammengefasst: Leichte Färbung, mäßiggradige Färbung, starke Färbung, nicht vorhandene Färbung, nicht auswertbare Färbung.

Einteilung der Färb- ergebnisse	Prozentualer Anteil	Intensität der Färbung	Lokalisation der Färbung
Leichte Färbung	Bis zu 10 % der Epithelzellen ge- färbt	Spärlich sichtbare Färbung	Färbung zytoplas- matisch
Mäßiggradige Färbung	Bis zu 50 % der Epithelzellen ge- färbt	Schwach ausge- prägte Färbung	Färbung zytoplas- matisch
Starke Färbung	Über 50% der Epithelzellen ge- färbt	Schwach bis gut sichtbar ausge- prägte Färbung	Färbung zytoplas- matisch

Tabelle 16: Kategorisierung der Expression mit den Antikörperklonen C1P5, BF7, 8E2

2.2.4.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit dem Anti- körper K1H8 (Anti-HPV-L1)

Bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörperklon K1H8 wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Epithelzellen, die Intensität und Lokalisation der Färbung in der Zelle erfasst. Diese drei Kriterien wurden zu folgenden Kategorien zusammengefasst: Leichte Färbung, mäßiggradige Färbung, starke Färbung, nicht vorhandene Färbung, nicht auswertbare Färbung.

Einteilung der Färb- ergebnisse	Prozentualer Anteil	Intensität der Färbung	Lokalisation der Färbung
Leichte Färbung	Bis zu 10 % der Epithel- zellen gefärbt	Spärlich sicht- bare Färbung	Färbung zytoplasma- tisch oder nukleär
Mäßiggradige Färbung	Bis zu 50 % der Epithel- zellen gefärbt	Schwach aus- geprägte Fär- bung	Färbung zytoplasma- tisch oder nukleär
Starke Färbung	Über 50 % der Epithel- zellen gefärbt	Schwach bis gut sichtbar ausge- prägte Färbung	Färbung zytoplasma- tisch oder nukleär

Tabelle 17: Kategorisierung der Expression mit dem Antikörperklon K1H8

2.2.5 Kontrollgewebe

2.2.5.1 Zelllinien

Zur Negativkontrolle für die HPV-spezifischen Antikörper (Klon C1P5 (Abcam, UK), Klon BF7 (Abcam, UK), Klon 8E2 (Abcam, UK), Klon K1H8 (Abcam, UK)) wurden die HPV-negativen Mammacarcinomzelllinien SKBR3 und MCF7 verwendet.

Als Positivkontrolle für HPV wurde die HPV18-positive HeLa-Plattenepithelcarcinomzelllinie verwendet, welche nachweislich die HPV-18-Onkoproteine E6 und E7 und das HPV18-Hauptkapsidprotein L1 exprimiert (Xiao et al. 2015). Diese drei Zelllinien lagen als Paraffinzellblock vor.

2.2.5.2 TMA-Kontrollblock K01

Als Positivkontrolle für die HPV-spezifischen Antikörper wurde der TMA K01 mit ausgewählten Fällen von bereits mittels PCR untersuchten Plattenepithel- und Adenocarcinomen mit positivem Nachweis von HPV 16, HPV 18 und HPV 56 angefertigt, um die Funktion der Klone zu testen, das heißt um die Antikörper für die nachfolgenden Färbungen zu etablieren. In dem TMA K01 wurden 7 Plattenepithelcarcinome mit insgesamt 9 Cores und 3 Adenocarcinome mit insgesamt 4 Cores eingebracht. In 2 der 7 Plattenepithelcarcinome konnte mittels PCR HPV 18 (4 Cores), in 1 Plattenepithelcarcinom HPV 16 (1 Core), in einem weiteren Plattenepithelcarcinom HPV 56 (1 Core) nachgewiesen werden. In 3 Plattenepithelkarzinom fand sich kein HPV (3 Cores). In einem Adenocarcinom war HPV 18 (2 Cores) nachweisbar, in 2 Adenocarcinomen (je 1 Core) gelang kein HPV-Nachweis. Die Antikörper wurden mit Ausnahme des bereits kommerziell vorverdünnten Antikörperklons K1H8 in verschiedenen Verdünnungen (1:25, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500) getestet, wobei die jeweiligen ausgetesteten Verdünnungen zwischen den jeweiligen Antikörpern variierten. Zusätzlich wurde der TMA K01 zur Kontrolle der Immunogenität des Gewebes mit den in der Routinediagnostik des Institutes validierten Antikörper MIB-1 (DAKO, USA), p16 (Cintec/Roche, Schweiz) und p53 (Novocastra, Deutschland) gefärbt.

2.2.5.3 TMA mit malignen Mesotheliomen

Als Negativkontrolle für den Antikörperklon K1H8 (Abcam, UK) wurde ferner ein bereits vorliegender TMA mit malignen Mesotheliomen zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der angewandten TMA-Technik

3.1.1 Zelllinien HeLa, SKBR3 und MCF7

Eine Kontrolle der Antigenität der verwendeten Zelllinien im Rahmen dieser Studie war nicht notwendig, da diese Paraffinzellblocks der Zelllinien im Rahmen der Routinediagnostik im Institut für Pathologie täglich Verwendung finden und dem Qualitätsmanagement des immunhistochemischen Labors unterliegen.

3.1.2 TMA K01

3.1.2.1 TMA K01 Negativkontrolle

Um eine unspezifische Färbung durch das Detektionssystem OptiView DAB Detection Kit ausschließen zu können, wurde der TMA K01, welcher mit ausgewählten Fällen von bereits mittels PCR untersuchten Plattenepithel- und Adenocarcinomen mit positivem Nachweis von HPV 16 und HPV 18 bestückt war, ohne Zugabe des C1P5-Antikörpers bei CC1-Vorbehandlung immunhistochemisch gefärbt. In den Abbildungen 4 und 5 wird die Negativkontrolle gezeigt.

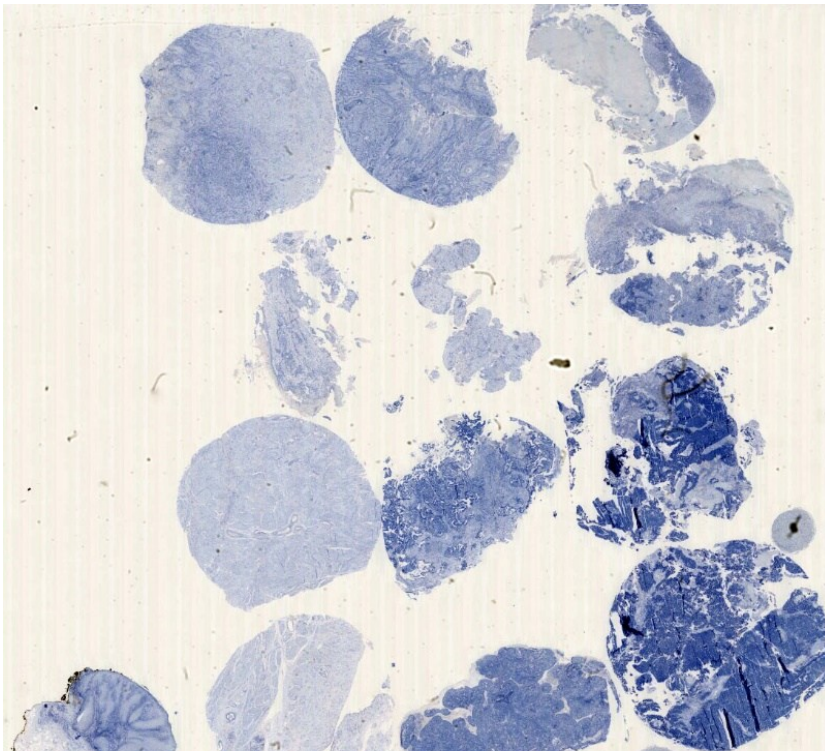


Abbildung 4: TMA K01, Negativkontrolle ohne Zugabe von C1P5. Kein Nachweis einer unspezifischen Färbung. CC1, DAB, x5.

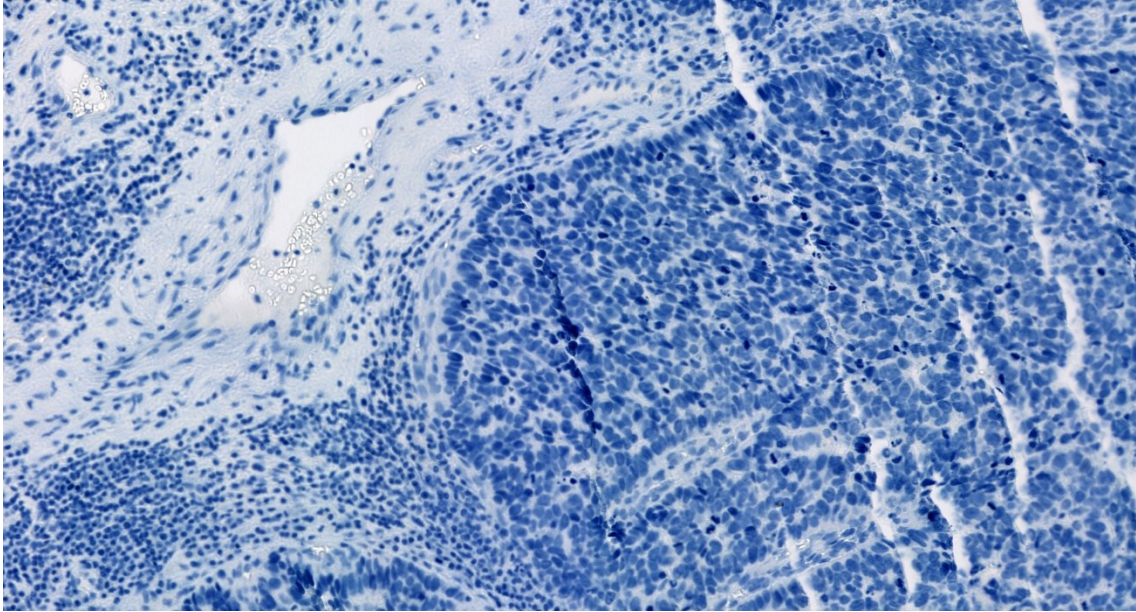


Abbildung 5: TMA K01, Negativkontrolle ohne Zugabe von C1P5. Kein Nachweis einer unspezifischen Färbung. CC1, DAB, x290.

3.1.2.2 Kontrolle der Immunogenität des Gewebes in TMA K01

Zur Kontrolle der Immunogenität der im TMA K01 eingestellten Carcinome wurde der TMA K01 mittels p16, p53 und MIB1 gefärbt.

Wie aus der Tabelle 18 hervorgeht, zeigten diejenigen Carcinome, bei denen HPV mittels PCR nachgewiesen worden war, eine kräftige Expression von p16 in 7 Cores. Interessanterweise zeigten auch 3 Cores, bei denen kein HPV nachgewiesen werden konnte, eine Expression von p16. Insbesondere aufgrund der überwiegend starken Expression von p16 bei den HPV-positiven Carcinomen kann somit von einem Erhalt der Antigenität ausgegangen werden.

TMA K01					
Cores	Histopathologische Diagnose	HPV-Typ	p16	p53	MIB-1 (%)
01-01	PLECA	HPV18	++	wt	30%
01-02	PLECA	HPV18	++	wt	20%
01-03	PLECA	HPV18	++	wt	70%
01-04	PLECA	HPV18	++	wt	50%
02-01	PLECA	HPV16	++	wt	50%
02-02	AC	PCR negativ	++	wt	20%
02-03	PLECA	PCR negativ	--	VM	5%
02-04	PLECA	HPV56	++	wt	10%
03-01	AC	HPV18	++	wt	25%
03-02	kein Tumor	HPV18	kein Tumor	kein Tumor	kein Tumor
03-03	PLECA	PCR negativ	--	VM	20%
03-04	AC	PCR negativ	++	wt	20%
04-01	PLECA	PCR negativ	+	wt	20%

Tabelle 18: Vergleich der p16-, p53- und MIB-1-Expression bei dem TMA K01 zur Kontrolle der Immunogenität des Gewebes; PLECA= Plattenepithelcarcinom, AC= Adenocarcinom, wt= Wildtyp, VM= Verdacht auf Mutation im p53-Gen.

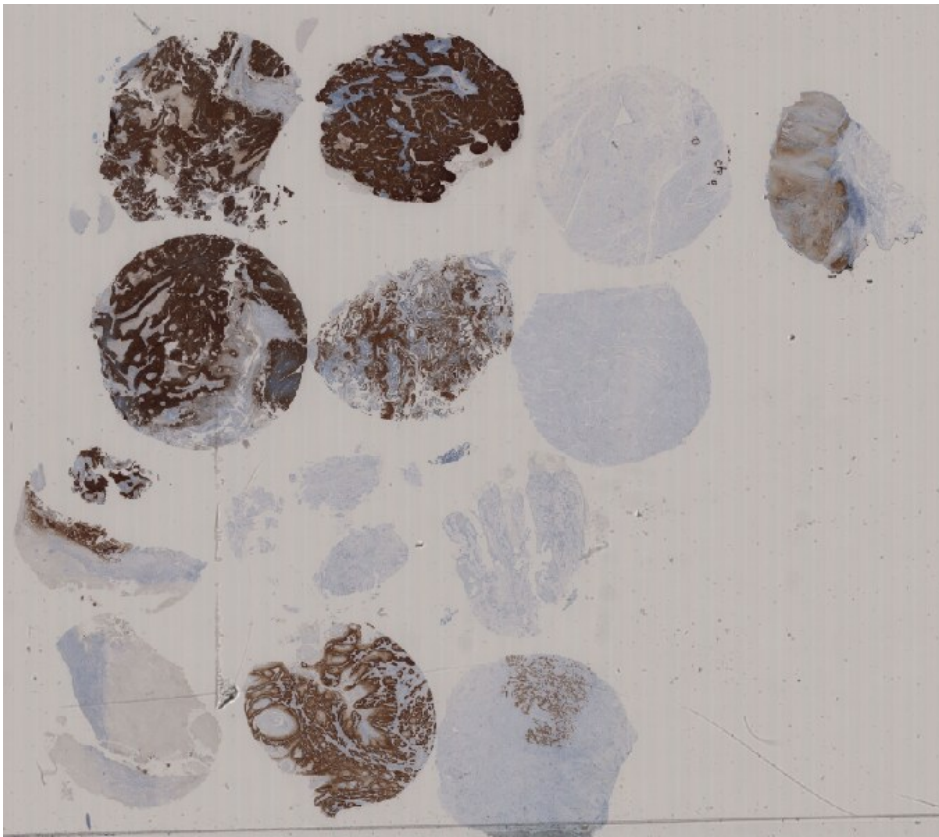


Abbildung 6: TMA K01. p16-Färbung, DAB, x5.

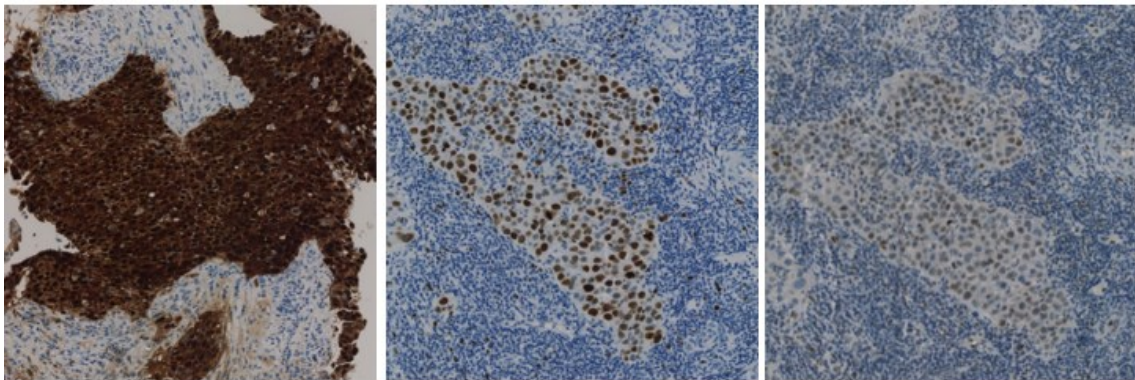


Abbildung 7: TMA K01, Core 01-03, Plattenepithelcarcinom, HPV 18. Links: p16-Färbung, Mitte: MIB-1-Färbung, Rechts: p53-Färbung. x10.

3.1.3 Validität der angewandten TMA-Technik für die Studien-TMAs an den mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnittpräparaten

Insgesamt wurden sechs Studien-TMAs mit insgesamt 216 Cores (100%) mittels HE gefärbt. 193 Cores (89,4 %) konnten histopathologisch ausgewertet werden. 4 der 23 nicht auswertbaren Cores waren nicht angeschnitten oder abgeschwommen, 2 Cores waren aufgerollt und die restlichen Cores bestanden nur aus cervicalem Schleim oder cervicalem Stroma ohne Epithelnachweis.

3.1.3.1 Zahl der nicht auswertbaren Gewebszylinder bei den verschiedenen Stanzzyylindergrößen

Der Durchmesser der Gewebestanzzyylinder für den TMA 1 und 6 betrug 3 mm. Im TMA 1 konnten 60 Cores (100 %), im TMA 6 53 Cores (88,3%) ausgewertet werden. Somit konnten nur 7 Cores (5,8%) von insgesamt 120 Cores (100%) der TMAs 1 und 6 mit einem Durchmesser der Gewebestanze von 3 mm nicht diagnostiziert werden.

Der Durchmesser der Gewebestanzungen für die TMAs 2, 3, 4 und 5 betrug 5 mm. Im TMA 2 konnte in 17 Cores (70,8 %) durch die HE-Färbung eine Diagnose gestellt werden. Im TMA 3 war eine diagnostische Auswertung von 19 Cores (79,2 %) möglich. Für den TMA 4 lag die Auswertbarkeit bei 21 Cores (87,5 %), während im TMA 5 in 23 Cores (95,8 %) eine Diagnosestellung erfolgen konnte. Somit konnten 16 Cores (16,7%) von insgesamt 96 Cores (100%) der TMAs 2 – 5 mit einem Durchmesser der Gewebestanzungen 5 mm nicht ausgewertet werden.

3.1.3.2 Korrelation der in der Routinediagnostik und der im Rahmen dieser Studie erstellten Diagnosen

Um zu prüfen, ob die routinemäßig erstellten Diagnosen auch an den Schnitten der TMAs nachvollziehbar waren, wurde von den TMAs 1 – 6 ein Schnitt mittels HE gefärbt und nachbegutachtet.

Von den 193 auswertbaren Cores stimmten in 42 % (81 Cores) der Cores die Diagnosen nicht überein. Bei den nicht übereinstimmenden Diagnosen (81 Cores; 100%) war in 32,1 % (26 Cores) der Cores keine histopathologische Veränderung im Epithel der Gewebestanzzyylinder der TMAs vorhanden.

In 58 % (112 Cores) der Cores stimmte die anhand der TMAs erstellte Diagnose mit der in dem Programm „NX_Pasnet_Patientendatei“ dokumentierten, in der Routine erhobenen Diagnose überein.

Tabelle 19 zeigt eine Übersicht der an den Cores der TMAs erstellten histopathologischen Diagnosen mit Angabe ihrer Häufigkeit.

Histopathologische Befunde	Prozentualer Anteil aller auswertbaren Cores (100%)	Fallzahl der einzelnen Diagnosen (n = 193)
CIN III	31,6 %	61
Keine Dysplasie	24,9 %	48
CIN I	18,7 %	36
CIN II	10,9 %	21
Plattenepithelcarcinom	3,1 %	6
Condyloma acuminatum	2,6 %	5
VIN I	1 %	2
VIN II	1 %	2
VIN III	1 %	2
VAIN II	0,5 %	1
Sonstige	2,1 %	4
Unklare Fälle	2,6 %	5

Tabelle 19: An den Cores der TMAs erstellte histopathologische Diagnosen mit Angabe ihrer Häufigkeit

3.1.3.3 Korrelation der an der Hämatoxylin-Eosin-Färbung erstellten Diagnosen mit der Expression von p16, p53 und MIB1

3.1.3.3.1 Korrelation der HE-Färbung mit der Expression von p16

Eine starke p16-Expression konnte in 61 Cores (31,6%) von insgesamt 193 Cores (100%) nachgewiesen werden. In 13 Cores (6,7 %) wurde eine mäßige Expression detektiert. In 41 Cores (21,2 %) war die p16 Expression schwach ausgeprägt. In 69 Cores (35,8 %) fand sich keine Färbung. In 9 Cores (4,7 %) war keine Auswertung aufgrund von fehlendem Epithel möglich.

Tabelle 20 zeigt die bei den einzelnen Diagnosen erhobene Expression von p16.

Pathologische Befunde	Anzahl Fälle	Keine Auswertung				
		negativ	schwach	mäßig	stark	
CIN III	61	0% (0)	9,8% (6)	13,1% (8)	6,6% (4)	70,5% (43)
Keine Dysplasie	48	12,5% (6)	68,6% (33)	16,7% (8)	2,1% (1)	0% (0)
CIN I	36	5,6% (2)	44,4% (16)	30,6% (11)	13,9% (5)	5,6% (2)
CIN II	21	4,8% (1)	23,8% (5)	28,6% (6)	4,8% (1)	38,1% (8)
PLECA	6	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	100% (6)
Condyloma acuminatum	5	0% (0)	80% (4)	20% (1)	0% (0)	0% (0)
Unklare Fälle	5	0% (0)	20% (1)	60% (3)	20% (1)	0% (0)
Sonstige	4	0% (0)	100% (4)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
VIN I	2	0% (0)	0% (0)	100% (2)	0% (0)	0% (0)
VIN II	2	0% (0)	0% (0)	100% (2)	0% (0)	0% (0)
VIN III	2	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	100% (2)
VAIN II	1	0% (0)	0% (0)	0% (0)	100% (1)	0% (0)

Tabelle 20: Anhand der HE-Färbung erhobene pathologische Diagnosen in Korrelation zur p16-Expression

In der Mehrzahl der Fälle korrelierte die p16-Expression mit dem dazugehörigen Dysplasiegrad (Abbildungen 8 – 10). Bei manchen Cores fand sich jedoch eine geringere oder sogar fehlende Expression von p16, als aufgrund der morphologischen Dysplasie-Beurteilung zu erwarten war (Abbildung 11 – 14). Möglicherweise liegt der geringeren Expression eine artifizielle Gewebsschädigung mit Herabsetzung der Immunogenität des Gewebes zugrunde. So zeigten z.B. 6 Cores (9,8 %) mit einer CIN III keine p16-Expression (Abbildung 15). Darüber hinaus zeigten 8 Cores (16,7%) bzw. 1 Core (2,1%) trotz eines fehlenden Dysplasienachweises in der HE-Färbung eine schwache bzw. mäßiggradige Expression von p16 (Abbildung 16). 33 Cores von den insgesamt 193 Cores (68,6%) wiesen bei HE-morphologisch fehlendere Dysplasie wiesen – wie zu erwarten war - keine p16 Expression auf (Abbildung 17).

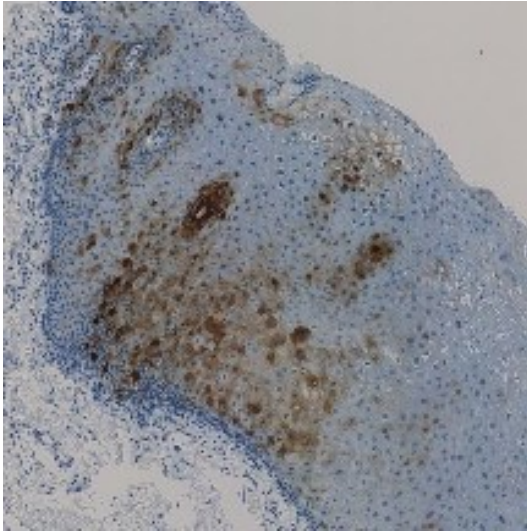


Abbildung 8: CIN I. p16-Färbung, DAB, 15-fache Vergrößerung.

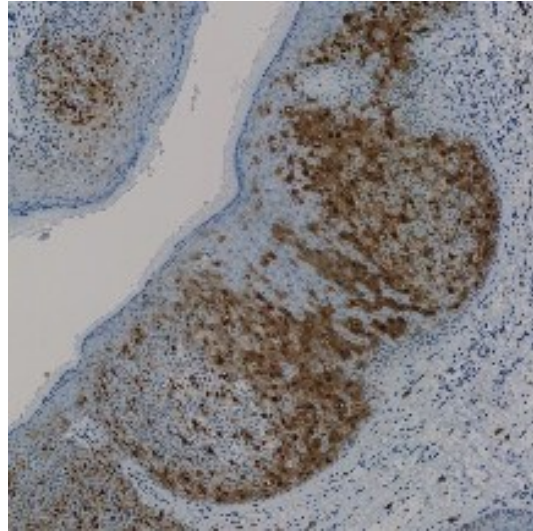


Abbildung 9: VIN II. p16-Färbung, DAB, 15-fache Vergrößerung.

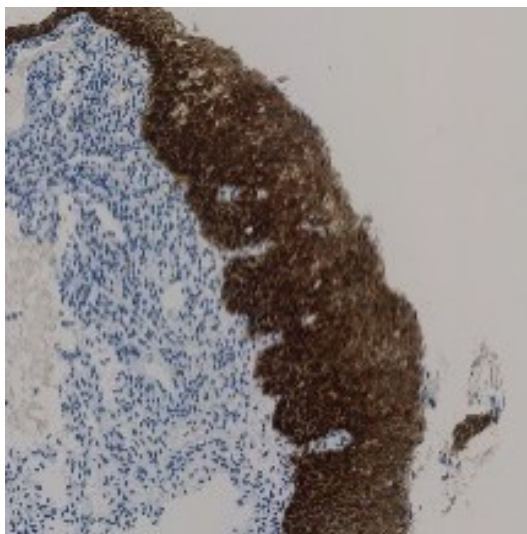


Abbildung 10: CIN III. p16-Färbung, DAB, 20-fache Vergrößerung.

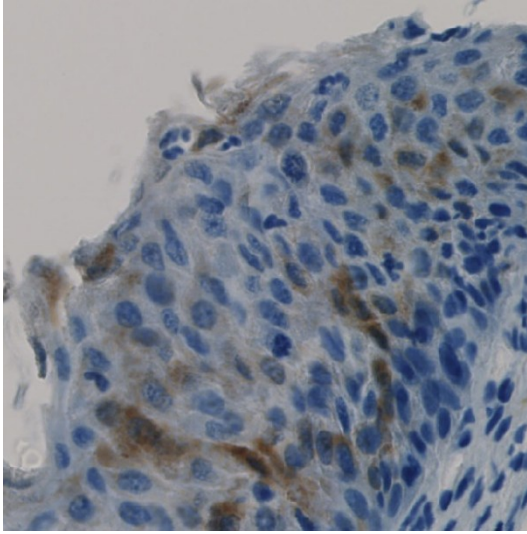


Abbildung 11: CIN III, HPV 74, möglicherweise herabgesetzte Immunogenität des Gewebes. p16-Färbung, DAB, x40.

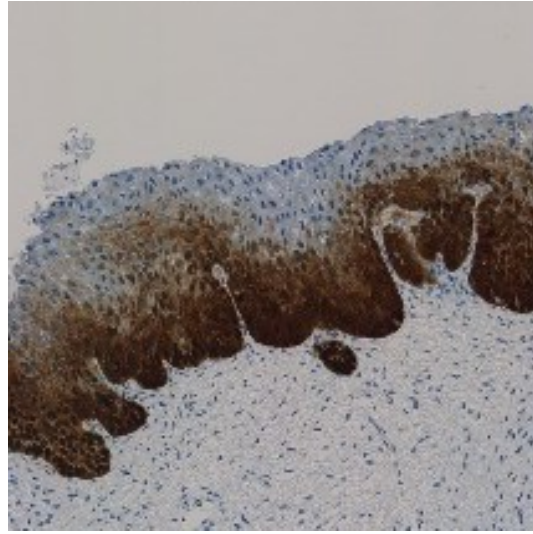


Abbildung 12: CIN III, superfizielle Epithelschichten mit ausbleibender Färbung. p16-Färbung, DAB, 20-fache Vergrößerung.

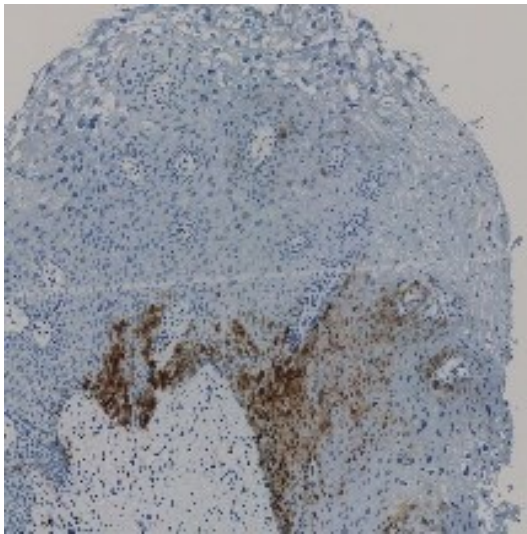


Abbildung 13: VAIN II, möglicherweise herabgesetzte Immunogenität des Gewebes. p16-Färbung, DAB, 15-fache Vergrößerung.

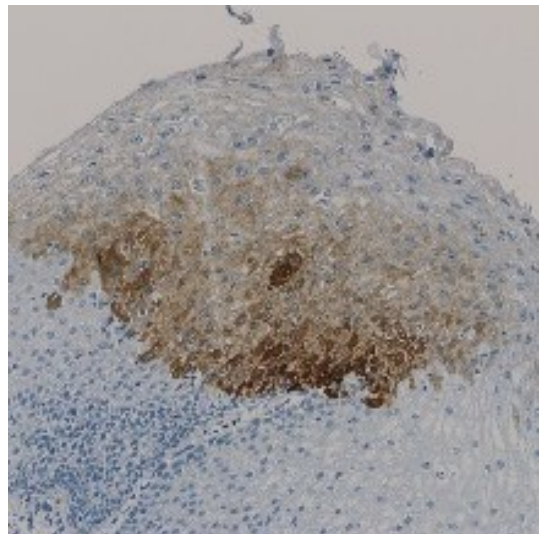


Abbildung 14: CIN III, möglicherweise herabgesetzte Immunogenität des Gewebes. p16-Färbung, DAB, 25-fache Vergrößerung.

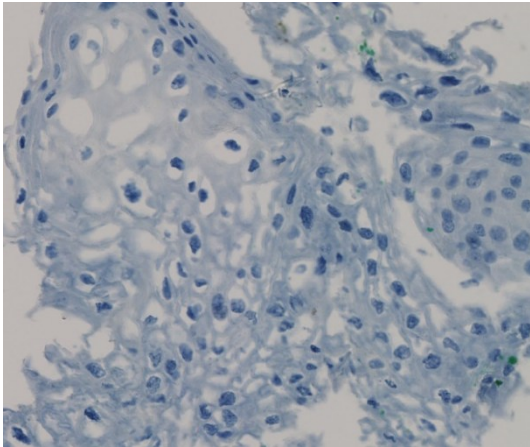


Abbildung 15: CIN III, HPV 18, keine Färbung. p16-Färbung, DAB, x40.

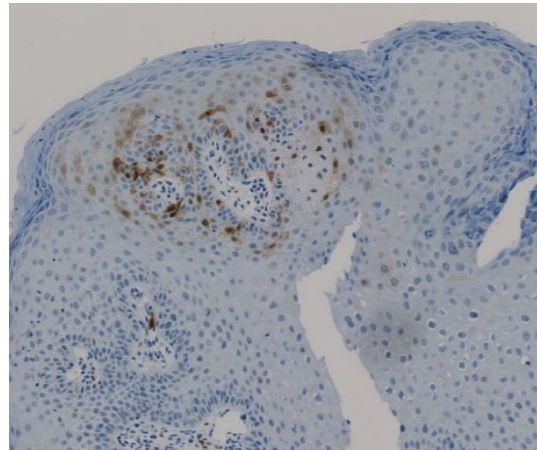


Abbildung 16: keine Dysplasie, HPV 6, schwache p16-Expression. p16-Färbung, DAB, x20.

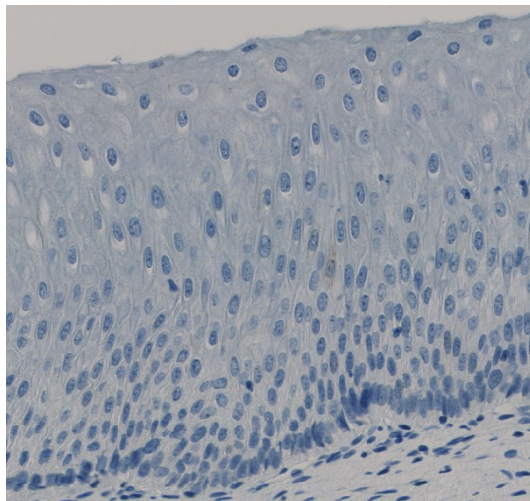


Abbildung 17: keine Dysplasie, HPV 18, keine Färbung. p16-Färbung, DAB, x20.

3.1.3.3.1 Korrelation der p16-Färbung mit den HPV-Typen

Zur Vereinfachung der Darstellung der Ergebnisse wurden die HPV-Typen in folgende Kategorien unterteilt: HR-Typen, LR-Typen, intermediäre Typen, Mischinfektionen und unklare Fälle (positiver HPV-Nachweis bei frustraner Typisierung).

Von den insgesamt 193 auswertbaren Cores fanden sich in 109 Cores (56,5 %) HR-HPV-Typen, in 51 Cores (26,6 %) LR-HPV-Typen, in 12 Cores (6,2 %) Mischinfektionen, in 9 Cores (4,7 %) keine HP-Viren und in 6 Cores (3,1%) intermediäre HP-Viren. In ebenfalls 6 Cores (3,1%) konnte HPV nachgewiesen werden, wobei jedoch eine eindeutige Typisierung nicht gelang (unklare Fälle). Tabelle 21 zeigt die HPV-Typen in Korrelation zur p16 Expression.

Einteilung der HPV-Infektionen	keine Auswertung	p16 negativ	p16 schwach	p16 mäßig	p16 stark
HR	5,5% (6)	30,3% (33)	11% (12)	7,3% (8)	45,9% (50)
LR	2% (1)	43,1% (22)	39,2% (20)	9,8% (5)	5,9% (3)
Mischinfektion	8,3% (1)	25% (3)	25% (3)	0% (0)	41,7% (5)
PCR negativ	11,1% (1)	44,4% (4)	22,2% (2)	0% (0)	22,2% (2)
Intermediär	0% (0)	66,7% (4)	33,3% (2)	0% (0)	0% (0)
Unklare Fälle	0% (0)	50% (3)	33,3% (2)	0% (0)	16,7% (1)

Tabelle 21: HPV-Typen in Korrelation zur p16-Expression

P16 dient, wie in Kapitel 1.4.4.2 beschrieben, als Surrogatmarker für eine HPV-Infektion des Epithels. Erwartungsgemäß zeigten viele Cores mit HR-HPV-Typen eine starke Expression von p16 auf. Jedoch erstaunte die oftmals schwache Expression von p16 bei einem HR-HPV-Nachweis. Die fehlende Expression von p16 könnte wiederum auf eine herabgesetzte Immunogenität des Gewebes zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu zeigten 4 Cores (2,1 %) bei negativem PCR-HPV-Nachweis eine bisweilen starke p16-Expression. Dies zeigen die folgenden Abbildungen 18 + 19.

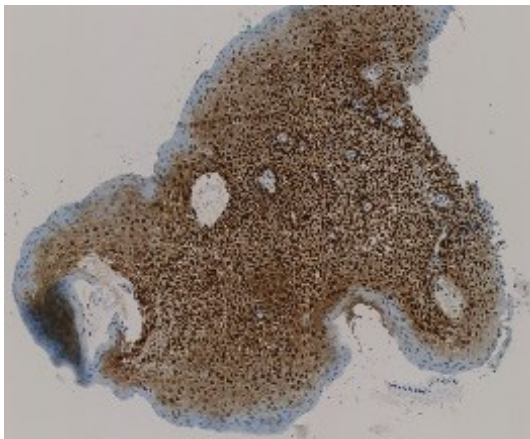


Abbildung 18: CIN III, PCR negativ, p16-Färbung kräftig positiv. p16-Färbung, DAB, 15-fache Vergrößerung.

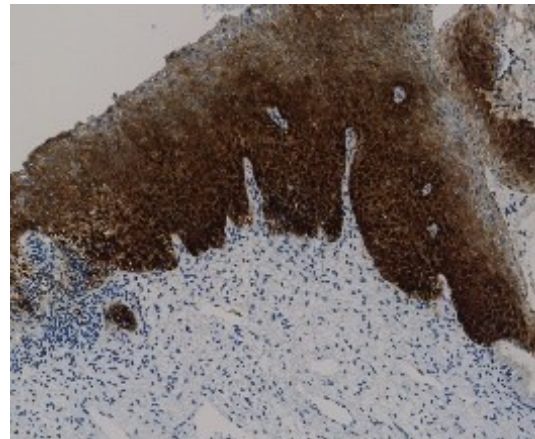


Abbildung 19: CIN III, PCR negativ, p16-Färbung kräftig positiv. p16-Färbung, DAB, 20-fache Vergrößerung.

3.1.3.3.2 Korrelation der HE-Färbung mit der Expression von p53

Eine dem p53-Wildtyp entsprechende p53-Expression konnte in 148 Cores (76,7 %) von insgesamt 193 Cores (100 %) nachgewiesen werden. In 25 Cores (13 %) fand sich keine Färbung. In 8 Cores (4,1 %) war keine sichere Einschätzung der Färbung möglich. In 12 Cores (6,2 %) war keine Auswertung aufgrund von fehlendem Epithel möglich. Eine Überexpression von p53 konnte in keinem der 193 Cores nachgewiesen werden.

Tabelle 22 zeigt die bei den einzelnen Diagnosen erhobene Expression von p53.

Pathologische Befunde	Anzahl Fälle	Keine Auswertung	Unsichere Fälle	p53-Wildtyp	Keine Expression
CIN III	100 % (61)	1,6% (1)	9,8% (6)	67,2% (41)	21,3% (13)
Keine Dysplasie	100 % (48)	12,5% (6)	0% (0)	81,3% (39)	6,3% (3)
CIN I	100 % (36)	11,1% (4)	0% (0)	77,7% (28)	11,1% (4)
CIN II	100 % (21)	4,8% (1)	4,8% (1)	71,4% (15)	19% (4)
PLECA	100 % (6)	0% (0)	0% (0)	100% (6)	0% (0)
Condyloma acuminatum	100 % (5)	0% (0)	0% (0)	100% (5)	0% (0)
Unklare Fälle	100 % (5)	0% (0)	0% (0)	80% (4)	20% (1)
Sonstige	100 % (4)	0% (0)	25% (1)	75% (3)	0% (0)
VIN I	100 % (2)	0% (0)	0% (0)	100% (2)	0% (0)
VIN II	100 % (2)	0% (0)	0% (0)	100% (2)	0% (0)
VIN III	100 % (2)	0% (0)	0% (0)	100% (2)	0% (0)
VAIN II	100 % (1)	0% (0)	0% (0)	100% (1)	0% (0)

Tabelle 22: Anhand der HE-Färbung erhobene pathologische Diagnosen in Korrelation zur p53-Expression

3.1.3.3.2.1 Korrelation der p53-Färbung mit den HPV-Typen

Um die Darstellung der Ergebnisse zu vereinfachen, erfolgte eine Kategorisierung der HPV-Typen in folgende Gruppen: HR-Typen, LR-Typen, intermediäre Typen, Mischinfektionen sowie unklare Fälle (positiver HPV-Nachweis ohne eindeutige Typisierung).

Von den insgesamt 193 auswertbaren Cores fanden sich in 109 Cores (56,5 %) HR-HPV-Typen, in 51 Cores (26,6 %) LR-HPV-Typen, in 12 Cores (6,2 %) Mischinfektionen, in 9 Cores (4,7 %) keine HP-Viren und in 6 Cores (3,1 %) intermediäre HP-Viren. In ebenfalls 6 Cores (3,1 %) konnte HPV nachgewiesen werden, wobei jedoch eine eindeutige Typisierung nicht gelang (unklare Fälle). Die Tabelle 23 zeigt die HPV-Typen in Korrelation zur p53-Expression.

Einteilung der HPV-Infektionen	keine Auswertung	unsichere Fälle	p53-Wildtyp	keine Expression
HR	6,4% (7)	7,3% (8)	68,8% (75)	17,4% (19)
LR	3,9% (2)	0% (0)	86,3% (44)	9,8% (5)
Mischinfektion	8,3% (1)	0% (0)	91,7% (11)	0% (0)
PCR negativ	11,1% (1)	0% (0)	77,8% (7)	11,1% (1)
Intermediär	16,7% (1)	0% (0)	83,3% (5)	0% (0)
Unklare Fälle	0% (0)	0% (0)	100% (6)	0% (0)

Tabelle 23: HPV-Typen in Korrelation zur p53-Expression

3.1.3.3.3 Korrelation der HE-Färbung mit der Expression von MIB-1

Bei der Auswertung der immunhistochemischen MIB-1-Färbung wurde zwischen Dysplasien und Carcinomen unterschieden. Die Abbildungen 20 – 23 zeigen exemplarisch die erwarteten Färbeergebnisse der verschiedenen Dysplasiegrade und Plattenepithelcarcinome, deren Kategorisierung in Kapitel 2.2.4.3. beschrieben wurde.

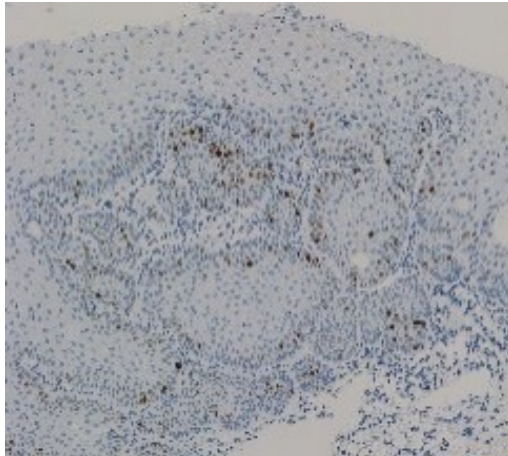


Abbildung 20: CIN I, basale Epithelschicht gefärbt. MIB-1-Färbung, DAB, 20-fache Vergrößerung.

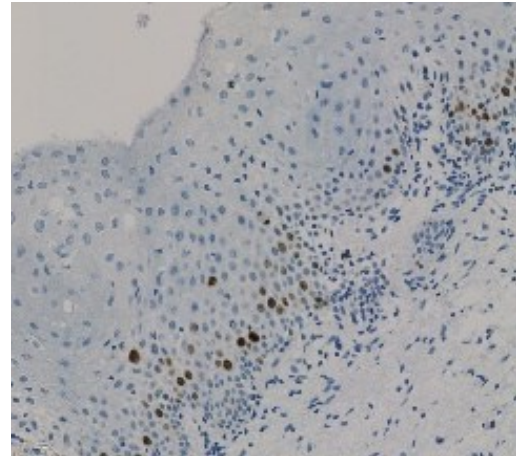


Abbildung 21: CIN II, mittleres Epitheldrittel gefärbt. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.

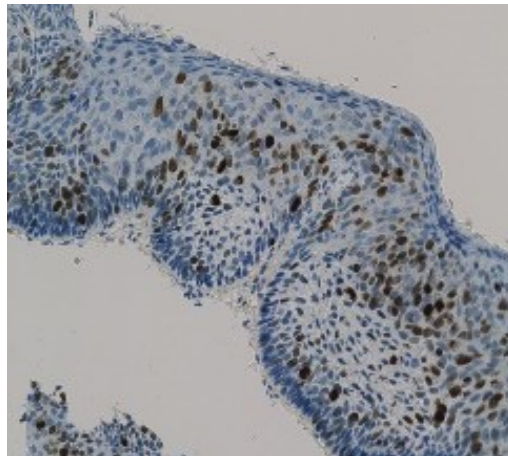


Abbildung 22: CIN III, superfizielle Epithelschicht gefärbt. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.

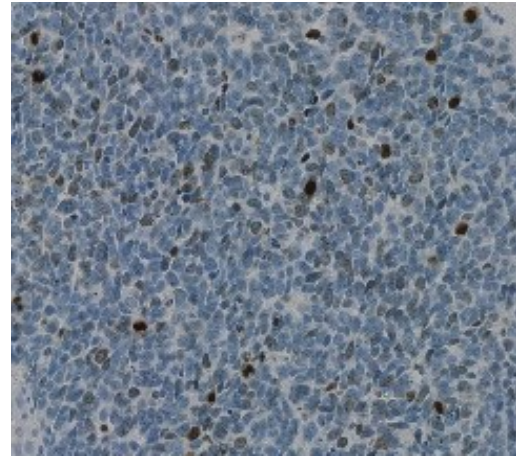


Abbildung 23: PLECA, nukleäre Färbung einzelner Zellen. MIB-1-Färbung, DAB, 40-fache Vergrößerung.

In 187 Cores (96,9 %) der insgesamt 193 Cores (100 %) wurde eine Dysplasie diagnostiziert. Von den 187 Cores (100 %) wurde in 14 Cores (7,5 %) in vereinzelt Zellen eine MIB-1-Expression auf unterschiedlichen Epithelhöhen nachgewiesen. In 88 Cores (47,1 %) wurde eine Expression im basalständigen Epitheldrittel detektiert. In 23 Cores (12,3 %) wiesen 2/3 der Epithelhöhe eine MIB-1-Expression auf. In 21 Cores (11,2 %) wurde eine MIB-1-Expression bis in die superfizielle Epithelzellschicht, das heißt in der gesamten Epithelhöhe nachgewiesen. In 25 Cores (13,4 %) fand sich keine Färbung. In 16 Cores (8,6 %) war keine Auswertung aufgrund von fehlendem Epithel möglich.

In 6 Cores (3,1 %) der insgesamt 193 Cores (100 %) wurden Carcinome diagnostiziert. Von den 6 Cores (100 %) waren in allen Cores (6 Cores; 100 %) mehr als 20% der Carcinomzellen gefärbt.

Tabelle 24 zeigt die bei den einzelnen Diagnosen erhobene Expression von MIB-1.

Pathologische Befunde	Anzahl Fälle	Vereinzelte Zellen	Basales Drittel des Epithels	2/3 des Epithels	Komplette Epithelfärbung	Negativ	Keine Auswertung
CIN III	100 % (61)	9,8% (6)	27,9% (17)	11,5% (7)	23% (14)	24,6% (15)	3,3% (2)
Keine Dysplasie	100 % (48)	0% (0)	64,6% (31)	4,2% (2)	2,1% (1)	10,4% (5)	18,8% (9)
CIN I	100 % (36)	8,3% (3)	55,6% (20)	11,1% (4)	8,3% (3)	5,6% (2)	11,1% (4)
CIN II	100 % (21)	4,8% (1)	66,7% (14)	9,5% (2)	9,5% (2)	4,8% (1)	4,8% (1)
Condyloma acuminatum	100 % (5)	40% (2)	40% (2)	0% (0)	20% (1)	0% (0)	0% (0)
Unklare Fälle	100 % (5)	20% (1)	40% (2)	0% (0)	0% (0)	40% (2)	0% (0)
Sonstige	100 % (4)	25% (1)	25% (1)	50% (2)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
VIN I	100 % (2)	0% (0)	50% (1)	50% (1)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
VIN II	100 % (2)	0% (0)	0% (0)	100% (2)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
VIN III	100 % (2)	0% (0)	0% (0)	100% (2)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
VAIN II	100 % (1)	0% (0)	0% (0)	100% (1)	0% (0)	0% (0)	0% (0)

Tabelle 24: Anhand der HE-Färbung erhobene pathologische Diagnose in Korrelation zur MIB-1-Expression.

Bei manchen Cores fand sich - wie auch bei der p16-Färbung - eine geringere Expression von MIB-1, als aufgrund der morphologischen Dysplasie-Beurteilung zu erwarten war. Möglicherweise könnte auch bei der immunhistochemischen MIB-1 Färbung eine artifizielle Gewebsschädigung mit Herabsetzung der Immunogenität Ursache für die geringere Expression sein. Die Abbildungen 24 und 25 veranschaulichen die ausbleibende Expression der oberen Epithelschichten bei hochgradigen CIN-Läsionen.

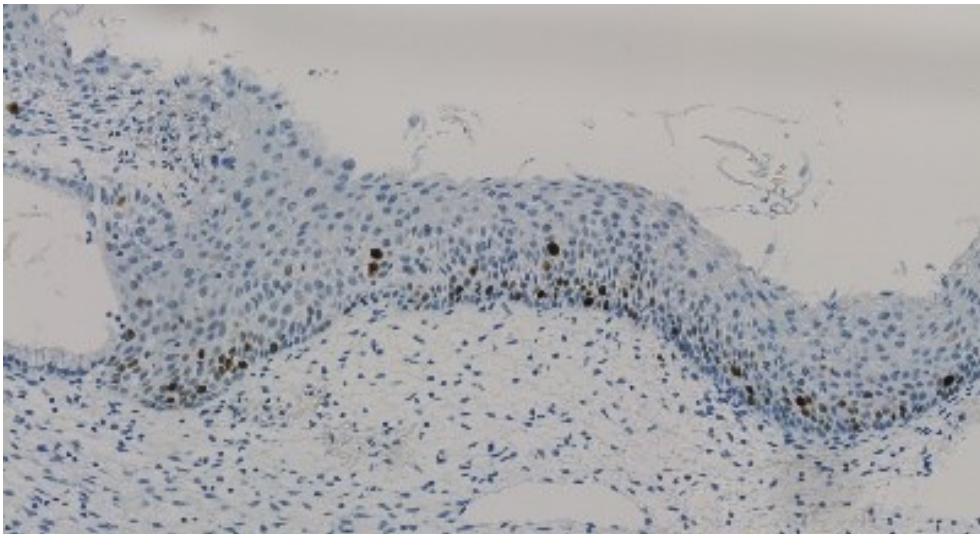


Abbildung 24: CIN II, ausbleibende MIB-1-Färbung in den superfiziellen Epithelschichten. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.

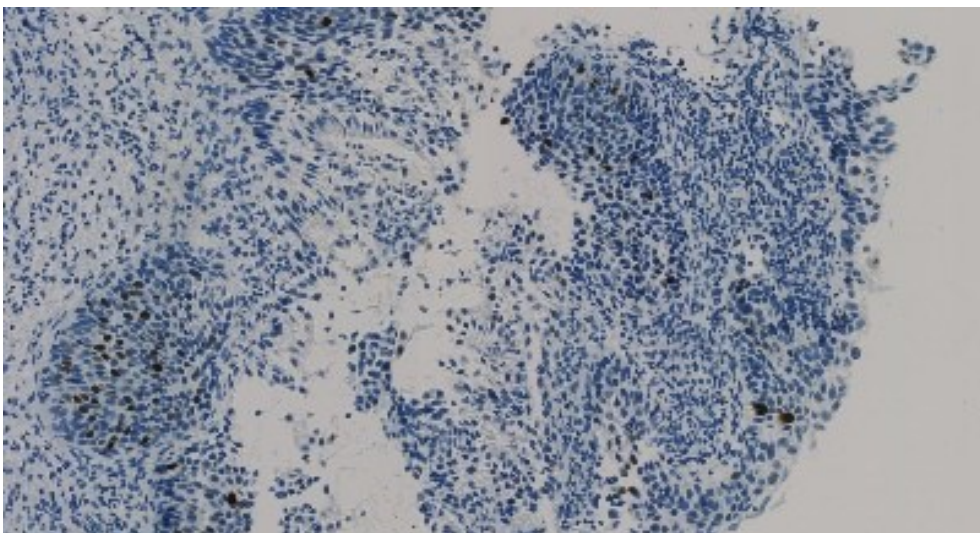


Abbildung 25: CIN III, ausbleibende MIB-1-Färbung in superfiziellen Epithelschichten. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.

3.1.3.3.1 Korrelation der MIB-1-Färbung mit den HPV-Typen

Zur Vereinfachung der Darstellung der Ergebnisse wurden die HPV-Typen in folgende Kategorien unterteilt: HR-Typen, LR-Typen, intermediäre Typen, Mischinfektionen und unklare Fälle (positiver HPV-Nachweis bei frustraner Typisierung).

Von den insgesamt 193 auswertbaren Cores fanden sich in 109 Cores (56,5 %) HR-HPV-Typen, in 51 Cores (26,6 %) LR-HPV-Typen, in 12 Cores (6,2 %) Mischinfektionen, in 9 Cores (4,7 %) keine HP-Viren und in 6 Cores (3,1 %) intermediäre HP-Viren. In ebenfalls 6 Cores (3,1 %) konnte HPV nachgewiesen werden, wobei jedoch eine eindeutige Typisierung nicht gelang (unklare Fälle). Die Tabelle 25 zeigt die HPV-Typen in Korrelation zur MIB-1-Expression.

Einteilung der HPV-Infektionen	Anzahl	vereinzelte Zellen	basale Schicht	mittlere Schicht	superfizielle Schicht	Carcinome	negativ	keine Auswertung
HR	100% (109)	7,3% (8)	41,3% (45)	7,3% (8)	11,9% (13)	5,5% (6)	16,5% (18)	10,1% (11)
LR	100% (51)	7,8% (4)	51% (26)	17,6% (9)	11,8% (6)	0% (0)	7,8% (4)	3,9% (2)
Mischinfektion	100% (12)	0% (0)	25% (3)	33,3% (4)	25% (3)	0% (0)	8,3% (1)	8,3% (1)
PCR negativ	100% (9)	11,1% (1)	55,6% (5)	11,1% (1)	0% (0)	0% (0)	11,1% (1)	11,1% (1)
Intermediär	100% (6)	16,7% (1)	66,7% (4)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	16,7% (1)
Unklare Fälle	100% (6)	0% (0)	83,3% (5)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	16,7% (1)	0% (0)

Tabelle 25: HPV-Typen in Korrelation zu der MIB-1-Expression

3.2 Antikörperklon C1P5 zum Nachweis des HPV 16/18-Onkoproteins E6

3.2.1 Zelllinien HeLa, SKBR3 und MCF7

Als Positivkontrolle für HPV18-E6 diente die HeLa -Zelllinie, welche nachweislich das HPV18-Onkoprotein E6 exprimiert. Als Negativkontrolle und damit zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung wurden die Zelllinien SKBR3 und MCF7 verwendet. Wie in Abbildung 26 zu erkennen, zeigen die HeLa -Zellen eine starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung mit dem C1P5-Antikörper bei CC1-Vorbehandlung und einer Antikörperverdünnung von 1:100. Jedoch zeigten auch die SKBR3- und die MCF7-Zelllinien eine ebenso kräftige zytoplasmatische und nukleäre Anfärbung mittels C1P5. Aufgrund der Anfärbung dieser beiden Mammacarcinomzelllinien kann eine spezifische Anfärbung von E6 in den HeLa -Zellen nicht mehr postuliert werden. Eine Expression von HPV18-E6 in diesen beiden Mammacarcinomzelllinien kann ausgeschlossen werden. Der C1P5-Antikörper kann somit nicht für eine spezifische Darstellung von E6 herangezogen werden.

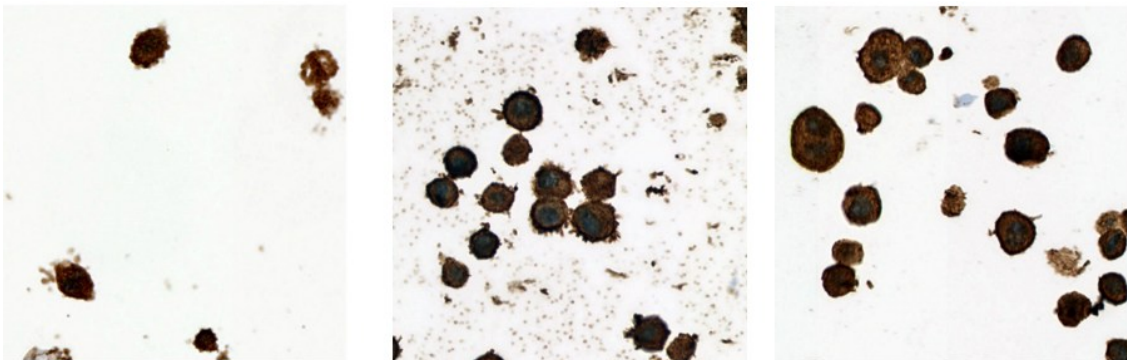


Abbildung 26: Links: HeLa -Zellen mit starker nukleärer und zytoplasmatischer Färbung, Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen mit starker nukleärer und zytoplasmatischer Färbung. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], x440.

3.2.2 TMA K01 Vergleich der unterschiedlichen Vorbehandlungen und Verdünnungen

Der Kontroll-TMA K01 wurde mit verschiedenen Verdünnungen des Antikörperklons C1P5 bei unterschiedlichen Vorbehandlungen gefärbt. Die Vorbehandlung der Schnitte erfolgte mittels Pronase, CC1 und CC2. Der Antikörperklon C1P5 wurde in einer Verdünnung von 1:100 mit allen verschiedenen Vorbehandlungen, in einer Verdünnung von 1:200 und 1:300 nur bei Vorbehandlung mit CC1 getestet.

3.2.2.1 Pronase-Vorbehandlung und 1:100 Verdünnung

Bei der Vorbehandlung mit Pronase bei einer Verdünnung des Antikörperklons von 1:100 ließ sich eine unspezifische zytoplasmatische Färbung in vereinzelt Zellen in 3 Cores nachweisen (Abbildungen 28 + 29), wobei am ehesten stromale Zellen oder Entzündungszellen vorlagen. In 10 Cores zeigte sich keine Färbung. Die Carcinome zeigten keine Färbereaktion (Abbildungen 30 + 31).

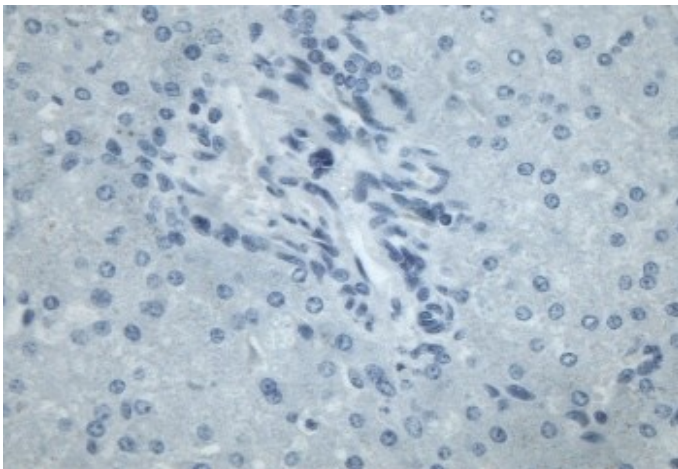


Abbildung 27: Markercore Leber, keine Färbung. C1P5-Färbung, Pronase [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

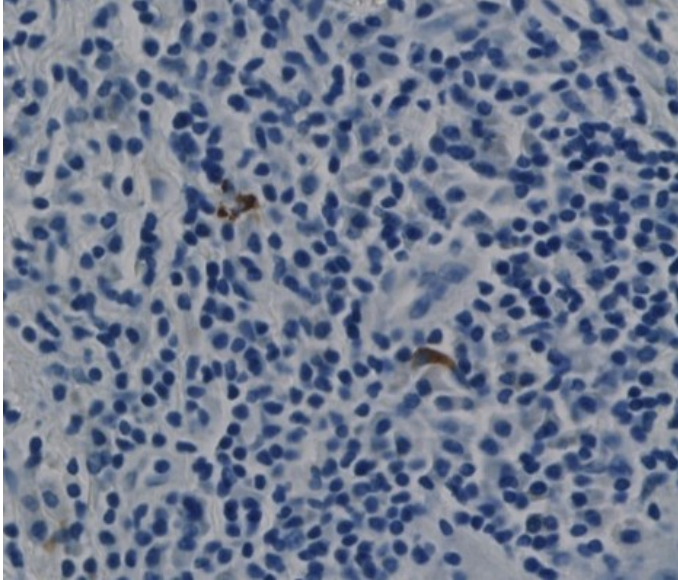


Abbildung 28: TMA K01, spärliche Zellen positiv. C1P5-Färbung, Pronase [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

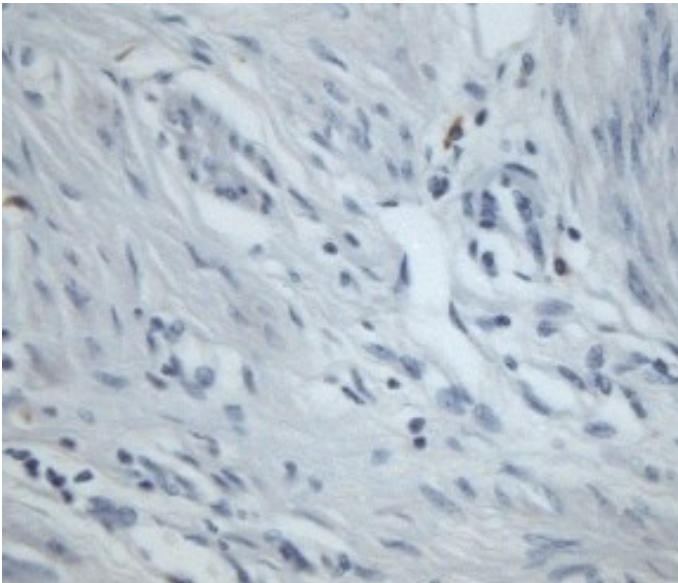


Abbildung 29: TMA K01, spärliche Zellen positiv. C1P5-Färbung, Pronase [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

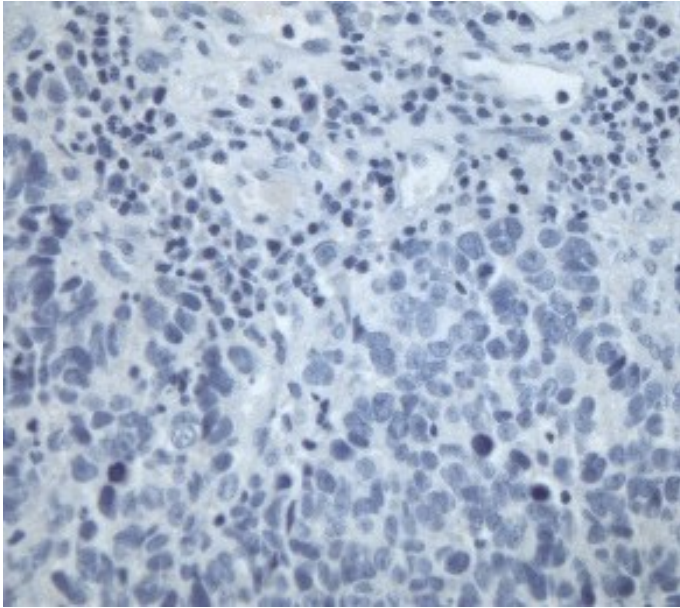


Abbildung 30: TMA K01, Plattenepithelcarcinom, HPV 18, keine Färbung. C1P5-Färbung, Pronase [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

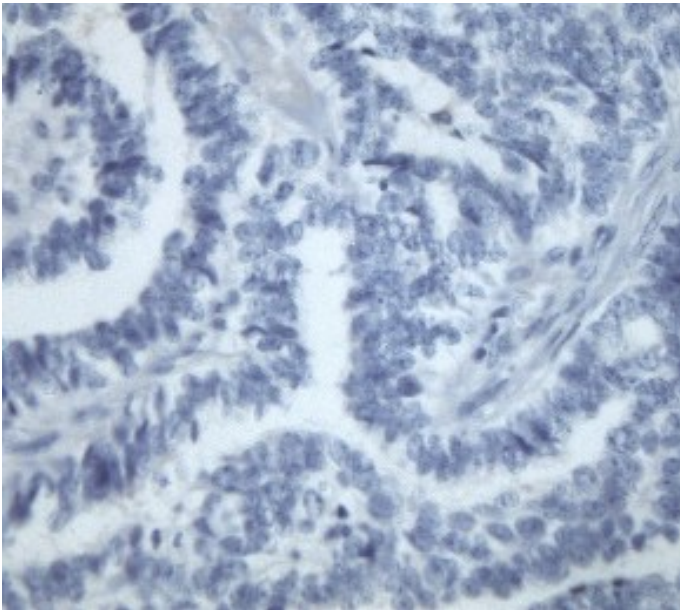


Abbildung 31: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, keine Färbung. C1P5-Färbung, Pronase [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.2.2.2 CC2 mit 1:100 Verdünnung

Bei der Vorbehandlung mit CC2 bei einer Verdünnung des Antikörperklons von 1:100 fand sich in 13 Cores eine unspezifische Färbung von Endothel, stromalen Zellen und Erythrozyten (Abbildungen 33 + 34). In 10 Cores wurde eine fokal schwache Färbung der Tumorzellen nachgewiesen (Abbildungen 33 + 34).

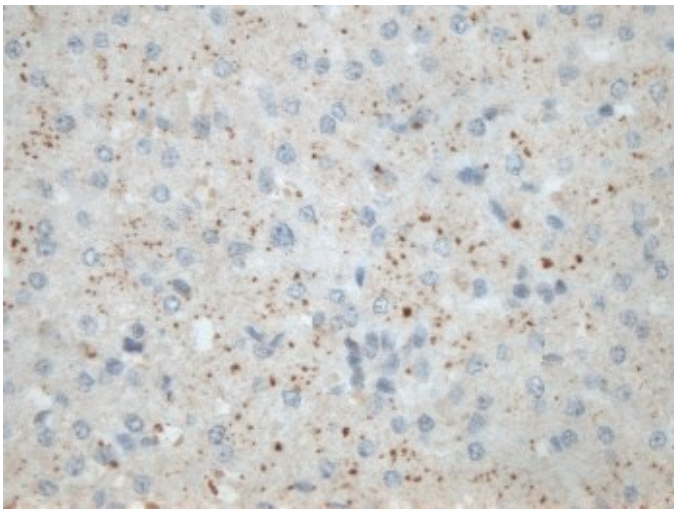


Abbildung 32: Markercore Leber, punktförmige zytoplasmatische Färbung der Hepatozyten. C1P5-Färbung, CC2 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

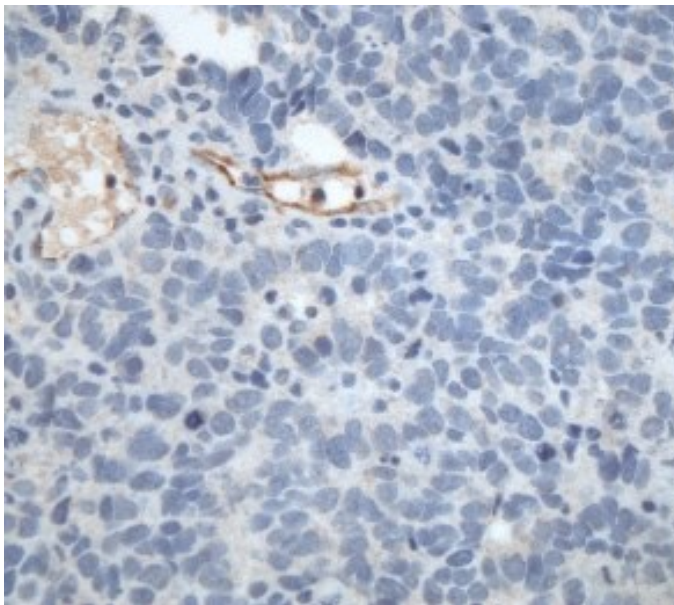


Abbildung 33: TMA K01, PLECA, HPV 18, Tumorzellen fokal sehr schwach zytoplasmatisch positiv, Endothel positiv. C1P5-Färbung, CC2 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

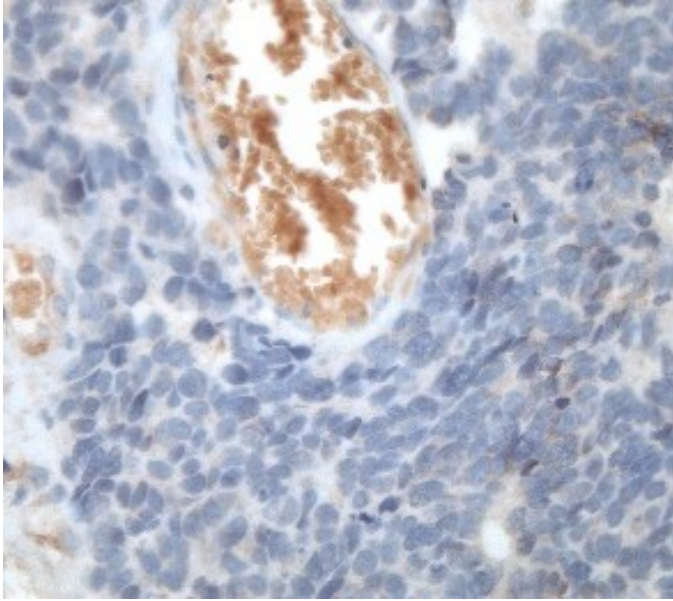


Abbildung 34: TMA K01, PLECA, HPV 18, Tumorzellen fokal schwach positiv, Endothel und Erythrozyten schwach positiv. C1P5-Färbung, CC2 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.2.2.3 CC1 mit 1:100 Verdünnung

Bei einer Vorbehandlung mit CC1 bei einer Verdünnung des Antikörperklons C1P5 von 1:100 zeigte sich eine schwach bis mäßiggradig ausgeprägte unspezifische Färbung von Endothel, Fibroblasten und glatter Muskulatur in 13 Cores (Abbildungen 36 – 39). In 7 Cores wurde eine schwache Färbung von Tumorzellen nachgewiesen (Abbildungen 38 – 40).

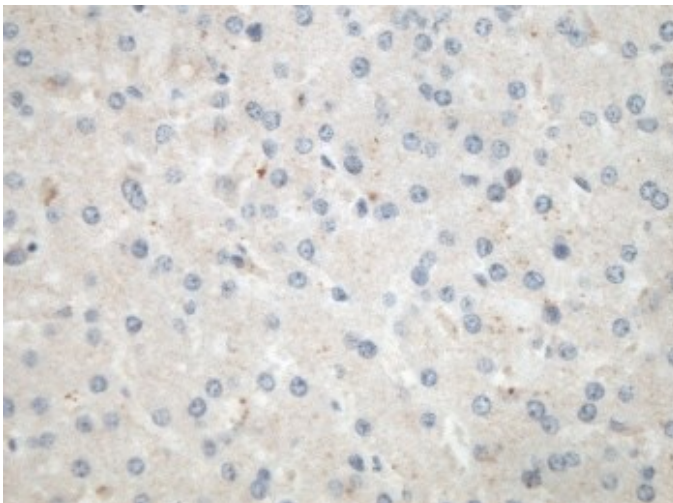


Abbildung 35: Markercore Leber, leichte zytoplasmatische unspezifische Färbung granulär. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

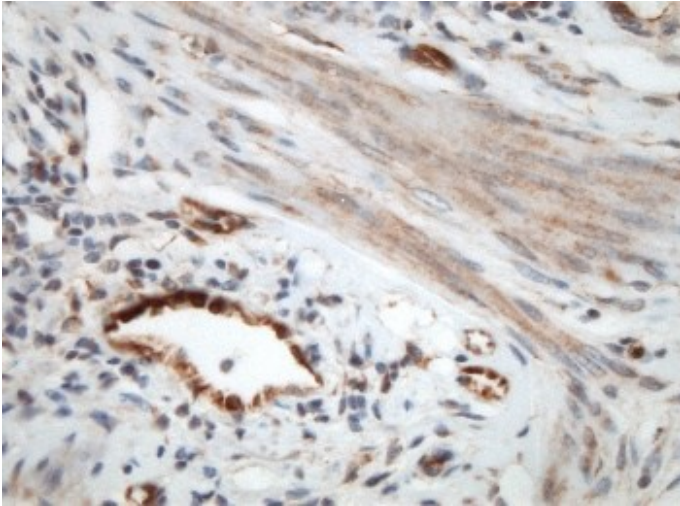


Abbildung 36: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, Fibroblasten, Endothel und glatte Muskulatur positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

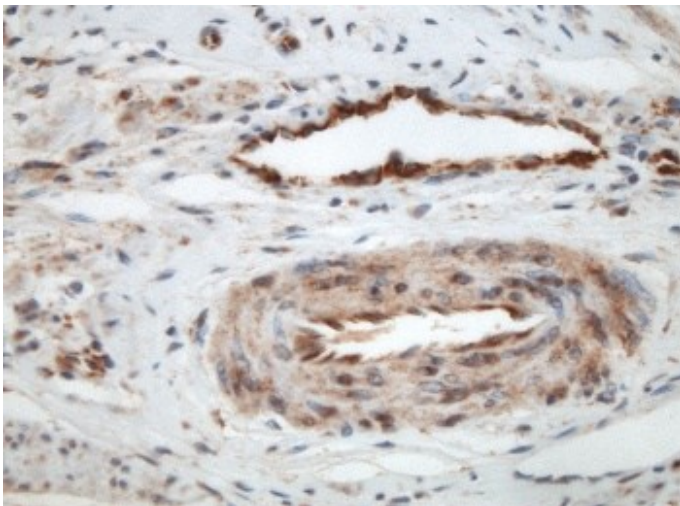


Abbildung 37: TMA K01, glatte Muskulatur der Gefäßwand positiv, Endothel positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

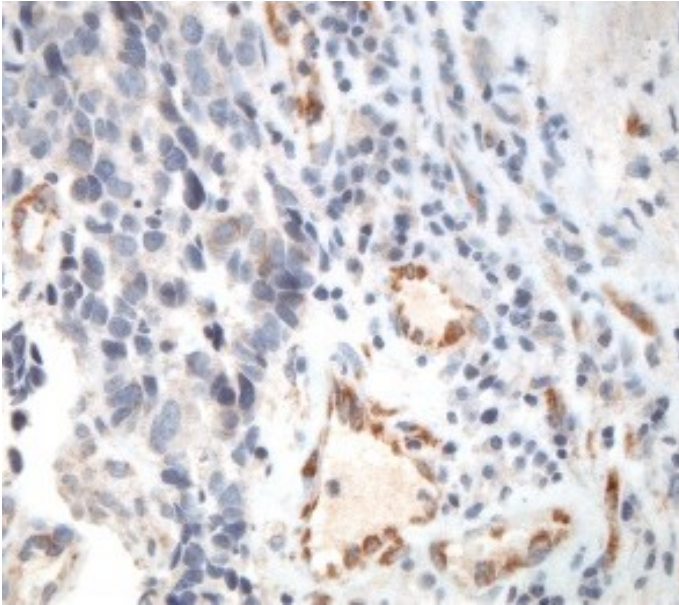


Abbildung 38: TMA K01, PLECA, HPV 18, Endothel zytoplasmatisch positiv, Tumor fokal zytoplasmatisch schwach positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

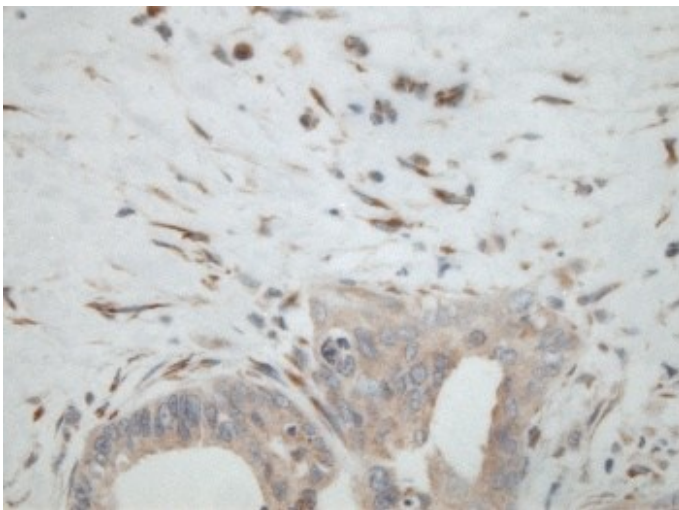


Abbildung 39: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, Adenocarcinomzellen zytoplasmatisch schwach positiv, Stromazellen positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

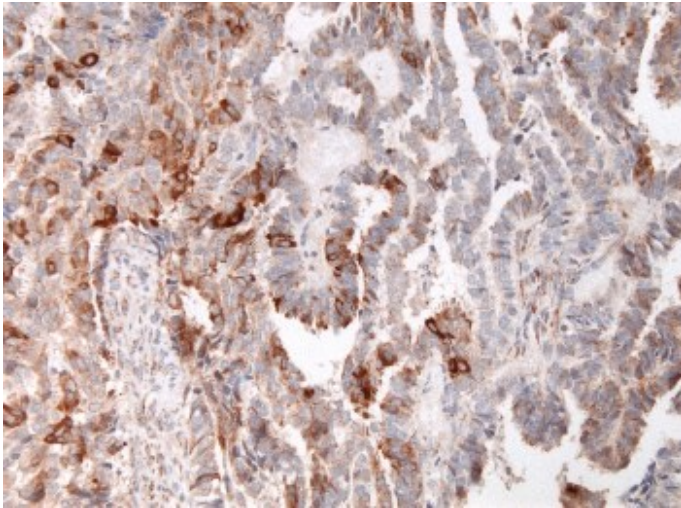


Abbildung 40: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, zytoplasmatische Positivität. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.2.2.4 CC1 mit 1:200 Verdünnung

Bei der Vorbehandlung mit CC1 in einer Verdünnung von 1:200 ließ sich eine schwache bis mäßiggradige unspezifischer Färbung in 13 Cores nachweisen, wobei insbesondere Endothel, Stroma und Entzündungszellen gefärbt wurden (Abbildungen 42 + 43). In 8 Cores wurde eine schwache bis mäßige Färbung von Tumorzellen beobachtet (Abbildungen 42 – 45).

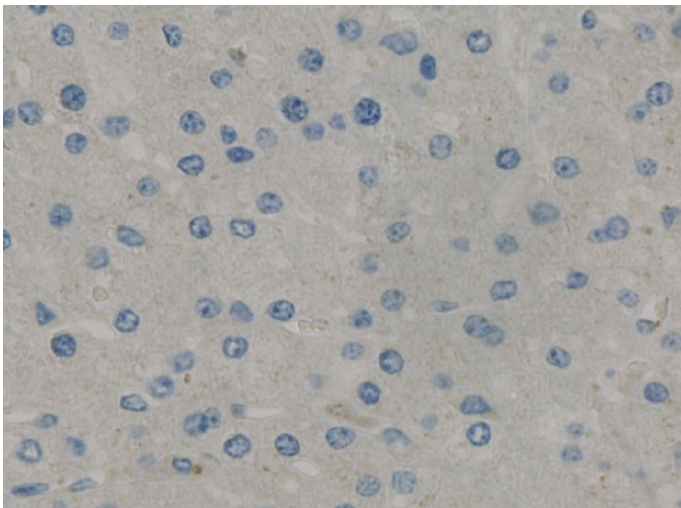


Abbildung 41: Markercore Leber, leichte zytoplasmatische unspezifische Färbung granulär. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

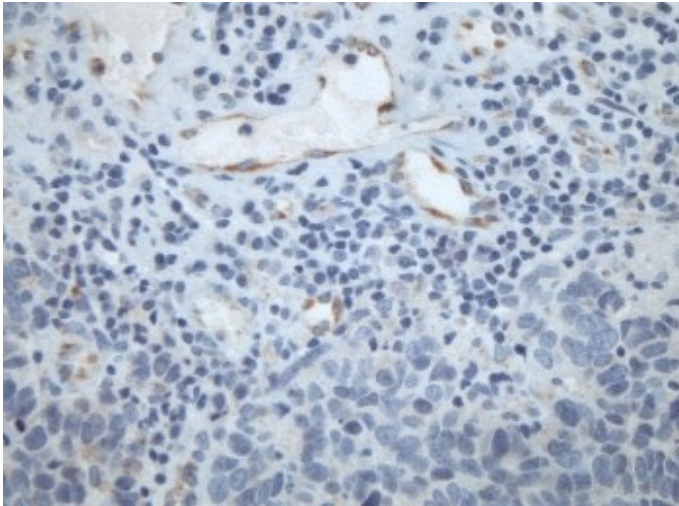


Abbildung 42: TMA K01, PLECA, HPV 18, Endothel zytoplasmatisch positiv, Tumor fokal zytoplasmatisch schwach positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

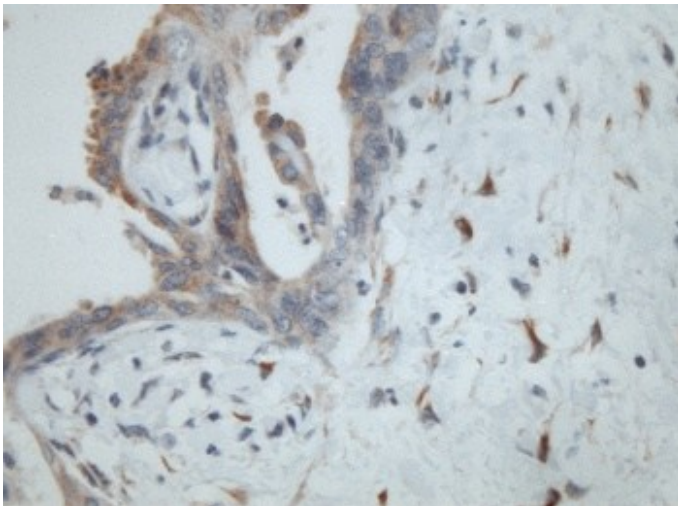


Abbildung 43: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, Adenocarcinom fokal positiv, Stromazellen positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

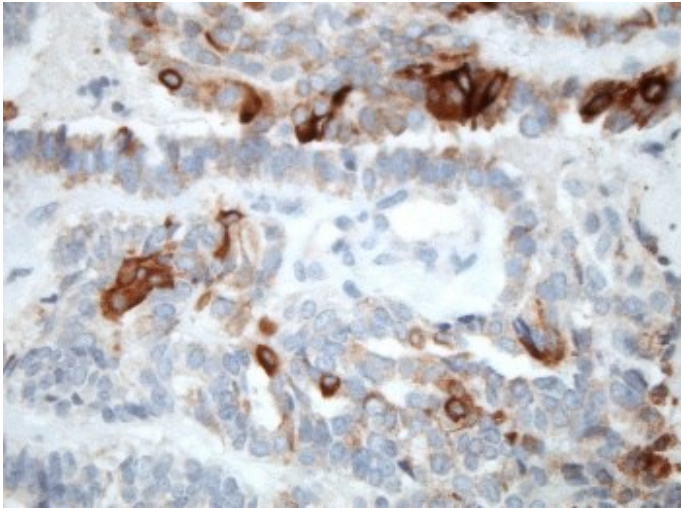


Abbildung 44: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, Adenocarcinom und Stroma fokal zytoplasmatisch positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

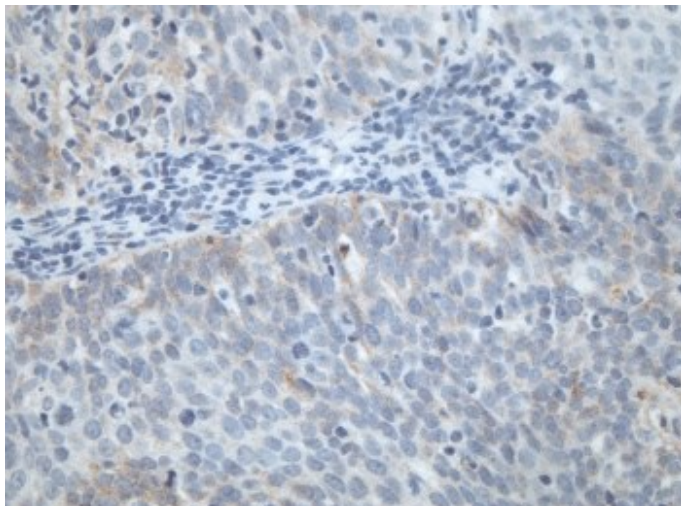


Abbildung 45: TMA K01, PLECA, HPV 16, Carcinom fokal schwach zytoplasmatisch positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.2.2.5 CC1 mit 1:300 Verdünnung

Bei einer Vorbehandlung mit CC1 in einer Verdünnung von 1:300 wurde in 13 Cores eine schwach bis mäßig ausgeprägte unspezifische Färbung von Endothel, Stroma und Entzündungszellen nachgewiesen (Abbildung 47). Eine schwache bis mäßiggradige Färbung der Carcinome wurde in 6 Cores festgestellt (Abbildung 47 + 48).

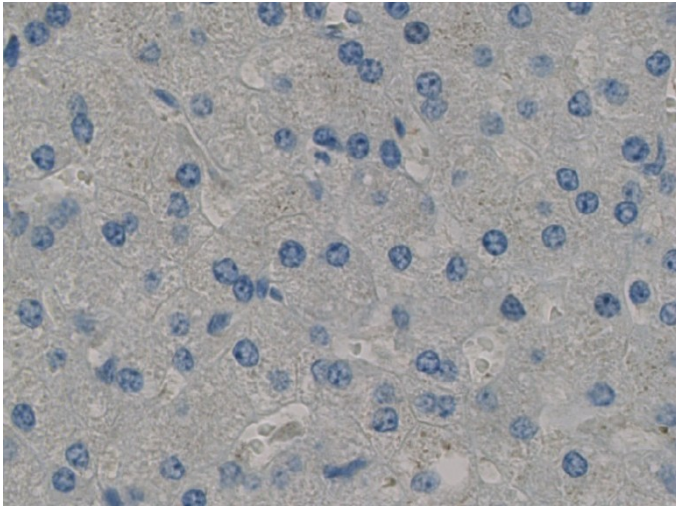


Abbildung 46: Markercore Leber, leichte zytoplasmatische unspezifische Färbung granulär. C1P5-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

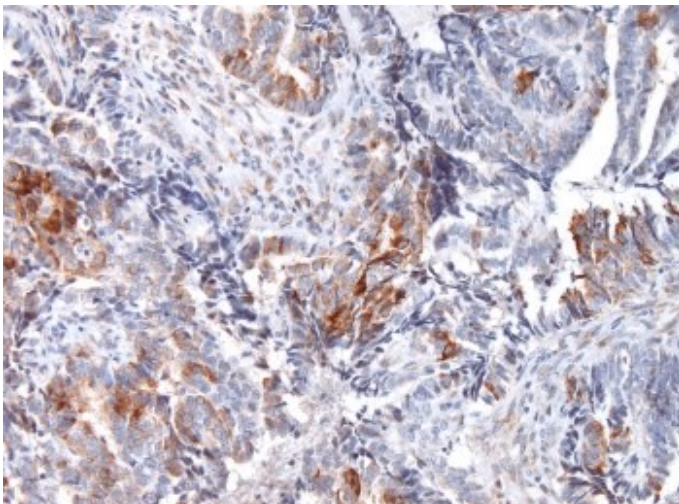


Abbildung 47: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, Adenocarcinom unterschiedlich stark positiv, Stromazellen ebenfalls positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:300], DAB, 40-fache Vergrößerung.

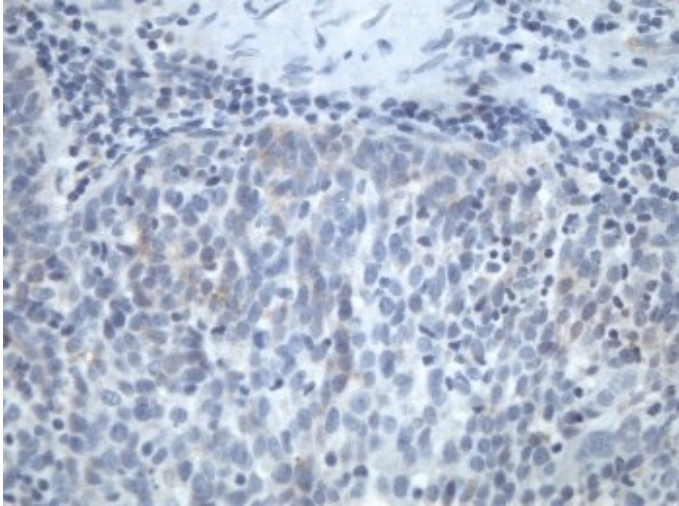


Abbildung 48: TMA K01, PLECA, HPV 16, PLECA fokal schwach zytoplasmatisch positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:300], DAB, 40-fache Vergrößerung.

Ein spezifisches Färbemuster zur Differenzierung zwischen PCR-negativen und HPV-positiven Gewebeproben konnte nicht beobachtet werden. Ebenso war keine Unterscheidung zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen möglich.

Für die weiteren immunhistochemischen Färbungen wurde die Vorbehandlung mit CC1 ausgewählt, da mit CC1 im Gegensatz zu CC2 und Pronase eine zumindest partielle Färbung von Carcinomzellen erreicht werden konnte. Die Verdünnung für den C1P5-Antikörperklon wurde auf 1:100 festgelegt, um keine Signale zu verlieren, welche evtl. bei einer höheren Verdünnung nicht mehr dargestellt worden wären. Die bislang vorliegenden Färbungen am TMA K01 zeigten keine spezifische Darstellung von HPV-E6, sondern eine weitgehende unspezifische Färbung von unterschiedlichen Zellen (Endothel, Fibrozyten, glatte Muskulatur, Plattenepithelcarcinomzellen, Adenocarcinomzellen). Dennoch wurden die TMAs 1 – 6 mit dem Antikörperklon C1P5 gefärbt, um den Antikörper an 216 weiteren Gewebeproben zu testen und die am TMA K01 erhobene Aussage der Unspezifität der Färbung zu erhärten.

3.2.3 Studien-TMAs

3.2.3.1 Färbung am Epithel

Von den 216 Cores (100 %) der 6 Studien TMAs konnten bei Färbung mit dem Antikörperklon C1P5 165 Cores (76,4 %) hinsichtlich einer epithelialen Färbung ausgewertet werden. Eine starke Färbung der Gewebeproben wurde in 157 Cores (95,2 %) nachgewiesen. Eine mäßige Färbung wurde in 5 Cores (3 %) und eine schwache Färbung in 2 Cores (1,2 %) beobachtet. In 1 Core (0,6 %) zeigte sich keine Färbung. Die Abbildungen 49 – 52 zeigen exemplarisch die Färberegebnisse mit dem Antikörperklon C1P5.

3.2.3.2 Färbung am Stroma

Eine Auswertung war bei 165 Cores bei der Färbung mit dem Antikörper C1P5 möglich. In 164 Cores (99 %) wurde eine unspezifische Färbung im Stroma (Endothel, glatte Muskulatur, Fibrozyten) nachgewiesen. Lediglich 1 Core (1 %) blieb ohne jeglichen Nachweis einer Färbung. Dabei war die unspezifische Färbung in 154 Cores (93 %) stark, in 6 Cores (4 %) mäßig und in 4 Cores (2 %) schwach ausgeprägt.

Die unspezifischen Färbungen zeigten ein stark positives Endothel und Stroma. Dies wird in den Abbildungen 49 – 52 der C1P5-Färbung verdeutlicht.

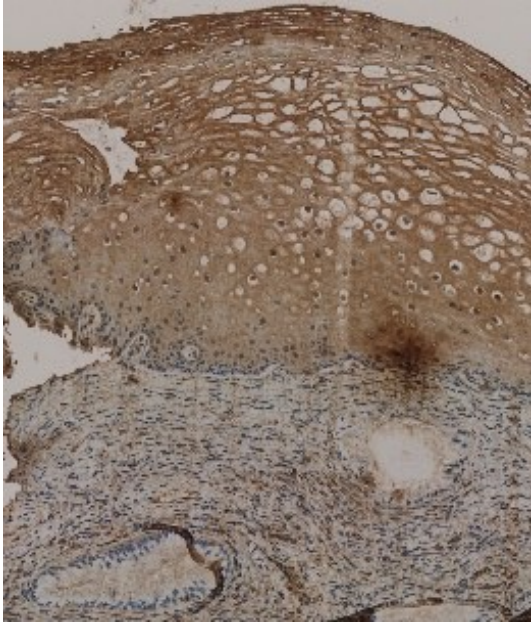


Abbildung 49: Plattenepithel, keine Dysplasie, HPV 16, Zylinderepithel fast nicht gefärbt, Stroma und Endothel unspezifisch positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

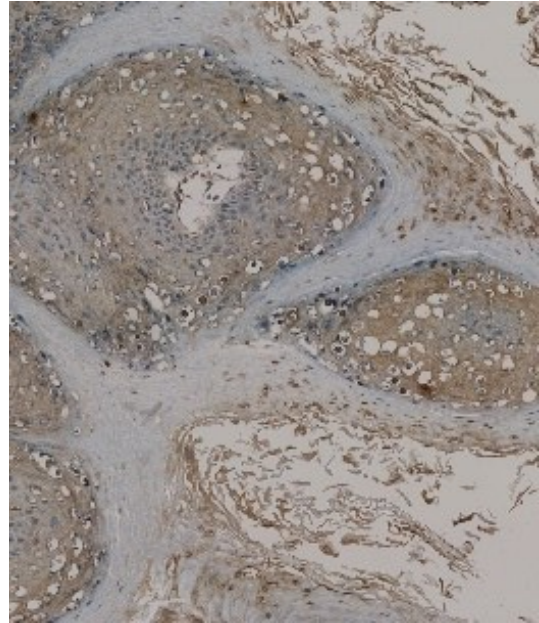


Abbildung 50: Verruca vulgaris, HPV 2a, spärliche Plattenepithelzellkerne kräftig positiv, fraglich spezifische Färbung. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

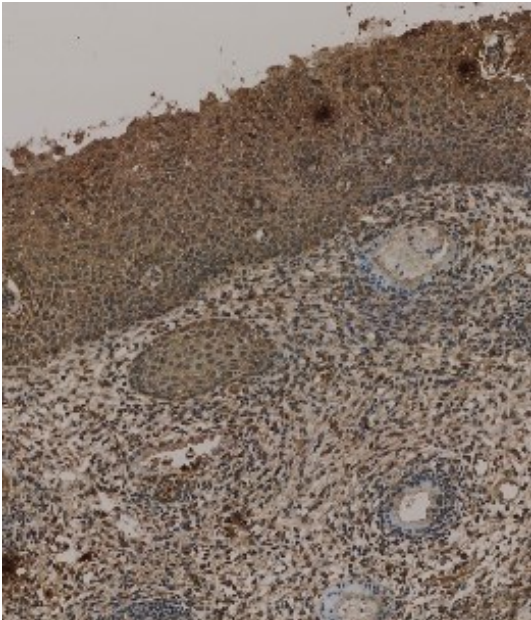


Abbildung 51: CIN III, HPV 35, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

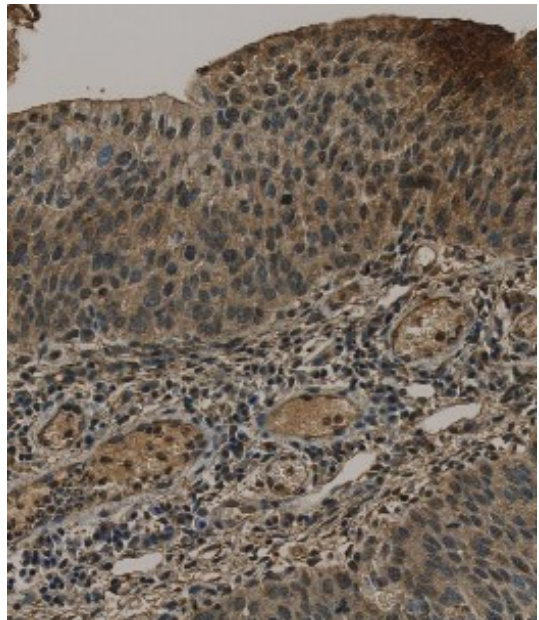


Abbildung 52: CIN III, Mischinfektion HPV 6, 11, 16, Epithel und Stroma gleichermaßen unspezifisch gefärbt. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.2.3.3 Färbeergebnisse mit high-risk- (HR-) und low-risk- (LR-) HPV-Typen

165 (76,4 %) der 216 (100 %) mit dem AK C1P5 gefärbten Cores konnten ausgewertet werden. In 88 Cores (53,3 %) lag eine Infektion mit einem HR-HPV-Typ und in 45 Cores (27,3 %) mit einem LR-HPV-Typ vor. In 13 Cores (7,9 %) wurde eine Mischinfektion mit verschiedenen HPV-Typen nachgewiesen. In 8 Cores (4,8 %) war das Epithel HPV-PCR negativ, in 6 Cores (3,6 %) war keine eindeutige Identifizierung des HPV-Typs möglich und in 5 Cores (3,0 %) lagen intermediäre HPV-Typen vor.

Die Expression von C1P5 in Korrelation zu den HPV-Typen wird in Tabelle 26 verdeutlicht.

HPV-Typen	stark	mäßig	schwach	negativ
HR	96,6% (85)	2,3% (2)	1,1% (1)	0% (0)
LR	91,1% (41)	6,7% (3)	2,2% (1)	0% (0)
Mischinfektion	92,3% (12)	0% (0)	0% (0)	7,7% (1)
PCR negativ	100% (8)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Intermediär	100% (5)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Unklare Fälle	100% (6)	0% (0)	0% (0)	0% (0)

Tabelle 26: HPV-Typen in Korrelation zur Expression von C1P5

Hervorzuheben ist, dass in alle 8 Cores der HPV-PCR-negativen Proben entgegen der Erwartung eine starke Expression bei der Färbung mit dem Antikörper festgestellt wurde. Die Färbung der HPV-PCR-negativen Proben ist in den Abbildungen 53 – 55 dargestellt.

Darüber hinaus war kein Unterschied der Färbeergebnisse zwischen HR-HPV-Typen und LR-HPV-Typen zu erkennen (Abbildungen 56 – 59).

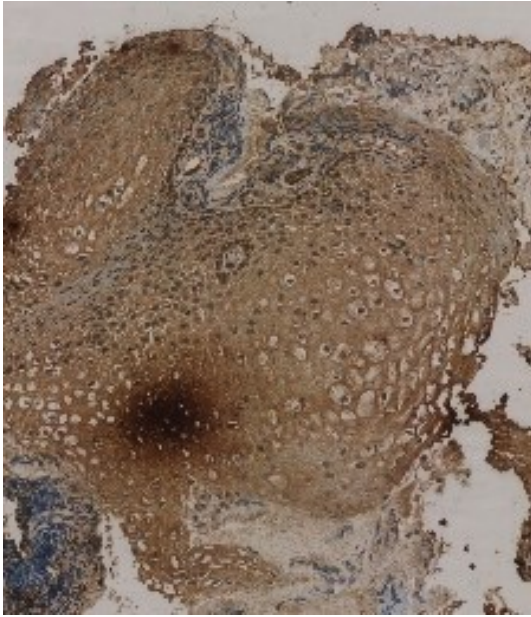


Abbildung 53: CIN I, PCR negativ, Epithel und Stroma stark positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

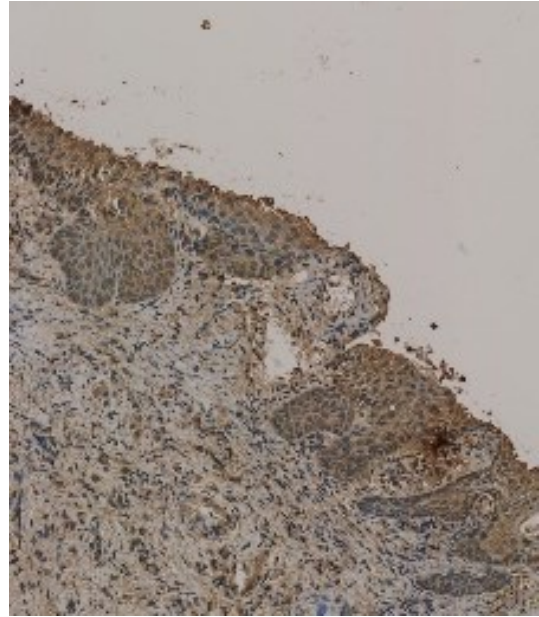


Abbildung 54: CIN III, PCR negativ, Epithel und Stroma stark positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB; 20-fache Vergrößerung.

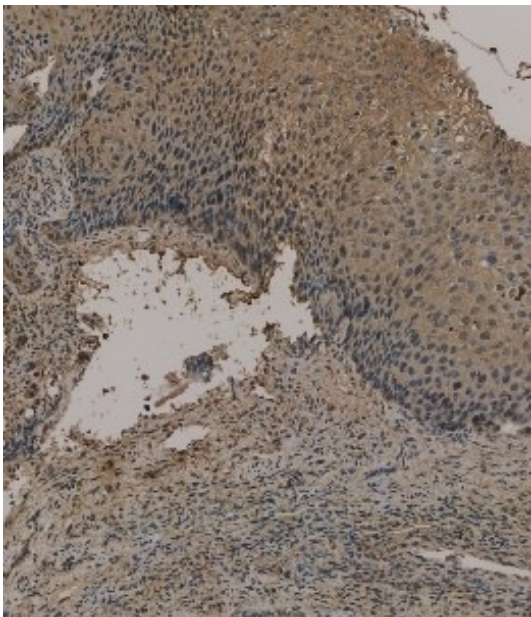


Abbildung 55: CIN III, PCR negativ, Epithel und Stroma positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

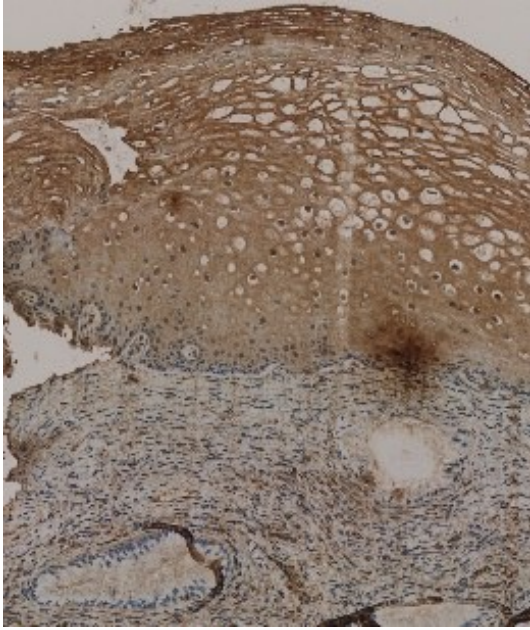


Abbildung 56: Keine Dysplasie, HPV 16, Stroma und Endothel positiv. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.



Abbildung 57: CIN I, HPV 70, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.

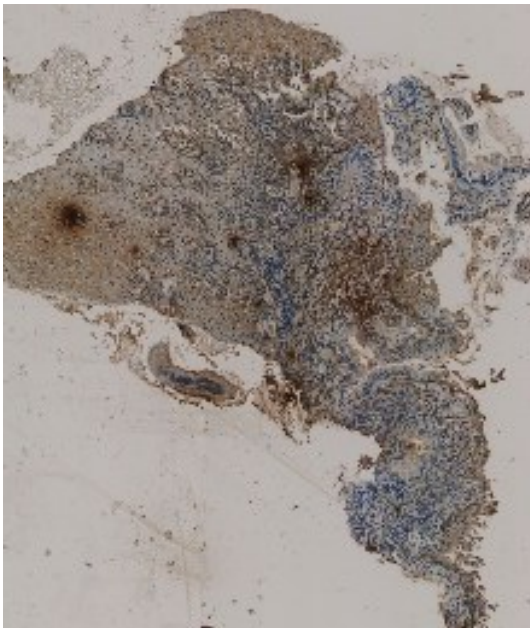


Abbildung 58: CIN II, HPV 6, Epithel und Stroma gleichermaßen gefärbt. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 10-fache Vergrößerung.

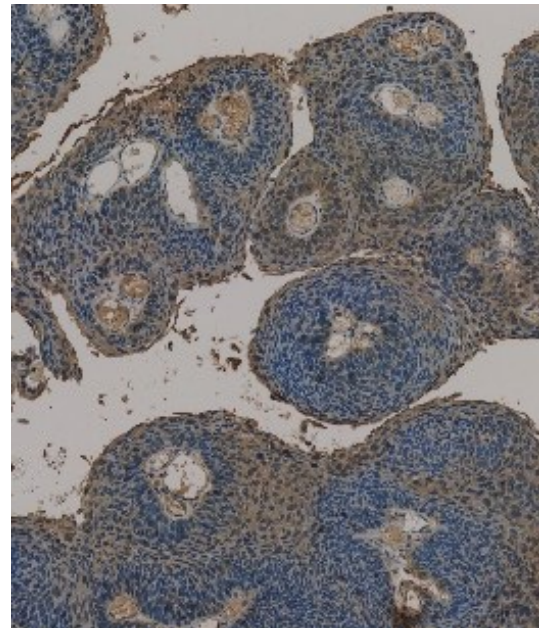


Abbildung 59: CIN III, HPV 33, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

Der Antikörperklon C1P5 soll gemäß der Herstellerangaben spezifisch das HPV 16- und HPV 18-E6-Protein nachweisen. In 19 Cores (11,5 %) wurde eine HPV-PCR-Analyse mit positivem Nachweis von HPV 16 durchgeführt. In allen 19 Cores zeigte sich eine starke Anfärbung des Epithels. Eine HPV-PCR-Analyse mit positivem Nachweis von HPV 18 wurde in 14 Cores (8,5 %) durchgeführt. Dabei zeigte sich in 13 Cores eine starke Färbung im Epithel und in 1 Core eine mäßiggradige Anfärbung des Epithels. Diese Anfärbung im Epithel kann jedoch aufgrund der unspezifischen Färbung der Stromalen Gewebsanteile in 164 Cores (99,3 %) und aufgrund der Epithelanfärbung in HPV-PCR negativen Proben als nicht spezifisch angesehen werden.

3.2.3.4 Färbeergebnisse mit high-grade squamösen intraepithelialen Läsionen (HSIL) und low-grade squamösen intraepithelialen Läsionen (LSIL)

165 (76,4 %) der 216 (100 %) mit dem AK C1P5 gefärbten Cores konnten ausgewertet werden. In 75 Cores (45,5 %) wurde anhand der HE-Färbung eine HSIL, in 39 Cores (23,6 %) keine Dysplasie und in 30 Cores (18,2 %) eine LSIL diagnostiziert. In 7 Cores (4,2 %) war eine Beurteilung aufgrund fehlenden Gewebes nicht durchführbar. Sonstige Diagnosen wurden mittels HE-Färbung bei 6 Cores (3,6 %) gestellt, in 5 Cores (3 %) blieb eine Diagnosesicherung aus und ein PLECA wurde in 3 Cores (1,8 %) diagnostiziert.

Pathologische Befunde	stark	mäßig	schwach	negativ
HSIL	97,3% (73)	1,3% (1)	1,3% (1)	0% (0)
LSIL	96,7% (29)	3,3% (1)	0% (0)	0% (0)
Keine Dysplasie	89,7% (35)	7,7% (3)	2,6% (1)	0% (0)
PLECA	100% (3)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Sonstige	100% (6)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Unklare Fälle	100% (5)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Keine Auswertung	85,7% (6)	0% (0)	0% (0)	14,3% (1)

Tabelle 27: pathologische Befunde in Korrelation zu der Expression von C1P5

Aus der Tabelle 27 geht hervor, dass die Expression der Färbung in keinem Zusammenhang mit dem Grad der Dysplasie stand. Diese Beobachtung wird in den Abbildungen 60 – 70 veranschaulicht.

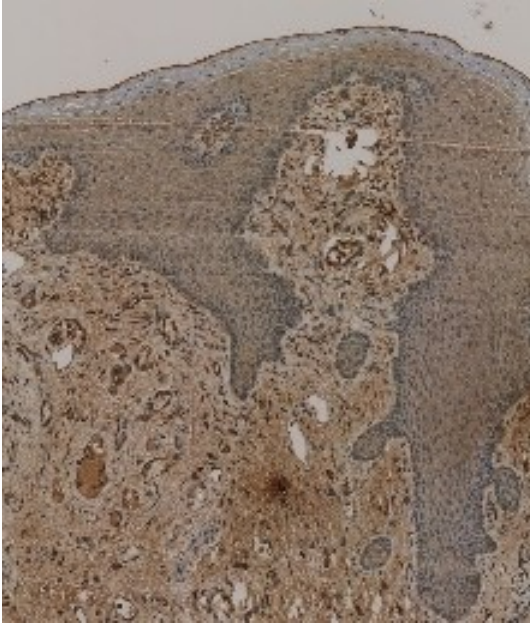


Abbildung 60: CIN I, HPV 73, starke Färbung von Endothel und Stroma; schwache Epithelfärbung. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.

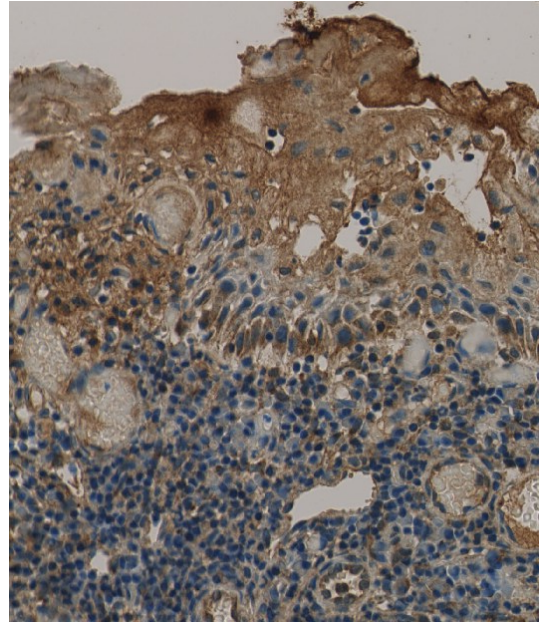


Abbildung 61: CIN II, HPV 56, partiell starke Färbung des Oberflächenepithels. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

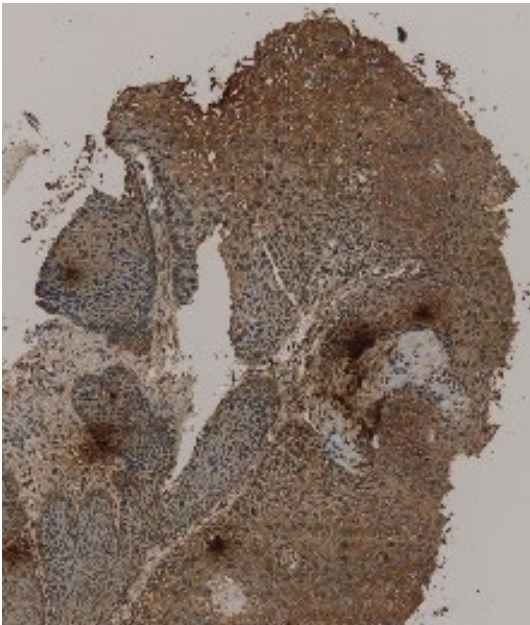


Abbildung 62: CIN III, Mischinfektion HPV 6, 11, 16, 35, 44, starke Färbung von Endothel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.

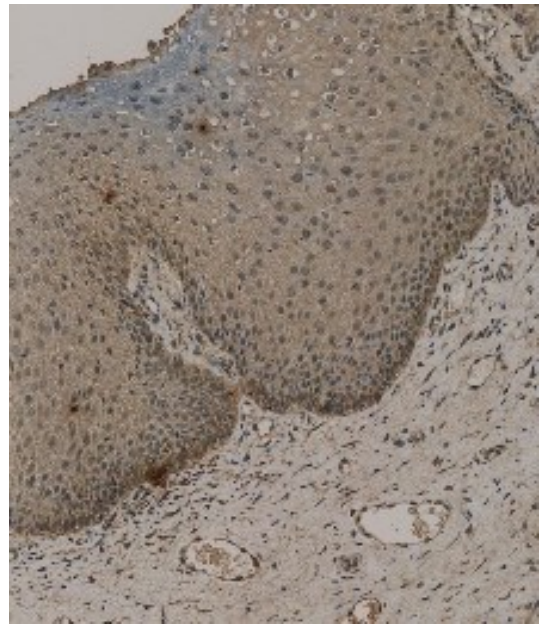


Abbildung 63: VIN I, Mischinfektion HPV 33, 42. Schwache Färbung von Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.

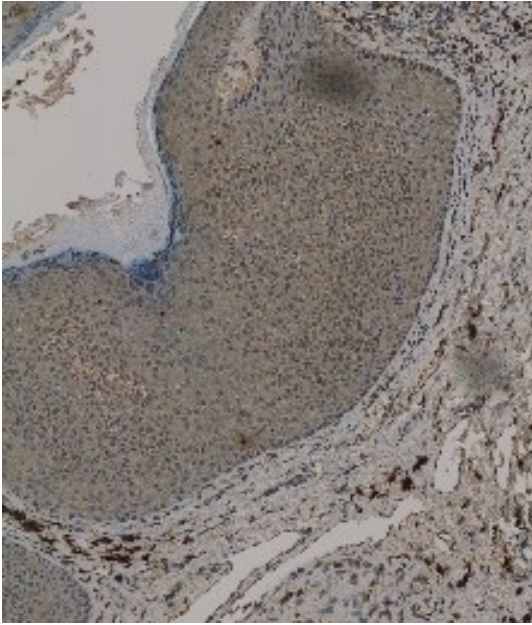


Abbildung 64: VIN II, HPV 6, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.

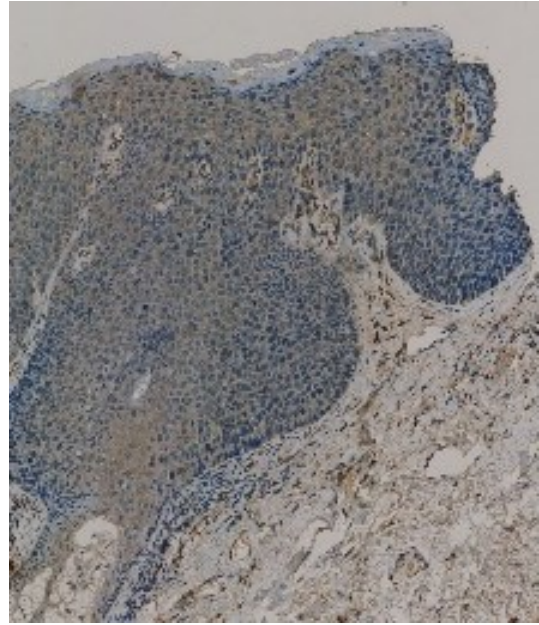


Abbildung 65: VIN III, HPV 33, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.

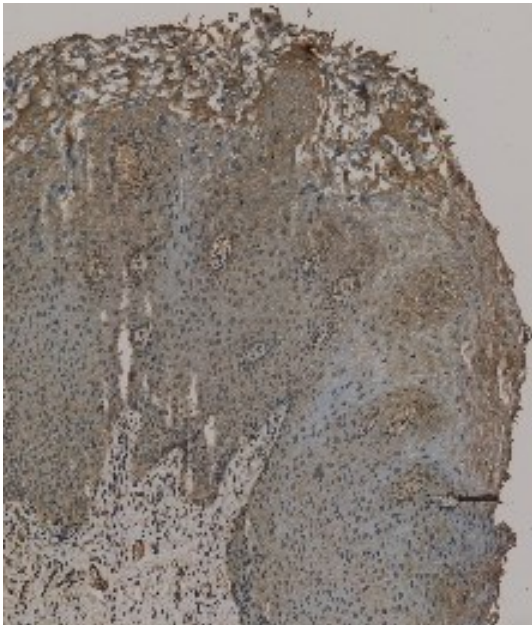


Abbildung 66: VAIN II, HPV 56, Epithel und Stroma gleichermaßen gefärbt. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 15-fache Vergrößerung.

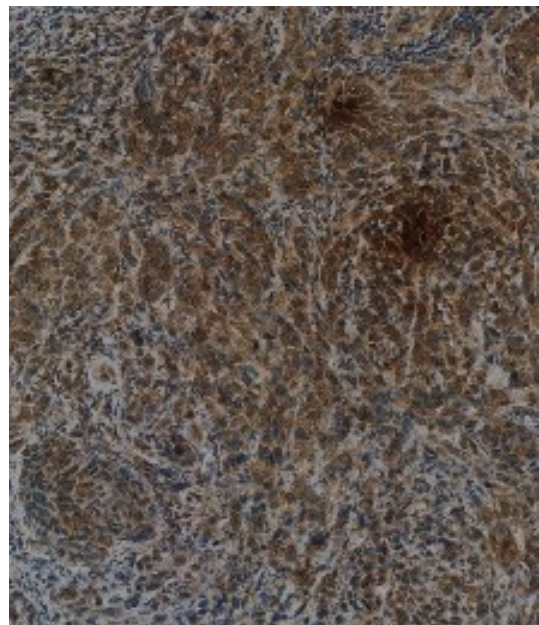


Abbildung 67: PLECA, HPV 45, unspezifische Färbung im Tumor und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

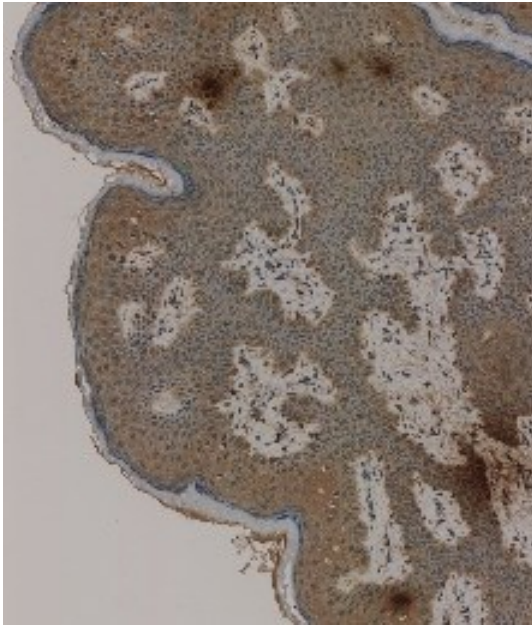


Abbildung 68: Condyloma acuminatum, HPV 2, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

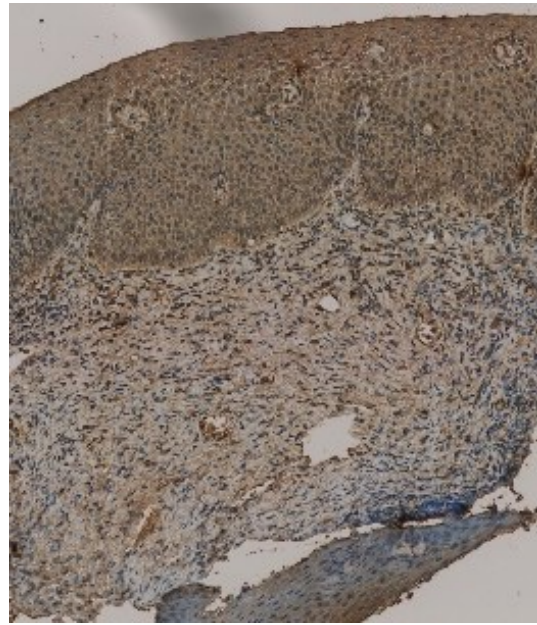


Abbildung 69: Plattenepitheliale Hyperplasie, Mischinfektion HPV 31, 33, unspezifische Färbung in Epithel und Stroma. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

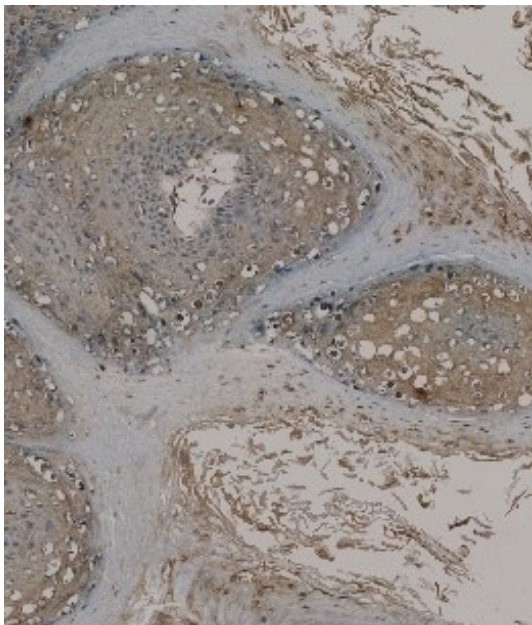


Abbildung 70: Verruca vulgaris, HPV 2a, spärliche Plattenepithelzellkerne kräftig positiv, fraglich regelhafte Färbung. C1P5-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

3.3 Antikörperklon BF7 zum Nachweis des HPV-Onkoproteins E6

3.3.1 Zelllinien HeLa, SKBR3 und MCF7

Als Positivkontrolle für HPV18-E6 diente die HeLa -Zelllinie, welche nachweislich das HPV18-Onkoprotein E6 exprimiert. Als Negativkontrolle und damit zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung wurden die Zelllinien SKBR3 und MCF7 verwendet.

Wie in den Abbildungen 71 – 74 zu erkennen, ließ sich in den HeLa -Zellen bei CC1 Vorbehandlung in allen Antikörperverdünnungen (1:25, 1:100, 1:200 und 1:500) keine Anfärbung nachweisen.

Die SKBR3- und die MCF7-Zelllinien wiesen in der Verdünnung 1:25 eine sehr schwache, kaum sichtbare zytoplasmatische Positivität auf, welche in den Verdünnungen 1:100, 1:200 und 1:500 nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 71 – 74).

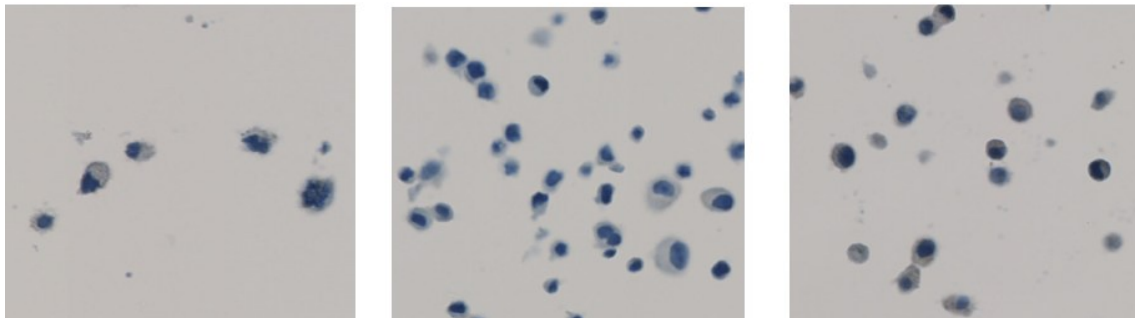


Abbildung 71: Links: HeLa -Zellen, keine Färbung, Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen, schwache zytoplasmatische Positivität. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, x440.

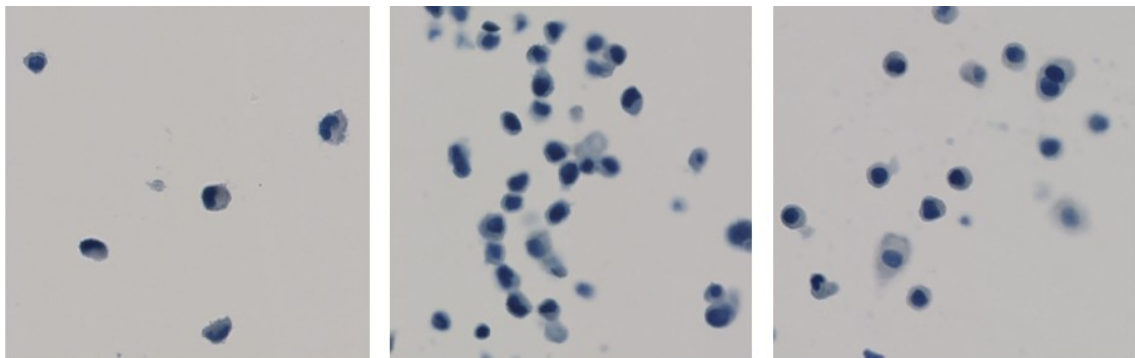


Abbildung 72: Links: HeLa -Zellen, keine Färbung, Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, x440.

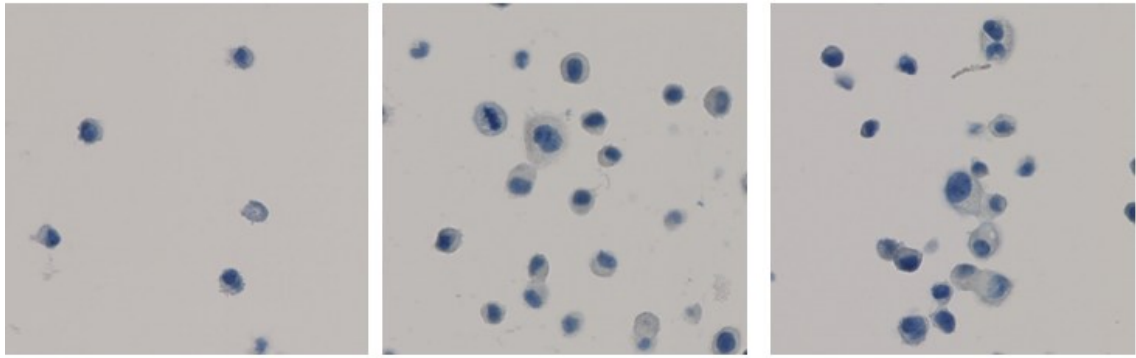


Abbildung 73: Links: HeLa -Zellen, keine Färbung, Mitte und rechts: SBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:200], DAB, x440.

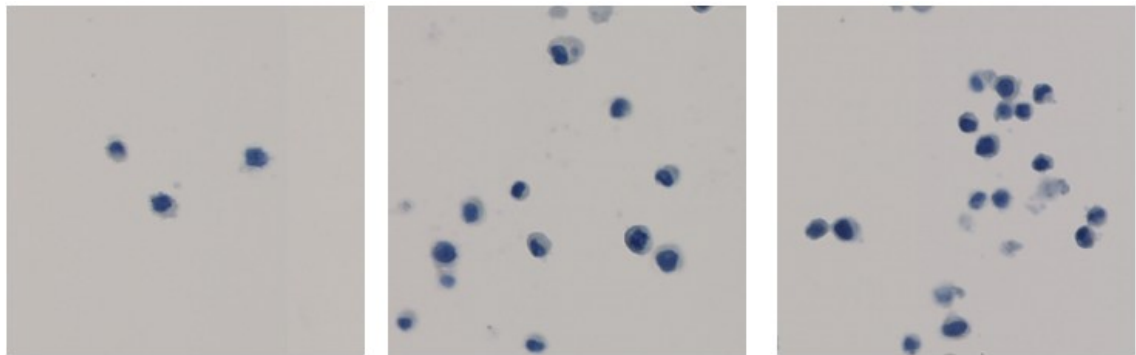


Abbildung 74: Links: HeLa -Zellen, keine Färbung, Mitte und rechts: SBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:500], DAB, x440.

3.3.2 TMA K01 Vergleich der unterschiedlichen Verdünnungen

Der TMA K01 wurde mit CC1 vorbehandelt und mit dem Antikörper BF7 in den Verdünnungen 1:25, 1:100, 1:200 und 1:500 gefärbt. In allen Verdünnungsstufen waren 4 Cores aufgrund von fehlen dem Tumor nicht auswertbar.

3.3.2.1 CC1 mit 1:25 Verdünnung

Bei der Vorbehandlung mit CC1 bei einer Verdünnung des Antikörperklons von 1:25 konnten 9 Cores des Kontroll-TMAs ausgewertet werden. 4 Cores des TMA K01 waren aufgrund von fehlendem Tumorgewebe nicht auswertbar. Bei der Vorbehandlung mit CC1 bei einer Verdünnung des Antikörperklons von 1:25 ließ sich eine unspezifische Färbung in 6 Cores des TMA K01 nachweisen. Die unspezifische Färbung wurde im Stroma, in Plasmazellen und in Fibroblasten dokumentiert (Abbildungen 76 – 79). Die Carcinome zeigten bis auf 2 sehr schwach gefärbte Cores keine Färbereaktion (Abbildung 80 – 83).

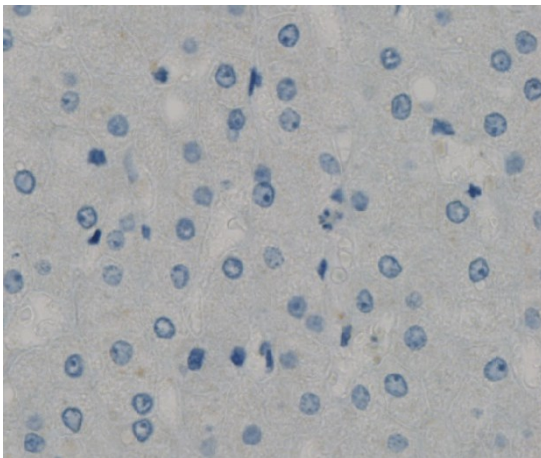


Abbildung 75: Markercore Leber, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.

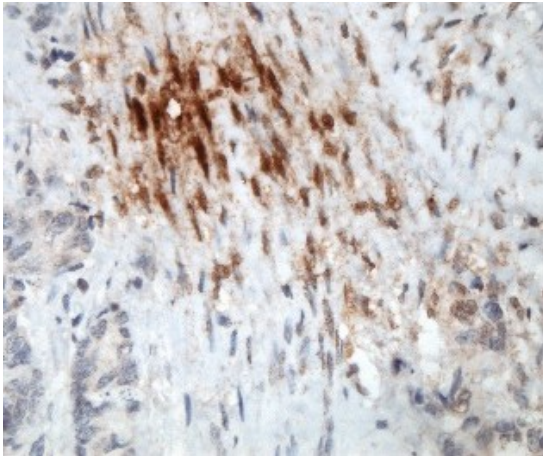


Abbildung 76: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, unspezifische Färbung im Stroma. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.

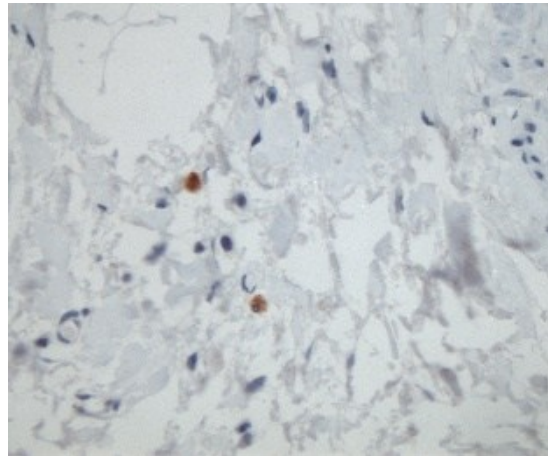


Abbildung 77: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, Carcinom negativ, Plasmazellen positiv. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.

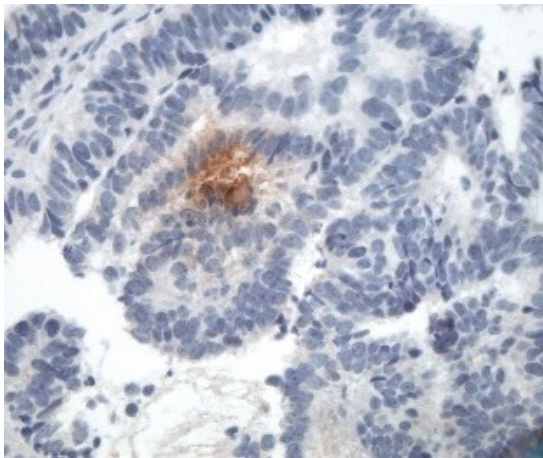


Abbildung 78: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, unspezifische Färbung im Carcinom. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.

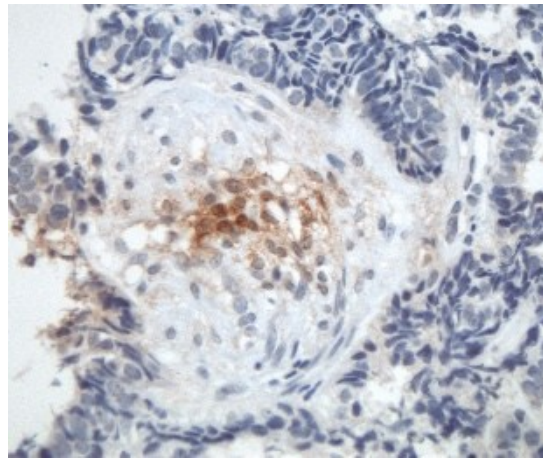


Abbildung 79: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ, Stroma unspezifisch gefärbt. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.

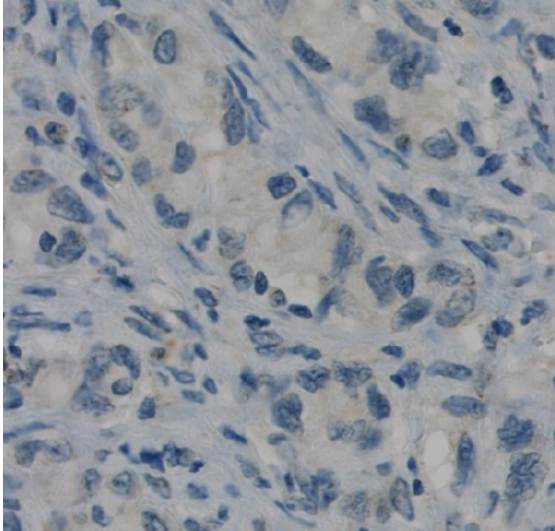


Abbildung 80: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ für HPV, sehr schwache, kaum erkennbare Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.

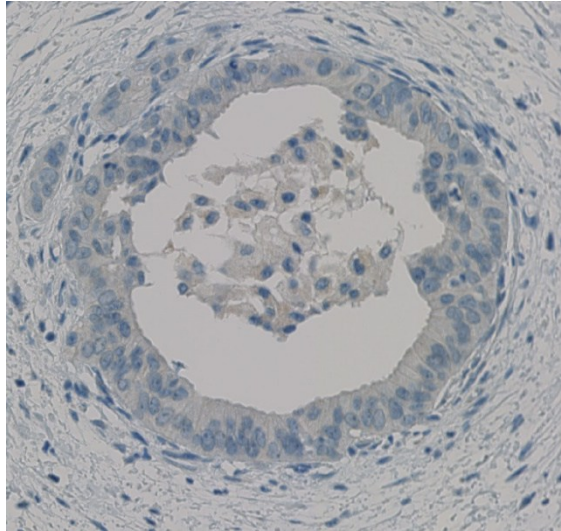


Abbildung 81: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, sehr schwache, kaum erkennbare Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 20-fache Vergrößerung.

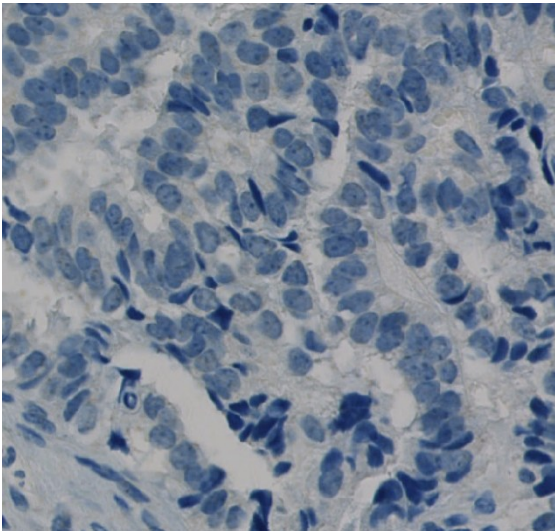


Abbildung 82: TMA K01, Adenocarcinom, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.

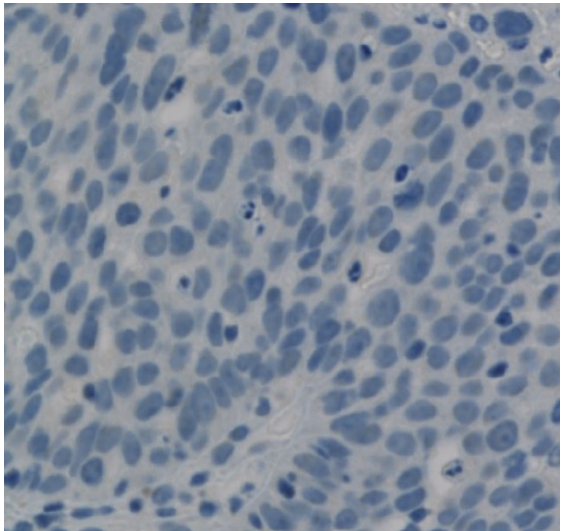


Abbildung 83: TMA K01, HPV 16, PLECA, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.3.2.2 CC1 mit 1:100 Verdünnung

Bei der Vorbehandlung mit CC1 bei einer Verdünnung des Antikörperklons von 1:100 konnten 9 Cores des Kontroll-TMAs ausgewertet werden. 4 Cores des TMA K01 waren aufgrund von fehlendem Tumorgewebe nicht auswertbar. Bei allen auswertbaren Cores ließ sich keine Färbung des TMA K01 nachweisen (Abbildungen 85 + 86).

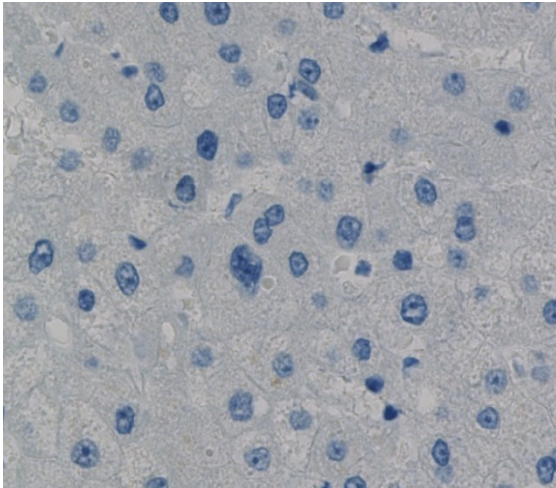


Abbildung 84: Markercore Leber, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

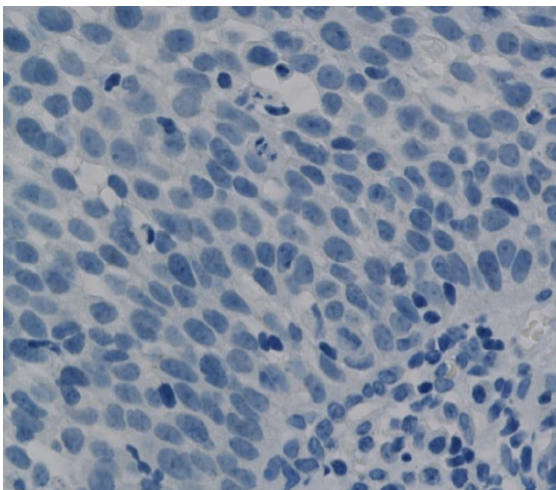


Abbildung 85: TMA K01, Plattenepithelcarcinom, HPV 16, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

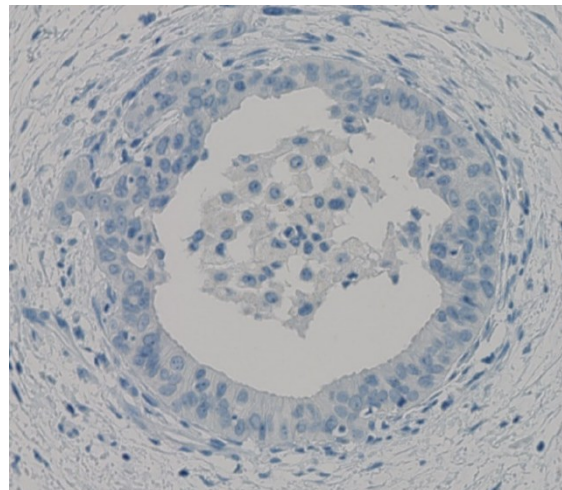


Abbildung 86: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

3.3.2.3 CC1 mit 1:200 Verdünnung

Bei der Vorbehandlung mit CC1 in der Verdünnung 1:200 konnten 9 Cores des Kontroll-TMAs ausgewertet werden. 4 Cores des TMA K01 waren aufgrund von fehlendem Tumorgewebe nicht auswertbar. In keinem der auswertbaren Cores wurde eine Färbung der Carcinome nachgewiesen (Abbildungen 88 – 90). Eine Färbung im Oberflächenepithel, stromalen Zellen und glatter Muskulatur konnte in dieser Verdünnung ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

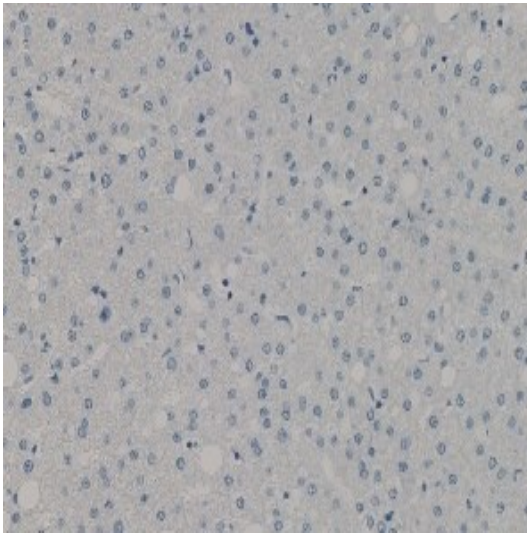


Abbildung 87: Markercore Leber, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

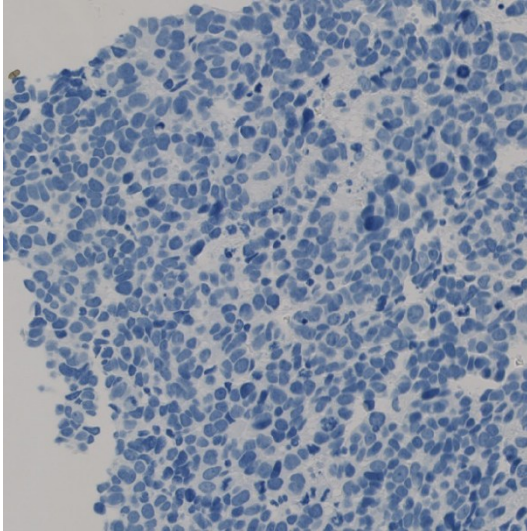


Abbildung 88: TMA K01, PLECA, HPV 18, keine Färbung der Tumorzellen. BF7-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 20-fache Vergrößerung.

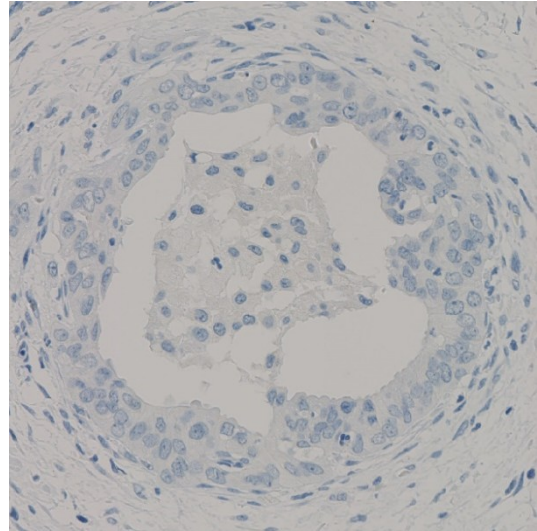


Abbildung 89: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, keine Färbung des Adenocarcinoms. BF7-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 20-fache Vergrößerung.

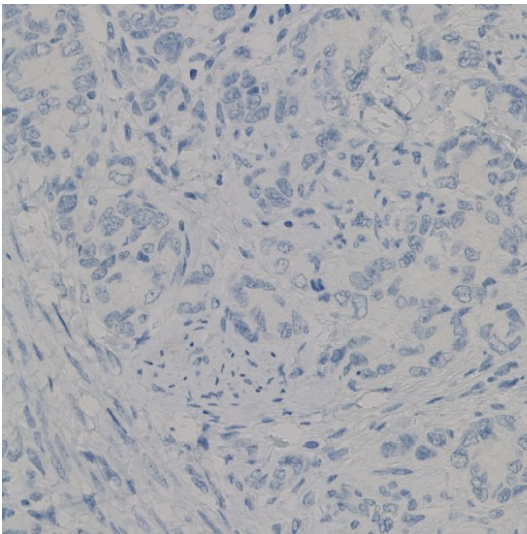


Abbildung 90: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ für HPV, keine Färbung des Carcinoms. BF7-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 20-fache Vergrößerung.

3.3.2.4 CC1 mit 1:500 Verdünnung

Bei der Vorbehandlung mit CC1 in der Verdünnung 1:500 konnten 9 Cores des Kontroll-TMAs ausgewertet werden. 4 Cores des TMA K01 waren aufgrund von fehlendem Tumorgewebe nicht auswertbar. In keinem der auswertbaren Cores wurde eine Färbung der Carcinome nachgewiesen (Abbildungen 92 – 94). Eine Färbung in Oberflächenepithel, stromalen Zellen und glatter Muskulatur konnte in dieser Verdünnung ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

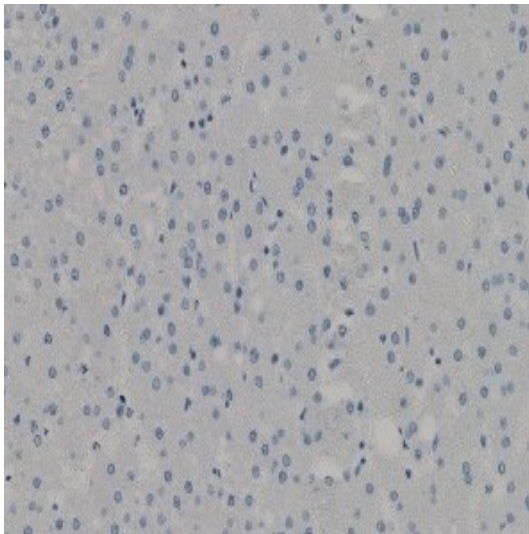


Abbildung 91: Markercore Leber, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.

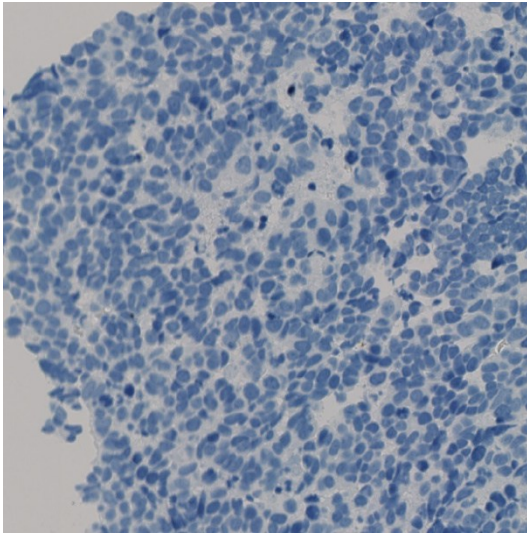


Abbildung 92: TMA K01, PLECA, HPV 18, keine Färbung der Tumorzellen. BF7-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 20-fache Vergrößerung.

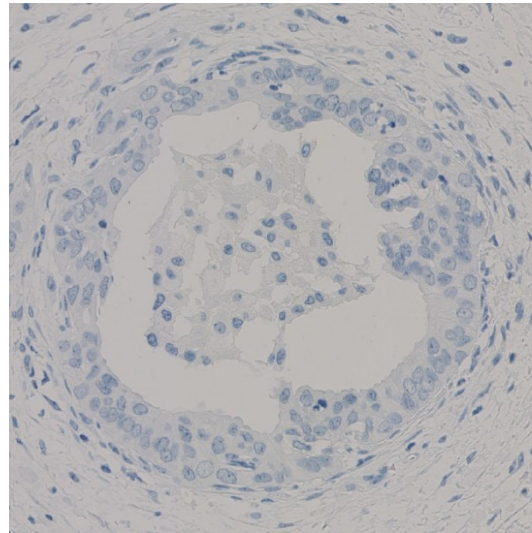


Abbildung 93: TMA K01, Adenocarcinom, HPV 18, keine Färbung des Adenocarcinoms. BF7-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 20-fache Vergrößerung.

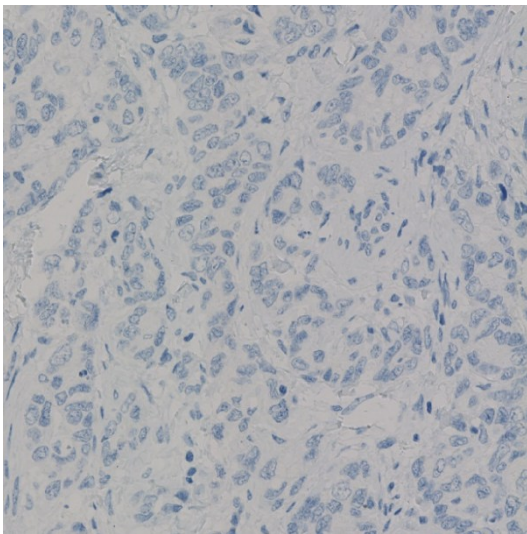


Abbildung 94: TMA K01, Adenocarcinom, PCR negativ für HPV, keine Färbung des Carcinoms. BF7-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 20-fache Vergrößerung.

Für die weiteren immunhistochemischen Färbungen wurde die Vorbehandlung mit CC1 bei einer Verdünnung des AK BF7 von 1:100 gewählt. Die bislang vorliegenden Färbungen am TMA K01 zeigten keine Anfärbung von HPV-E6. Dennoch wurden die TMAs 1 – 6 mit dem Antikörperklon C1P5 gefärbt, um den Antikörper an 216 weiteren Gewebeproben zu testen.

3.3.3 Studien-TMAs

3.3.3.1 Färbung am Epithel

Von den 216 Cores (100%) der 6 Studien-TMAs konnten bei Färbung mit dem Antikörperklon BF7 192 Cores (88,9 %) hinsichtlich einer epithelialen Färbung ausgewertet werden. Bei 191 Cores (99,5 %) wurde keine Färbung der Gewebeproben im Epithel bzw. Tumorzellen mit dem Antikörperklon BF7 nachgewiesen. In 1 Core (0,5 %) lag eine schwache nukleäre Färbung im Epithel vor (Abbildung 95).

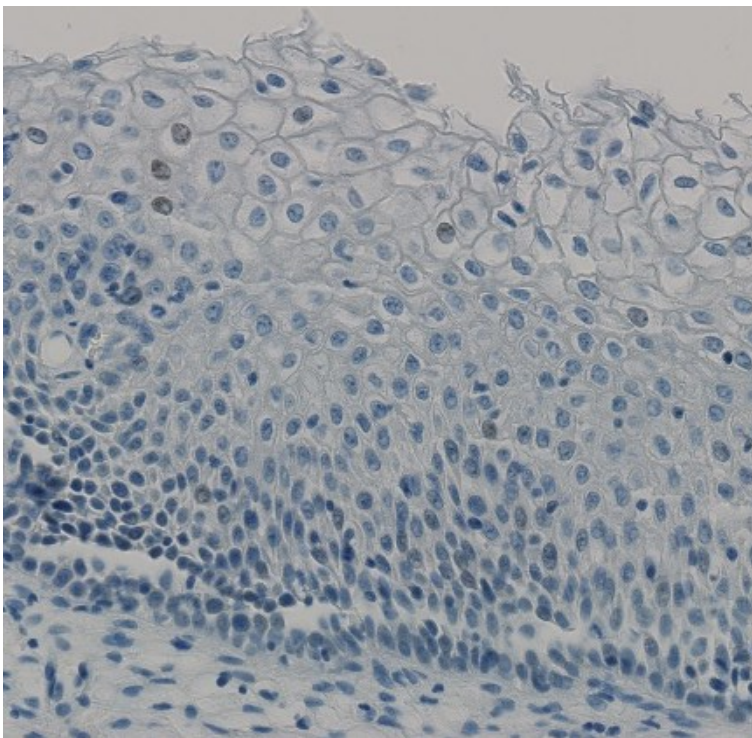


Abbildung 95: TMA 5, Core 02-01, keine Dysplasie, HPV 66, schwache nukleäre Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

Das nur in einem Core angefärbte Epithel zeigte keine Dysplasie, keine p16-Expression, eine p53-Wildtyp-Expression und eine MIB-1-Färbung in der basalen Zellschicht (Abbildung 96). Die PCR-Analyse ergab eine Positivität für HPV 66. Im Zusammenhang mit der p16-, p53- und MIB-1-Färbung war die Spezifität der Färbung bei einem für diesen AK nicht ausgetesteten HPV-Typ als fraglich zu werten.

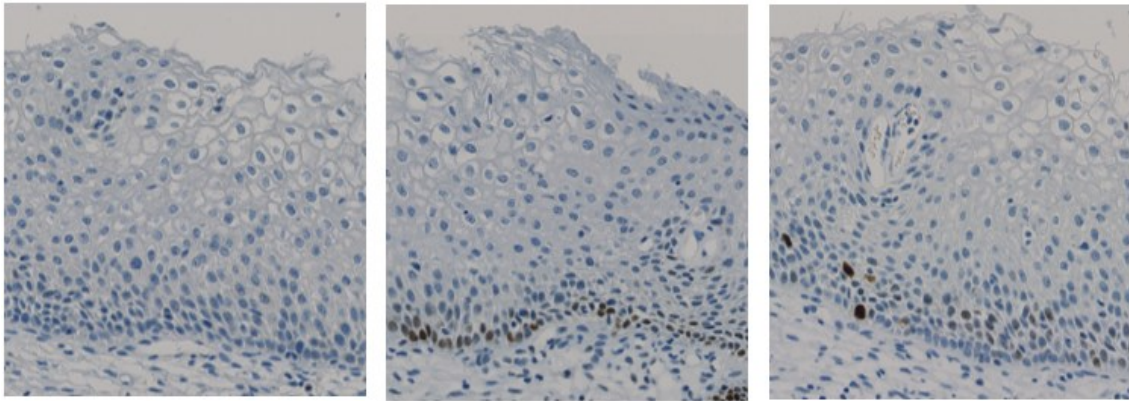


Abbildung 96: TMA 5, Core 02-01, keine Dysplasie, HPV 66. 40-fache Vergrößerung. Links: p16-Färbung, Mitte: p53-Färbung, Rechts: MIB-1-Färbung.

3.3.3.2 Färbung im Stroma

Von den 216 Cores (100 %) der TMAs 1 – 6 konnten bei Färbung mit dem Antikörperklon BF7 192 Cores (88,9 %) ausgewertet werden. Bei 189 Cores (98,4 %) konnte keine Färbung im Stroma der Gewebeproben mit dem AK erzielt werden. In 3 Cores (1,6 %) zeigte sich eine schwache unspezifische zytoplasmatische Färbung von Makrophagen und Kollagen im Zytoplasma (Abbildungen 97 – 99).

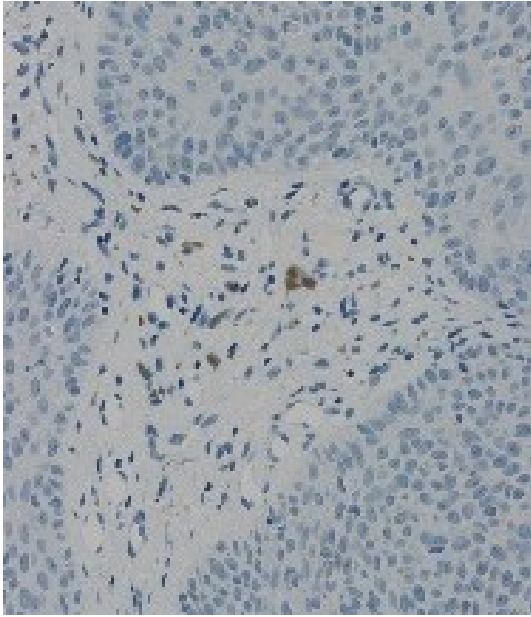


Abbildung 97: VIN II, HPV 6, Makrophagen unspezifisch zytoplasmatisch positiv. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

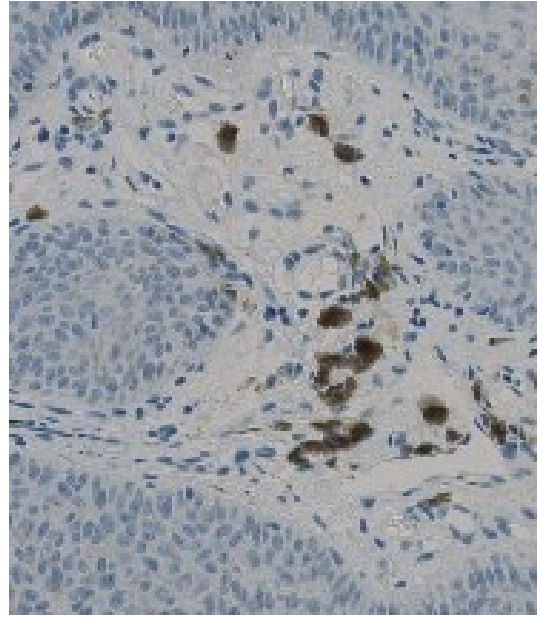


Abbildung 98: VIN II, HPV 6, Makrophagen unspezifisch zytoplasmatisch positiv. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

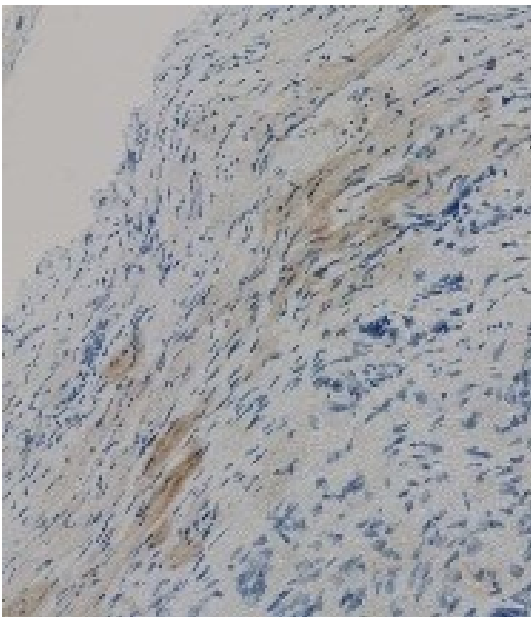


Abbildung 99: CIN I, HPV 56, Kollagen fokal zytoplasmatisch positiv. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.3.3.3 Färbeergebnisse mit HR- und LR-HPV-Typen

Da mit dem Antikörperklon BF7 keine Färbung erzielt werden konnte, erfolgte keine Korrelation der Färbeergebnisse mit HR- und LR-HPV-Typen.

Der Antikörperklon BF7 soll gemäß der Herstellerangaben spezifisch das HPV 18-E6-Protein nachweisen. Die Abbildungen 100 + 101 veranschaulichen das Ausbleiben der Färbung bei HPV 18 positivem Epithel. Dieses nicht zu erwartende Ergebnis weist darauf hin, dass der Antikörper keine valide Färbung zumindest bei den in dieser Studie verwendeten Gewebeproben liefert.

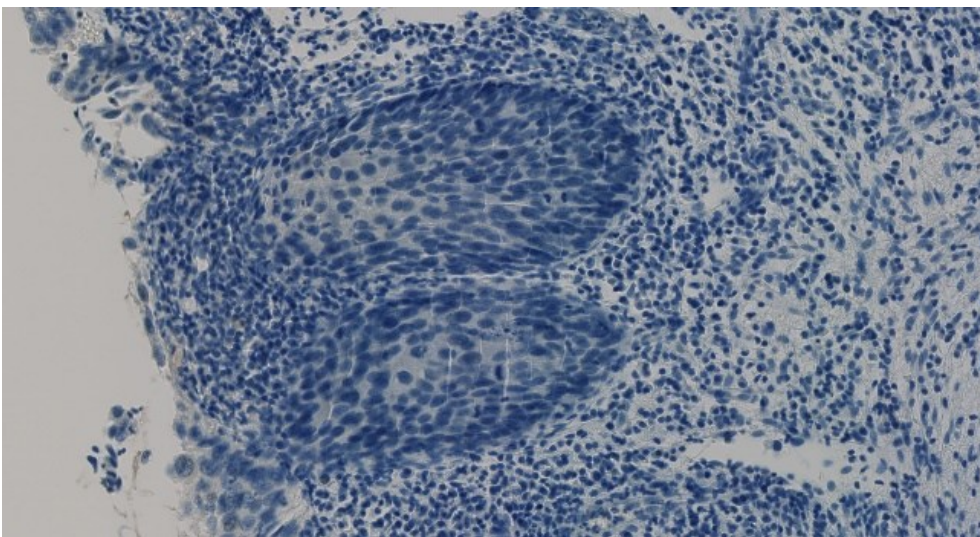


Abbildung 100: CIN III, HPV 18, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

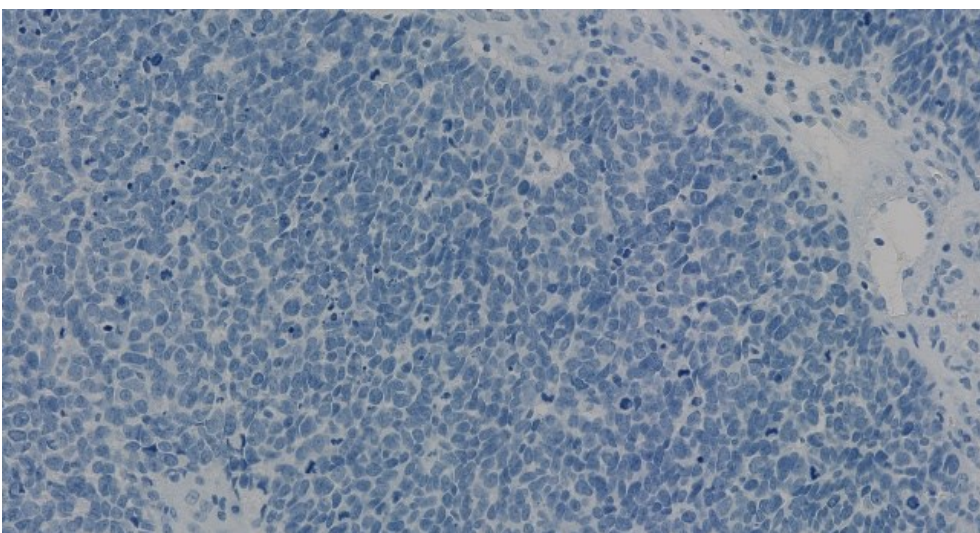


Abbildung 101: PLECA, HPV 18, keine Färbung. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.3.3.4 Färbeergebnisse mit HSIL und LSIL

Aufgrund der ausbleibenden Färbung mit dem Antikörperklon BF7 wurde keine Korrelation der Färbeergebnisse mit den pathologischen Befunden vorgenommen.

3.4 Antikörperklon 8E2 zum Nachweis des HPV-Onkoproteins E7

3.4.1 Zelllinien HeLa, SKBR3 und MCF7

Als Positivkontrolle für HPV18-E7 diente die HeLa -Zelllinie, welche nachweislich das HPV18-Onkoprotein E7 exprimiert. Als Negativkontrolle und damit zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung wurden die Zelllinien SKBR3 und MCF7 verwendet. Wie in den Abbildungen 102 – 105 zu erkennen, zeigen die HeLa -Zellen bei CC1-Vorbehandlung und den Antikörperverdünnungen von 1:25, 1:100, 1:200 und 1:500 eine starke zytoplasmatische Färbung mit dem 8E2-Antikörper. Jedoch zeigten auch die SKBR3- und die MCF7-Zelllinien eine zytoplasmatische Anfärbung mittels 8E2 in den Verdünnungen 1:25 und 1:100, jedoch nicht mehr bei den Verdünnungen 1:200 und 1:500 (Abbildungen 104 + 105). Aufgrund der fehlenden Anfärbung der beiden Mammacarcinomzelllinien SKBR3 und MCF7 in den Verdünnungen 1:200 und 1:500 kann eine spezifische Anfärbung von E7 in den HeLa -Zellen postuliert werden, da eine Expression von HPV18-E7 in diesen beiden Mammacarcinomzelllinien ausgeschlossen werden kann. Ab einer Verdünnung von 1:200 und darüber könnte der 8E2-Antikörper seine unspezifischen Färbereaktionen verlieren.

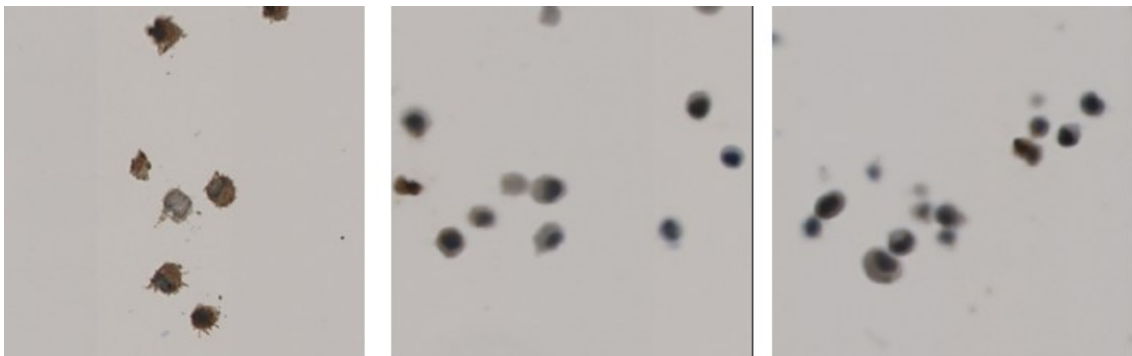


Abbildung 102: Links: HeLa -Zellen, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung mit hoher Intensität, Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen mit schwacher unspezifischer zytoplasmatischer Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, x440.



Abbildung 103: Links: HeLa -Zellen, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung mit hoher Intensität, Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen mit fokal unspezifischer zytoplasmatischer Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, x440.

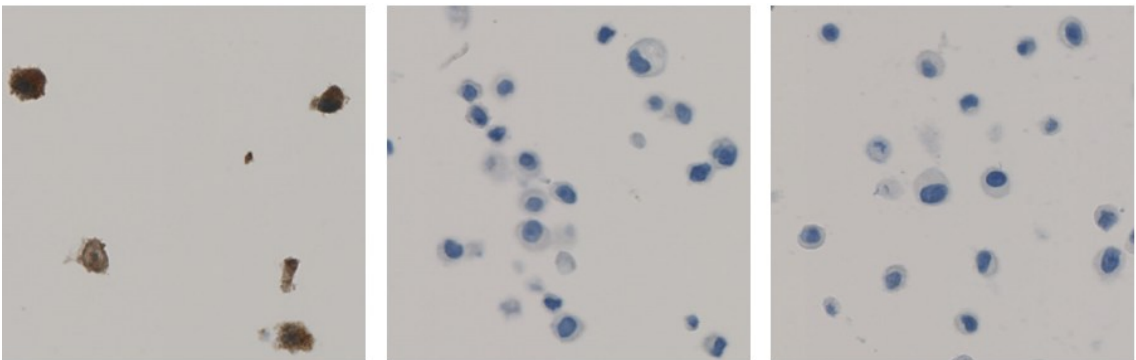


Abbildung 104: Links: HeLa -Zellen, zytoplasmatische Färbung. Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, x440.

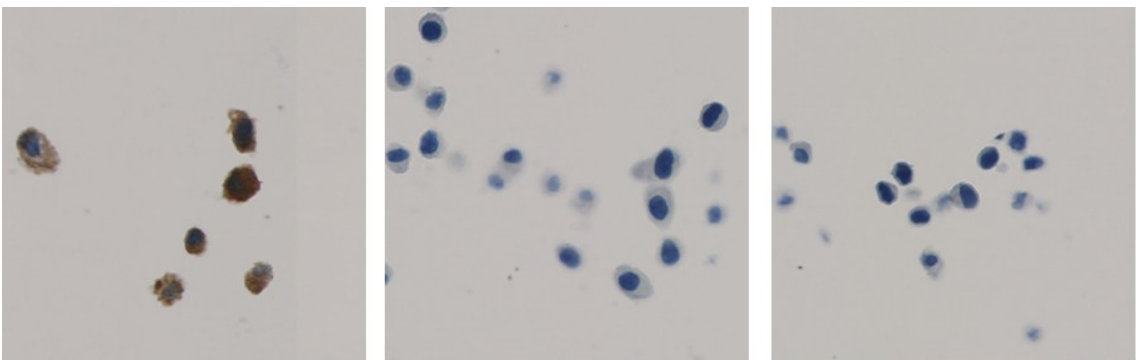


Abbildung 105: Links: HeLa -Zellen, zytoplasmatische Färbung. Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, x440.

3.4.2 TMA K01 Vergleich der unterschiedlichen Verdünnungen

Der Kontroll-TMA K01 wurde mit verschiedenen Verdünnungen des Antikörperklons 8E2 gefärbt. Die Vorbehandlung der Schnitte erfolgte mittels CC1 in den Verdünnungen von 1:25, 1:100, 1:200 und 1:500.

3.4.2.1 CC1 mit 1:25 Verdünnung

Bei der Vorbehandlung mit CC1 bei einer Verdünnung des Antikörperklons von 1:25 konnten 9 Cores des Kontroll-TMAs ausgewertet werden. 4 Cores des TMA K01 waren aufgrund von fehlendem Tumorgewebe nicht auswertbar. In allen auswertbaren 9 Cores fand sich eine unspezifische Färbung von stromalen Zellen, Entzündungszellen und Endothel (Abbildungen 107 – 111). Die Carcinome zeigten in 5 Cores eine Färbereaktion, wobei sowohl HPV-PCR-positive als auch HPV-PCR-negative Carcinome gefärbt wurden (Abbildungen 107, 108, 110 + 111).

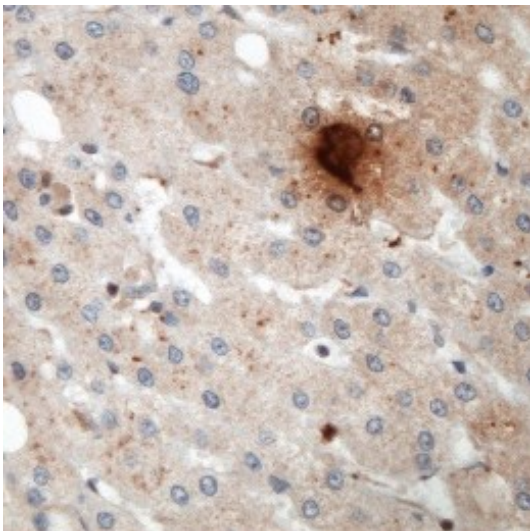


Abbildung 106: Markercore Leber, unspezifische zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.

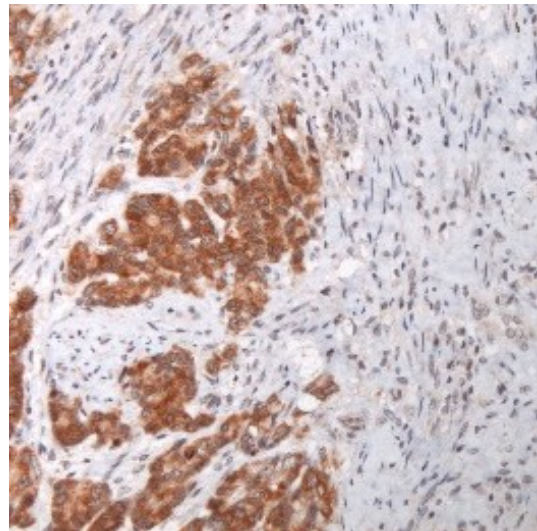


Abbildung 107: TMA K01, Core 03-04, Adenocarcinom, PCR negativ für HPV, Epithel stark positiv, Stroma schwach positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 20-fache Vergrößerung.

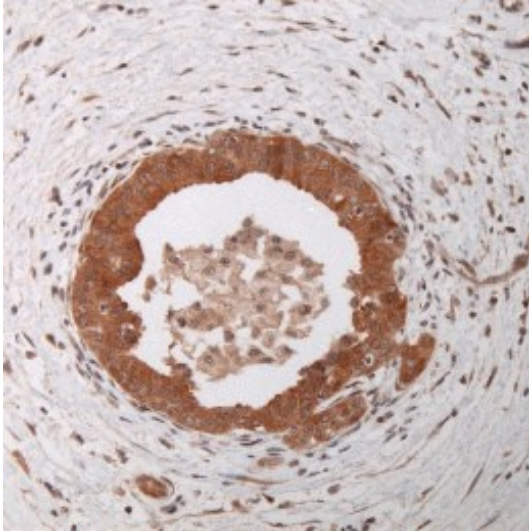


Abbildung 108: TMA K01, Core 03-01, Adenocarcinom, HPV 18, Tumor zytoplasmatisch positiv, unspezifische Färbung des Stromas. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 20-fache Vergrößerung.

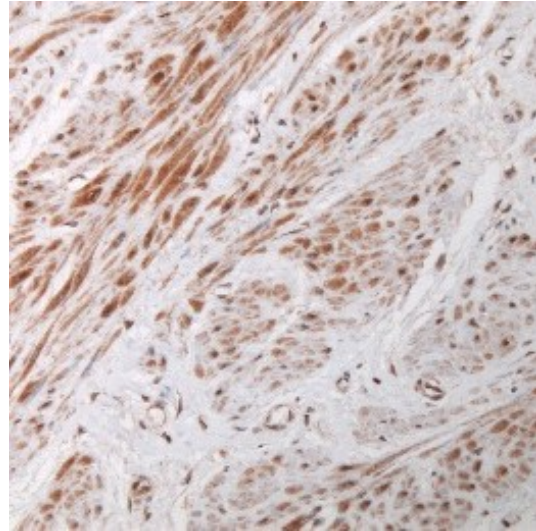


Abbildung 109: TMA K01, Core 03-01, Adenocarcinom, HPV 18, unspezifische Färbung des Stromas. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 20-fache Vergrößerung.

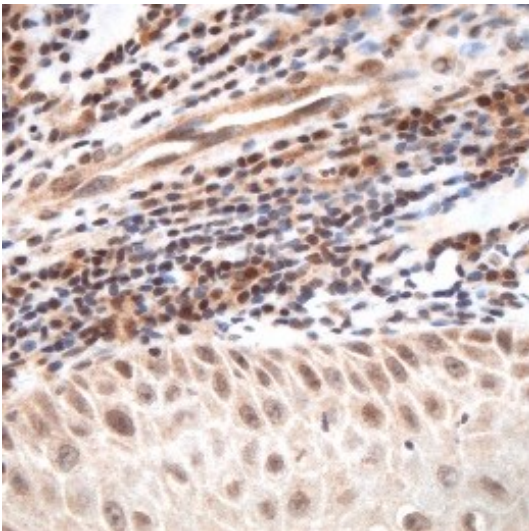


Abbildung 110: TMA K01, Core 02-03, PLECA, PCR negativ, Epithel, Endothel und Entzündungszellen unspezifisch positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.

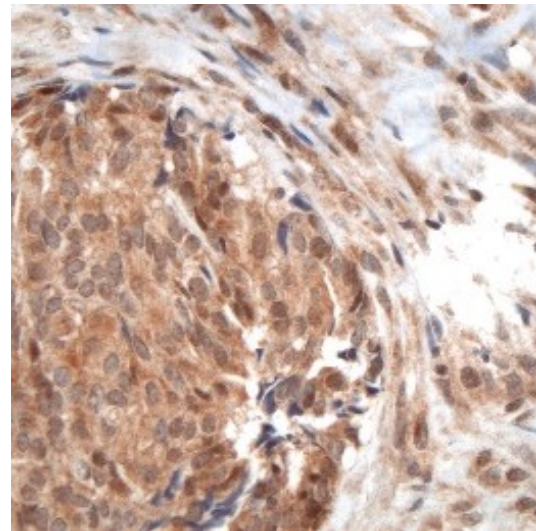


Abbildung 111: TMA K01, Core 02-01, PLECA, HPV 16, unspezifische Tumorepithel- und Stromafärbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:25], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.4.2.2 CC1 mit 1:100 Verdünnung

Bei der Vorbehandlung mit CC1 bei einer Verdünnung des Antikörperklons von 1:100 konnten 8 Cores des Kontroll-TMAs ausgewertet werden. 5 Cores des TMA K01 waren aufgrund von fehlendem Tumorgewebe nicht auswertbar. In allen auswertbaren Cores (8 Cores) fand sich eine schwache unspezifische zytoplasmatische Färbung von Epithel, Endothel, stromalen Zellen und glatter Muskulatur (Abbildungen 117 – 121). In 4 Cores wurden Carcinomzellen gefärbt, während in ebenfalls 4 Cores die Carcinome keine Färbereaktion zeigten (Abbildungen 119 + 121). Ein HPV 18 positives Carcinom (Core 01-02) zeigte eine starke zytoplasmatische Expression von E7 (Abbildung 116). Ein HPV 16 positives Carcinom (Core 02-01) zeigte weitgehend nur randständig eine relativ starke nukleäre Expression von E7 (Abbildung 115). Dieser nur randständige E7-Nachweis könnte auf eine schlechte Fixierung und/oder auf einen anderweitigen Verlust der Antigenität der Carcinomzellen hinweisen. Ein HPV 56 positives Carcinom (Core 02-04) zeigte eine nur sehr schwache partielle zytoplasmatische Färbereaktion, welche auch in angrenzenden Entzündungszellen im Stroma nachweisbar war (Abbildung 114 + 121). Ferner wurden Carcinomzellen stark zytoplasmatisch angefärbt (Core 3-4), obwohl mittels PCR in diesem Carcinom kein HPV nachgewiesen werden konnte (Abbildung 113). Der Antikörperklon 8E2 wurde bislang laut der Herstellerangaben nur für HPV 18 E7-Protein validiert. Eine Reaktion des Antikörpers mit HPV 56 E7 ist somit durchaus denkbar. Die Anfärbung von HPV-negativen Carcinomzellen lässt zunächst an einer Spezifität des Antikörpers für HPV-E7 zweifeln; jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den Carcinomzellen ein bislang von der PCR nicht erfasster HPV-Typ vorliegt oder die PCR fälschlicherweise negativ wurde.

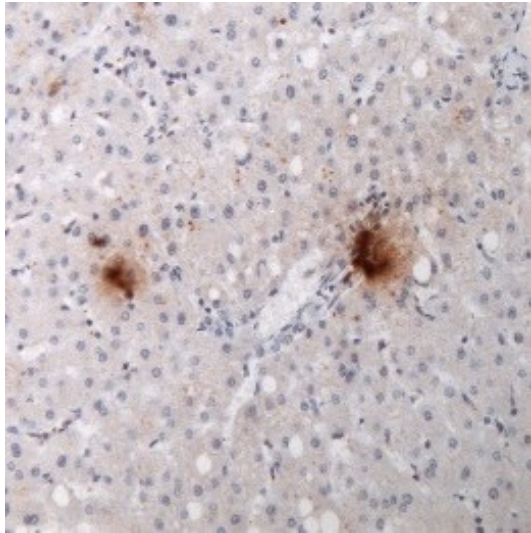


Abbildung 112: Markercore Leber, fokale unspezifische zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

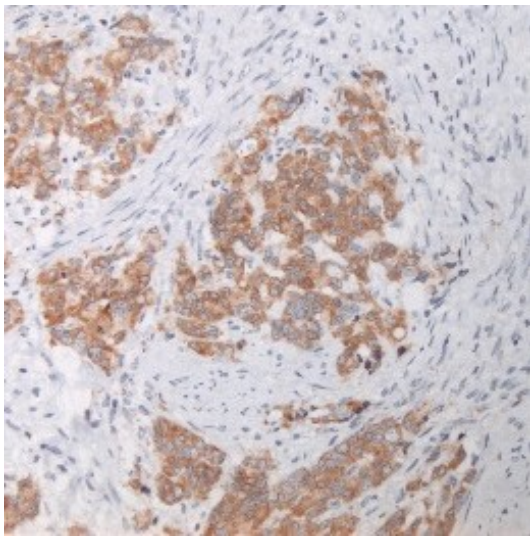


Abbildung 113: TMA K01, Core 03-04, Adenocarcinom, PCR negativ, Tumorzellen positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

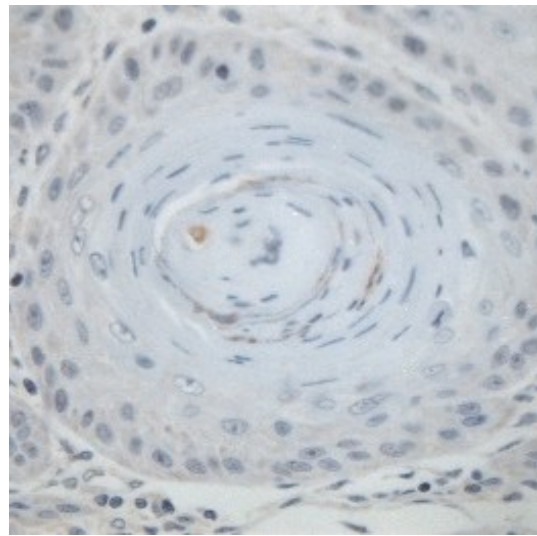


Abbildung 114: TMA K01, Core 02-04, PLECA, HPV 56, Verhornung schwach positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

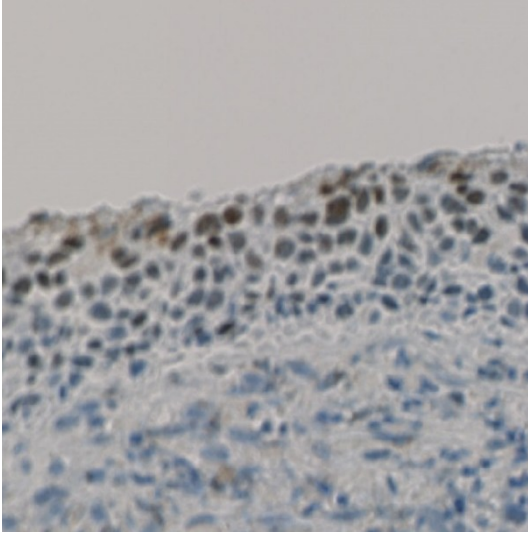


Abbildung 115: TMA K01, Core 02-01, PLECA, HPV 16, randständige relativ starke nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

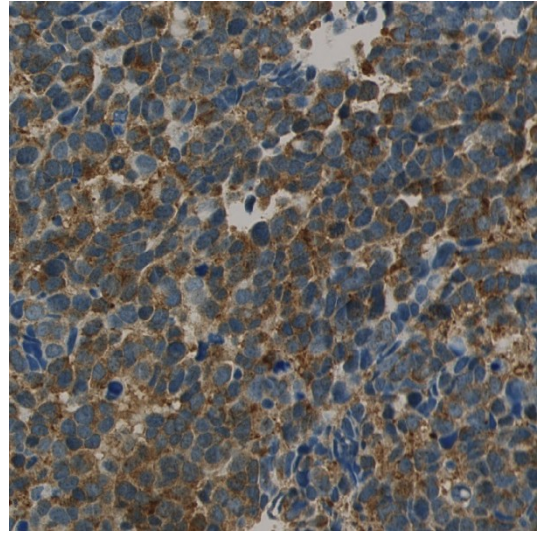


Abbildung 116: TMA K01, Core 01-02, PLECA, HPV 18, starke Färbereaktion. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

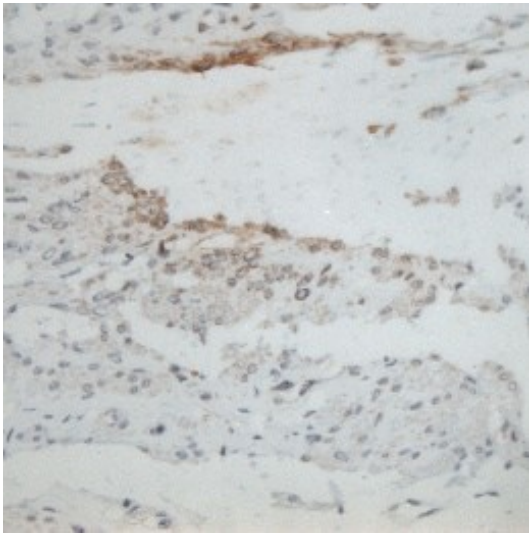


Abbildung 117: TMA K01, Core 03-02, Adenocarcinom, HPV 18, unspezifische Färbung des Stromas. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

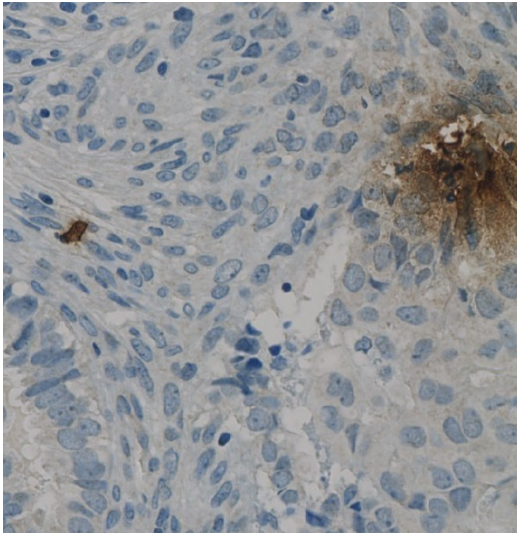


Abbildung 118: TMA K01, Core 03-03, PLECA, PCR negativ, unspezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

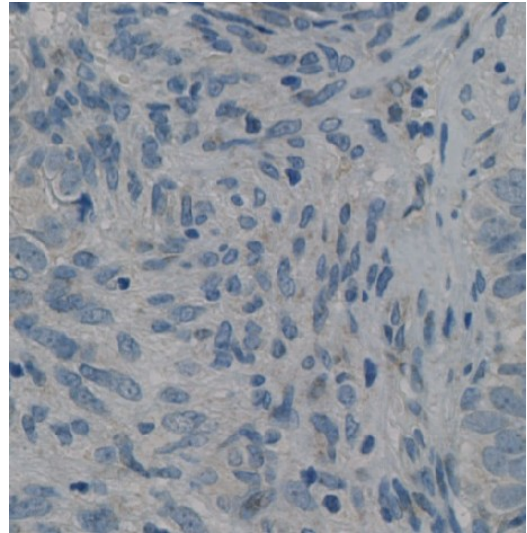


Abbildung 119: TMA K01, Core 02-02, Adenocarcinom, PCR negativ, wohl unspezifische Färbung im Stroma. BF7-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

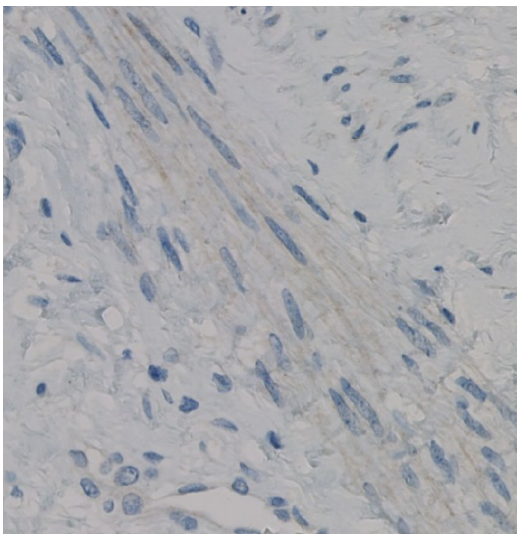


Abbildung 120: TMA K01, Core 03-04, glatte Muskulatur zytoplasmatisch schwach gefärbt. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

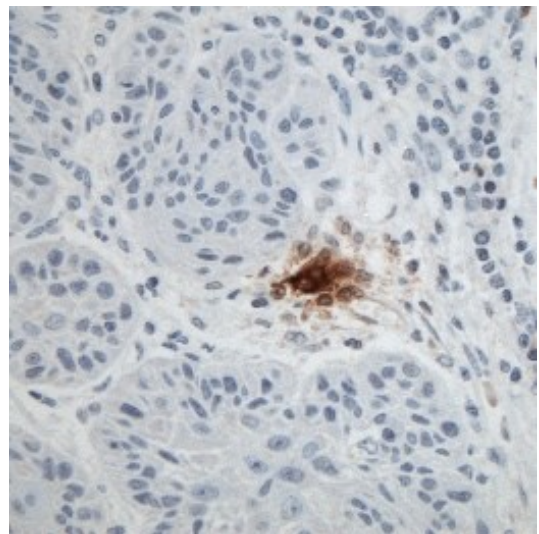


Abbildung 121: TMA K01, Core 02-04, PLECA, HPV 56, Tumor negativ, unspezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.4.2.3 CC1 mit 1:200 Verdünnung

Bei der Vorbehandlung mit CC1 bei einer Verdünnung des Antikörperklons von 1:200 konnten 9 Cores des Kontroll-TMAs ausgewertet werden. 4 Cores des TMA K01 waren aufgrund von fehlendem Tumorgewebe nicht auswertbar. In 3 der auswertbaren Cores wurde eine zytoplasmatische Färbung der Carcinome dokumentiert (Abbildungen 123 – 125). Ein HPV 18 positives Carcinom (Core 01-02) zeigte eine mäßiggradige zytoplasmatische Expression von E7 (Abbildung 123). Ein HPV 18 positives Carcinom (Core 03-01) zeigte eine schwache zytoplasmatische Färbereaktion (Abbildung 124). Ferner wurden Carcinomzellen stark zytoplasmatisch angefärbt (Core 3-4), obwohl mittels PCR in diesem Carcinom kein HPV nachgewiesen werden konnte (Abbildung 125). Der Antikörperklon 8E2 wurde bislang laut der Herstellerangaben nur für das HPV 18 E7-Protein validiert. Die Anfärbung von HPV-negativen Carcinomzellen lässt zunächst an einer Spezifität des Antikörpers für HPV-E7 zweifeln; jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den Carcinomzellen ein bislang von der PCR nicht erfasster HPV-Typ vorliegt oder die PCR fälschlicherweise negativ war. Eine Färbung in stromalen Zellen und glatter Muskulatur konnte in dieser Verdünnung nicht mehr nachgewiesen werden.

Ein HPV 16 positives Carcinom (Core 02-01), welches in der Verdünnung 1:100 eine weitgehend nur randständig relativ starke nukleäre Expression von E7 zeigte, wies in der Verdünnung 1:200 keine Expression von E7 auf (Abbildung 126). Ferner zeigte ein HPV 56 positives Carcinom (Core 02-04), welches in der Verdünnung 1:100 eine schwache zytoplasmatische Expression aufzeigte, in der Verdünnung 1:200 ebenfalls keine Färbereaktion (Abbildung 127).

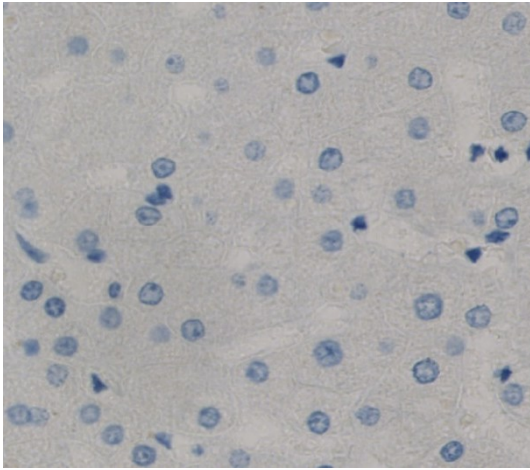


Abbildung 122: Markercore Leber, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

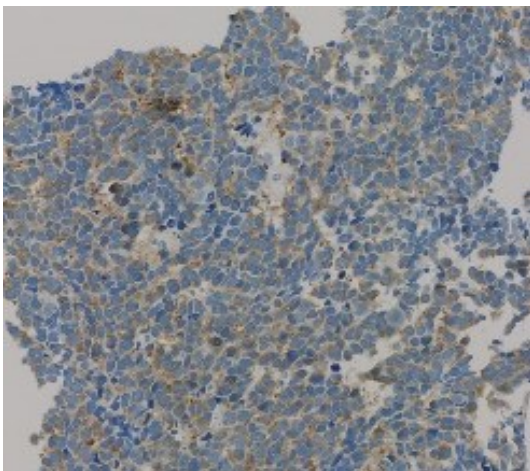


Abbildung 123: TMA K01, Core 01-02, PLECA, HPV 18, starke zytoplasmatische Positivität der Tumorzellen. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

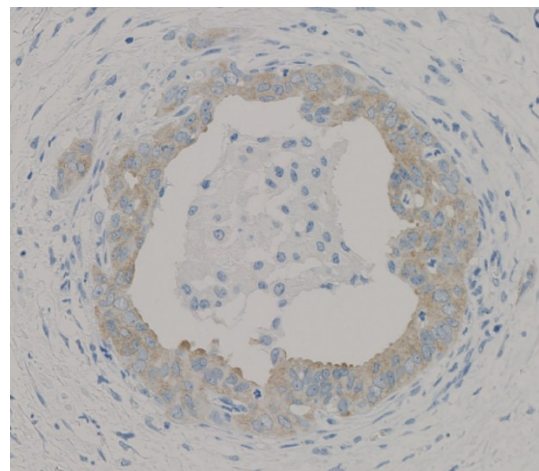


Abbildung 124: TMA K01, Core 03-01, Adenocarcinom, HPV 18, leichte zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 20-fache Vergrößerung.

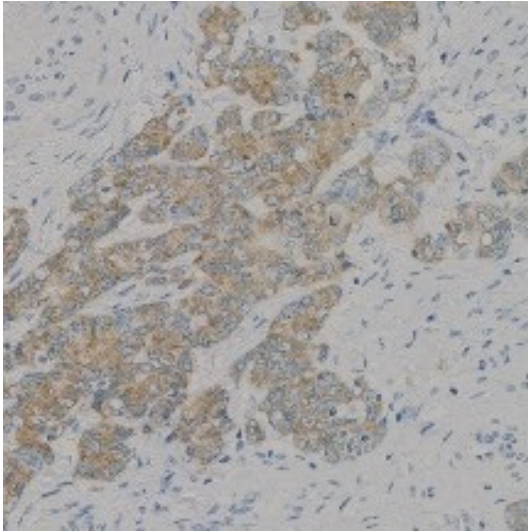


Abbildung 125: TMA K01, Core 03-04, Adenocarcinom, PCR negativ, wohl unspezifische Färbung des Carcinoms. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

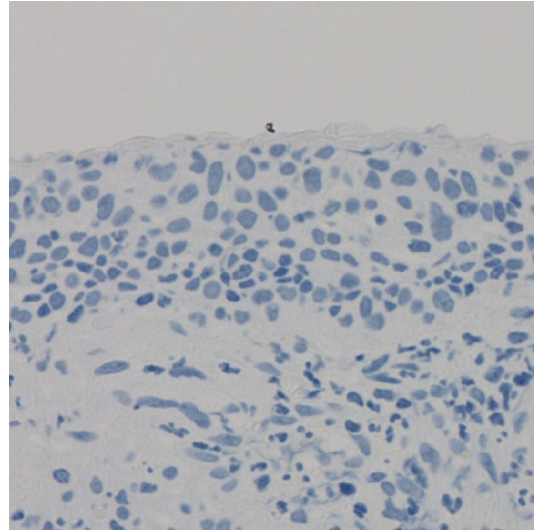


Abbildung 126: TMA K01, Core 02-01, PLECA, HPV 16, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

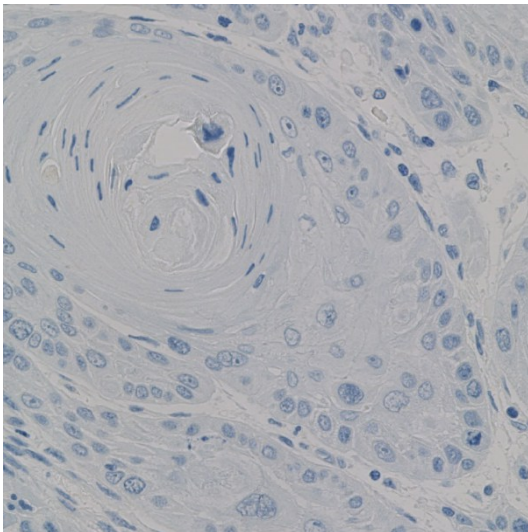


Abbildung 127: TMA K01, Core 02-04, PLECA, HPV 56, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:200], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.4.2.4 CC1 mit 1:500 Verdünnung

Bei der Vorbehandlung mit CC1 in der Verdünnung 1:500 konnten 9 Cores des Kontroll-TMAs ausgewertet werden. 4 Cores des TMA K01 waren aufgrund von fehlendem Tumorgewebe nicht auswertbar.

Ein HPV 18 positives Carcinom (Core 01-02) zeigte eine starke zytoplasmatische Expression von E7 (Abbildung 129). Ein HPV 16 positives Carcinom (Core 02-01) zeigte randständig eine schwache nukleäre Expression von E7 (Abbildung 130). Dieses Carcinom wies in der Verdünnung 1:100 ebenfalls eine weitgehend nur randständig relativ starke nukleäre Expression von E7 auf, zeigte jedoch in der Verdünnung 1:200 keine Expression von E7. Es ist unklar, warum mit der Verdünnung von 1:200 keine Färbereaktion erzielt werden konnte. Der nur randständige E7-Nachweis in den Verdünnungen 1:100 und 1:500 könnte auf eine schlechte Fixierung und/oder auf einen anderweitigen Verlust der Antigenität der Carcinomzellen hinweisen. Ein HPV 18 positives Carcinom (Core 03-01) zeigte eine zytoplasmatische Färbereaktion (Abbildung 131). Ferner wurden Carcinomzellen stark zytoplasmatisch angefärbt (Core 3-4), obwohl mittels PCR in diesem Carcinom kein HPV nachgewiesen werden konnte (Abbildung 132). Der Antikörperklon 8E2 wurde bislang laut der Herstellerangaben nur für HPV 18 E7-Protein validiert. Die Anfärbung von HPV-negativen Carcinomzellen lässt zunächst an einer Spezifität des Antikörpers für HPV-E7 zweifeln; jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den Carcinomzellen ein bislang von der PCR nicht erfasster HPV-Typ vorliegt oder die PCR fälschlicherweise negativ wurde.

Ferner zeigte ein HPV 56 positives Carcinom (Core 02-04), welches in der Verdünnung 1:100 eine schwache zytoplasmatische Expression aufzeigte, weder in der Verdünnung 1:200 noch in der Verdünnung 1:500 eine Färbereaktion (Abbildung 133).

Eine Färbung in stromalen Zellen und glatter Muskulatur konnte in dieser Verdünnung nicht mehr nachgewiesen werden.

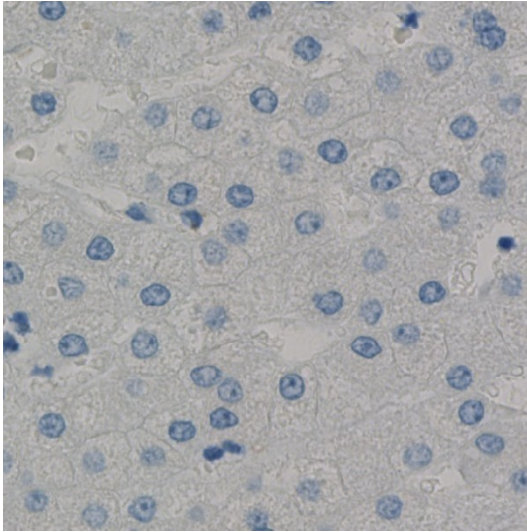


Abbildung 128: Markercore Leber, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.

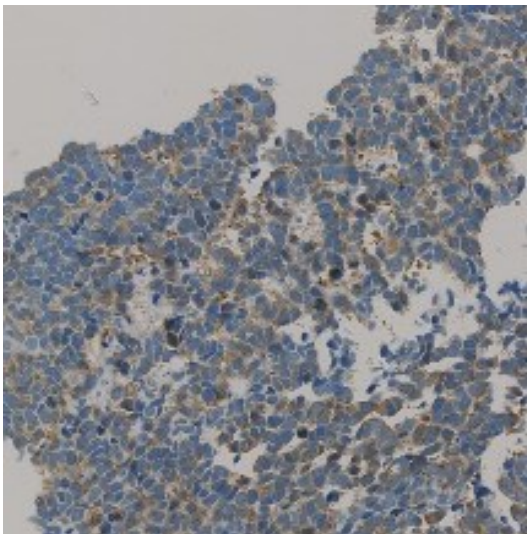


Abbildung 129: TMA K01, Core, 01-02, PLECA, HPV 18, starke zytoplasmatische Positivität. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.

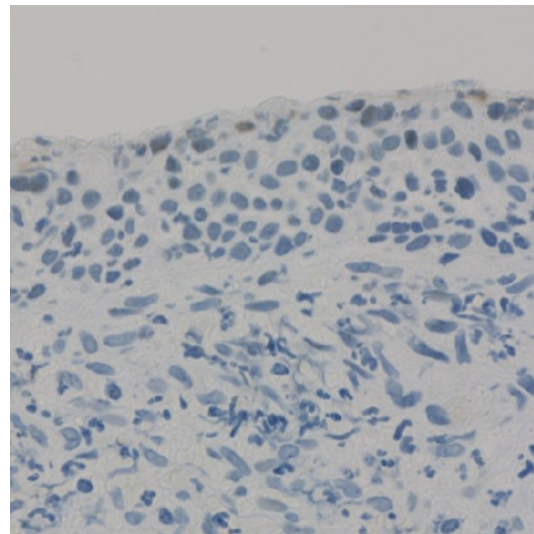


Abbildung 130: TMA K01, Core 02-01, PLECA, HPV 16, randständige schwache nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.

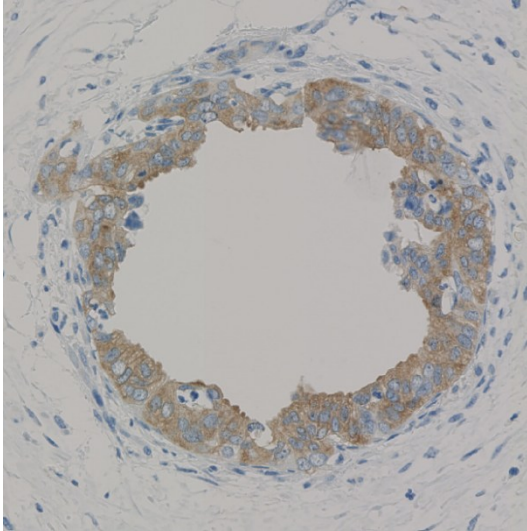


Abbildung 131: TMA K01, Core 03-01, Adenocarcinom, HPV 18, zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 20-fache Vergrößerung.

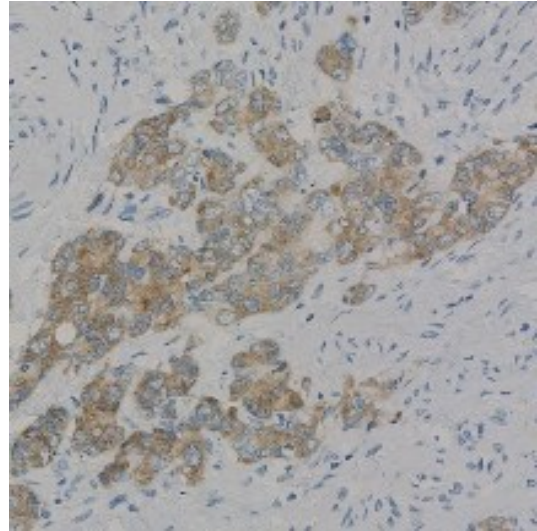


Abbildung 132: TMA K01, Core 03-04, Adenocarcinom, PCR negativ, wohl unspezifische Färbung des Carcinoms. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.

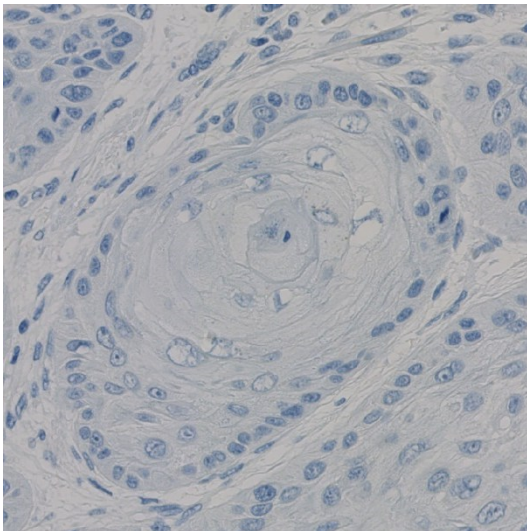


Abbildung 133: TMA K01, Core 02-04, PLECA, HPV 56, keine Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:500], DAB, 40-fache Vergrößerung.

Für die weiteren immunhistochemischen Färbungen wurde die Vorbehandlung mit CC1 bei einer Verdünnung des AK 8E2 von 1:100 gewählt. Die Verdünnung wurde trotz der Möglichkeit von unspezifischen stromalen Färbungen auf 1:100 festgelegt, um keinen Dysplasie- oder Carcinomfall zu verlieren, bei dem nur eine sehr schwache Expression von E7 und/oder fixationsbedingt eine Herabsetzung der Antigenität vorliegt.

Die Studien-TMAs wurden mit dem Antikörperklon 8E2 gefärbt, um den Antikörper an 216 weiteren Gewebeproben zu testen.

3.4.3 Studien-TMAs

3.4.3.1 Färbung am Epithel

Von den 216 Cores (100%) der 6 Studien-TMAs konnten bei Färbung mit dem Antikörperklon 8E2 (Verdünnung 1:100) 181 Cores (83,8 %) hinsichtlich einer epithelialen Färbung ausgewertet werden. Eine schwache Färbung des Epithels wurde in 80 Cores (44,2 %) nachgewiesen. Eine mäßige Färbung wurde in 41 Cores (22,7 %) und eine starke Färbung in 24 Cores (13,3 %) beobachtet (Abbildungen 134 – 143). In 36 Cores (19,9 %) zeigte sich keine Färbung.

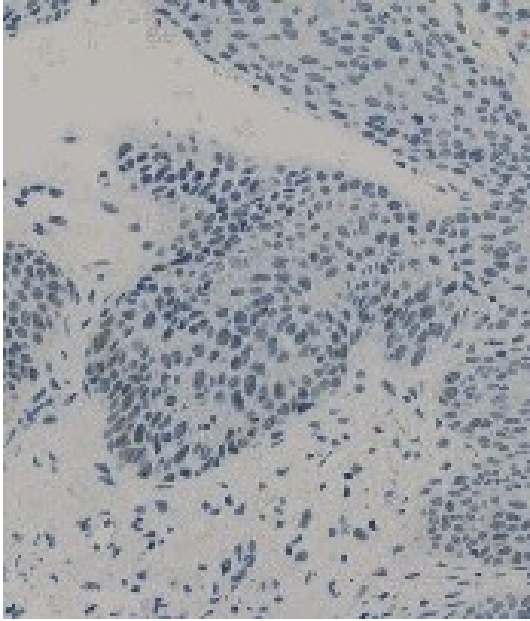


Abbildung 134: CIN III, Mischinfektion HPV 6, 11, 16, 35, 42, schwache nukleäre basalständige Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

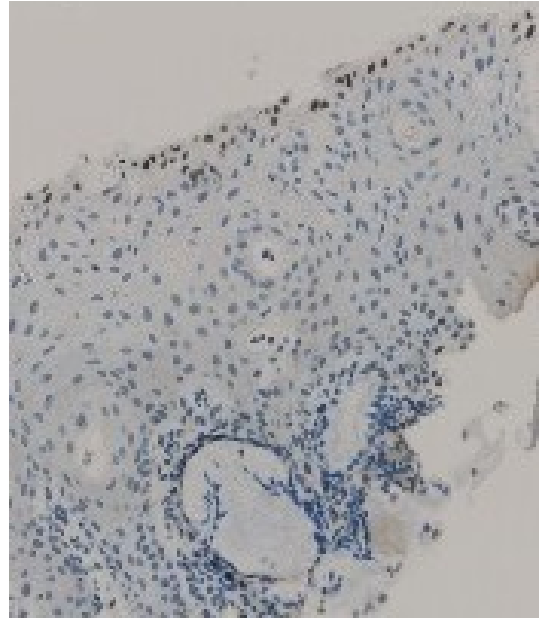


Abbildung 135: keine Dysplasie, HPV 73, mäßige, nukleäre Färbung der basalen und superficialen Epithelschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.

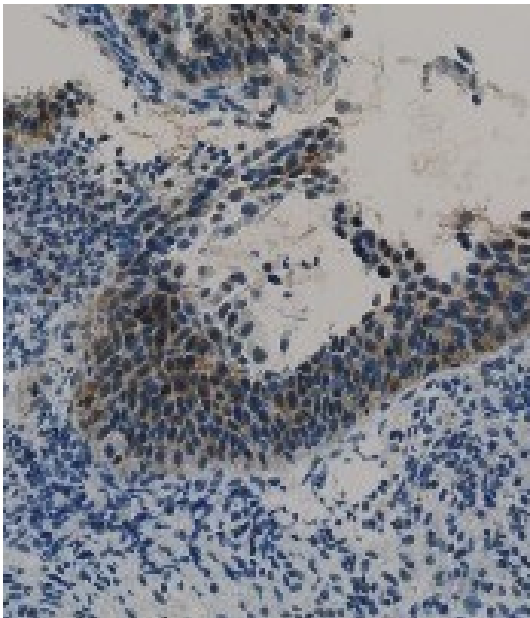


Abbildung 136: CIN III, HPV 18, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung durch alle Epithelschichten. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

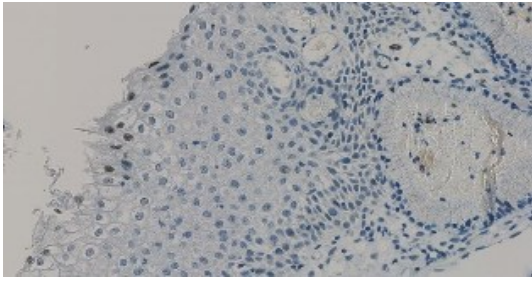


Abbildung 137: keine Dysplasie, HPV 66, fraglich spezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

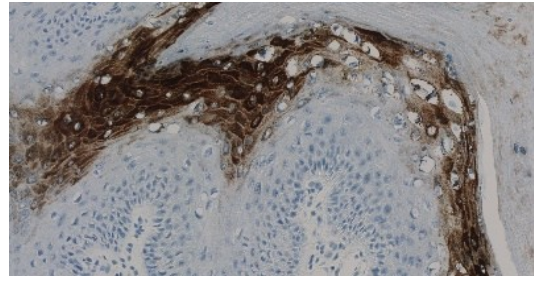


Abbildung 138: Verruca vulgaris, HPV 2a, fraglich spezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

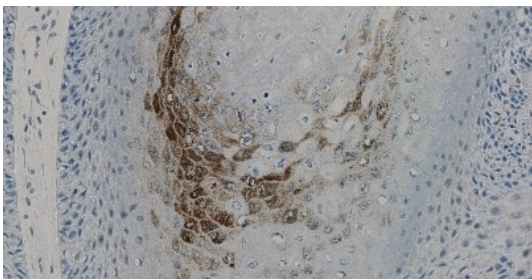


Abbildung 139: CIN I, HPV 6, Koilozyten stark positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

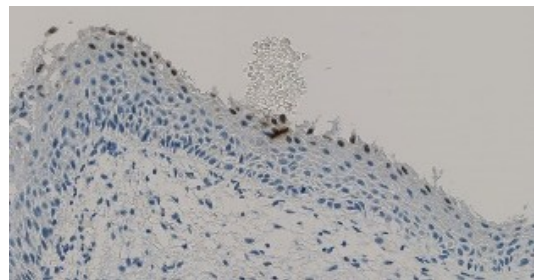


Abbildung 140: Unklare Diagnose, vermutlich CIN II, HPV 42, fraglich spezifische nukleäre superfizielle Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

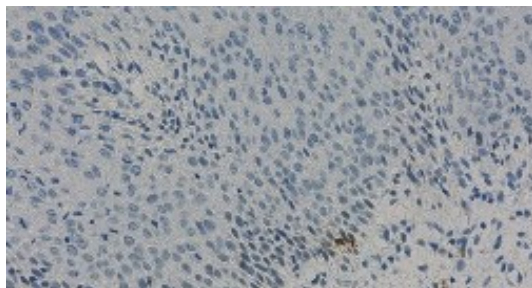


Abbildung 141: CIN III, PCR negativ, sehr schwache basalständige nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

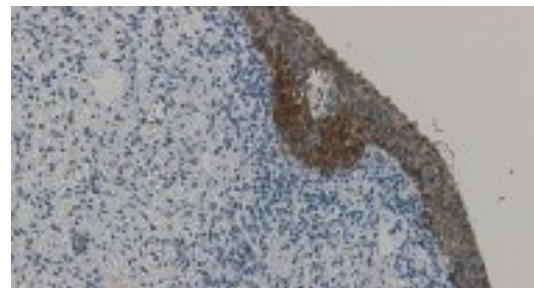


Abbildung 142: CIN III, HPV 18, Färbung der Dysplasie, Stroma ebenfalls positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

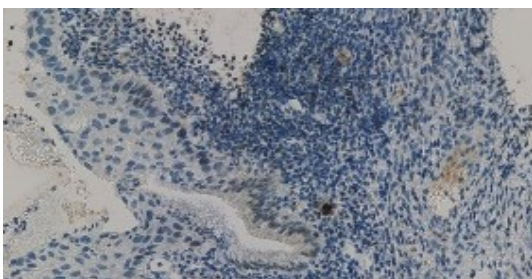


Abbildung 143: CIN III, Mischinfektion HPV 6, 11, 16, fraglich spezifische nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.

In 37 Cores (20,4 %) fand sich eine Färbung im Epithel bei fehlender unspezifischer Färbung im Stroma (Abbildungen 144 – 147). Allerdings wurde sowohl HPV-PCR negatives Epithel als auch nicht dysplastisches Epithel gefärbt. Ob diese Anfärbung im Epithel tatsächlich als spezifisch gewertet werden kann, muss aufgrund der unspezifischen Färbung von Stroma (Endothel, Zylinderepithel, Fibrozyten) und Entzündungszellen (Makrophagen, Plasmazellen) in insgesamt 109 Cores (60,2 %) und aufgrund der Epithelanfärbung in HPV-PCR negativen Proben angezweifelt werden.

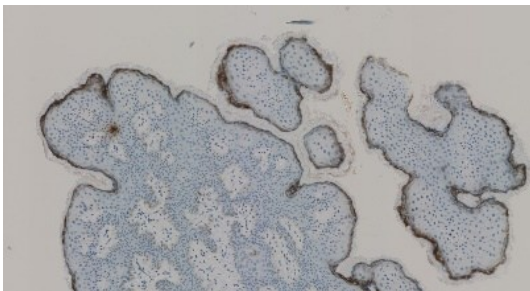


Abbildung 144: Condyloma acuminatum, HPV 2, starke superfielle und schwache basale zytoplasmatische Färbung, fraglich spezifisch. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

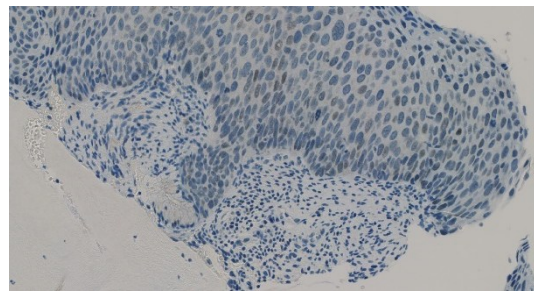


Abbildung 145: CIN III, HPV 56, nukleäre Färbung über alle Epithelschichten, Stroma negativ, fraglich spezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

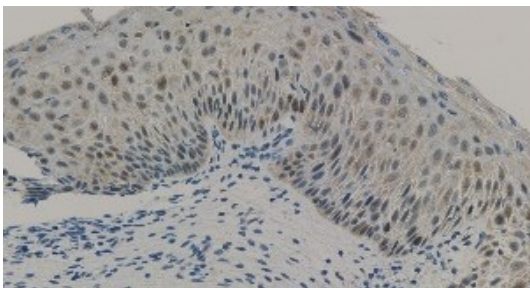


Abbildung 146: CIN III, HPV 18, nukleäre und zytoplasmatische Färbung über alle Epithelschichten mit schwacher Intensität, Stroma negativ, fraglich spezifisch. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

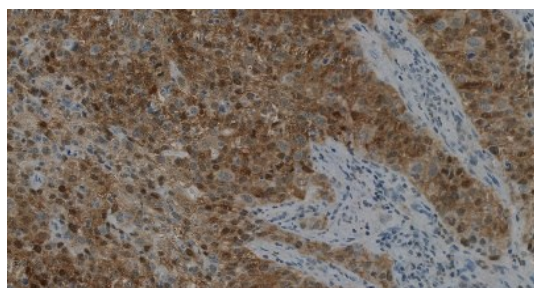


Abbildung 147: PLECA, HPV 18, spezifisch erscheinende Färbung im Tumor, Stroma negativ. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.4.3.2 Färbung am Stroma

Eine Auswertung war bei 181 Cores bei der Färbung mit dem Antikörper 8E2 möglich. In 109 Cores (60,2 %) wurde eine unspezifische Färbung im Stroma (Endothel, Zylinderepithel, Fibrozyten) und in Entzündungszellen (Makrophagen, Plasmazellen) nachgewiesen (Abbildungen 148 – 152). Dabei war die unspezifische Färbung in 87 Cores (48,1 %) schwach, in 16 Cores (8,8 %) mäßig und in 6 Cores (3,3 %) stark ausgeprägt. In 72 Cores (38,8 %) zeigte sich keine Färbung im Stroma.

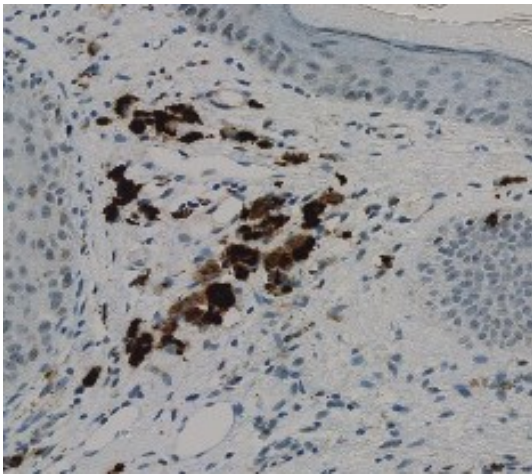


Abbildung 148: VIN II, HPV 6, Makrophagen stark positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

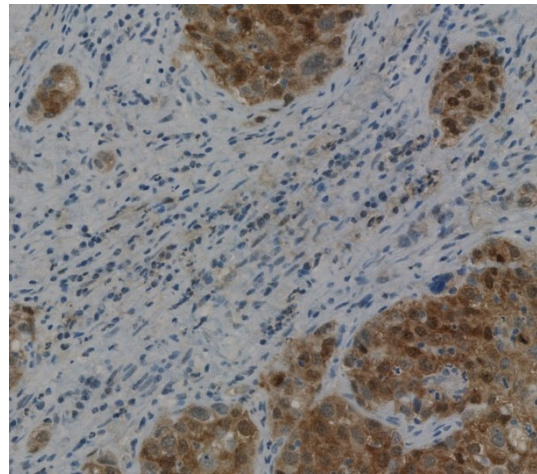


Abbildung 149: PLECA, HPV 18, PLECA stark zytoplasmatisch und nukleär positiv, Stroma zytoplasmatisch positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

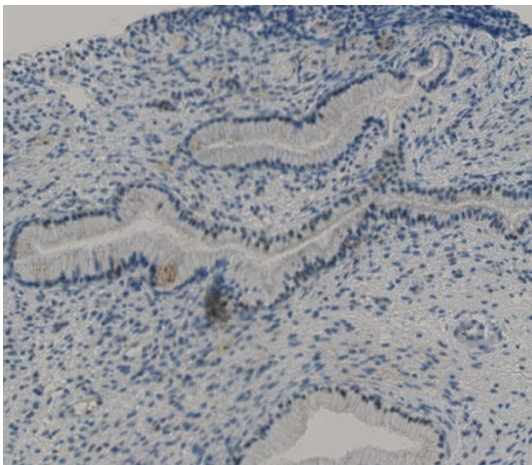


Abbildung 150: CIN III, HPV 18, Stroma und Zylinderepithel positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

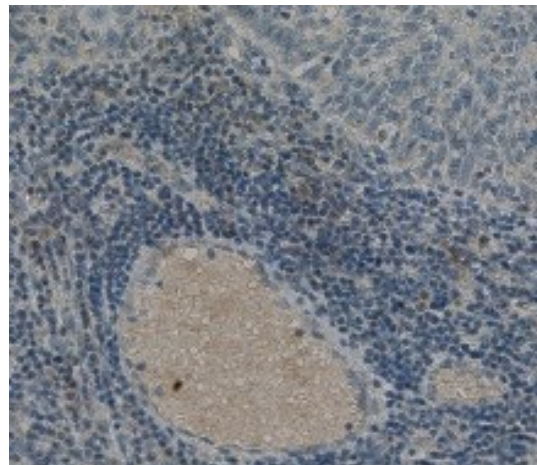


Abbildung 151: PLECA, HPV 16, Blut und Endothel positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

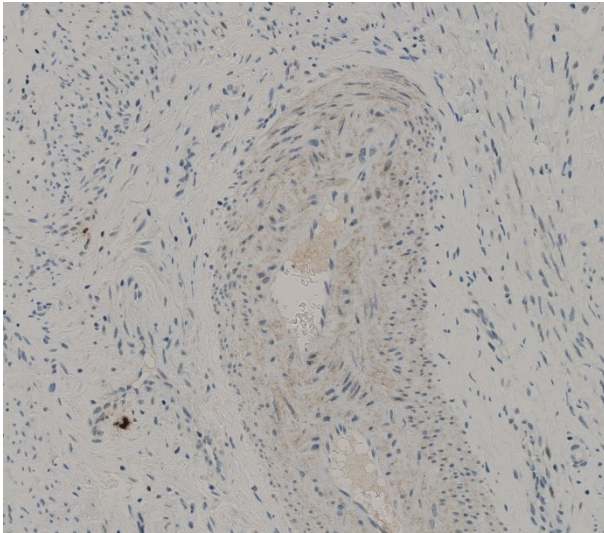


Abbildung 152: keine Dysplasie, HPV 56, glatte Muskulatur der Gefäßwand positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

3.4.3.3 Färbeergebnisse mit HR- und LR-HPV-Typen

181 (83,8 %) der 216 (100 %) mit dem AK 8E2 gefärbten Cores konnten ausgewertet werden. In 102 Cores (56,4 %) lag eine Infektion mit einem HR-HPV-Typ und in 49 Cores (27,1 %) mit einem LR-HPV-Typ vor. In 12 Cores (6,6 %) wurde eine Mischinfektion mit verschiedenen HPV-Typen nachgewiesen. In 9 Cores (5,0 %) war das Epithel HPV-PCR negativ, in 5 Cores (2,8 %) war keine eindeutige Identifizierung des HPV-Typs möglich und in 4 Cores (2,2 %) lagen intermediäre HPV-Typen vor.

Die Expression von 8E2 in Korrelation zu den HPV-Typen wird in Tabelle 28 verdeutlicht.

HPV-Typen	stark	mäßig	schwach	negativ
HR	17,6% (18)	18,6% (19)	40,2% (41)	23,5% (24)
LR	10,2% (5)	34,7% (17)	42,9% (21)	12,2% (6)
Mischinfektion	8,3% (1)	16,7% (2)	50% (6)	25% (3)
PCR negativ	0% (0)	11,1% (1)	66,7% (6)	22,2% (2)
Intermediär	0% (0)	50% (2)	50% (2)	0% (0)
Unklare Fälle	0% (0)	0% (0)	80% (4)	20% (1)

Tabelle 28: HPV-Typen in Korrelation zur 8E2-Expression

Es ist hervorzuheben, dass zwar die meisten stark gefärbten Cores mit einem HR-HPV-Typen infiziert waren, jedoch der größte Teil aller HR-HPV-Gewebeproben nur schwach gefärbt wurde. Darüber hinaus war kein Unterschied der Färberegebnisse zwischen HR-HPV-Typen und LR-HPV-Typen zu erkennen. Ferner wurden sowohl HPV-PCR positives als auch negatives Gewebe gefärbt.

Die Abbildungen 153 – 164 veranschaulichen exemplarisch die verschiedenen Färberegebnisse, die bei den unterschiedlichen HPV-Typen beobachtet wurden.

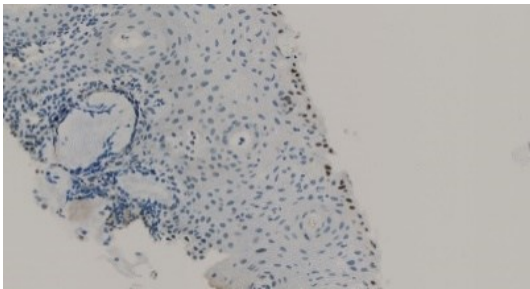


Abbildung 153: keine Dysplasie, HPV 73, schwache nukleäre Färbung der basalen und starke nukleäre Färbung der superfiziellen Zellschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

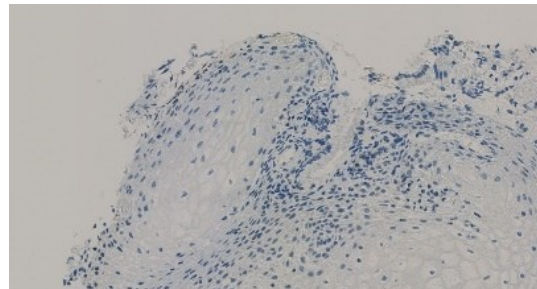


Abbildung 154: CIN I, PCR negativ, schwache nukleäre basalständige und superfizielle Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

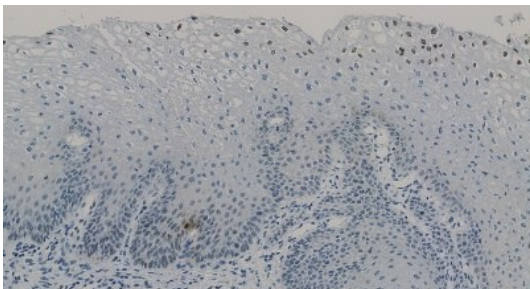


Abbildung 155: CIN I, HPV 91, partiell starke nukleäre Färbung der basalen und superfiziellen Schicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.

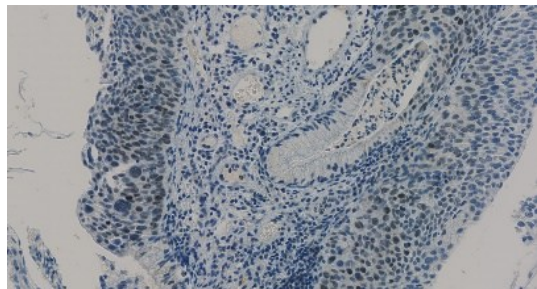


Abbildung 156: CIN III, Mischinfektion 6, 11, 16, nukleäre Färbung durch alle Epithelschichten. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

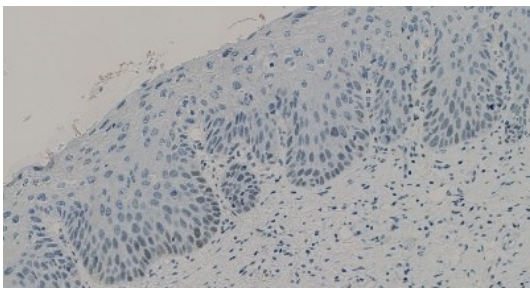


Abbildung 157: CIN III, Mischinfektion HPV 6, 11, 16, 35, 44, nukleäre Färbung der basalen Epithelschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

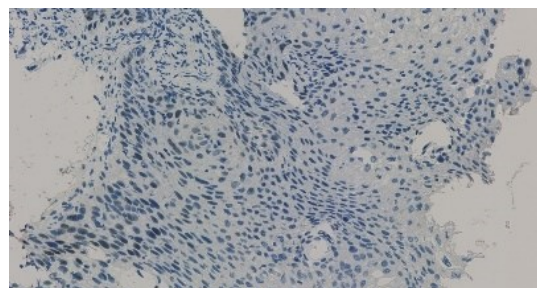


Abbildung 158: CIN III, PCR negativ, schwache nukleäre Färbung der basalen Epithelschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

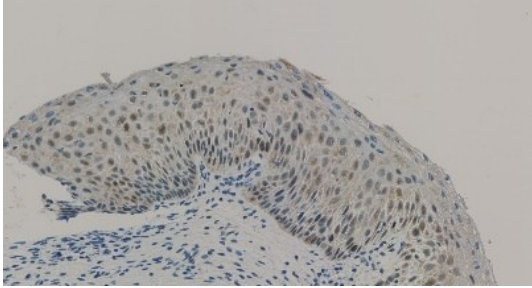


Abbildung 159: CIN III, HPV 18, nukleäre und zytoplasmatische Färbung über alle Epithelschichten mit schwacher Intensität, fraglich spezifisch. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

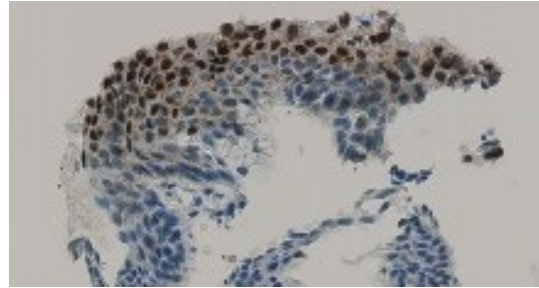


Abbildung 160: CIN III, HPV 31, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung durch alle Epithelschichten. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

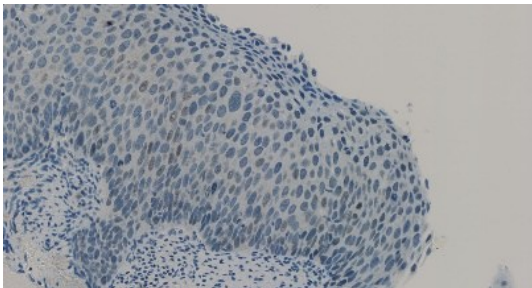


Abbildung 161: CIN III, HPV 56, schwache nukleäre Färbung durch alle Epithelschichten. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

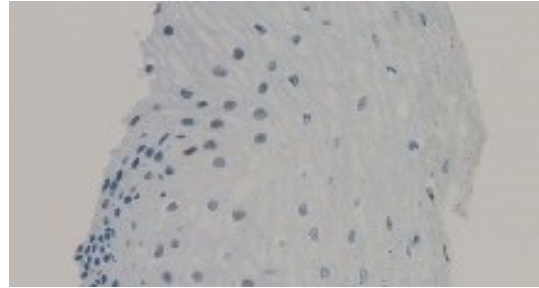


Abbildung 162: CIN III, HPV 16, schwache nukleäre Färbung in der basalen Epithelschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

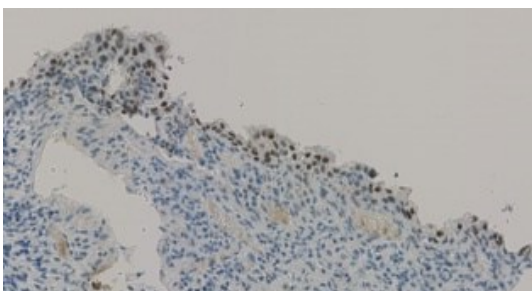


Abbildung 163: Unklare Diagnose, HPV 6, starke nukleäre Färbung in der superfiziellen Epithelschicht. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.

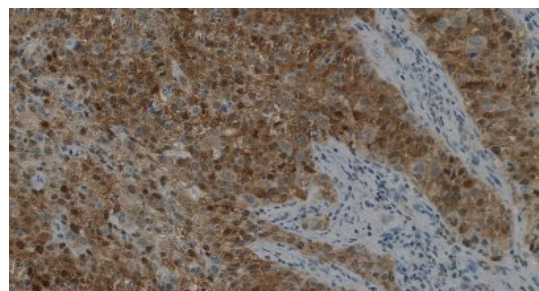


Abbildung 164: PLECA, HPV 18, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung, fraglich spezifische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

Der Antikörperklon 8E2 soll gemäß der Herstellerangaben spezifisch das HPV 18-E7-Protein nachweisen. In 15 Cores (8,3 %) wurde eine HPV-PCR-Analyse mit positivem Nachweis von HPV 18 durchgeführt. Dabei zeigte sich in 7 Cores eine starke Färbung im Epithel und in 4 Cores eine mäßiggradige Anfärbung des Epithels. In 1 Core wurde das Epithel schwach gefärbt. Bei ebenfalls 1 Core wurde das Epithel nicht gefärbt. In 2 Cores war die Auswertung aufgrund von fehlendem Epithel nicht möglich. Die Färbeergebnisse werden in den folgenden Abbildungen 165 – 170 dargestellt.

Diese Anfärbung im Epithel lässt eine spezifische Anfärbung von HPV E7 vermuten; aufgrund der teilweise zwar schwachen unspezifischen Färbung im Stroma (Endothel, Zylinderepithel, Fibrozyten) und Entzündungszellen (Makrophagen, Plasmazellen) in 109 Cores (60,2 %) und aufgrund der Epithelanfärbung in HPV-PCR negativen Proben lässt sich keine endgültige Entscheidung über die Spezifität des Antikörpers treffen.

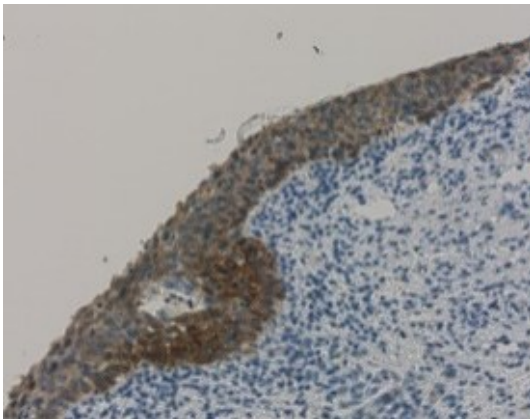


Abbildung 165: CIN III, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

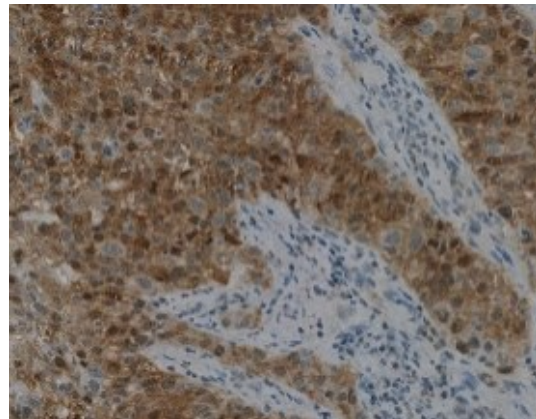


Abbildung 166: PLECA, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

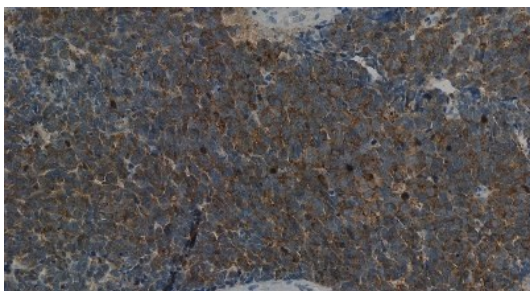


Abbildung 167: PLECA, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

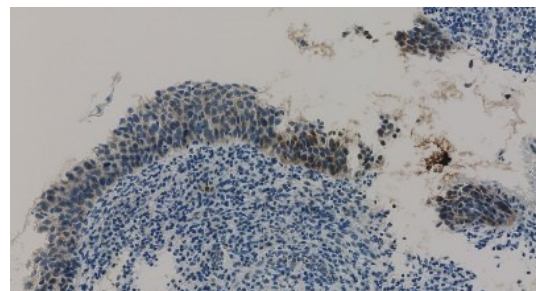


Abbildung 168: CIN III, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

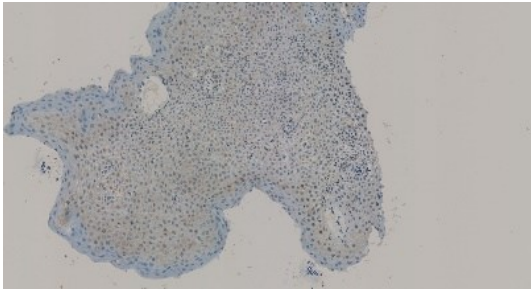


Abbildung 169: CIN III, HPV 18, mäßiges Färberegebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

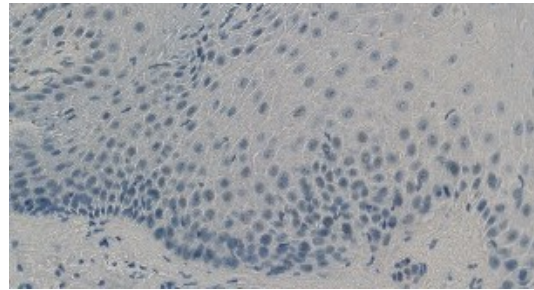


Abbildung 170: keine Dysplasie, HPV 18, schwaches basalständiges Färberegebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.4.3.4 Färberegebnisse mit HSIL und LSIL

181 (83,8 %) der 216 (100 %) mit dem AK 8E2 gefärbten Cores konnten ausgewertet werden. In 80 Cores (44,2 %) wurde anhand der HE-Färbung eine HSIL, in 42 Cores (23,2 %) keine Dysplasie und in 32 Cores (17,7 %) eine LSIL diagnostiziert. In 8 Cores (4,4 %) war eine Beurteilung aufgrund fehlenden Gewebes nicht durchführbar. Sonstige Diagnosen (z.B. Epithelhyperplasie) wurden mittels HE-Färbung bei 8 Cores (4,4 %) gestellt, in 6 Cores (3,3 %) wurde ein PLECA diagnostiziert und in 5 Cores (2,8 %) konnte keine eindeutige Dysplasiegraduierung erfolgen. Die Tabelle 29 zeigt die pathologischen Befunde in Korrelation zu der 8E2-Färbung.

Pathologischer Befund	stark	mäßig	schwach	negativ
HSIL	18,8% (15)	23,8% (19)	40% (32)	17,5% (14)
LSIL	6,3% (2)	18,8% (6)	53,1% (17)	21,9% (7)
Keine Dysplasie	4,8% (2)	21,4% (9)	50% (21)	23,8% (10)
PLECA	50% (3)	50% (3)	0% (0)	0% (0)
Sonstige	0% (0)	62,5% (5)	37,5% (3)	0% (0)
Unklare Fälle	40% (2)	0% (0)	40% (2)	20% (1)
Keine Auswertung	0% (0)	0% (0)	50% (4)	50% (4)

Tabelle 29: pathologische Befunde in Korrelation zu der 8E2-Expression

Die Färberegebnisse werden in den folgenden Abbildungen 171 – 173 dargestellt.

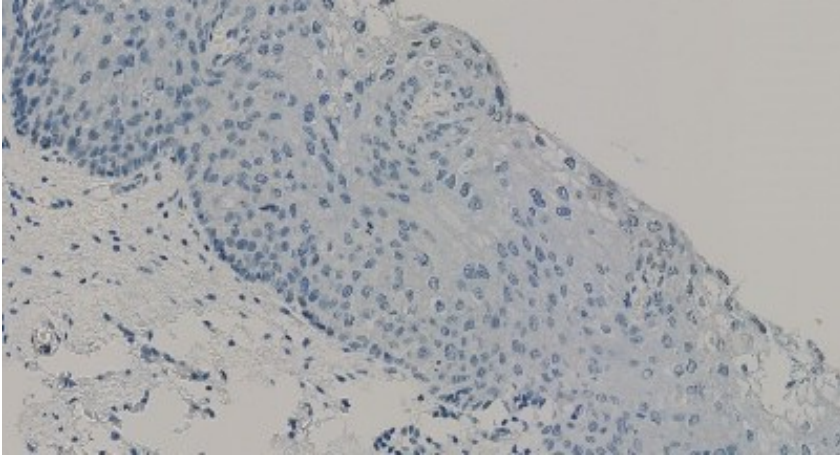


Abbildung 171: CIN III, HPV 56, schwache Färbung in den superfiziellen Epithelschichten. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB; 40-fache Vergrößerung.

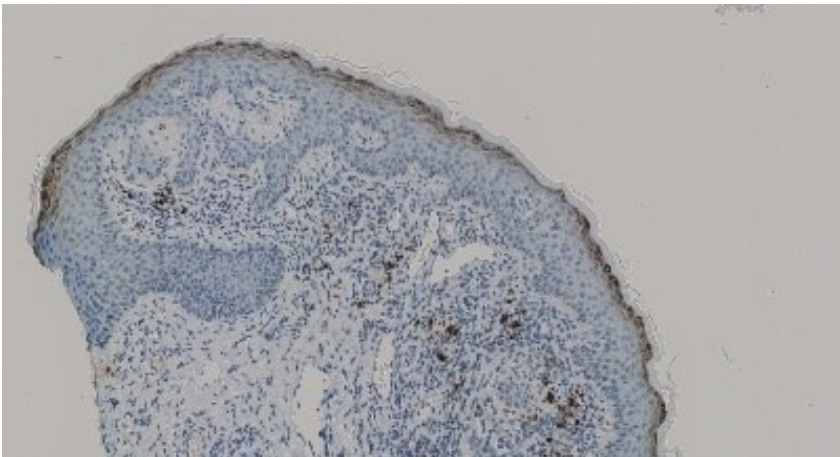


Abbildung 172: CIN I, HPV 6, mäßige Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.

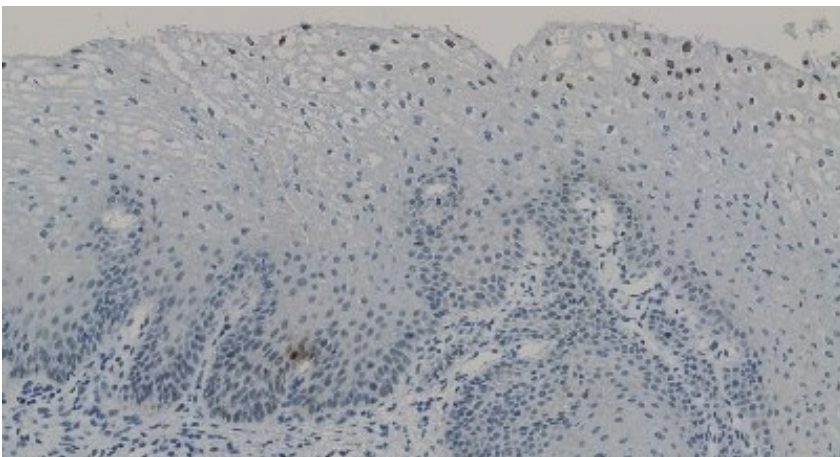


Abbildung 173: CIN I, HPV 91, starke nukleäre Färbung des oberen Epitheldrittels und schwache basale Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 30-fache Vergrößerung.

Es war auffällig, dass die Plattenepithelcarcinome mit einer HPV 18 Infektion eine starke Expression aufwiesen. Die übrigen Plattenepithelcarcinome zeigten zwar eine Färbung, diese war allerdings deutlich geringer ausgeprägt. Diese Beobachtung wird in den Abbildungen 174 – 176 veranschaulicht.

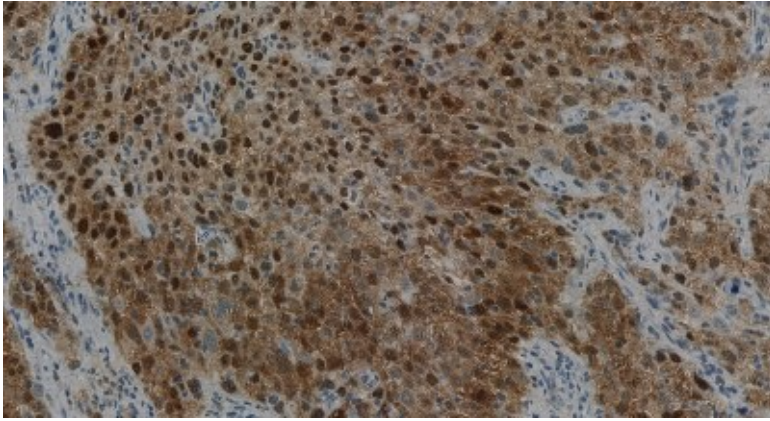


Abbildung 174: PLECA, HPV 18, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

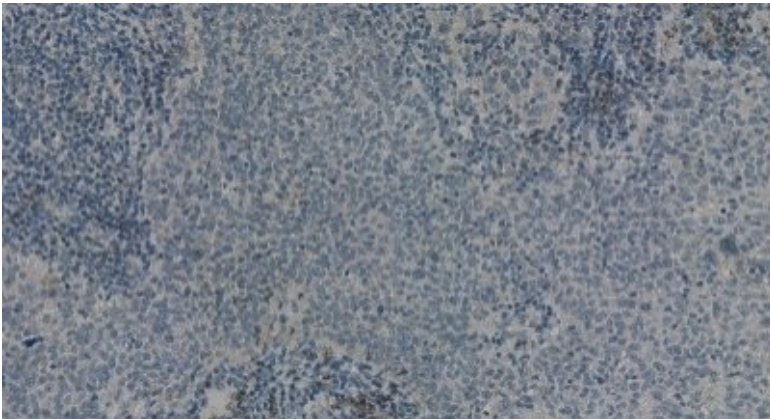


Abbildung 175: PLECA, HPV 16, mittelstarke zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

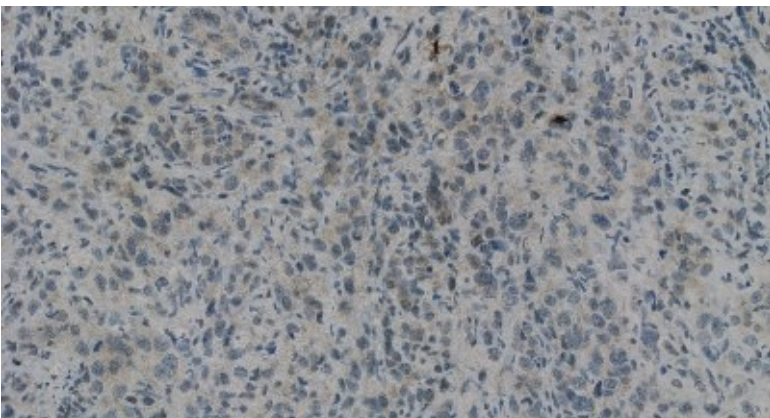


Abbildung 176: PLECA, HPV 45, mittelstarke zytoplasmatische Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

Darüber hinaus zeigte sich, dass HPV 18 positives Epithel mit zunehmendem Dysplasiegrad eine verstärkte E7-Expression aufwies (Abbildungen 177 – 182).

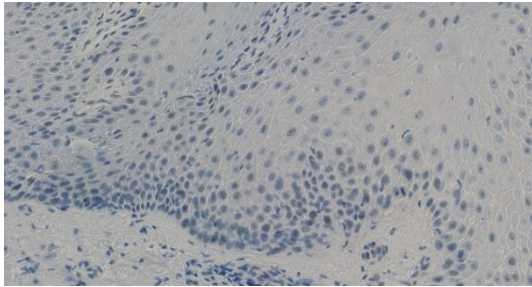


Abbildung 177: keine Dysplasie, HPV 18, schwaches Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

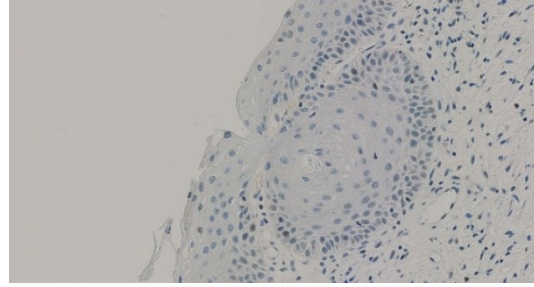


Abbildung 178: keine Dysplasie, HPV 18, mäßiges Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

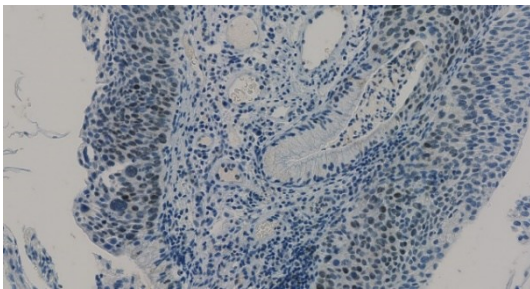


Abbildung 179: CIN III, HPV 18, mäßiges Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

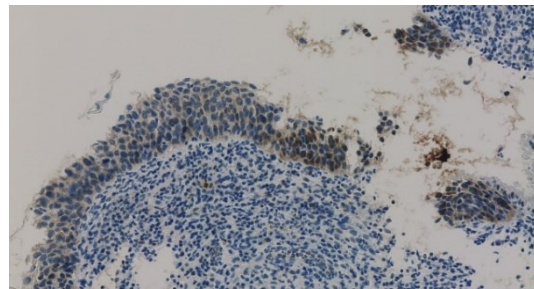


Abbildung 180: CIN III, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

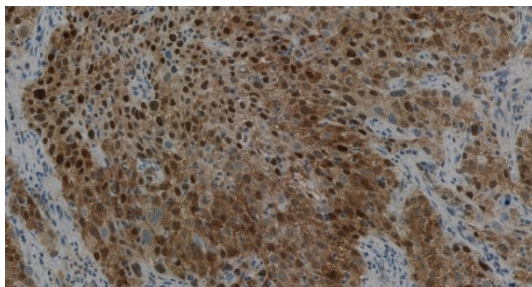


Abbildung 181: PLECA, HPV 18, starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB; 40-fache Vergrößerung.

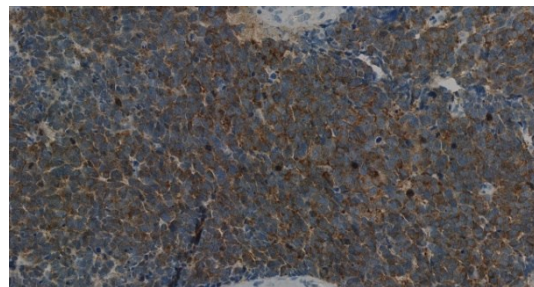


Abbildung 182: PLECA, HPV 18, starkes Färbeergebnis. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.4.3.5 Herkunft des Gewebes

Bei dem Vergleich der Herkunft der Gewebeproben war festzustellen, dass bei 6 Cores das Gewebe aus der Vulva und nicht aus der Cervix stammte. Von diesen 6 Cores zeigten 4 Cores eine mäßige, 1 Core eine schwache und ebenfalls 1 Core eine starke Färbung.

Bei den Gewebeproben mit VIN I war 1 Core schwach (Abbildung 183) und in 1 Core mäßiggradig gefärbt. Alle Proben der VIN II (2 Cores) waren mäßiggradig gefärbt. Bei der VIN III wurde bei 1 Core eine mäßiggradige und bei 1 Core eine starke Färbung (Abbildung 184) festgestellt.

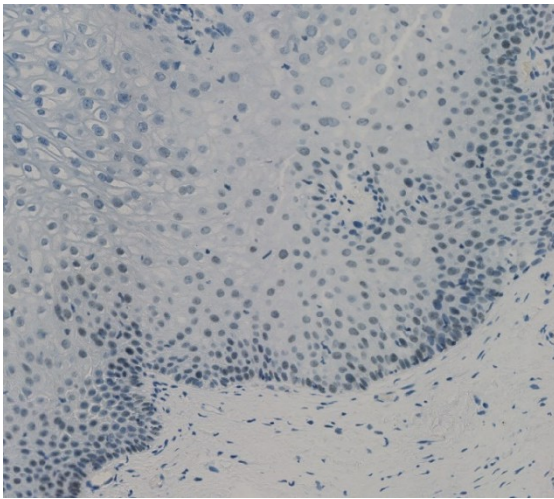


Abbildung 183: VIN I, Mischinfektion HPV 33,42, schwache basalständige nukleäre Färbung des Epithels. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

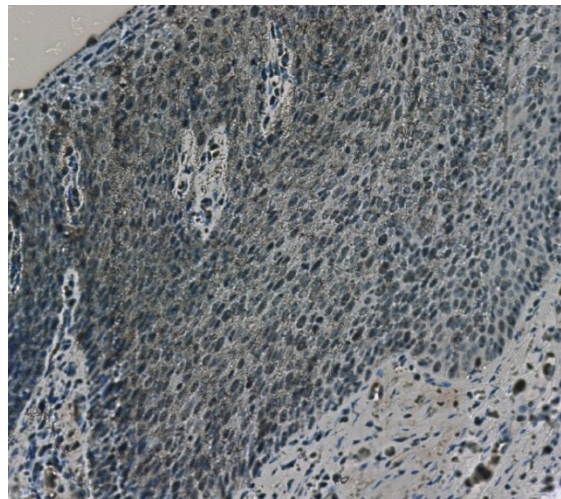


Abbildung 184: VIN III, HPV 16, starke Färbung des Epithels, Stroma ebenfalls positiv. 8E2-Färbung, CC1 [1:100], DAB, 20-fache Vergrößerung.

3.5 Antikörperklon K1H8 zum Nachweis des HPV-Hauptkapsidproteins L1

3.5.1 Zelllinien HeLa, SKBR3 und MCF7

Als Positivkontrolle für das HPV18-Hauptkapsidprotein L1 diente die HeLa -Zelllinie, welche nachweislich das HPV18-Hauptkapsidprotein L1 exprimiert. Als Negativkontrolle und damit zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung wurden die Zelllinien SKBR3 und MCF7 verwendet. Wie in Abbildung 185 zu erkennen, zeigten weder die HeLa -Zellen noch die SKBR3- und MCF7-Zellen eine Färbung mit dem K1H8-Antikörper.

Der K1H8-Antikörper scheint somit nicht für eine spezifische Darstellung von L1 geeignet zu sein.

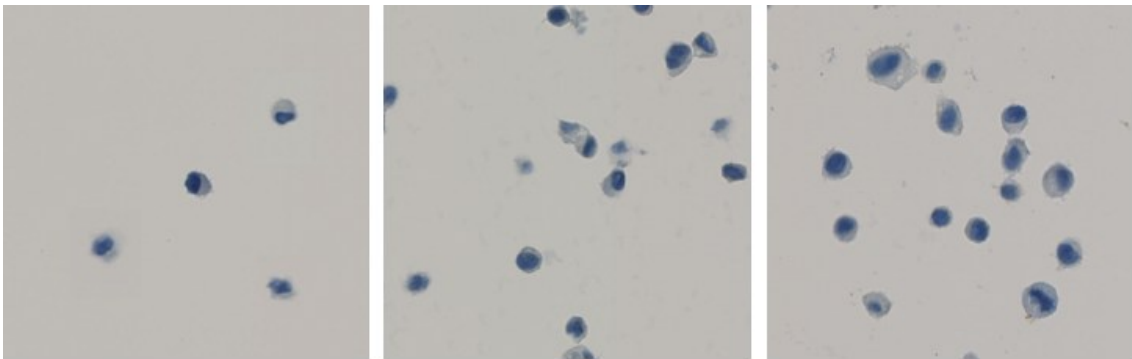


Abbildung 185: Links: HeLa -Zellen, keine Färbung, Mitte und rechts: SKBR3- und MCF7-Zellen, keine Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, x440.

3.5.2 Negativkontrolle mit einem TMA mit malignen Mesotheliomen

Um die Spezifität des Antikörperklons K1H8 zu prüfen, wurde als Negativkontrolle für K1H8 ein TMA mit 17 Proben von Mesotheliomen gefärbt. Von den 17 Cores wurden bei 16 Cores freiliegende spärliche braune Granula sowie wenige Zellen mit fein granulärem positivem Zytoplasma dokumentiert. Differentialdiagnostisch könnte die granuläre Färbung auf Lipofuszin zurückgeführt werden. Bei 1 Core wurden keine braunen Granula dokumentiert. Die braunen Granula sowie die wohl unspezifischen Färbungen werden in den Abbildungen 186 – 193 dargestellt. Insbesondere die fokal zytoplasmatische Färbung in Mesotheliomzellen spricht gegen eine Spezifität des Antikörperklons K1H8.

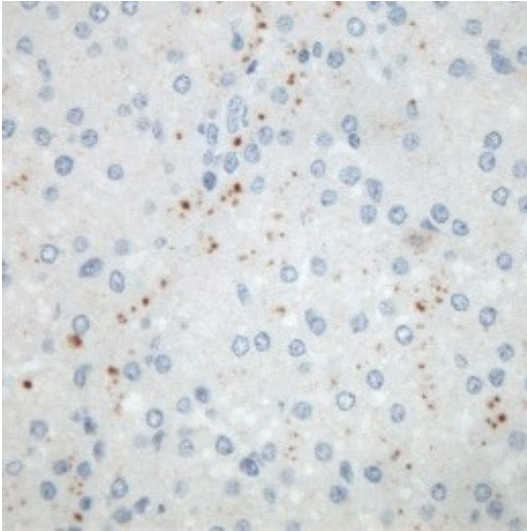


Abbildung 186: TMA Meso, Markercore Leber, wohl eher kein Lipofuszin der Leber, sondern eher eine unspezifische Färbung des HPV-Antikörpers. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

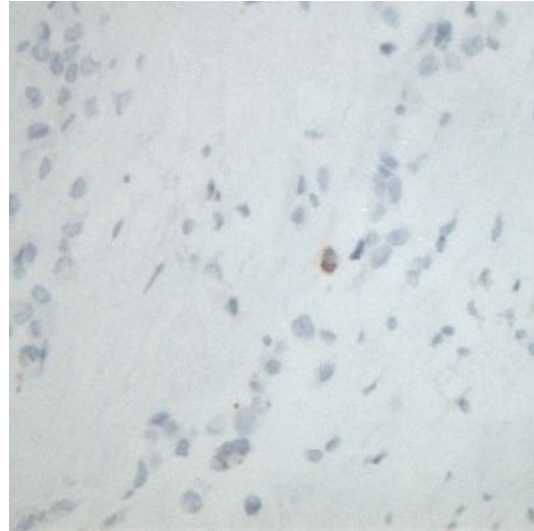


Abbildung 187: TMA Meso, Mesotheliom, wenige Zellen mit braunem granulärem Zytoplasma. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

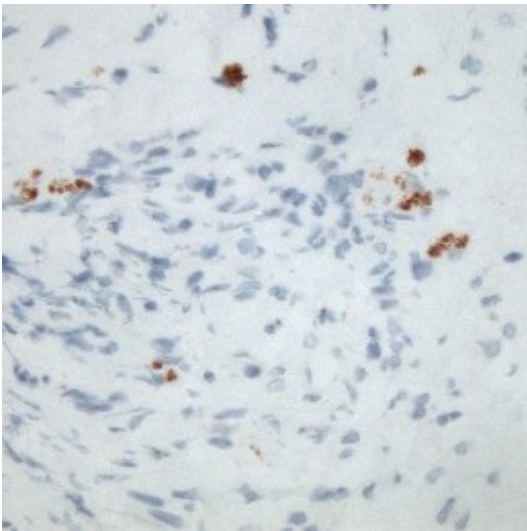


Abbildung 188: TMA Meso, Mesotheliom, Braune Granula im Zytoplasma einzelner Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

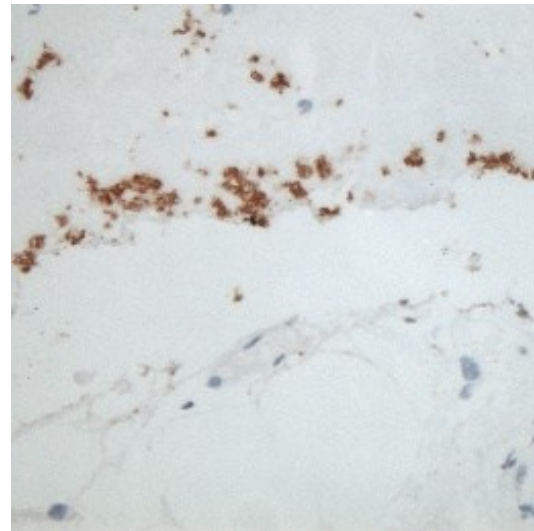


Abbildung 189: TMA Meso, Mesotheliom, Blut mit fraglich unspezifischer Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

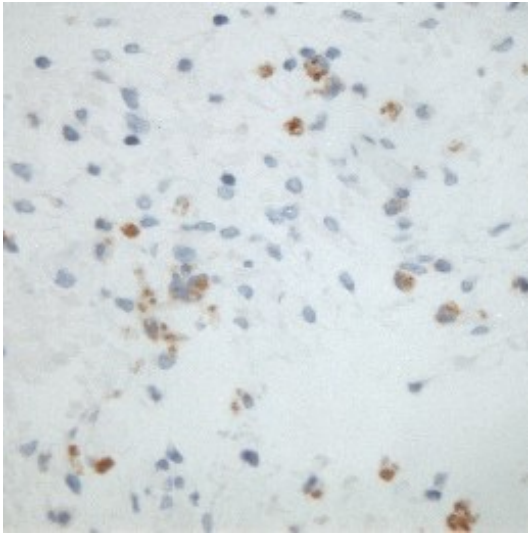


Abbildung 190: TMA Meso, Mesotheliom, fraglich unspezifische Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

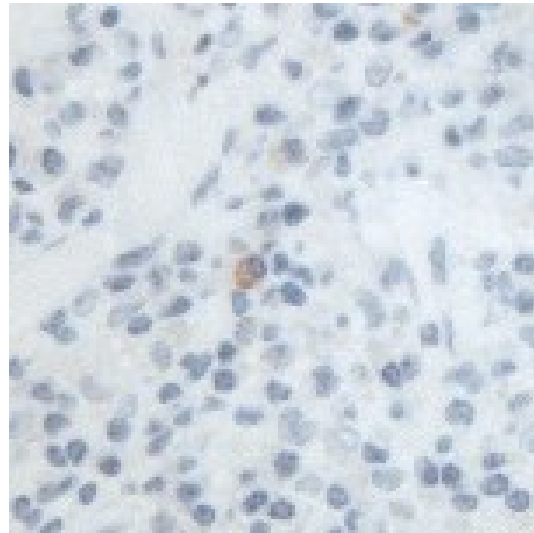


Abbildung 191: TMA Meso, Mesotheliom, Plasmazelle zytoplasmatisch positiv. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

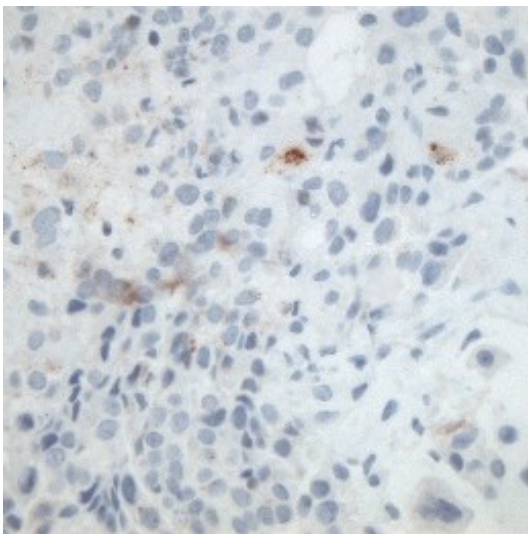


Abbildung 192: TMA Meso, Mesotheliom, fokal wenige Zellen mit zytoplasmatischer Positivität. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

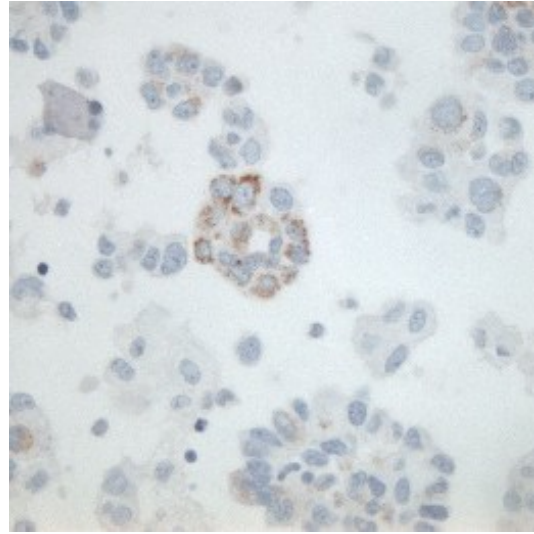


Abbildung 193: TMA Meso, Mesotheliom, wenige Tumorzellen mit feinen braunen Granula. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.5.3 TMA K01 Vergleich der unterschiedlichen Verdünnungen

Da es sich bei dem Antikörper K1H8 um eine vom Hersteller vorverdünnte Lösung (ready-to-use Antikörper) handelt, wurde auf eine Testung in unterschiedlichen Verdünnungen verzichtet.

3.5.4 Studien-TMAs

3.5.4.1 Färbung am Epithel

Von den 216 Cores (100 %) der 6 Studien-TMAs konnten bei Färbung mit dem Antikörperklon K1H8 180 Cores (83,3 %) hinsichtlich einer epithelialen Färbung ausgewertet werden. In 124 Cores (68,9 %) zeigte sich keine Färbung. Eine schwache Färbung wurde in 52 Cores (28,9 %) nachgewiesen. Eine mäßige und eine starke Färbung wurden in je 2 Cores (1,1 %) beobachtet.

Es fiel auf, dass bei höherer Färbeintensität eine nukleäre Färbung der superficialen Epithelschichten nachgewiesen wurde. Eine detaillierte Betrachtung eines möglichen Expressionsmusters der K1H8-Färbung erfolgt im Kapitel 3.5.4.3.2 dieser Arbeit.

Die Abbildungen 194 – 205 zeigen Färbeergebnisse mit dem Antikörperklon K1H8 bei unterschiedlichen pathologischen Diagnosen und HPV-Typen.

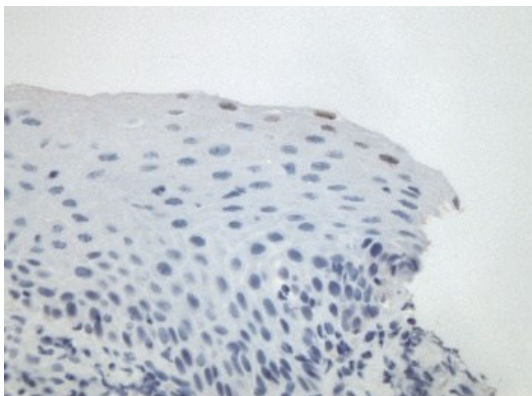


Abbildung 194: Keine Dysplasie, HPV 16, sehr schwache oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

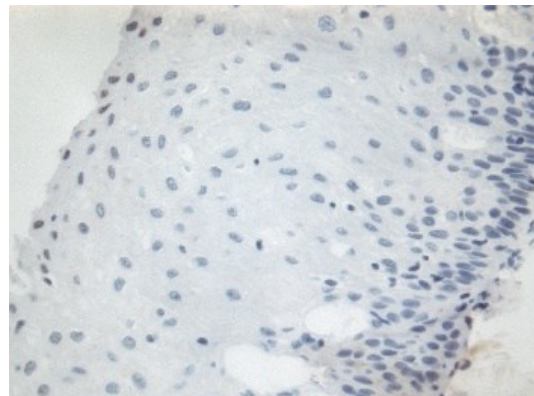


Abbildung 195: Keine Dysplasie, PCR negativ, schwache nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

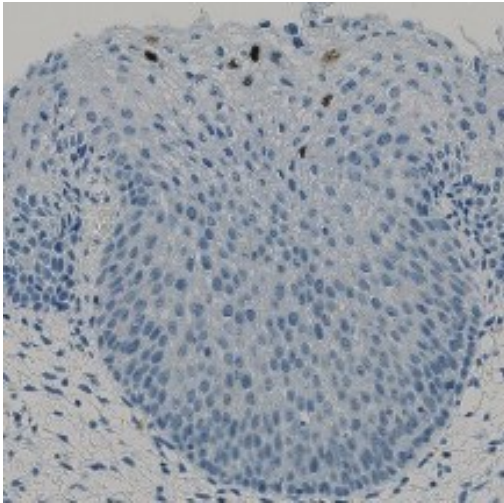


Abbildung 196: CIN I, HPV 35, starke nukleäre Expression in den superfiziellen Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

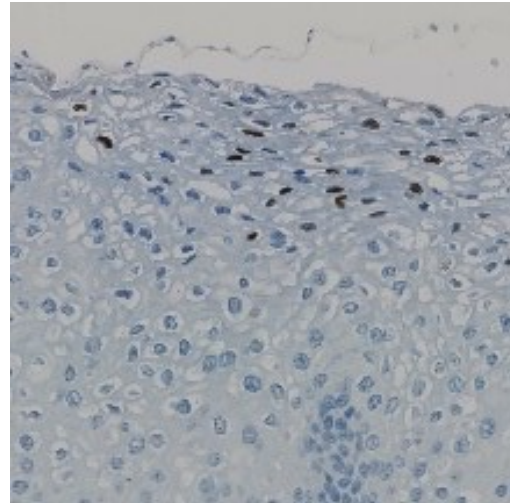


Abbildung 197: CIN I, PCR negativ, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

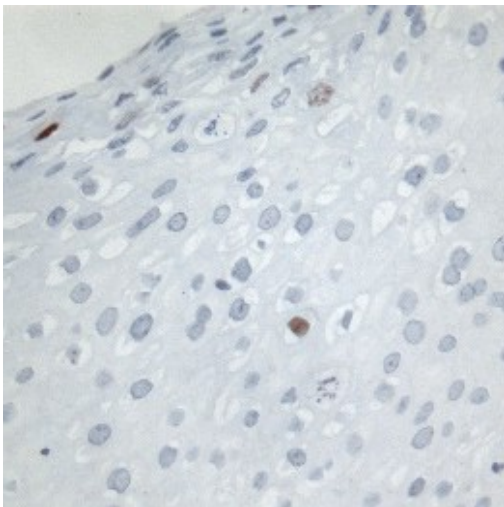


Abbildung 198: CIN I, HPV 6, spärliche Einzelzellfärbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

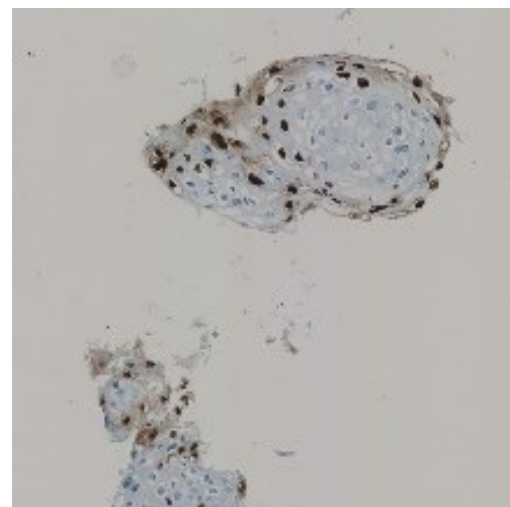


Abbildung 199: CIN I, HPV 11, starke nukleäre Expression in den superfiziellen Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

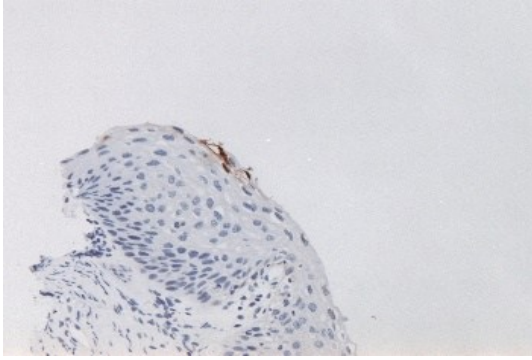


Abbildung 200: CIN II, HPV 58, oberflächliche Färbung fraglich spezifisch. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

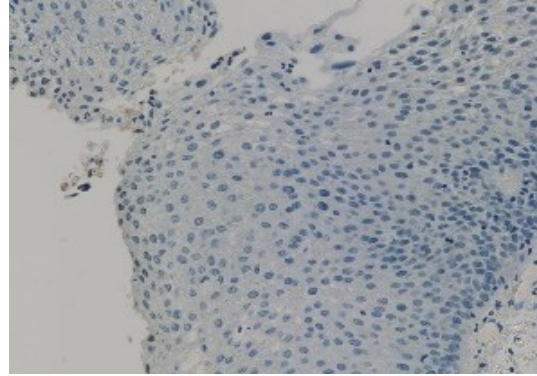


Abbildung 201: CIN III, HPV 11, schwache nukleäre Färbung der superfiziellen Epithelschicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

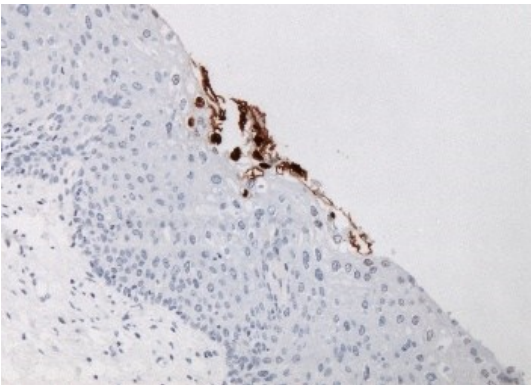


Abbildung 202: CIN I, HPV 56, oberflächliche Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

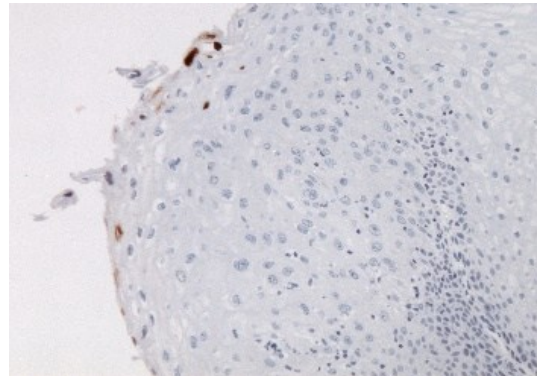


Abbildung 203: CIN I, Mischinfektion HPV 18,31, spärliche Zellen oberflächlich positiv. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

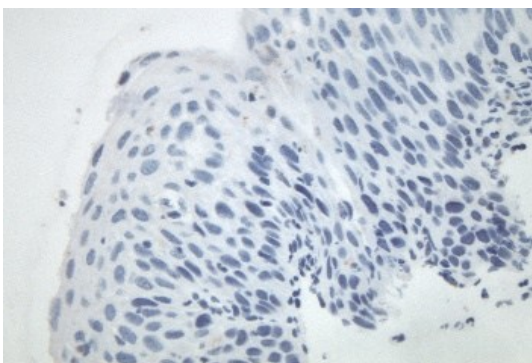


Abbildung 204: CIN III, HPV 16, schwache oberflächliche Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.



Abbildung 205: CIN III, HPV 18, starke nukleäre Anfärbung der Zellen der mittleren und superfiziellen Schicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

In 39 Cores (21,8 %) fand sich eine Färbung im Epithel bei fehlender unspezifischer Färbung im Stroma. Die Abbildungen 206 – 212 zeigen Cores, bei denen der Antikörperklon K1H8 spezifische Färbeergebnisse erzielt haben könnte.

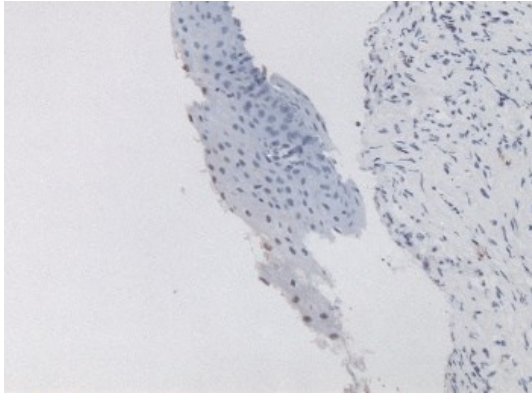


Abbildung 206: Plattenepitheliale Hyperplasie, Mischinfektion HPV 31,33, spärliche schwache oberflächliche Färbung im Epithel, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

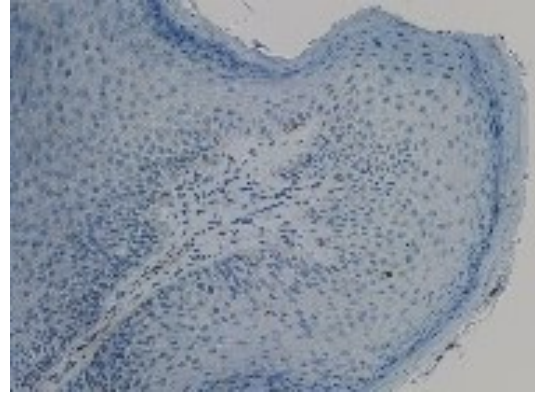


Abbildung 207: Condyloma acuminatum, Mischinfektion HPV 6, 11, nukleäre Färbung weniger Zellen der superfiziellen Epithelschicht, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

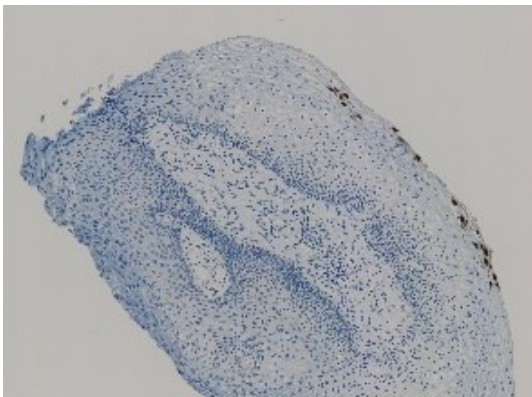


Abbildung 208: CIN II, Mischinfektion HPV 16, 43, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.

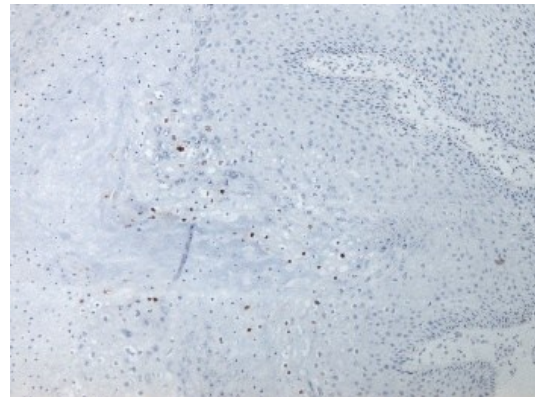


Abbildung 209: Condyloma acuminatum, HPV 6, Färbung der Koilozyten, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 10-fache Vergrößerung.

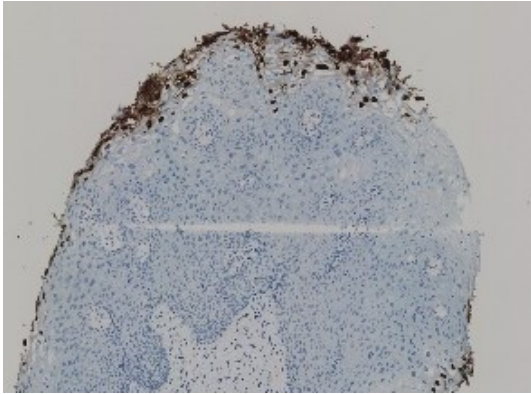


Abbildung 210: VAIN II, HPV 56, starke nukleäre Zellen der superfiziellen Schicht, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.

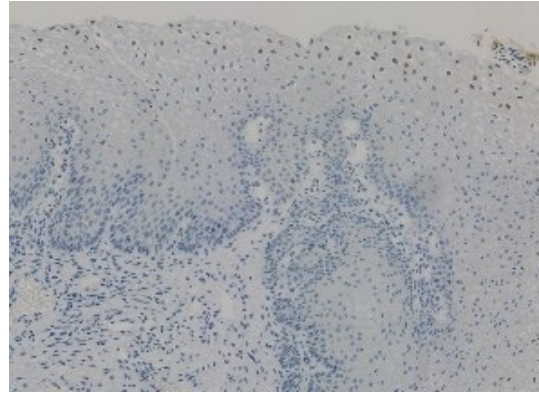


Abbildung 211: CIN I, HPV 91, schwache nukleäre Färbung der superfiziellen Epithelschichten, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

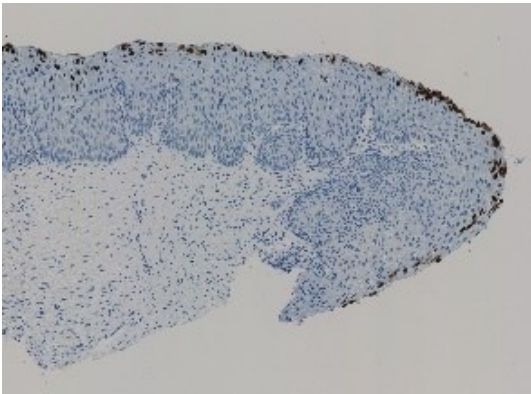


Abbildung 212: CIN III, HPV 58, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen, Stroma negativ. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.

3.5.4.2 Färbung am Stroma

Eine Auswertung war bei 180 Cores bei der Färbung mit dem Antikörper K1H8 möglich. 137 Cores (76,1 %) blieben ohne Nachweis einer unspezifischen Färbung im Stroma. In 43 Cores (23,9 %) wurde eine schwache unspezifische Färbung im Stroma nachgewiesen.

Die unspezifischen Färbungen zeigten eine zytoplasmatische Positivität einzelner stromaler Zellen und von Zylinderepithel. Dies wird in den Abbildungen 213 – 218 der K1H8-Färbung verdeutlicht.

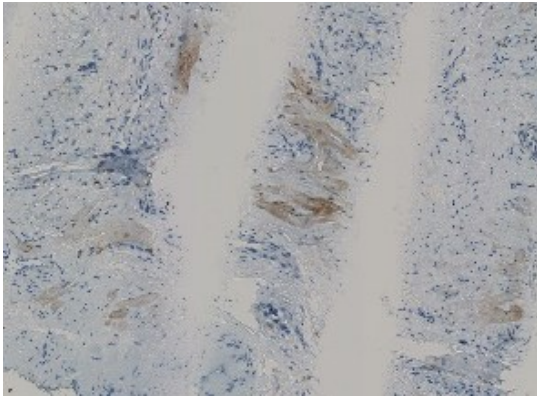


Abbildung 213: keine Dysplasie, HPV 16, Verschmutzung, fraglich unspezifische Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

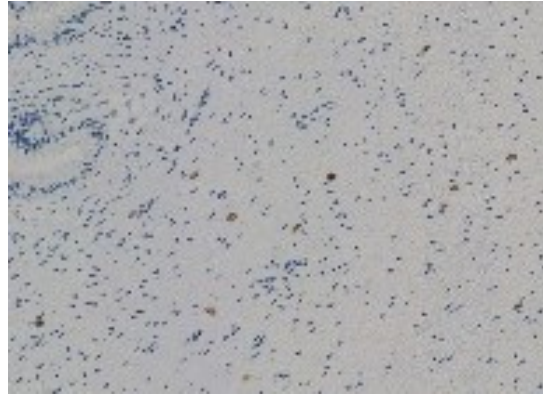


Abbildung 214: CIN III, HPV 18, einzelne Zellen im Stroma positiv. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

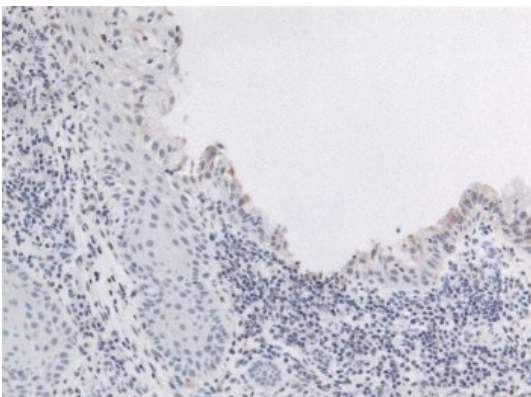


Abbildung 215: keine Dysplasie, HPV 73, oberflächliche Färbung im Zylinderepithel. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

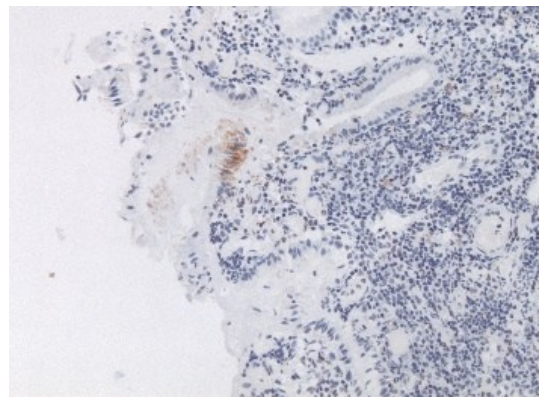


Abbildung 216: keine Dysplasie, HPV 56, möglicherweise unspezifische Färbung im Zylinderepithel. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

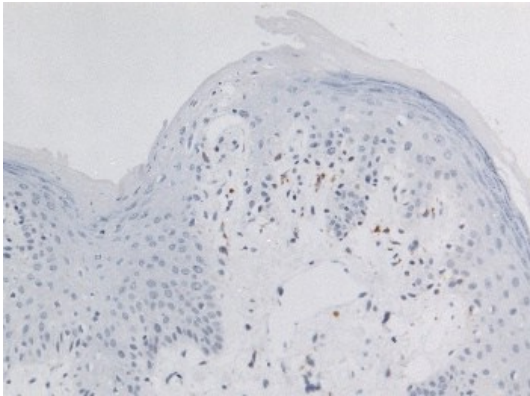


Abbildung 217: keine Dysplasie, HPV 11, fraglich unspezifische Färbung im Stroma. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

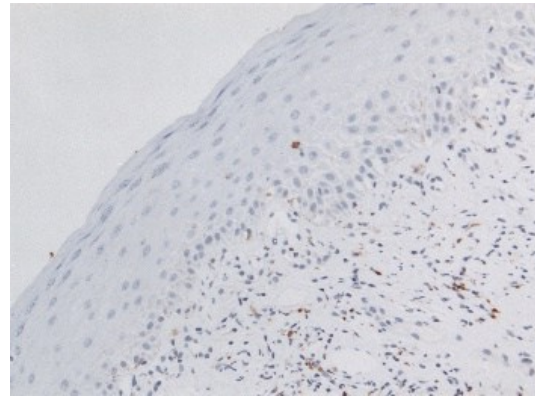


Abbildung 218: CIN I, HPV 33, wohl unspezifische Färbung in Entzündungszellen des Stromas; im Epithel nur hauchdünne strichförmige, wohl unspezifische Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

3.5.4.3 Färberegebnisse mit HR- und LR-HPV-Typen

180 (83,3 %) der 216 (100 %) mit dem AK K1H8 gefärbten Cores konnten ausgewertet werden. In 99 Cores (55,0 %) lag eine Infektion mit einem HR-HPV-Typ und in 50 Cores (27,7 %) mit einem LR-HPV-Typ vor. In 13 Cores (7,2 %) wurde eine Mischinfektion mit verschiedenen HPV-Typen nachgewiesen. In 9 Cores (5,0 %) war das Epithel HPV-PCR negativ, in 6 Cores (3,3 %) war keine eindeutige Identifizierung des HPV-Typs möglich und in 3 Cores (1,7 %) lagen intermediäre HPV-Typen vor.

Die Expression von K1H8 in Korrelation zu den HPV-Typen wird in Tabelle 30 verdeutlicht.

HPV-Typen	stark	mäßig	schwach	negativ
HR	2% (2)	1% (1)	23,2% (23)	73,7% (73)
LR	0% (0)	2% (1)	36% (18)	62% (31)
Mischinfektion	0% (0)	0% (0)	30,8% (4)	69,2% (9)
PCR negativ	0% (0)	0% (0)	44,4% (4)	55,6% (5)
Intermediär	0% (0)	0% (0)	66,7% (2)	33,3% (1)
Unklare Fälle	0% (0)	0% (0)	16,7% (1)	83,3% (5)

Tabelle 30: HPV-Typen in Korrelation zu der K1H8-Expression

Die Übersicht verdeutlicht, dass bei HR-HPV-Typen keine erhöhte Färbeexpression nachgewiesen wurde. Mit 73 Cores (73,7 %) konnte bei dem größten prozentualen Anteil der HR-HPV-Infektionen keine Färbung nachgewiesen werden.

Auffällig ist, dass die beiden einzigen Cores mit starker Expression HPV18 positiv waren und mit einer CIN III assoziiert waren (Abbildung 219). Zudem wiesen 4 Cores der PCR-negativen Proben entgegen der Erwartung eine schwache Färbung auf (Abbildungen 220 – 222).

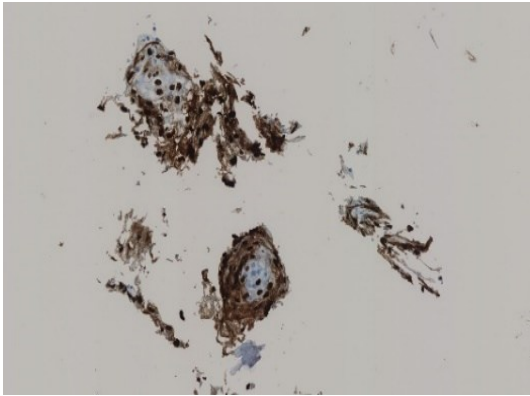


Abbildung 219: CIN III, HPV 18, starke nukleäre Zellen der mittleren und superfiziellen Schicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

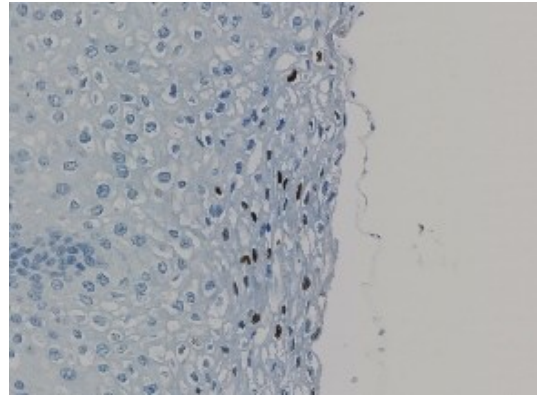


Abbildung 220: CIN I, PCR negativ, nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

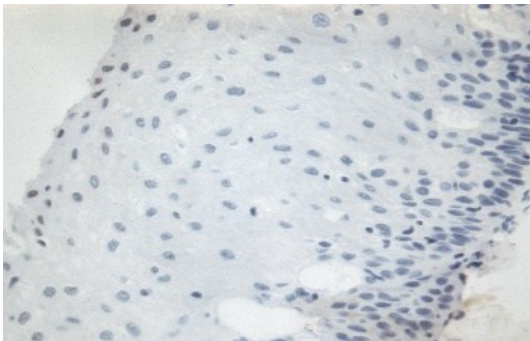


Abbildung 221: keine Dysplasie, PCR negativ, schwache nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

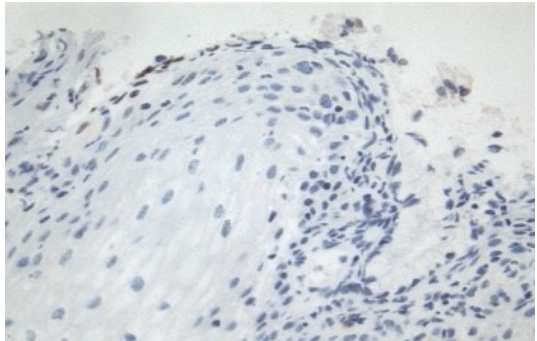


Abbildung 222: CIN I, PCR negativ, spärliche oberflächliche Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.5.4.3.1 Auswertung der von K1H8 erfasste HPV-Typen

Der Antikörperklon K1H8 soll gemäß der Herstellerangaben spezifisch das HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 51, 52, 56 und 58 L1-Protein nachweisen. Die Tabelle 31 gibt eine Übersicht der jeweiligen HPV-Typen, die gemäß Herstellerangaben detektiert werden sollen und der Fallzahl der in dieser Studie analysierten Fälle.

HPV-Typen	Anzahl
HPV 6	11,1% (20)
HPV 11	4,4% (8)
HPV 16	8,9% (16)
HPV 18	8,9% (16)
HPV 31	6,1% (11)
HPV 33	7,8% (14)
HPV 42	2,8% (5)
HPV 51	1,1% (2)
HPV 52	0,6% (1)
HPV 56	5% (9)
HPV 58	9,4% (17)
Mischinfektionen	11,1 % (20)
alle anderen HPV-Typen	14,4% (26)
PCR negativ	5% (9)
Typisierung nicht möglich	3,3% (6)

Tabelle 31: Übersicht der Fallzahl der einzelnen nach Herstellerangaben von K1H8 detektierten HPV-Typen

Um eine Übersicht über die Ausprägung der Färbung der einzelnen HPV-Typen zu erlangen, wurde folgende Übersicht erstellt (Tabelle 32).

HPV-Typen	stark	mäßig	schwach	negativ
HPV 6	0% (0)	0% (0)	40% (8)	60% (12)
HPV 11	0% (0)	0% (0)	37,5% (3)	62,5% (5)
HPV 16	0% (0)	0% (0)	37,5% (6)	62,5% (10)
HPV 18	12,5% (2)	0% (0)	6,3% (1)	81,2% (13)
HPV 31	0% (0)	0% (0)	18,2% (2)	81,8% (9)
HPV 33	0% (0)	0% (0)	21,4% (3)	78,6% (11)
HPV 42	0% (0)	0% (0)	20% (1)	80% (4)
HPV 51	0% (0)	0% (0)	0% (0)	100% (2)
HPV 52	0% (0)	0% (0)	0% (0)	100% (1)
HPV 56	0% (0)	0% (0)	44,4% (4)	55,6% (5)
HPV 58	0% (0)	5,9% (1)	17,6% (3)	76,5% (13)
alle anderen HPV-Typen	0% (0)	3,8% (1)	30,8% (8)	65,4% (17)
PCR negativ	0% (0)	0% (0)	44,4% (4)	55,6% (5)
Typisierung nicht möglich	0% (0)	0% (0)	16,7% (1)	83,3% (5)

Tabelle 32: von K1H8 zu detektierende HPV-Typen in Korrelation zur K1H8-Expression

3.5.4.3.2 Expressionsmuster

In 15 Cores der Färbungen mit dem Antikörperklon K1H8 wurden superfizielle Zellen mit hoher Intensität nukleär gefärbt. Es fiel auf, dass jeder der 15 Cores mit einem HPV-Typen infiziert war, der vom Hersteller für diesen Antikörper validiert war. Eine höhere Intensität bei zunehmendem Dysplasiegrad konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung zeigen die Abbildungen 223 – 238.

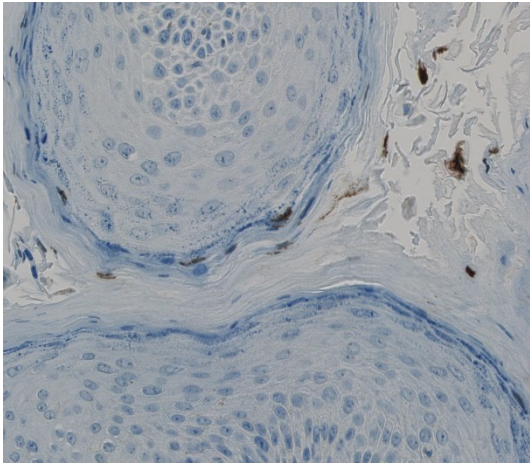


Abbildung 223: Condyloma acuminatum, Mischinfektion HPV 6, 11, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

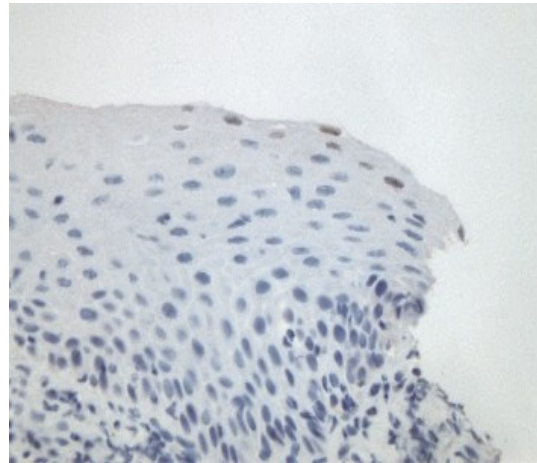


Abbildung 224: keine Dysplasie, HPV 16, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

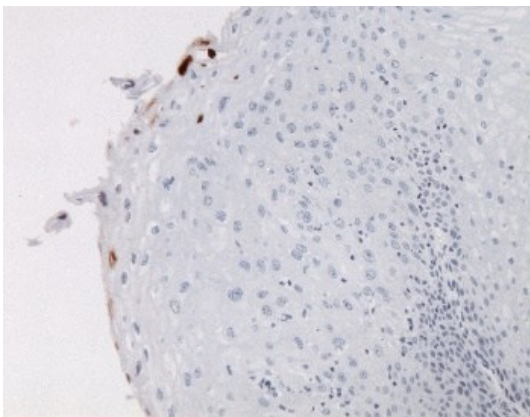


Abbildung 225: CIN III, Mischinfektion, HPV 18, 33, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

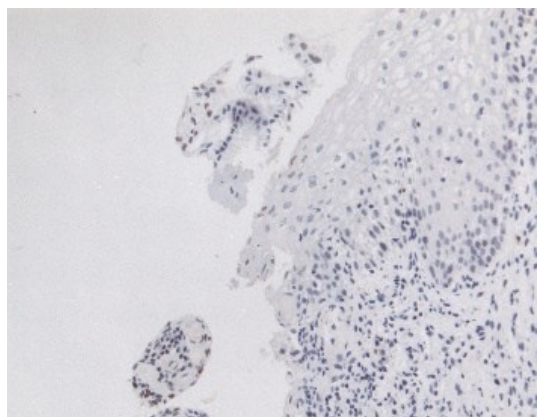


Abbildung 226: CIN I, HPV 6, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

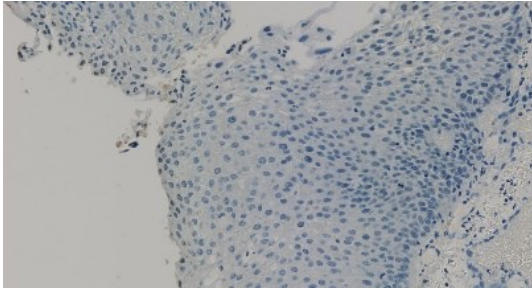


Abbildung 227: CIN III, HPV 11, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

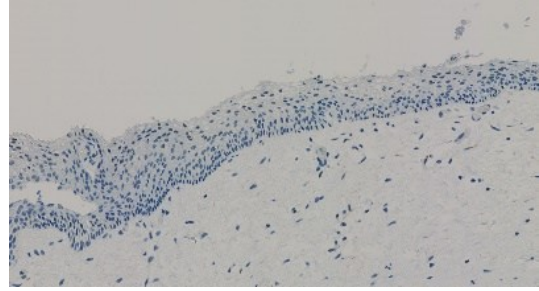


Abbildung 228: CIN I, HPV 16, oberflächliche nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

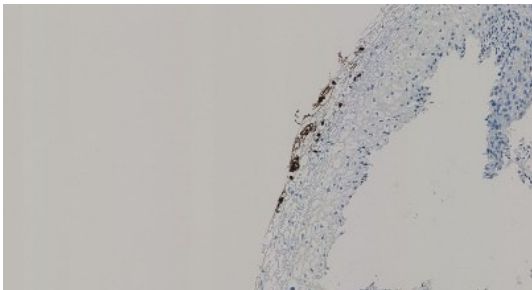


Abbildung 229: CIN II, HPV 56, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

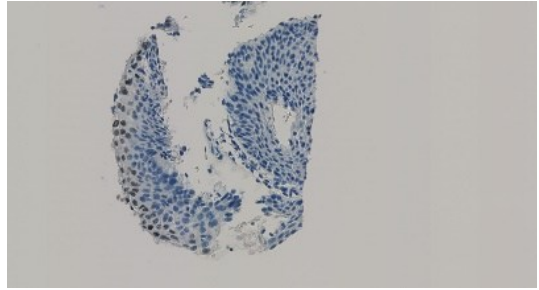


Abbildung 230: CIN III, HPV 56, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

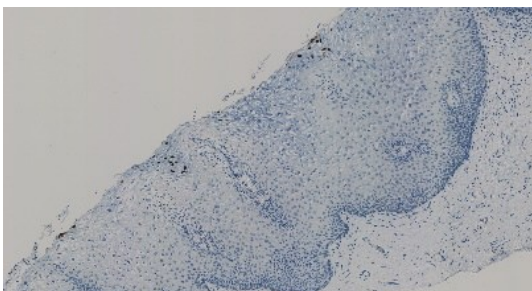


Abbildung 231: VIN I, Mischinfektion HPV 33, 42, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.

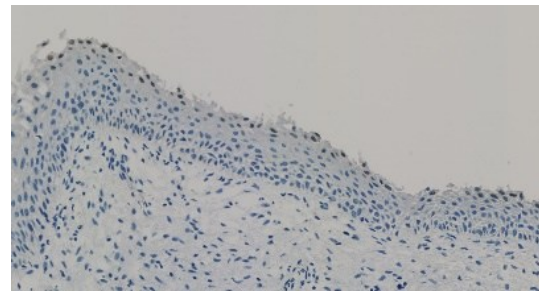


Abbildung 232: Unklare Diagnose, vermutlich CIN II, HPV 42, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

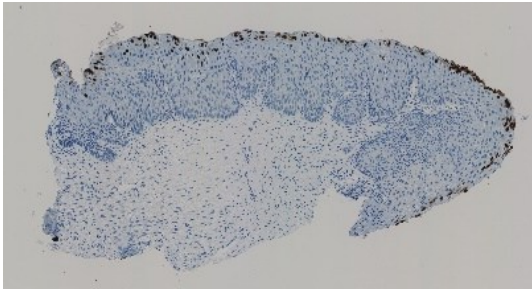


Abbildung 233: CIN III, HPV 58, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.

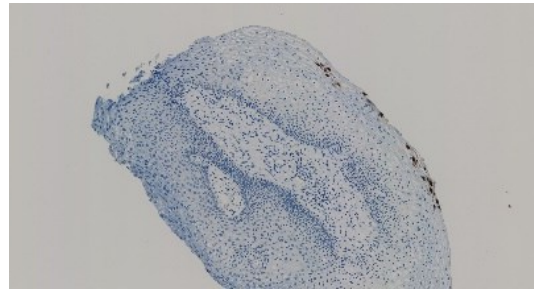


Abbildung 234: CIN II, Mischinfektion HPV 16, 43, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.

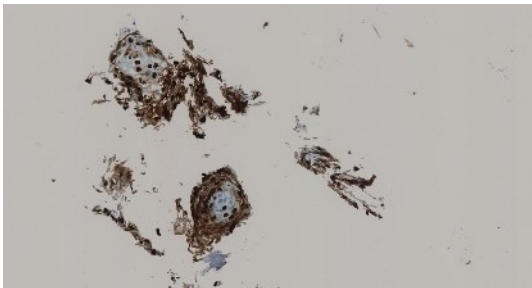


Abbildung 235: CIN III, HPV 18, starke nukleäre Färbung der mittleren und superfiziellen Schicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

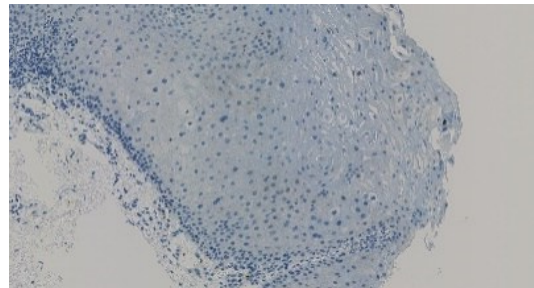


Abbildung 236: CIN I, HPV 6, nukleäre Färbung von Zellen der superfiziellen Epithelschichten. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 25-fache Vergrößerung

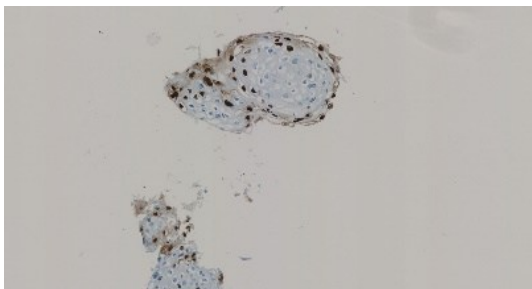


Abbildung 237: CIN I, HPV 11, starke nukleäre Zellen der superfiziellen Schicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

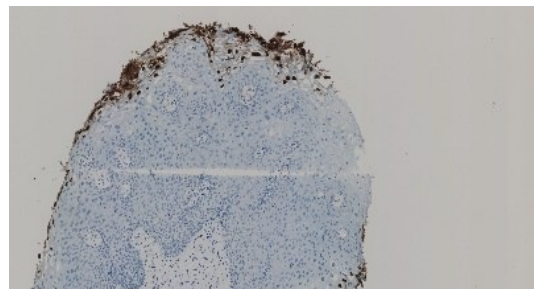


Abbildung 238: VAIN II, HPV 56, starke nukleäre Zellen der superfiziellen Schicht. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.

3.5.4.4 Färbeergebnisse mit HSIL und LSIL

180 (83,3 %) der 216 (100 %) mit dem AK K1H8 gefärbten Cores konnten ausgewertet werden. In 80 Cores (44,4 %) wurde anhand der HE-Färbung eine HSIL, in 39 Cores (21,7 %) keine Dysplasie und in 32 Cores (17,8 %) eine LSIL diagnostiziert. In 10 Cores (5,6 %) war eine Beurteilung aufgrund fehlenden Gewebes nicht durchführbar. Sonstige Diagnosen wurden mittels HE-Färbung bei 8 Cores (4,4 %) gestellt, in 6 Cores (3,3 %) wurde ein PLECA diagnostiziert und in 5 Cores (2,8 %) blieb eine Diagnosesicherung aus.

Die Tabelle 33 zeigt die histopathologischen Befunde in Korrelation zur K1H8-Expression.

pathologische Befund	stark	mäßig	schwach	negativ
HSIL	2,5% (2)	1,3% (1)	27,5% (22)	68,8% (55)
LSIL	0% (0)	3,1% (1)	37,5% (12)	59,4% (19)
Keine Dysplasie	0% (0)	0% (0)	15,4% (6)	84,6% (33)
PLECA	0% (0)	0% (0)	16,7% (1)	83,3% (5)
Sonstige	0% (0)	0% (0)	87,5% (7)	12,5% (1)
Unklare Fälle	0% (0)	0% (0)	40% (2)	60% (3)
Keine Auswertung	0% (0)	0% (0)	20% (2)	80% (8)

Tabelle 33: pathologische Befunde in Korrelation zur K1H8-Expression

Tabelle 33 zeigt, dass in den einzigen beiden Cores mit starker Färbung eine hochgradige Dysplasie nachgewiesen wurde. Jedoch wurde der Großteil der HSILs schwach oder nicht gefärbt (Abbildungen 242 + 243). Darüber hinaus wurde für alle PLECAs - abgesehen von einem Core mit schwacher Färbung - keine Anfärbung dokumentiert (Abbildungen 239 – 241). Dies deutet darauf hin, dass mit der in dieser Studie angewandten Färbemethode und dem vorliegenden Gewebe kein Zusammenhang zwischen dem Dysplasiegrad und der Intensität der Färbung zu erkennen war.

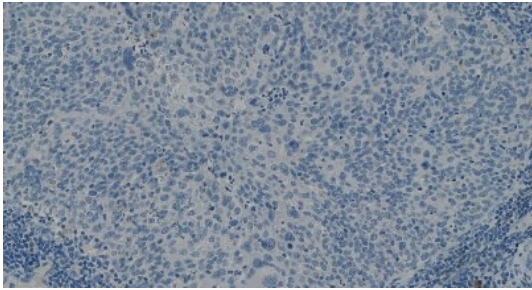


Abbildung 239: PLECA, HPV 16, keine Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

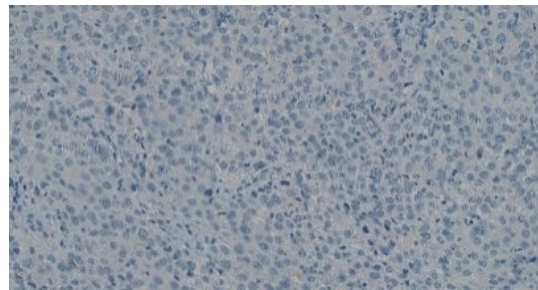


Abbildung 240: PLECA, HPV 18, keine Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

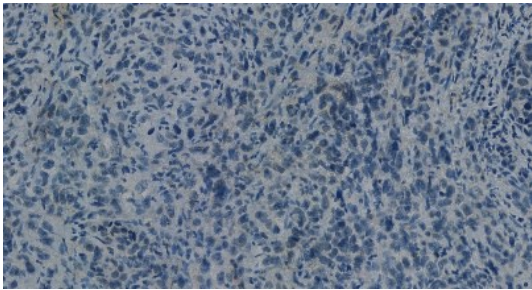


Abbildung 241: PLECA, HPV 45, leichte zytoplasmatische und nukleäre Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

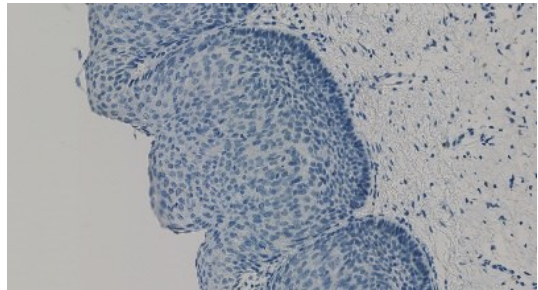


Abbildung 242: CIN III, HPV 16, keine Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

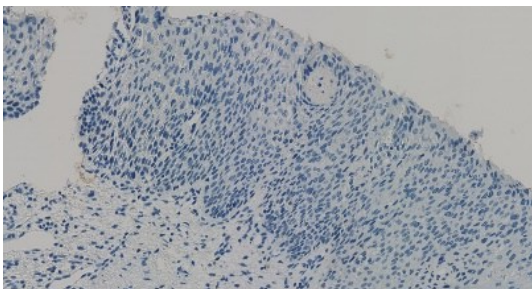


Abbildung 243: CIN III, HPV 35, keine Färbung. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

3.5.4.5 Herkunft des Gewebes

Bei der Auswertung der Herkunft der Gewebeproben zeigte sich, dass bei 6 Cores das Gewebe aus der Vulva stammte.

Von diesen 6 Cores war in 5 Cores das Epithel nicht gefärbt. Es fiel auf, dass in 3 Cores dieser Gewebeproben eine schwache unspezifische Färbung im Stroma dokumentiert wurde. Es müsste differentialdiagnostisch eine Färbung durch Melanin ausgeschlossen werden. Bei lediglich 1 Core zeigte sich eine schwache Epithelanfärbung.

Die Abbildungen 244 – 247 zeigen die Färbeergebnisse mit dem Antikörperklon K1H8 in den Gewebeproben der Vulva.

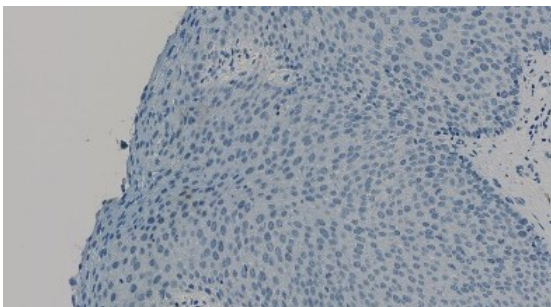


Abbildung 244: VIN III, HPV 16, schwache zytoplasmatische Färbung, fraglich unspezifisch. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

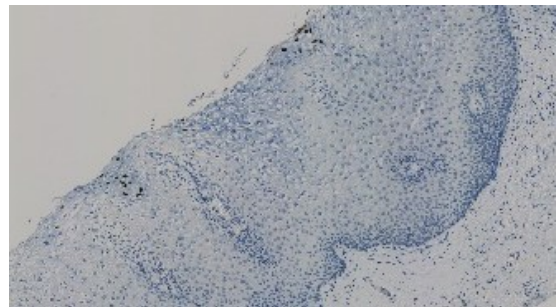


Abbildung 245: VIN I, Mischinfektion HPV 33, 42, starke nukleäre Färbung superfizieller Zellen. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 15-fache Vergrößerung.

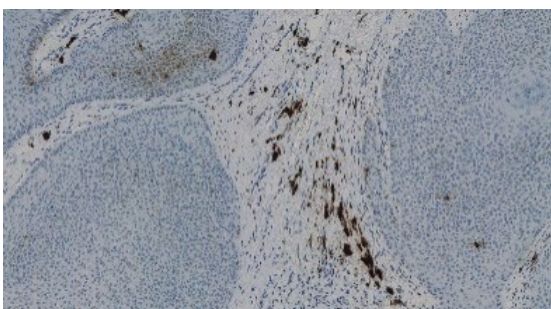


Abbildung 246: VIN II, HPV 6, zytoplasmatische Färbung, Makrophagen gefärbt. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 20-fache Vergrößerung.

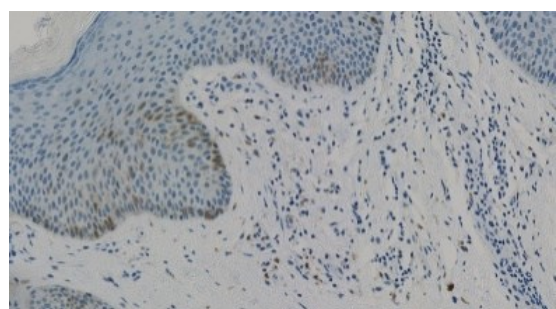


Abbildung 247: VIN I, HPV 55, zytoplasmatische Färbung fraglich unspezifisch. K1H8-Färbung, CC1, prediluted, DAB, 40-fache Vergrößerung.

4 Diskussion

4.1 Validität der TMA-Technik

In dieser Studie wurden insgesamt sechs Studien-TMAs mit 216 Cores erstellt und mittels Immunhistochemie gefärbt. Bei einem Tissue Microarray werden die zu untersuchenden Gewebeproben mithilfe einer Stanze aus den Donorparaffinblöcken entnommen und nach einem definierten Koordinatensystem auf dem sogenannten Empfängerblock platziert (Kononen et al. 1998). Diese Technik dient dazu, viele Gewebeproben gleichzeitig auf einem Objektträger zu färben und ermöglicht dadurch eine schnelle und kostengünstige Begutachtung. Nach Fedor und De Marzo ist es möglich, bis zu 1000 Gewebeproben auf einem Paraffinblock mit präzisiertem Abstandsmuster zu erstellen (Fedor & De Marzo 2005). Das Bestücken von TMAs wird inzwischen meist mithilfe von manuellen oder automatisierten sogenannten Tissue Arrayern vorgenommen, wodurch der Zeitaufwand der Erstellung verringert wird (Jawhar 2009). Zur Herstellung der TMAs wurde in dieser Studie die von Wilkens patentierte Technik (Patentnummer: DE 102 03 524 A 1) angewandt (Wilkens 2003). Die Platzierung des Gewebes erfolgt bei dieser Technik manuell. Als Hilfe zur definierten Positionierung der Gewebeproben können z.B. mittels computer numerical control (CNC) Bohrmaschinen vorgebohrte Empfängerblöcke verwendet werden (Vogel 2014). Insgesamt wurden ein Kontroll-TMA mit einem Durchmesser der Gewebestanzzyylinder von 5 mm und 21 Studien-TMAs mit einem Durchmesser der Gewebestanzzyylinder von 3 mm (3 TMAs) und 5 mm (18 TMAs), erstellt. Die immunhistochemischen Färbungen mit den zu testenden Antikörpern wurden am Kontroll-TMA und an 6 Studien-TMAs durchgeführt. Der in der Literatur beschriebene übliche Stanzzyylinderdurchmesser für TMAs beträgt 0,6 mm (Remotti 2013; Simon & Sauter 2003; Vogel 2014). Bei der Größenauswahl der Stanzdurchmesser ist entscheidend, ob damit das Gewebe of interest erfasst werden kann. Um mit höherer Wahrscheinlichkeit das Gewebe of interest - in unserem Fall dysplastische Epithelanteile von Cervix- und Vulvaschleimhaut - zu erfassen, wurden in dieser Studie die Stanzzyylinderdurchmesser größer gewählt als in der Literatur üblich, in der weitgehend invasive zellreiche Tumoren untersucht werden.

Von den 216 Cores der 6 Studien-TMAs konnten 23 Cores nicht ausgewertet werden. Davon waren 4 der 23 Cores nicht angeschnitten oder abgeschwommen, 2 Cores waren aufgerollt und die restlichen Cores bestanden nur aus cervicalem Schleim oder cervicalem Stroma ohne Epithelnachweis. Die TMAs mit einem Stanzzylinderdurchmesser von 3 mm konnten in 7 Cores (5,8 %) nicht ausgewertet werden. Die TMAs mit einem Stanzzylinderdurchmesser von 5 mm konnten in 16 Cores (16,7 %) nicht ausgewertet werden. Der geringere Ausfall der Cores bei einem Stanzzylinderdurchmesser von 3 mm im Gegensatz zu dem Stanzzylinderdurchmesser von 5 mm deutet darauf hin, dass die Größe des Stanzdurchmessers in dieser Studie keine entscheidende Rolle für die Erfassung des Gewebes of interest spielte. Der Ausfall der einzelnen Cores war auf die geringe Menge des verbleibenden Gewebes auf dem Donorblock nach der materialintensiven vorangegangenen PCR-Analyse zurückzuführen. Eine mögliche Ablösung von Cores vom doppelseitigen Klebeband beim Aufschmelzen des TMAs und dem damit verbundenen Verlust von Cores konnte nicht beobachtet werden. Der Schmelzprozess eines mit Paraffincores bestückten TMAs kann zu einer festen Verbindung zwischen dem Stanzzylinder aus dem Spenderblock und dem Paraffin des Empfängerblockes beitragen, wodurch das Ablösen und Aufrollen von Gewebecores beim Schneiden des TMAs am Mikrotom und Aufziehen des vom TMA erstellten Schnittes verhindert wird (Vogel 2014).

Im Gegensatz zur Literatur wurden in der vorliegenden Studie die Donorparaffinblöcke vor der Entnahme der Stanzzylinder nicht frisch angeschnitten und auf das Gewebe of interest untersucht, da durch die vorangegangene PCR-Untersuchung oft nur noch geringes Restgewebe vorhanden war. Aufgrund dessen war es oftmals nicht möglich, die Dysplasien beziehungsweise Carcinome gezielt zu stanzen. Um zu prüfen, ob in den Gewebeschnitten nach der Stanzung eine Dysplasie vorlag, wurden alle TMAs mittels HE-Färbung nachbegutachtet. In 193 Cores (89,4 %) war es möglich, mithilfe der HE-Färbung zu einer histologischen Diagnose zu gelangen. Von den 193 Cores (100 %) stimmten in 81 Cores (42 %) die am TMA erstellten histopathologischen Diagnosen nicht mit denen der Routinehistologie überein.

Bei den nicht übereinstimmenden Diagnosen (81 Cores; 100 %) fand sich in 26 Cores (32,1 %) im Gegensatz zum Routinebefund keine Dysplasie.

Simon, Mirlacher und Sauter beschreiben, dass bei der Entnahme von zwei oder drei Stanzzyllindern aus einer Gewebeprobe eine hohe Konkordanz der histopathologischen Befunde erreicht werden kann (Simon, Mirlacher & Sauter 2004). Durch die vorherige HPV-PCR-Analyse war es nicht bei allen Gewebeproben möglich, mehrere Stenzen zur Sicherung der histopathologischen Befunde zu entnehmen.

Ferner bestand durch das geringe Restgewebe auf den Spenderblöcken die Möglichkeit, dass kein dysplastisches Epithel oder Carcinom mehr in den Gewebeproben enthalten war. Um dem entgegenzuwirken, wurde in dieser Studie der Stanzzyllinderdurchmesser so groß gewählt, dass möglichst viel Gewebe entnommen und untersucht werden konnte.

Eine weitere Einschränkung der Effektivität der TMA-Technik kann durch die Färbung der Proben mit Biomarkern entstehen, die eine Heterogenität in ihrer Expression aufweisen (Remotti 2013). Zu den Markern, die nicht homogen exprimiert werden, gehören Ki-67 und p53, wie in den Studien von Chiesa-Vottero, Rybicki und Prayson und Meresburger et al. beschrieben wird (Chiesa-Vottero, Rybicki & Prayson 2003; Merseburger et al. 2003). Dies kann zu einer Abweichung der erwarteten Ki-67- und p53-Expression in der TMA-Analyse im Vergleich zur Analyse des gesamten Donorparaffinblocks führen (Remotti 2013). Durch den möglichst groß gewählten Stanzdurchmesser konnte in der vorliegenden Studie ein größeres Areal des Gewebes untersucht und daher eine Heterogenität der Biomarker besser beurteilt werden.

In 112 Cores (58 %) stimmte die Diagnose mit der in dem Programm „NX_Pasnet_Patientendatei“ dokumentierten Diagnose überein. Es wurden in 61 Cores (31,6 %) eine CIN III, in 48 Cores (24,9 %) keine Dysplasie, in 36 Cores (18,7 %) eine CIN I und in 21 Cores (10,9 %) eine CIN II diagnostiziert. In 6 Cores (3,1 %) wurde ein Plattenepithelcarcinom, in 5 Cores (2,6 %) ein Condyloma acuminatum und in je 2 Cores (1 %) eine VIN I, eine VIN II und eine VIN III nachgewiesen.

In 1 Core (0,5 %) wurde eine VAIN II nachgewiesen. In 4 Cores (2,1 %) wurden sonstige Diagnosen erhoben und in 5 Cores (2,6 %) war eine eindeutige Diagnosesicherung nicht möglich.

Verschiedene Faktoren können die Diagnostik erschweren. Zum einen fällt die Klassifizierung der Läsionen selbst geübten Patholog:innen schwer. Dies zeigt sich nach Angaben der WHO vor allem bei LSILs und bei moderaten HSILs (CIN II) (WHO 2020). Die Hälfte der Biopsien, die zunächst als LSIL eingestuft werden, stellen sich bei einem zweiten Gutachten als gutartige entzündliche Plattenepithelien heraus (WHO 2020). Zum anderen beeinträchtigen entzündlich bedingte Epithelreaktionen die Unterscheidung zwischen einer HSIL und einer unreifen Metaplasie mit Atypie (Kamal 2022).

Darüber hinaus erschweren in einigen Läsionen Oberflächenveränderungen mit Koilozyten die Diagnostik (Kamal 2022). Die Läsionen mit einer ausreifenden CIN III haben die Diagnostik in dieser Studie erschwert, wodurch in 5 Cores (2,6 %) der 193 Cores (100 %) anhand der HE-Färbung keine abschließende Diagnosesicherung möglich war. Die Abgrenzung kann in diesen Cores mittels p16- oder MIB-1-Färbung erfolgen. Dabei spricht eine Expression von p16 oder MIB-1 in der gesamten Epithelhöhe für eine high-grade Läsion. Jedoch zeigten 6 Cores (9,8 %) mit einer CIN III keine p16-Expression. Darüber hinaus wiesen trotz eines fehlenden Dysplasienachweises in der HE-Färbung 8 Cores (16,7 %) eine schwache bzw. 1 Core (2,1 %) eine mäßiggradige Expression von p16 auf. Die Diskrepanz in den Färbeergebnissen, bei denen ein Ausfall der p16-Färbung in den hochgradigen Läsionen festgestellt wurde, könnte auf das Alter des Gewebes sowie eine herabgesetzte Immunreaktivität oder präanalytische Gewebeschädigung zurückzuführen sein. Auf die präanalytischen Gewebeschädigungen wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

4.2 Bedeutung der Präanalytik

Präanalytische Gewebeschäden sind multifaktoriell und können zu verfälschten immunhistochemischen Färberegebnissen führen. Es kommt zur Zerstörung des Antigens, wodurch das Binden des Antikörpers nicht mehr gewährleistet wird. Mit zunehmendem Grad der Dysplasie ist eine zunehmende MIB-1- und p16-Expression zu erwarten. Bei einer HSIL ist mit einer bandartigen p16- und MIB-1-Färbung bis in superfizielle Epithelschichten zu rechnen (Lin et al. 2003). Allerdings erscheint das Gewebe in einigen MIB-1- und p16-Färbungen der vorliegenden Studie artifiziell geschädigt. In einigen Gewebeproben wurde bei high-grade Läsionen eine fehlende p16- oder MIB-1-Expression insbesondere in den superfiziellen Epithelschichten beobachtet (Abbildung 248 + 249).

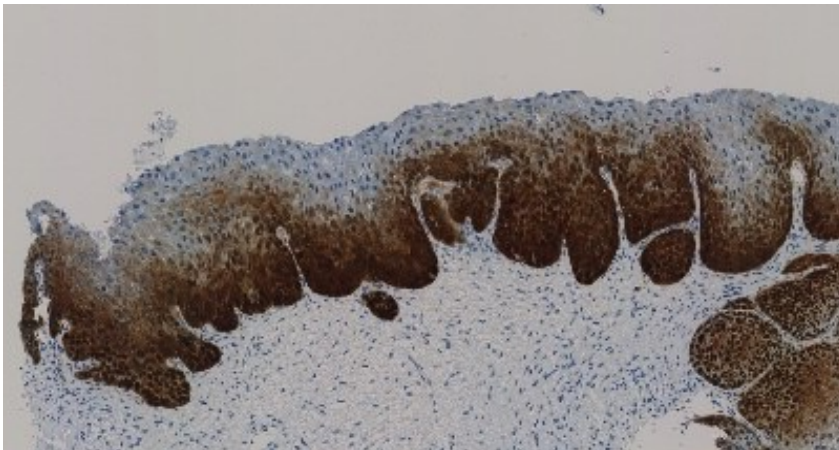


Abbildung 248: CIN III, ausbleibende p16-Expression in superfiziellen Epithelschichten. p16-Färbung, DAB, 20-fache Vergrößerung.

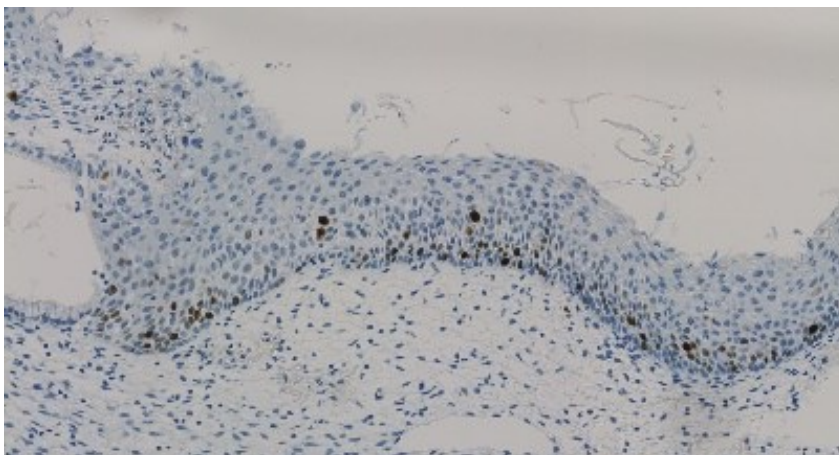


Abbildung 249: CIN III, ausbleibende MIB-1-Färbung in superfiziellen Epithelschichten. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.

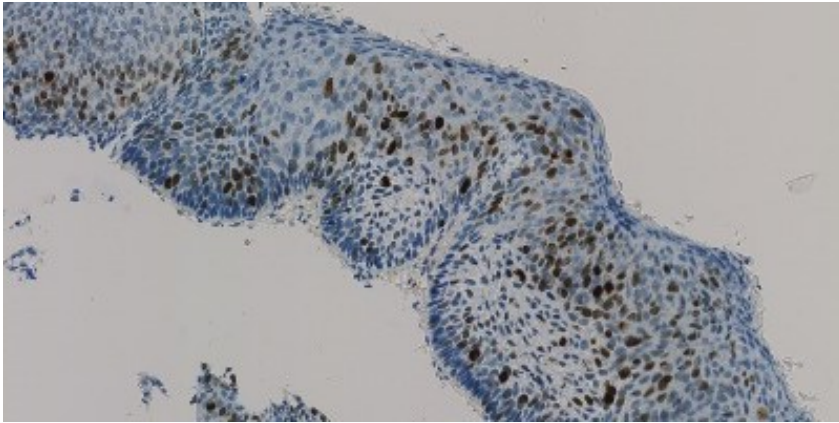


Abbildung 250: CIN III, Expressionsmuster einer MIB-1-Färbung bei CIN III, superfizielle Epithelschicht gefärbt. MIB-1-Färbung, DAB, 30-fache Vergrößerung.

Eine mögliche artifizielle Gewebsschädigung in dieser Studie könnte durch die Essigsäure entstehen, welche in der Gynäkologie bei der kolposkopischen Untersuchung der Cervix auf das Cervixepithel aufgetragen wird (WHO 2020). Inwieweit die Gewebeproben dieser Studie eine Essigsäurebehandlung erhielten, ließ sich nicht eruieren; es ist jedoch davon auszugehen. Ferner beschreibt Curiel-Valdés, dass es darüber hinaus bei der anschließenden Probenentnahme (z.B. Gewebsquetschung durch Pinzetten) und der Konservierung zu Fehlern kommt, die die Qualität der Proben beeinflusst (Curiel-Valdés 2002). Bei der Konservierung des Gewebes können sowohl eine Unterfixierung als auch eine Überfixierung ursächlich für eine herabgesetzte Immunogenität sein. Wenn das Gewebe nicht ausreichend fixiert ist, kommt es zur Autolyse des Gewebes und damit zur Antigenzerstörung. Bei der Fixierung des Gewebes mit Formalin werden Proteine quervernetzt und damit denaturiert. Bei einer Überfixierung wird durch das Formalin die Immunogenität der Zielstruktur verändert, sodass diese vom Antikörper nicht mehr detektiert werden kann. Der Großteil der in dieser Studie verwendeten Gewebeproben stammte aus dem Jahr 2002. Eine weitere Ursache für das Ausfallen einer immunhistochemischen Färbung in dieser Studie könnte das Alter des Gewebes sein, da auch in einem Paraffinblock insbesondere bei unsachgemäßer Lagerung (z.B. zu hohe Luftfeuchtigkeit) eine Gewebsalterung mit Verlust der Antigenität eintreten kann. Die in dieser Studie zumeist kräftige Expression von p16 in den HPV-assoziierten Dysplasien spricht für eine erhaltene Immunogenität des untersuchten Gewebes.

4.3 Wechselwirkung zwischen dem HPV Onkoprotein E6 und dem Tumorsuppressorprotein p53 und daraus resultierender Einfluss auf die IHC

Der Einfluss präanalytischer Gewebeschädigungen und die damit verbundene mögliche herabgesetzte Immunogenität des Gewebes wurde im vorangegangenen Kapitel (Kapitel 4.2) beschrieben. Ferner weist der Biomarker p53 eine Heterogenität in der Expression auf (Remotti 2013). Somit kann es sowohl durch präanalytische Gewebeschädigungen als auch durch die Heterogenität des Biomarkers p53 zu einem Ausfallen der immunhistochemischen Färbung kommen.

Neben diesen Ursachen für eine fehlende Expression des Biomarkers p53 kann die Wechselwirkung des HPV-Onkoproteins E6 mit dem Tumorsuppressorprotein p53 für eine ausbleibende Färbereaktion verantwortlich sein. Das HPV Onkoprotein E6 bildet einen Komplex mit der Ubiquitinligase E6AP (Harden & Munger 2017). Dieser Komplex bindet spezifisch an das Tumorsuppressorprotein p53, wodurch es zu einem Ubiquitin-abhängigen proteolytischen Abbau von p53 kommt (Scheffner et al. 1993). Es wäre möglich, dass in den Cores, in denen keine Expression von p53 nachgewiesen wurde, E6 den Tumorsuppressor p53 abgebaut hat. Von diesem Zusammenhang und der Möglichkeit eines indirekten Nachweises von E6 durch p53 berichten Aco-Tlachi et al. in ihrer Studie (Aco-Tlachi et al. 2018).

In der vorliegenden Studie wurde bei 25 Cores (13 %) der 193 auswertbaren Cores (100 %) eine ausbleibende p53-Expression bei Vorliegen eines HR-HPV-Typs im Gewebe nachgewiesen. Allerdings lässt sich nicht abschließend klären, ob E6 den Tumorsuppressor p53 abgebaut hat. Eine p53-Mutation könnte - wenngleich wenig wahrscheinlich - ebenso Ursache für eine fehlende Expression sein. Demgegenüber stehen in der vorliegenden Studie 148 Cores (76,7 %), in denen eine dem p53-Wildtyp entsprechende Färbung nachgewiesen wurde. In 8 Cores (4,1 %) war keine sichere Einschätzung der Färbung möglich. In den übrigen 12 Cores (6,2 %) war keine Auswertung aufgrund von fehlendem Epithel möglich.

Die Hypothese, dass eine fehlende p53-Expression in den Basalzellen bei nachgewiesener HPV-Infektion ein Surrogatmarker für die Überexpression von E6 sein könnte, kann mit letzter Sicherheit erst nach dem Ausschluss einer Mutation im *TP53*-Gen bewiesen werden. Bei der vorliegenden Studie wurde keine molekulare Untersuchung der Gewebeproben auf eine p53-Mutation durchgeführt. Die ausfallende Färbung einzelner Gewebeproben kann daher nicht mit Sicherheit einem proteolytischen Abbau von p53 zugeordnet werden.

4.3.1 Relevanz der Gewebeherkunft bei der p53-Expression

Die Tumorgenese von vulvären intraepithelialen Neoplasien (VIN) kann über zwei verschiedene Signalkaskaden vorangetrieben werden kann. Zum einen kann eine VIN HPV-getrieben sein, zum anderen durch eine Mutation im p53-Gen (Woelber et al. 2021). In dieser Studie wurden insgesamt 6 Cores von intraepithelialen Neoplasien der Vulva untersucht. In allen Fällen wurde ein dem p53-Wildtyp entsprechendes Expressionsmuster beobachtet. Die in der vorliegenden Studie ausgewerteten VINs wurden mittels PCR-Analyse positiv auf HPV getestet, wodurch von einer durch HPV-getriebenen Dysplasie ausgegangen werden kann.

4.4 Antikörper

In der Literatur finden sich nur wenige Studien, in denen die Detektion der HPV-Onkoproteine E6 und E7 mittels Immunhistologie (IHC) erfolgte (Lifsics et al. 2021). Eine Etablierung der in diesen Studien verwendeten Antikörper in der pathohistologischen Routinediagnostik ist bislang nicht erfolgt. Laut Wentzensen wird die Entwicklung von Anti-E6- und Anti-E7-Antikörpern durch die geringe Immunogenität von E6 und E7 erschwert (Wentzensen 2011). Der Goldstandard zum Nachweis dieser Onkoproteine ist die in situ Hybridisierung (ISH) (Outh-Gauer et al. 2019), welche jedoch im Gegensatz zur Immunhistologie deutlich teuer ist und nicht in jedem pathohistologischen Routinelabor zur Verfügung steht. Um das Problem des direkten immunhistochemischen E6- und E7-Nachweises zu umgehen, wird in der pathohistologischen Routinediagnostik eine immunhistologische Bestimmung des Tumorsuppressorproteins p16 durchgeführt, welches somit als Surrogatmarker für E7 verwendet wird.

Eine Überexpression von E7 in Epithelzellen lässt auf eine HPV-Infektion schließen. Einschränkend muss hierbei jedoch beachtet werden, dass eine p16-Überexpression auch ohne eine HPV-Infektion und somit ohne eine Überexpression von E7 auftreten kann (De Wispelaere et al. 2022). Um das Problem der Unspezifität einer p16-Überexpression durch den direkten Nachweis von HPV E6 und E7 zu lösen, wurden in dieser Studie 2 verschiedene Antikörper gegen E6 und ein Antikörper gegen E7 auf ihre Spezifität und Anwendbarkeit in der histopathologischen Routinediagnostik (formalinfixiertes paraffiniertes Gewebe, routinemäßig eingesetzte Reagenzien zur Vorbehandlung und Signaldetektion in der IHC) getestet. Ferner wurde ein Antikörper zum Nachweis des L1-Hauptkapsidproteins von HPV an den Studien-TMAs untersucht. Da die bislang verfügbaren Antikörper für E6, E7 und L1 laut Herstellerangaben HPV-Typ-spezifisch binden (siehe Tabelle 7 – 9), sollte insbesondere in dieser Studie auch auf die Reaktion der Antikörper mit den HPV-Typen geachtet werden, für welche die Antikörper zur Zeit nicht validiert sind.

4.4.1 Antikörperklon C1P5

Stiasny et al. konnten mit dem Antikörperklon C1P5 der Firma abcam am formalinfixierten paraffinierten Gewebe von cervicalen intraepithelialen Neoplasien und Carcinomen reproduzierbar und spezifisch HPV-E6 nachweisen (Stiasny et al. 2016). Im Gegensatz zur Publikation von Stiasny et al., in der im Materialteil nur von in der Studie untersuchten HPV-positiven Gewebeproben ohne nähere HPV-Typ-Angabe berichtet wird, ist der Antikörperklon C1P5 laut Hersteller nur für die high risk HPV-Typen 16 und 18 validiert. Da somit ein anscheinend gut funktionierender Antikörper zum HPV-E6-Nachweis für die HPV-Typen 16 und 18 vorhanden war, sollte in dieser Studie insbesondere das Färbeverhalten von C1P5 bei anderen HPV-Typen untersucht werden. Im besten Fall hätte der Antikörper auch das HPV-E6-Protein anderer HPV-Typen erkannt, wodurch ein Typ-unabhängiger immunhistochemischer und damit kostengünstiger HPV-Nachweis mit der Möglichkeit einer Risikoabschätzung für die Progression einer Dysplasie zum Carcinom möglich gewesen wäre. Der Surrogatmarker p16 hätte somit durch C1P5 ersetzt werden können.

Ferner sollte das Färbeverhalten von C1P5 unter routinemäßigen Vorbehandlungsbedingungen bei automatisierter immunhistochemischer Färbung (Roche/Ventana stainer) untersucht werden.

Vor Anwendung des Antikörpers am Studienmaterial wurde der Antikörper C1P5 an einem Kontroll-Tissue Microarray (TMA) mit verschiedenen Vorbehandlungen (Pronase, CC1, CC2) und Verdünnungen (1:25, 1:100, 1:200, 1:300) ausgetestet. Dieser Kontroll-TMA beinhaltete definierte HPV 16-, HPV 18-, HPV 56-positive und HPV-negative Plattenepithel- und Adenocarcinome der Cervix. Im Gegensatz zu Stiasny et al. konnte jedoch bei ausgeprägter unspezifischer stromaler Färbung - möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Vorbehandlungen und Detektionssysteme - keine gesicherte spezifische Färbung erlangt werden. In der Studie von Stiasny et al. wurde das Detektionssystem Zytochem-Plus HRP Polymer-Methode von Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland, verwendet (Stiasny et al. 2016). Es wird beschrieben, dass dieses Kit durch endogenes Biotin eine unspezifische Hintergrundfärbung umgeht (Stiasny 2018).

Stiasny färbte mit einer Verdünnung von 1,000 mg/ml das zu untersuchende Gewebe per Hand (Stiasny 2018). In dieser Studie erfolgte die immunhistochemische Färbung mit Vorbehandlung, Inkubation des Antikörpers und Detektion (OptiView DAB IHC Detection Kits; indirekte, biotinfreie Methode) im vollautomatischen Immunostainer BenchMark ULTRA (Ventana). Dieses Detection Kit zeichnet sich durch eine sehr starke Signalamplifikation aus. Neben der Austestung an dem Kontroll-TMA erfolgte der Einsatz des C1P5 auch an formalinfixierten und paraffinierten Zellblöcken von HeLa- (HPV 18-positives Plattenepithelcarcinom der Cervix), SKBR3- (HPV-negatives Mammacarcinom) und MCF7- (HPV-negatives Mammacarcinom) Zelllinien unter CC1-Vorbehandlung und einer Verdünnung von 1:100. Alle Zelllinien zeigten eine starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung, welche wiederum als unspezifisch gewertet werden muss. Um den Antikörper C1P5 noch an weiteren Gewebeproben von cervicalen und vulvären intraepithelialen Neoplasien (CIN, VIN) und an Cervixcarcinomen zu testen, wurden die Schnitte der Studien-TMAs 1 – 6 ebenfalls bei Vorbehandlung mit CC1 und einer Verdünnung von 1:100 gefärbt.

Auch hier zeigte sich eine ausgeprägt unspezifische Färbung der Epithelzellen und des Stromas. Aufgrund der schlechten Färbeergebnisse, die im Widerspruch zur Literatur standen, wurde der Hersteller kontaktiert und mit den vorliegenden Daten konfrontiert. Nach Aussage der Firma abcam war zwischenzeitlich sowohl die Produktion als auch der Vertrieb des Antikörperklons C1P5 wegen nicht zufriedenstellender Performance eingestellt worden (persönliche Kommunikation mit abcam, Juli 2023).

Als Entschädigung für den, zumindest unter Routinebedingungen nicht funktionierenden gekauften Antikörperklon C1P5 wurden von der Firma abcam die Antikörperklone BF7, 8E2 und K1H8 für weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

4.4.2 Antikörperklon BF7

Der Antikörperklon BF7 soll gemäß der Herstellerangaben (Firma abcam) spezifisch das HPV 18-E6-Protein bei Westernblot-, Radio-Immunoassay- und Elisa-Analysen nachweisen. Eine Anwendung des BF7-Klons in der Immunhistologie war bislang laut Hersteller nicht erfolgt.

Zur Etablierung von BF7 in der pathohistologischen Routinediagnostik wurde der Antikörper mit verschiedenen Verdünnungen (1:25, 1:100, 1:200, 1:500) bei Vorbehandlung mit CC1 (Roche/Ventana) am Kontroll-TMA und an den Zelllinien ausgetestet. Eine sehr schwache zytoplasmatische Färbereaktion in Carcinomzellen zeigte sich nur mit der Verdünnung 1:25 in einem HPV 18-infizierten Adenocarcinom und in einem HPV-negativen Plattenepithelkarzinom. Jedoch fand sich auch eine sicher unspezifische Reaktion im Stroma der untersuchten Gewebe. Die HeLa-Zelllinie, welche als Positivkontrolle für BF7 vorgesehen war, zeigte keinerlei Reaktion bei den verschiedenen Verdünnungsstufen. Die Schnitte der Studien-TMAs 1 – 6 wurden ebenfalls mit CC1 vorbehandelt und mit BF7 in einer Verdünnung von 1:100 überschichtet. Nur 1 Core von 192 Cores zeigte eine schwache nukleäre Färbereaktion. Unspezifische Färbungen fanden sich in 3 Cores.

BF7 erscheint zumindest unter Verwendung dieser immunhistochemischen Färbeprotokolle insbesondere bei HPV 18 als nicht geeignet für den routinemäßigen Einsatz zum Nachweis von HPV E6 und ist somit nicht geeignet als Ersatz für p16.

4.4.3 Antikörperklon 8E2

Der Antikörperklon 8E2 soll gemäß der Herstellerangaben (Firma abcam) spezifisch das HPV 18-E7-Protein bei Western-Blot- und Elisa-Analysen sowie bei der Immunpräzipitation und der Immunzytochemie nachweisen. So konnte Aco-Tlachi et al. mittels des Antikörperklons 8E2 in einer Western-Blot-Analyse das E7-Protein in HeLa-Zellen detektieren (Aco-Tlachi et al. 2018). Bei der Untersuchung der in der vorliegenden Studie eingesetzten Zelllinien zeigten die HeLa-Zellen in allen Verdünnungsstufen (1:25, 1:100, 1:200, 1:500) eine starke zytoplasmatische Färbereaktion unter Vorbehandlung mit CC1. Bei den Verdünnungen 1:25 und 1:100 fand sich eine teilweise kräftige nukleäre und zytoplasmatische Anfärbung der SKBR3- und MCF7-Zelllinien. Bei höheren Verdünnungen zeigte sich diese unspezifische Reaktion nicht mehr.

In der Studie von Sun et al. wurde mit dem Antikörperklon 8E2 das HPV 18-E7-Protein unter anderem mittels Immunhistochemie nachgewiesen (Sun et al. 2021). Bei Anfärbung der Schnitte des Kontroll-TMAs der vorliegenden Studie unter Vorbehandlung mit CC1 konnte in allen Verdünnungen (1:25, 1:100, 1:200, 1:500) im von HPV 18 befallenen Epithel eine Färbereaktion erreicht werden. Bei den Verdünnungen 1:25 und 1:100 konnte in mit HPV 16 und HPV 56 infiziertem Epithel eine schwache Färbung erzielt werden. Jedoch zeigte sich auch bei diesen Verdünnungen eine schwache stromale Färbereaktion, so dass ein spezifischer HPV-Nachweis wohl erst ab einer Verdünnung von 1:200 und nur für HPV 18 gelingt. Das in allen Verdünnungsstufen mit 8E2 positive, jedoch HPV-negative Adenocarcinom lässt jedoch an einer spezifischen Darstellung von HPV 18-E7 zweifeln. Eine falsch negative PCR bei der damaligen routinemäßigen HPV-Typisierung z.B. aufgrund eines neuen mittels PCR noch nicht detektierbaren HPV-Typs kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Die Schnitte der Studien-TMAs 1 – 6 wurden ebenfalls mit CC1 vorbehandelt und mit dem Antikörperklon 8E2 in einer Verdünnung von 1:100 gefärbt. In 12 von 13 HPV 18-positiven dysplastischen oberflächlichen Plattenepithelien konnte mittels 8E2 eine Färbereaktion gefunden werden.

Die HPV-Typen 2, 6, 11, 16, 31, 33, 35, 44, 45, 56, 58, 62, 64, 66, 70, 73, 83, 91 zeigten ebenfalls eine positive, jedoch überwiegend im Vergleich zu HPV 18 deutlich schwächere zytoplasmatische und/oder nukleäre Anfärbung. Bei diesen Gewebeproben fanden sich aber auch Färbereaktion im Stroma, sodass die Spezifität der epithelialen Anfärbung in Zweifel gezogen werden muss.

Shi et al. berichtet in seiner Studie über ein Gemisch aus monoklonalen E7-Antikörpern, welche mittels Gewebeschnitten verschiedener cervicaler Läsionen immunhistochemischer Färbung getestet wurde (Shi et al. 2018). Nach Shi et al. wurden E7-Proteine der high-risk HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58 und 59 mit hoher Spezifität detektiert und wiesen ein ähnliches Expressionsmuster wie die p16-Immunfärbung auf (Shi et al. 2018). Somit könnte laut Shi et al. das HPV E7-Protein ein geeigneter Biomarker bei HPV-Infektionen darstellen (Shi et al. 2018). Der von Shi et al. beschriebene Antikörper-Cocktail kann bislang leider nicht kommerziell erworben werden. Anfragen bei den Firmen Roche und abcam verliefen negativ (persönliche Kommunikation, September 2023). Eine Kontaktaufnahme per E-mail mit dem Senior-Autor der Arbeit, Hr. Dr. Xiaojia Chang, gelang nicht, obwohl die E-mail anscheinend ihr Ziel erreichte und nicht zurückgeschickt wurde (Kontaktanfrage, August 2023). Somit konnte dieser Cocktail leider nicht im Rahmen dieser Arbeit ausgetestet werden.

4.4.4 Antikörperklon K1H8

Der Antikörperklon K1H8 soll gemäß der Herstellerangaben (Firma abcam) spezifisch das HPV-Hauptkapsidprotein L1 der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 51, 52, 56 und 58 bei immunhistochemischen Untersuchungen nachweisen. Für die Detektion von Virusproteinen werden Sequenzhomologien der Proteine zwischen den verschiedenen HPV-Typen genutzt (Resnick et al. 1990; Sotlar 2008). K1H8 detektiert ein nicht-konformationelles internes lineares Epitop von L1, wodurch die Detektion verschiedener HPV-Typen möglich wird (Iwasaki et al. 1992).

Da es sich bei dem Antikörperklon K1H8 um einen vorverdünnten ready-to-use Antikörper handelt, wurde der Antikörperklon nicht in weiteren Verdünnungen getestet. Bei der Untersuchung der in der vorliegenden Studie eingesetzten Zelllinien zeigten weder die HeLa-Zellen, noch die SKBR3- und MCF7-Zellen eine Färbereaktion unter Vorbehandlung mit CC1. Dies lässt darauf schließen, dass der K1H8-Antikörper möglicherweise zumindest bei diesem Färbeprotokoll nicht für eine spezifische Darstellung von L1 geeignet ist.

Ferner wurde der Antikörperklon K1H8 an einem TMA mit malignen Mesotheliomen unter Vorbehandlung mit CC1 in der vom Hersteller vorgegebenen Verdünnung getestet. Bei 16 von 17 Cores, die untersucht wurden, konnten spärliche freiliegende braune Granula und/oder eine schwach zytoplasmatische Färbung in Mesotheliomzellen beobachtet werden. Die Färbung in den Mesotheliomzellen spricht gegen eine Spezifität des Antikörperklons K1H8, da eine Infektion der Mesotheliomzellen mit HPV ausgeschlossen werden kann.

Die Schnitte der Studien-TMAs 1 – 6 wurden ebenfalls mit CC1 vorbehandelt und mit dem Antikörperklon K1H8 in der vom Hersteller vorgegebenen ready-to-use Verdünnung gefärbt. In nur 56 Cores (31,1 %) der 180 Cores (100 %) konnte eine epitheliale Färbung erzielt werden, wobei die Mehrzahl der angefärbten Epithelien eine nur schwache Färbung aufwiesen.

In der Studie von Iwasaki et al. wurde der Antikörperklon K1H8 entwickelt und in insgesamt 68 Biopsien des weiblichen Genitaltraktes, bei denen es sich um Condylomata acuminata und koilozytäre Läsionen mit oder ohne Dysplasien handelte, untersucht (Iwasaki et al. 1992). Das Hauptkapsidprotein L1 der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 51, 52, 56 und 58 wurde mittels IHC in 62 % nachgewiesen (Iwasaki et al. 1992). Die für das Antigen positiven Zellen zeigten immer eine koilozytäre Veränderung; viele koilozytäre Zellen waren jedoch negativ (Iwasaki et al. 1992). Die Lokalisation des Antigens wurde in der Studie von Iwasaki et al. überwiegend im Zellkern, weniger im Zytoplasma und in den oberflächlichen und mittleren Epithelschichten beobachtet (Iwasaki et al. 1992).

In der Studie von Alshenawy wurde mittels IHC die Expression von p16, Ki-67 und HPV-L1 (mittels des Antikörperklons K1H8) miteinander verglichen (Alshenawy 2014). Die Expression sollte mit dem Grad der Dysplasie in intraepithelialen Läsionen der Cervix in Zusammenhang gestellt werden, um möglicherweise einen Surrogatmarker für die Progression von cervicalen intraepithelialen Läsionen und Cervixcarcinomen zu entwickeln (Alshenawy 2014). Nach Alshenawy wurde - wie auch in der Studie von Iwasaki et al. - in den Zellen der oberen Epithelschichten eine Färbung nachgewiesen, während in der basalen und parabasalen Epithelschicht keine Färbung festgestellt werden konnte (Alshenawy 2014).

Während in HPV 16-infizierten Läsionen, die aktiv Viren produzieren, die Expression der Onkoproteine E6 und E7 gleichmäßig im gesamten infizierten Epithel erfolgt, nimmt die Expression des Hauptkapsidproteins L1 in den suprabasal gelegenen Zellen deutlich zu (Laimins 1996; Przybylski et al. 2023). Aufgrund der Erkenntnisse aus der Studie von Iwasaki et al. und Alshenawy war daher mit einer Expression in der oberflächennahen Epithelschichten zu rechnen.

Die Expression in den oberflächennahen Epithelschichten konnte in der vorliegenden Studie bei 15 Cores der TMAs 1 – 6 bei der Färbung mit dem Antikörperklon K1H8 nachgewiesen werden. In den übrigen 41 Cores, die eine epitheliale Anfärbung zeigten, wurde entweder eine Färbung nur in der basalen Epithelschicht oder sowohl in superfiziellen als auch basalen Epithelschichten nachgewiesen.

Nach Alshenawy werden die Kapsidproteine L1 und L2 nach deren Biosynthese im Zytoplasma in den Zellkern transloziert, womit der Nachweis von L1 im Zellkern erklärt werden kann (Alshenawy 2014). In der vorliegenden Studie wurde in 41 der 56 Cores eine nukleäre Färbung im Epithel beobachtet. In lediglich 9 Cores wurde eine rein zytoplasmatische Färbung nachgewiesen. In den übrigen 6 Cores wurde sowohl eine zytoplasmatische als auch eine nukleäre Färbung detektiert.

Der Schweregrad einer Dysplasie hängt von der Verteilung der viralen Genprodukte im Epithel und von der Fähigkeit des Virus ab, den Produktionszyklus vollständig abzuschließen (Middleton et al. 2003). Die Vollendung des viralen Lebenszyklus wird bei der produktiven Infektion durch die Expression der Kapsidproteine L1 und L2 und einer gesteigerten Expression des E4-Virusproteins möglich (Alshenawy 2014; Sotlar 2008). Der virale Lebenszyklus wird in Zellen, in denen L1 nachgewiesen wird, als abgeschlossen bezeichnet (Alshenawy 2014). Nach Alshenawy nahm die Expression des HPV-Hauptkapsidproteins L1 mit zunehmendem Dysplasiegrad ab (Alshenawy 2014).

In der Studie von Przybylski et al. wurde ebenfalls beobachtet, dass bei Patientinnen mit einem molekularen HPV-Nachweis ohne cervicale Läsionen ein höherer L1-Spiegel gemessen wurde als bei Patientinnen mit einer LSIL (CIN I) und einer HSIL (CIN II) (Przybylski et al. 2023). Der Grund hierfür könnte sein, dass die DNA-Sequenzen der Proteine L1 und E1 häufig bei der Integration in das Wirtsgenom verloren gehen (Williams, Kostiuik & Biron 2022).

In der Studie von Bin et al. wurde gezeigt, dass der Dysplasiegrad bei Fehlen von L1 zunimmt (Bin et al. 2013). Bin et al. zeigte somit eine negative Korrelation der L1-Expression mit dem Grad der Läsion (Bin et al. 2013). Dies unterstützt die Hypothese von Przybylski et al., dass bei erhöhter L1-Expression die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer Epitheldysplasie und das Fortschreiten der Dysplasie in ein invasives Carcinom verringert ist (Przybylski et al. 2023).

Ein dementsprechender Zusammenhang konnte mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten Gewebe bei der angewandten Methodik nicht festgestellt werden. So zeigten die einzigen zwei Gewebe mit starker Expression von L1 bei molekularem Nachweis einer HPV 18-Infektion eine CIN III. Anhand der Erkenntnisse der oben genannten Studien von Bin et al. und Przybylski et al. wäre bei einer HSIL nicht mit einer derartigen Expression zu rechnen. Es kann lediglich vermutet werden, dass in den K1H8 exprimierenden high-grade Läsionen der vorliegenden Studie eine produktive HPV-Infektion vorlag, womit eine derartige Expression von L1 erklärt werden könnte. Während der Großteil der Carcinome keine Färbung aufwies, zeigte ein Carcinom der insgesamt 6 Carcinome eine Färbereaktion.

In 124 der 180 Cores zeigte sich bei der Färbung mit dem Antikörperklon K1H8 keine Färbereaktion. In diesen Cores könnte das Gewebe in einer Phase der Infektion gewesen sein, in der noch kein L1 exprimiert wird oder bei erfolgter Integration des Virusgenoms ins Wirtsgenom die für das L1-Protein kodierende DNA verloren ging. Eine weitere Ursache für das Ausbleiben der Färbung könnte eine der im Kapitel 4.2 beschriebenen präanalytischen Gewebeschädigungen sein.

Ferner ließ sich kein Unterschied im Färbeverhalten der Proben, die mit einem vom Hersteller validierten HPV-Typ infiziert waren und den HPV-Typen, die nicht validiert waren, erkennen. Neben den vom Hersteller validierten HPV-Typen färbte der Antikörperklon K1H8 auch die HPV-Typen 2a, 35, 62, 64, 73, 91 sowie einen neuen, damals mittels PCR identifizierbaren, jedoch noch nicht offiziell klassifizierten HPV-Typ.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Studie in 4 von 9 Cores ohne molekularen HPV-Nachweis eine Färbung nachgewiesen. Eine falsch negative PCR bei der damaligen routinemäßigen HPV-Typisierung z.B. aufgrund eines neuen mittels PCR noch nicht detektierbaren HPV-Typs kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Für die immunhistochemische Routinediagnostik scheint der Antikörperklon K1H8 nicht hilfreich zu sein, da damit nicht alle durch HPV entstandenen Dysplasien und Carcinoma nachgewiesen werden können. Im Gegensatz dazu liefert p16 zuverlässigere Ergebnisse. Alshenawy kommt zu dem Schluss, dass der Nachweis von HPV-L1 mit dem Antikörperklon K1H8 nur in Ergänzung zu p16 und MIB-1 eine genauere Diagnostik und Prognose erlaubt (Alshenawy 2014). Przybylski et al. kommt zu einem ähnlichen Ergebnis: Die Untersuchung der L1-Expression bietet lediglich eine Einstufung der Progressionswahrscheinlichkeit cervicaler Läsionen (Przybylski et al. 2023).

Abschließend lässt sich festhalten, dass K1H8 in der vorliegenden Studie lediglich wenige Zellen bei manchen Geweben gefärbt hat und sich somit eine routinemäßige Anwendung als Ersatz für p16 verbietet. Jedoch könnte die Anwendung von K1H8 in koilozytären nicht dysplastischen Epithelveränderungen sinnvoll sein, in denen p16 noch nicht exprimiert wird.

4.4.5 Vergleich der Antikörperklone C1P5, BF7, 8E2 und K1H8 mit der p16-Expression

p16 dient, wie in Kapitel 1.4.4.2 beschrieben, als Surrogatmarker für HPV (Hoehn et al. 2021). Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargelegt, konnte keiner der getesteten Antikörperklone den in der histopathologischen Routine weltweit eingesetzten p16-Biomarker ersetzen.

5 Zusammenfassung

Humane Papillomaviren (HPV) sind in den meisten Cervixcarcinomen und in deren Vorstufen - der cervicalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) und dem Adenocarcinoma in situ (AIS) - nachweisbar. Es wird zwischen high-risk (HR) und low (LR)-risk HPV-Typen unterschieden. Die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer Epitheldysplasie im Sinne einer CIN und eines AIS und für das Fortschreiten dieser Präkanzerosen in ein invasives Carcinom (Progressionswahrscheinlichkeit) ist bei einer Infektion mit einem HR-HPV-Typ im Vergleich zu einem LR-HPV-Typ deutlich erhöht. Dabei spielen die viralen Onkoproteine E6 und E7 eine maßgebliche Rolle in der malignen Transformation. Zum Nachweis einer HPV-Infektion kann auch das HPV-Hauptkapsidprotein L1 bestimmt werden. In der histopathologischen Routinediagnostik der CINs wird jedoch bislang nur das p16-Protein als Surrogatmarker für eine HPV-Infektion verwendet.

Ziel dieser Studie war die Etablierung eines routinemäßigen immunhistochemischen Nachweises der HPV-Onkoproteine E6 und E7 und des HPV-Hauptkapsidproteins L1 am formalinfixierten paraffinierten Gewebe, um den HPV-unspezifischen immunhistochemischen p16-Nachweis abzulösen. Ferner sollte geprüft werden, ob die Antikörper auch bei anderen als den bislang von den Herstellern angegebenen und in der Literatur beschriebenen HPV-Typen binden.

Hierzu wurden ein Kontroll-TMA und 21 Studien-TMAs mit insgesamt 598 Gewebestanzylindern (Cores) erstellt. Die Antikörperklone C1P5 (HPV 16-/18-E6), BF7 (HPV 18-E6), 8E2 (HPV 18-E7) und K1H8 (HPV 6-/ 11-/ 16-/ 18-/ 31-/ 33-/ 42-/ 51-/ 52-/ 56-/ 58-L1) wurden an Paraffinschnitten von drei Carcinomzelllinien (HeLa, SKBR3, MCF7), dem Kontroll-TMA und 6 der 21 Studien-TMAs mit insgesamt 118 CINs und 18 Cervixkarzinomen ausgetestet. Bis auf eine Gewebeprobe konnte der Erhalt der Antigenität mittels p16-, MIB-1- und p53-Immunhistologie bestätigt werden.

Trotz Austestung des Antikörperklons C1P5 mit unterschiedlichen immunhistochemischen Färbeprotokollen (z.B. Vorbehandlung mit Pronase, Ventana/Roche CC1) und unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen konnte keine sichere Detektion des HPV-E6-Proteins nachgewiesen werden, da der Antikörper nicht nur dysplastisches oder carcinomatöses Epithel, sondern auch mesenchymale Gewebsanteile anfärbte. Aus diesem Grund wurden die immunhistochemischen Untersuchungen nach Auswertung der Carcinomzelllinien, des Kontroll-TMAs und 6 der 21 Studien-TMAs abgebrochen. Aufgrund der schlechten Färberegebnisse wurde der Hersteller kontaktiert und mit den vorliegenden Daten konfrontiert. Nach Aussage der Firma abcam war zwischenzeitlich sowohl die Produktion als auch der Vertrieb des Antikörperklons C1P5 wegen nicht zufriedenstellender Performance eingestellt worden (persönliche Kommunikation mit abcam, Juli 2023).

Trotz Austestung des Antikörperklons BF7 bei CC1 Vorbehandlung in unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen zeigte sich keine sicher verwertbare Färbereaktion insbesondere auch bei HPV 18 positiven Geweben.

Ab einer Verdünnung von mindestens 1:200 und einer CC1-Vorbehandlung zeigte der Antikörperklon 8E2 eine spezifisch erscheinende Färbereaktion in der HeLa-Zelllinie im Gegensatz zu den Mammacarcinomzelllinien SKBR3 und MCF7. Es fiel auf, dass mit Ausnahme von einem Core in den HPV 18 positiven oberflächlichen Plattenepithelien eine Färbereaktion mittels 8E2 nachgewiesen werden konnte. Die HPV-Typen 2, 6, 11, 16, 31, 33, 35, 44, 45, 56, 58, 62, 64, 66, 70, 73, 83, 91 zeigten ebenfalls eine positive, jedoch überwiegend im Vergleich zu HPV 18 deutlich schwächere zytoplasmatische und/oder nukleäre Anfärbung. Bei diesen Gewebeproben fanden sich aber auch Färbereaktionen im Stroma, sodass die Spezifität der epithelialen Anfärbung in Zweifel gezogen werden muss. Aufgrund der stark variierenden Färberegebnisse und den unspezifischen Färbungen kann lediglich spekuliert werden, ob der Antikörperklon in einigen Fällen bei der in dieser Studie verwendeten Gewebeproben mit der angewandten Methodik valide Ergebnisse geliefert hat.

Der Antikörperklon K1H8 wurde bei CC1 Vorbehandlung in der vom Hersteller vorverdünnten Konzentration an den Carcinomzelllinien, einem TMA mit malignen Mesotheliomen und den 6 Studien-TMAs ausgetestet. Für die immunhistochemische Routinediagnostik scheint der Antikörperklon K1H8 nicht hilfreich zu sein, da damit nicht alle durch HPV entstandenen Dysplasien und Carcinome nachgewiesen werden konnten und zumindest unter dem in der vorliegenden Studie verwendeten Färbeprotokoll eine Färbereaktion in mesenchymalen Gewebeanteilen nachgewiesen werden konnte, wodurch die Spezifität von K1H8 in Frage gestellt werden muss. Im Gegensatz dazu liefert p16 zuverlässigere Ergebnisse. Jedoch könnte die Anwendung von K1H8 in koilozytären nicht dysplastischen Epithelveränderungen sinnvoll sein, in denen p16 noch nicht exprimiert wird.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich keiner der getesteten Antikörper zumindest mit den in dieser Studie angewandten Färbeprotokollen für die Routinediagnostik eignet, um p16 als Surrogatmarker für eine HPV-Infektion abzulösen. Andere Untersuchungsmethoden, wie zum Beispiel die in situ-Hybridisierung (ISH), die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die reverse Transkriptase-(RT)-PCR sind somit zumindest bislang die besseren Methoden zum spezifischen Nachweis einer Infektion mit HPV, zur Identifizierung der spezifischen HPV-Typen und zur Beurteilung der Progressionswahrscheinlichkeit über die HPV-E6 und -E7-m-RNA, wobei diese Methoden deutlich kostenintensiver im Vergleich zur Immunhistologie sind. Auch die zuletzt genannten Methoden ersetzen jedoch nicht die HE-Färbung, welche nach wie vor am Anfang jeder routinemäßigen Dysplasie- und Carcinomdiagnostik steht. Der in der Studie von Shi et al. publizierte Antikörper-Cocktail zum Nachweis von HPV-E7 könnte in naher Zukunft den Surrogatmarker p16 ablösen. Allerdings ist dieser Antikörper-Cocktail bisher nicht kommerziell erhältlich, weswegen dieser Cocktail in dieser Studie auch nicht getestet werden konnte. Eine E-Mail zur Kontaktaufnahme mit dieser Arbeitsgruppe blieb unbeantwortet.

6 Literaturverzeichnis

- Aco-Tlachi M, Carreño-López R, Martínez-Morales PL, et al. Glycogene expression profiles based on microarray data from cervical carcinoma HeLa cells with partially silenced E6 and E7 HPV oncogenes. *Infect Agent Cancer*. 2018;13:25. doi: 10.1186/s13027-018-0197-2.
- Alshenawy HA. Evaluation of p16, human papillomavirus capsid protein L1 and Ki-67 in cervical intraepithelial lesions: potential utility in diagnosis and prognosis. *Pathol Res Pract*. 2014;210(12):916-21. doi: 10.1016/j.prp.2014.07.007.
- Alvarado-Cabrero I, Parra-Herran C, Stolnicu S, Roma A, Oliva E, Malpica A. The Silva Pattern-based Classification for HPV-associated Invasive Endocervical Adenocarcinoma and the Distinction Between In Situ and Invasive Adenocarcinoma: Relevant Issues and Recommendations From the International Society of Gynecological Pathologists. *Int J Gynecol Pathol*. 2021;40(Suppl 1):S48-S65. doi: 10.1097/PGP.0000000000000735.
- Anderson LA, O'Rourke MA, Wilson R, Jamison J, Gavin AT. Northern Ireland HPV Working Group. HPV prevalence and type-distribution in cervical cancer and premalignant lesions of the cervix: A population-based study from Northern Ireland. *J Med Virol*. 2016;88(7):1262-70. doi: 10.1002/jmv.24447.
- Arafah M, Rashid S, Tulbah A, Akhtar M. Carcinomas of the Uterine Cervix: Comprehensive Review With An Update on Pathogenesis, Nomenclature of Precursor and Invasive Lesions, and Differential Diagnostic Considerations. *Adv Anat Pathol*. 2021;28(3):150-170. doi: 10.1097/PAP.0000000000000300.
- AWMF. S3-Leitlinie Diagnostik Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom (2021). AWMF online. https://register.awmf.org/assets/guidelines/032-033OLk_S3_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_Zervixkarzinom_2022-03.pdf. Accessed Aug 24, 2023.
- Bachman J. Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR). *Methoden Enzymol*. 2013;530:67-74. doi: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6.
- Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol*. 1991;65(1):292-8. doi: 10.1128/JVI.65.1.292-298.1991.
- Basukala O, Banks L. The Not-So-Good, the Bad and the Ugly: HPV E5, E6 and E7 Oncoproteins in the Orchestration of Carcinogenesis. *Viruses*. 2021;13(10):1892. doi: 10.3390/v13101892.

- Beckmann MW, Stuebs FA, Vordermark D, Koch MC, Horn LC, Fehm T. The Diagnosis, Treatment, and Aftercare of Cervical Carcinoma. *Dtsch Arztebl Int.* 2021;118(47):806-812. doi: 10.3238/arztebl.m2021.0352.
- Bin H, Ruifang W, Ruizhen L, et al. Detention of HPV L1 Capsid Protein and hTERC Gene in Screening of Cervical Cancer. *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16(6):797-802. PMID: 23997907.
- Blum HE, Mueller-Wieland D. *Klinische Pathophysiologie.* 10. Aufl., Stuttgart: Thieme; 2018.
- Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway1. *Cancer Res.* 1996;56 (20): 4620–4624.
- Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell.* 1989;58(6):1097-105. doi: 10.1016/0092-8674(89)90508-4.
- Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology.* 2013;445(1-2):169-74. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.038.
- Buehling KJ, Lepenies J, Witt K. *Intensivkurs. Allgemeine und spezielle Pathologie,* 4. Aufl., München: Urban & Fischer; 2008.
- Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, et al. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2008;9(10):937-45. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70208-0.
- Cerny T., Karlin K (Hrsg.). *Patho Maps. klinisch-pathologische Uebersichtskarten,* 2. Aufl. Berlin: Springer; 2023.
- Chiesa-Vottero AG, Rybicki LA, Prayson RA. Comparison of proliferation indices in glioblastoma multiforme by whole tissue section vs tissue microarray. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(6):902-8. doi: 10.1309/8UAU-KFK3-NBDM-VTNU.
- Clarke MA, Cheung LC, Castle PE, et al. Five-Year Risk of Cervical Precancer Following p16/Ki-67 Dual-Stain Triage of HPV-Positive Women. *JAMA Oncol.* 2019;5(2):181-186. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4270.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003;88(1):63-73. doi: 10.1038/sj.bjc.6600688.

- Curiel-Valdés Jde J. Citología vaginal: la importancia de la zona de transformación y cómo obtener una muestra adecuada [Vaginal cytology: the importance of the transformation zone and how to obtain an adequate sample]. *Gac Med Mex.* 2002;138(3):259-65. PMID: 12096394.
- De Wispelaere N, Rico SD, Bauer M, et al. High prevalence of p16 staining in malignant tumors. *PLoS One.* 2022;17(7):e0262877. doi: 10.1371/journal.pone.0262877.
- Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis Markers.* 2007;23(4):297-313. doi: 10.1155/2007/613150.
- Dunne EF, Park IU. HPV and HPV-associated diseases. *Infect Dis Clin North Am.* 2013;27(4):765-78. doi: 10.1016/j.idc.2013.09.001.
- Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses.* 2015;7(7):3863-90. doi: 10.3390/v7072802.
- European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety, Karsa, L., Dillner, J., Suonio, E., et al., European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. *Publications Office.* 2015;2. doi: 10.2875/859507.
- Fedor HL, De Marzo AM. Practical methods for tissue microarray construction. *Methods Mol Med.* 2005;103:89-101. doi: 10.1385/1-59259-780-7:089.
- Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997;11(16):2090-100. doi: 10.1101/gad.11.16.2090.
- Gadducci A, Guerrieri ME, Cosio S. Adenocarcinoma of the uterine cervix: Pathologic features, treatment options, clinical outcome and prognostic variables, *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;135:103-114. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.01.006.
- Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol.* 1990;64(2):723-30. doi: 10.1128/JVI.64.2.723-730.1990.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133(4):1710-5.
- Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol.* 1990;1(3):199-206. PMID: 2103495.

- Gustinucci D, Passamonti B, Cesarini E, et al. Role of p16(INK4a) cytology testing as an adjunct to enhance the diagnostic specificity and accuracy in human papillomavirus-positive women within an organized cervical cancer screening program. *Acta Cytol.* 2012;56(5):506-14. doi: 10.1159/000338979.
- Hara Y, Tuchida S, Nakamura T, et al. Human papillomavirus infection of the uterine cervix analyzed by nonisotopic in situ hybridization. *J Med Virol.* 1990;31(2):120-8. doi: 10.1002/jmv.1890310209.
- Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017;772:3-12. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.07.002.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998;338(7):423-8. doi: 10.1056/NEJM199802123380703.
- Hodgson A, Olkhov-Mitsel E, Howitt BE, Nucci MR, Parra-Herran C. International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): correlation with adverse clinicopathological features and patient outcome. *J Clin Pathol.* 2019;72(5):347-353. doi: 10.1136/jclinpath-2018-205632.
- Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES, et al. HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer Lett.* 2012;323(1):88-96. doi: 10.1016/j.canlet.2012.03.033.
- Hoefler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg.). *Pathologie. Das Lehrbuch*, 6. Aufl., München: Urban & Fischer; 2019.
- Hoehn A, Brambs CE, Hiller G, May D, Schmoeckel E, Horn L. WHO-Klassifikation 2020 fuer Tumoren des unteren weiblichen Genitales. *Thiemeeref.* 2021;81(10): 1145 – 1153. doi: 10.1055/a-1545-4279.
- Horn LC, Beckmann MW, Follmann M. et al. Revidierte Fassung der S3-Leitlinie Zervixkarzinom 2021 – Anforderungen an die Pathologie. *Pathologie.* 2022;43, 292–302. doi: <https://doi.org/10.1007/s00292-021-01051-3>.
- Hoshikawa S, Sano T, Yoshida T, Ito H, Oyama T, Fukuda T. Immunohistological analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in low-grade dysplastic lesions of the uterine cervix. *Pathol Res Pract.* 2010;206(12):816-20. doi: 10.1016/j.prp.2010.09.005.
- Hsu EM, McNicol PJ, Guijon FB, Paraskevas M. Quantification of HPV-16 E6-E7 transcription in cervical intraepithelial neoplasia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Int J Cancer.* 1993;55(3):397-401. doi: 10.1002/ijc.
- Hussaini HM, Seo B, Rich AM. Immunohistochemistry and Immunofluorescence. *Methods Mol Biol.* 2023;2588:439-450. doi: 10.1007/978-1-0716-2780-8_26.

- Iaconis L, Hyjek E, Ellenson LH, Pirog EC. p16 and Ki-67 immunostaining in atypical immature squamous metaplasia of the uterine cervix: correlation with human papillomavirus detection. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(9):1343-9. doi: 10.5858/2007-131-1343-PAKIIA.
- Iwasaki T, Sata T, Sugase M, et al. Detection of capsid antigen of human papillomavirus (HPV) in benign lesions of female genital tract using anti-HPV monoclonal antibody. *J Pathol*. 1992;168(3):293-300. doi: 10.1002/path.1711680309.
- Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med*. 2009; 29(2):123-7. doi: 10.4103/0256-4947.51806.
- Jensen E. Technical review: In situ hybridization. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014;297(8):1349-53. doi: 10.1002/ar.22944.
- Kamal M. Cervical Pre-cancers: Biopsy and Immunohistochemistry. *Cytojournal*. 2022; 19:38. doi: 10.25259/CMAS_03_13_2021.
- Kellner U, Frahm SO, Mawrin C, Krams M. *Kurzlehrbuch. Pathologie*, 3. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2019.
- Kerwin CM, Markese M, Moroney MR, Smith LP, Patel NU. Adenocarcinoma of the uterine cervix, gastric-type (GAS): a review of the literature focused on pathology and multimodality imaging. *Abdom Radiol (NY)*. 2023;48(2):713-723. doi: 10.1007/s00261-022-03724-w.
- Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. 1996;380(6569):79-82. doi: 10.1038/380079a0.
- Kombe Kombe AJ, Li B, Zahid A, et al. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. *Front Public Health*. 2021;8:552028. doi: 10.3389/fpubh.2020.552028.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7. doi: 10.1038/nm0798-844.
- Kuhn E, Morbini P, Cancellieri A, Damiani S, Cavazza A, Comin CE. Adenocarcinoma classification: patterns and prognosis. *Pathologica*. 2018;110(1):5-11.
- Laimins LA. Human papillomaviruses target differentiating epithelia for virion production and malignant conversion. *Seminars in Virology*. 1996; 305-313. <https://doi.org/10.1006/smv.1996.0038>.

- Lifsics A, Groma V, Cistjakovs M, Skuja S, Deksnis R, Murovska M. Identification of High-Risk Human Papillomavirus DNA, p16, and E6/E7 Oncoproteins in Laryngeal and Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinomas. *Viruses*. 2021;13(6):1008. doi: 10.3390/v13061008.
- Lin O, Olgac S, Green I, et al. Immunohistochemical staining of cytologic smears with MIB-1 helps distinguish low-grade from high-grade neuroendocrine neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2003;120(2):209-16. doi: 10.1309/TGCD-66L3-1DHY-X5HK.
- Lordick F, Krauss J, Jäger D. Tumormarker und Biomarker bei Hals-Kopf-Tumoren. *HNO*. 2018;56(9):881-885. doi: 10.1007/s00106-008-1762-6.
- Lukas J, Parry D, Aagaard L, et al. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*. 1995;375(6531):503-6. doi: 10.1038/375503a0.
- Mabruk MJ. In situ hybridization: detecting viral nucleic acid in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004;4(5):653-61. doi: 10.1586/14737159.4.5.653.
- Massimi P, Gardiol D, Roberts S, Banks L. Redistribution of the discs large tumor suppressor protein during mitosis. *Exp Cell Res*. 2003;290(2):265-74. doi: 10.1016/s0014-4827(03)00317-3.
- Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, et al. P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol*. 2003;34(8):778-83. doi: 10.1016/s0046-8177(03)00284-3.
- Mattoscio D, Gheit T, Strati K, Venuti A. Editorial: HPV and Host Interaction. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:638005. doi: 10.3389/fcimb.2021.638005.
- McBride AA. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res*. 2008;72:155-205. doi: 10.1016/S0065-3527(08)00404-1.
- Merseburger AS, Kuczyk MA, Serth J, et al. Limitations of tissue microarrays in the evaluation of focal alterations of bcl-2 and p53 in whole mount derived prostate tissues. *Oncol Rep*. 2003;10(1):223-8. PMID: 12469173.
- Middleton K, Peh W, Southern S, et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*. 2003;77(19):10186-201. doi: 10.1128/jvi.77.19.10186-10201.2003.
- Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):550-60. doi: 10.1038/nrc2886.

- Mullangi S, Lekkala MR. Adenocarcinoma. *StatPearls Publishing LLC*. 2024. PMID: 32965808.
- Muenger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*. 1989;8(13):4099-105. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08594.x.
- Muenger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004;78(21):11451-60. doi: 10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004.
- Nguyen CL, Muenger K. Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes. *Virology*. 2008;380(1):21-5. doi: 10.1016/j.virol.2008.07.017.
- Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, et al. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell*. 2006;21(5):665-78. doi: 10.1016/j.molcel.2006.01.024.
- Outh-Gauer S, Augustin J, Mandavit M, et al. Chromogenic In Situ Hybridization as a Tool for HPV-Related Head and Neck Cancer Diagnosis. *J Vis Exp*. 2019;(148). doi: 10.3791/59422.
- Park KJ. Cervical adenocarcinoma: integration of HPV status, pattern of invasion, morphology and molecular markers into classification. *Histopathology*. 2020;76(1):112-127. doi: 10.1111/his.13995.
- Pérez-González A, Cachay E, Ocampo A, Poveda E. Update on the Epidemiological Features and Clinical Implications of Human Papillomavirus Infection (HPV) and Human Immunodeficiency Virus (HIV) Coinfection. *Microorganisms*. 2022;10(5):1047. doi: 10.3390/microorganisms10051047.
- Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, et al. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol*. 2011;121(3):505-9. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.02.033.
- Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM, ALTS Group. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis*. 2007;195(11):1582-9. doi: 10.1086/516784.
- Przybylski M, Pruski D, Millert-Kalińska S, et al. Expression of E4 Protein and HPV Major Capsid Protein (L1) as A Novel Combination in Squamous Intraepithelial Lesions. *Biomedicines*. 2023;11(1):225. doi: 10.3390/biomedicines11010225.

- Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000318. doi: 10.1371/journal.ppat.1000318.
- Remotti H. Tissue microarrays: construction and use. *Methods Mol Biol.* 2013;980:13-28. doi: 10.1007/978-1-62703-287-2_2.
- Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, et al. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(18):1477-84. doi: 10.1093/jnci/82.18.1477.
- Riede U, Werner M, Schaefer H. *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 5. Aufl., Stuttgart: Thieme; 2004.
- Robert Koch Institut. RKI-Ratgeber Humane Papillomviren. *Epid Bull.* 2018;27:255–259. doi: 10.17886/EpiBull-2018-033.
- Sangwaiya A, Gill M, Bairwa S, Chaudhry M, Sen R, Prakash Kataria S. Utility of P16/INK4a and Ki-67 in Preneoplastic and Neoplastic Lesions of Cervix. *Iran J Pathol.* 2018;13(3):308-316.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993;75(3):495-505. doi: 10.1016/0092-8674(93)90384-3.
- Schiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(6):394-8. doi: 10.1093/jnci/84.6.394.
- Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16086. doi: 10.1038/nrdp.2016.86.
- Schipper C, Zielinski D. RNA-in-situ-Hybridisierung: Technologie, Möglichkeiten und Anwendungsbereiche. *Pathologe.* 2020;41(6):563-573. doi: 10.1007/s00292-020-00839-z.
- Serrano B, Brotons M, Bosch FX, Bruni L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;47:14-26. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006.
- Shi L, Han F, Shi C, Huang Y, Liu Y, Chang X. Immunohistochemical detection of E7 human papillomavirus protein in pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Mol Med Rep.* 2018;18(4):3949-3956. doi: 10.3892/mmr.2018.9416.
- Silbernagel S, Lang F. *Taschenatlas Pathophysiologie*. &. Aufl., Stuttgart: Thieme; 2020.

- Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Biotechniques*. 2004;36(1):98-105. doi: 10.2144/04361RV01.
- Simon R, Sauter G. Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2003;21;5(26):1-12. doi: 10.1017/S1462399403006781.
- Sotlar K. Die Infektion mit humanen Papillomaviren. Pathologie und Molekularpathologie. *Pathologe*. 2008;29[Suppl 2]:153-6. doi: 10.1007/s00292-008-1072-5.
- Stiasny S. Die Rolle von E6 Onkoprotein, p53, p53 mutiert, p16, MDM2 und Galektin-3 bei Zervixkarzinom [Dissertation]. München: LMU München; 2018.
- Stiasny A, Kuhn C, Mayr D, et al. Immunohistochemical Evaluation of E6/E7 HPV Oncoproteins Staining in Cervical Cancer. *Anticancer Res*. 2016;36(6):3195-8.
- Stolnicu S, Barsan I, Hoang L, et al. International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): A New Pathogenetic Classification for Invasive Adenocarcinomas of the Endocervix. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(2):214-226. doi: 10.1097/PAS.0000000000000986.
- Stolnicu S, McCluggage WG. The evolving spectrum of endocervical adenocarcinoma in situ (AIS). *Virchows Arch*. 2020;476(4):485-486. doi: 10.1007/s00428-020-02770-3.
- Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol*. 1999;9(6):379-86. doi: 10.1006/scbi.1999.0141.
- Sun X, Fu P, Xie L, et al. Resveratrol inhibits the progression of cervical cancer by suppressing the transcription and expression of HPV E6 and E7 genes. *Int J Mol Med*. 2021;47(1):335-345. doi: 10.3892/ijmm.2020.4789.
- Teoh D, Musa F, Salani R, Huh W, Jimenez E. Diagnosis and Management of Adenocarcinoma in Situ: A Society of Gynecologic Oncology Evidence-Based Review and Recommendations. *Obstet Gynecol*. 2020;135(4):869-878. doi: 10.1097/AOG.0000000000003761.
- Thomas M, Myers MP, Massimi P, Guarnaccia C, Banks L. Analysis of Multiple HPV E6 PDZ Interactions Defines Type-Specific PDZ Fingerprints That Predict Oncogenic Potential. *PLoS Pathog*. 2016;12(8):e1005766. doi: 10.1371/journal.ppat.1005766.
- Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol*. 2018;99(8):989-990. doi: 10.1099/jgv.0.001105.
- Vande Pol SB, Klingelhutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*. 2013;445(1-2):115-37. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.026.

- Vats A, Trejo-Cerro O, Thomas M, Banks L. Human papillomavirus E6 and E7: What remains? *Tumour Virus Res.* 2021;11:200213. doi: 10.1016/j.tvr.2021.200213.
- Vinther J, Norrild B. Clearance of cervical human papillomavirus infections. *Int J Cancer.* 2003;104(2):255-6. doi: 10.1002/ijc.10922.
- Vogel U. Overview on Techniques to Construct Tissue Arrays with Special Emphasis on Tissue Microarrays. *Microarrays (Basel).* 2014;3(2):103-36. doi: 10.3390/microarrays3020103.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F.
- Wentzensen N. Molekulare Diagnostik der HPV-Infektion. *Pathologe.* 2011;32(6):461-6. doi: 10.1007/s00292-011-1475-6.
- WHO Classification of Tumours Editorial Board. *WHO Classification of Tumours. Female Genital Tumours*, 5th ed. Volume 4, Geneva: International Agency for Research on Cancer; 2020.
- WHO. *WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention: use of mRNA tests for human papillomavirus (HPV).*, 2nd ed, Geneva: World Health Organization; 2021. . Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Accessed Aug 24, 2023.
- Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. *World Cancer Report. Cancer Research for Cancer Prevention*, Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020. <http://publications.iarc.fr/586>. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO. Accessed Aug 24, 2023.
- Wilkens L. Verfahren und Vorrichtung zur Präparation von Gewebeproben. Deutsches Patent. DE 102 03 524 A 1. Offenlegungstag 15.05.2003.
- Williams J, Kostiuik M, Biron VL. Molecular Detection Methods in HPV-Related Cancers. *Front Oncol.* 2022;12:864820. doi: 10.3389/fonc.2022.864820.
- Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003;157(3):218-26. doi: 10.1093/aje/kwf180.

- Woelber L, Prieske K, Eulenburg C, et al. p53 and p16 expression profiles in vulvar cancer: a translational analysis by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Chemo and Radiotherapy in Epithelial Vulvar Cancer study group. *Am J Obstet Gynecol.* 2021;224(6):595.e1-595.e11. doi: 10.1016/j.ajog.2020.12.1220.
- Woodman CB, Collins S, Winter H, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2001;357(9271):1831-6. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04956-4.
- Xiao CY, Fu BB, Li ZY, et al. Observations on the expression of human papillomavirus major capsid protein in HeLa cells. *Cancer Cell Int.* 2015;15:53. doi: 10.1186/s12935-015-0206-0.
- Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res.* 1991;82(5):524-31. doi: 10.1111/j.1349-7006.1991.tb01882.x.
- Yu L, Majerciak V, Zheng ZM. HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4943. doi: 10.3390/ijms23094943.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie der Universität Tübingen unter Betreuung von Herrn PD Dr. med. Ulrich Vogel durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch den Facharzt für Pathologie und molekulare Pathologie Herrn PD Dr. med. Ulrich Vogel.

Sämtliche Versuche wurden in Zusammenarbeit mit dem immunhistochemischen Labor des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen durchgeführt. Dabei übernahm das Labor das Färben der Schnitte mit den Antikörpern.

Die Literaturrecherche, Datenakquisition, Block- und Schnittakquisition, Herstellung der Tissue Microarrays und Auswertung sämtlicher Färbungen erfolgte nach Anleitung durch Herrn PD Dr. Ulrich Vogel eigenständig durch mich.

Ich versichere, die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel: „Der immunhistochemische Nachweis des humanen Papillomavirus (HPV)-Onkoproteins E6 mittels der Antikörperklone C1P5 und BF7, des HPV-Onkoproteins E7 mittels des Antikörperklons 8E2 und des HPV-Hauptkapsidproteins L1 mittels des Antikörperklons K1H8 bei HPV induzierter cervicaler intraepithelialer Neoplasie (CIN) und invasiven Cervixcarcinomen bei unterschiedlichen HPV-Subtypen mit Vergleich zur Expression von p16 und Korrelation zu den CIN-Stadien“ selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die mich während der Entstehung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben, meinen tief empfundenen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Ulrich Vogel für die Überlassung dieses spannenden Themas sowie für seine exzellente Betreuung. Seine fachliche Expertise, seine wertvollen Anregungen und seine gewissenhafte Korrektur meiner Arbeit waren von unschätzbarem Wert.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Fend vom Institut für Pathologie der Universität Tübingen, dass ich meine Dissertationsschrift dort anfertigen durfte.

Für die Unterstützung beim Färben des Studienmaterials danke ich Frau Hermann und allen Mitarbeiter:innen des immunhistochemischen Labors des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Freunden, die mich in jeder Lebenslage unterstützen, mir Mut zusprechen und mich stets dazu anspornen, meine Ziele zu verfolgen.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meinen Freund Benedikt Stähler, der mich unermüdlich unterstützt und zahlreiche gemeinsame Abende entbehrt hat, damit ich mich voll und ganz meiner Dissertation widmen konnte. Seine Geduld, sein Verständnis und sein Zuspruch haben mir stets die nötige Kraft gegeben, dieses Projekt erfolgreich abzuschließen.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie – meinem kleinen Bruder Florian, meiner großen Schwester Anna-Lena, meinem Vater und meiner Mutter. Ohne euch wäre dieser Weg nicht möglich gewesen. Euer Zuspruch, eure Unterstützung und euer unerschütterlicher Glaube an mich haben mir geholfen, auch in herausfordernden Zeiten meinen Weg und dieses Studium zu bestreiten.