

**Aus dem Institut für Pathologie der Universität  
Tübingen  
Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. F. Fend**

**Prognostische Bedeutung der transkriptionellen Aktivität  
der E6/E7 Onkogene  
des Humanen Papillomavirus 16  
für die Entstehung und den Verlauf von  
zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN)**

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

**der Medizinische Fakultät  
der Eberhardt-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Sonja Sigrid Schulz, geb. Muckle**

**aus**

**Tübingen**

**2010**

Dekan:

Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. K. Sotlar

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. T. Iftner

# Inhaltsverzeichnis

## **1. Einleitung**

- 1.1. Historischer Überblick
- 1.2. Epidemiologie des Zervixkarzinoms
- 1.3. Klassifikation / Genomstruktur Humaner Papillomaviren und molekulare Pathogenese der viralen Onkoproteine
- 1.4. Zielsetzung der Arbeit

## **2. Patientinnen, Material und Methoden**

- 2.1. Aufnahmekriterien und Studiendesign
- 2.2. Klinische Befunde und Dokumentation
- 2.3. Kolposkopische Diagnostik
- 2.4. Zytologische Diagnostik
- 2.5. Histologische Diagnostik
- 2.6. Virusdiagnostik
- 2.7. Nachweis von mRNA der viralen Onkogene E6/E7
- 2.8. Genehmigung der Studie durch die Ethik-Kommission
- 2.9. Wissenschaftliche Auswertung

## **3. Ergebnisse**

- 3.4. Altersstruktur der Patientinnen
- 3.5. HPV-Typen Verteilung
- 3.3. Beobachtungszeiträume
- 3.4. Assoziation der histologischen Befunde mit dem Nachweis von HR-HPV DNA im Vergleich zum zusätzlichen Nachweis der transkriptionellen Aktivität der HR-HPV Onkogene E6 und E7
- 3.5. Sensitivität und Spezifität für die Ermittlung von zervicalen Dysplasien
- 3.6. Untersuchung der Dynamik der morphologischen Befunde im Zusammenhang des Nachweises von HR-HPV-DNA bzw. mRNA
- 3.7. Korrelation der morphologischen Befunde im Vergleich mit Einfach- und Mehrfachinfektionen auf HR-DNA-Ebene und im Transkriptnachweis
- 3.8. Vergleich der morphologischen Befunde zwischen einfach- und mehrfach transkriptionell aktiven HR-HPV-Infektionen

#### **4. Diskussion**

- 4.1. Prävalenz der HPV-Typen
- 4.2. Assoziation der morphologischen Befunde mit dem Nachweis von HR-HPV DNA im Vergleich zum zusätzlichen Nachweis der transkriptionellen Aktivität der HR-HPV Onkogene E6 und E7
- 4.3. Sensitivität und Spezifität des Nachweises von DNA und mRNA
- 4.4. Dynamik der morphologischen Befunde in Abhängigkeit des Nachweises von HR-HPV-DNA bzw. mRNA
- 4.5. Vergleich der morphologischen Befunde zwischen Einfach- und Mehrfachinfektionen auf HR-HPV-DNA-Ebene sowie zwischen einfach- und mehrfach transkriptionell aktiven HR-HPV-Infektionen

#### **5. Zusammenfassung**

#### **6. Abkürzungsverzeichnis**

#### **7. Tabellenverzeichnis**

#### **8. Abbildungsverzeichnis**

#### **9. Literaturverzeichnis**

#### **10. Danksagung**

#### **11. Lebenslauf**

# 1. Einleitung

## 1.1. Historischer Überblick

### *Klinik und Histologie in der Geschichte*

Bereits in der Antike waren Feigwarzen sog. Kondylome des äußeren Genitale bekannt, diese wurden auch schon in Zusammenhang mit dem Geschlechtsverkehr erkrankter Personen gebracht, obwohl es noch keine Vorstellungen von „Ansteckung“ gab. (Bäfverstedt 1967)

Im 15. Jahrhundert des Mittelalters wurden Condylomata acuminata (spitze Kondylome) in Zusammenhang mit Geschlechtskrankheiten wie Syphilis und Gonorrhoe beobachtet, daher wurden sie lange Zeit als deren Symptom gedeutet. (Waelsch 1917)

1842 wertete der italienische Arzt Rigoni-Stern in Verona die Todesursachen von Frauen über einen Zeitraum von 79 Jahren aus und fand heraus, daß das Zervixkarzinom bei verheirateten Frauen viel häufiger vorkam als bei Nonnen und anderen ledigen Frauen. (*Rigoni-Stern 1842*)

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde versucht einen Zusammenhang zwischen dem Zervixkarzinom und Geschlechtskrankheiten nachzuweisen, der Verdacht konnte jedoch nicht bestätigt werden (Schottländer et al. 1912).

Schauenstein beschrieb 1908 Epithelveränderungen an der Zervix, die alle Anzeichen der zellulären Entartung zeigten, ohne in das Bindegewebe einzudringen, er stufte es als „atypisches Epithel“ ein und bewertete es als Vorstufe eines Karzinoms.

Lange Zeit wurden die Schleimhautveränderungen unterteilt in „atypisches Epithel mit Schichtung bzw. Verlust der Schichtung“, was dem heutigen Carcinoma in situ entspricht. Die Differenzierung zwischen invasivem Karzinom und Carcinoma in situ wurde nicht, wie heute, daran festgemacht, ob die Basalmembran durchbrochen ist oder nicht, sondern lediglich am Vorhandensein dysplastischer Zellen und dem Verlust der Schichtung. (Schottländer und Kermauner 1912)

Mitte der 50iger Jahre wurde der Begriff „atypisches Epithel“ eingehender spezifiziert (Reagan 1953, Galvin et al. 1955) Seit den 50er Jahren beschäftigte man sich vermehrt mit den kondylomatösen Läsionen der Zervix, deren Abgrenzung zu anderen papillomatösen Veränderungen und deren Potenzial zu entarten.

(Marsh 1952, Woodruff u. Peterson 1958, Jagella u. Stegner 1974, Meisels u. Fortin 1976, Meisels et al. 1977)

Auch hielt, bedingt durch die veränderte Wertung des Begriffs, die Konisation als Therapie bei Carcinoma in situ vermehrt Einzug in den klinischen Alltag.

Weiterhin ungeklärt bzw. kontrovers diskutiert blieb die prognostische Bedeutung des „atypischen Epithels“ in Bezug auf das Entartungspotenzial: Einige Verlaufsstudien ergaben nur in wenigen Fällen eine Progression zum Carcinoma in situ (Galvin et al. 1955). Andere beschrieben eine so hohe Progressionsrate, daß dysplastisches Epithel genauso durch Konisation therapiert wurde, wie ein Carcinoma in situ (Richart et al. 1969).

Aufgrund eigener Forschungen erkannte Richart, daß „atypisches Epithel“ und Carcinoma in situ keine verschiedenartigen Erkrankungen sind, sondern lediglich unterschiedliche Stadien ein und derselben Erkrankung. Er etablierte daher den Begriff der „Zervikalen Intraepithelialen Neoplasien“. Er teilte diese in 4 Stadien (zervikale intraepitheliale Neoplasie: CIN I, CIN II, CIN III, CIN IV) ein, seit dem 2. Weltkongreß für Zervixpathologie wurden Stadium III und IV jedoch zusammengefaßt.

### *Geschichte der Papillomaviren*

Kurz vor Ende des 19. Jahrhunderts wurden die Bakterien entdeckt. Seit dieser Zeit wurde auch vermutet, daß Kondylome und Warzen durch Mikroorganismen verursacht werden. Es gab einige Versuche, bei denen suspensiertes Warzengewebe eines Individuums auf ein anderes übertragen wurde und dieses dann Warzen entwickelte. Einige dieser Versuche waren erfolgreich, aber es konnte kein bakterieller Erreger nachgewiesen werden (Waelsch 1917). Zellfreie Filtrate wurden auch von *Verrucae vulgares* (Ciuffo 1907) und von *Condylomata accuminata* (Serra 1908) erfolgreich übertragen und somit wurden, ebenfalls um die Jahrhundertwende, „vermehrungsfähige Krankheitserreger, die bakterienreiche Filter passieren können, im Lichtmikroskop nicht sichtbar sind und sich auf gängigen Nährböden nicht züchten lassen“, definiert (Löffler et al. 1898). Eine weitere führende Entdeckung wurde von Shope 1933 gemacht, als er ein übertragbares Agens in hornähnlichen Warzen bei Baumwollschwanz-Kaninchen fand. Das „cottontail rabbit papillomavirus“ (CRPV) diente später als frühes Modell der viralen Karzinogenese. (Rogers et al. 1960) Ein großer Durchbruch gelang in den frühen

80er Jahren, als das molekulare Klonen und Sequenzieren vom bovinen Papillomavirus BPV 1 möglich wurde (Chen et al. 1982). Ab Mitte der 80er Jahre wurde es durch DNA Hybridisation und durch Sequenzieren möglich, 65 HPV-Genotypen zu differenzieren. Durch epidemiologische Studien wurde weiterhin belegt, dass bestimmte Genotypen in der Entstehung von Condyloma acuminata involviert sind, die als „low-risk“ Typen bezeichnet wurden und andere Genotypen, die mit Karzinomen assoziiert sind, als sog. „high-risk“ Typen bezeichnet wurden.

Das erste Zervixkarzinom-assoziierte humane Papillomavirus Typ 16 wurde von Dürst et al. 1983 aus einer zervikalen Biopsie isoliert (Dürst et al. 1983) im nächsten Jahr erfolgte die Entdeckung eines „neuen Papillomavirus“ – HPV Typ 18 wurde aus einer zervikalen Karzinombiopsie von Boshart et al. isoliert (Boshart et al. 1984) 1987 wurde ein immortalisierender Effekt von HPV Typ 16 auf Keratinozyten beobachtet ( Dürst et al. 1987, Pirisi et al. 1987).

Schwarz et al. wiesen 1985 zum ersten Mal die Expression der spezifischen Onkogentranskripte E6/E7 von den beiden zuvor genannten HPV-Typen nach. Sie beschrieben weiterhin Deletionen am Virusgenom nach Integration der viralen DNA in das Wirtszellgenom. Die transformierenden Eigenschaften der Onkogentranskripte E6/E7 im Zusammenhang mit humanen Keratinozyten wurden 1991 von Münger et al. beschrieben. Dem synergistischen Effekt dieser beiden Onkogene, die einen Verlust der Zellzykluskontrolle bewirken, wird die zentrale Bedeutung der Karzinogenese des Plattenepithelkarzinoms der Portio zugeschrieben. (Hawley et al. 1989) Dass die Expression der viralen Onkogene E6/E7 ein transformierendes Potential besitzen und für das maligne Wachstum von zervikalen Zellen notwendig sind, indem sie die Tumorsuppressor-Gene p53 und RB hemmen, wurde von Scheffner et al. 1993 gezeigt.

## **1.2. Epidemiologie des Zervixkarzinoms**

Das Zervixkarzinom stellt mit etwa 500.000 Neuerkrankungen und über 250.000 Todesfällen weltweit pro Jahr das dritthäufigste Malignom der Frau dar (Parkin et al. 2001) In aller Regel erfolgt eine Infektion mit HR-HPV durch sexuelle Kontakte, und es gibt einen Altersgipfel zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr. In Europa und den USA sinkt die Prävalenz um das 50. Lebensjahr auf ein niedriges Niveau und erreicht im späteren Leben einen erneuten Gipfel (Munoz et al., 2003) Zwischen 5% und 15% der weiblichen Bevölkerung weist eine Infektion mit HR-HPV auf, wobei die

Prävalenz der Infektionen bei jungen Frauen am höchsten ist. Frauen haben generell ein kumulatives Risiko von 80% sich im Laufe ihres Lebens mit HR-HPV zu infizieren. Bei Männern liegt das Risiko ähnlich hoch, ist wegen der geringeren klinischen Relevanz jedoch weitaus weniger genau untersucht (Rosenfeld et al., 1992). Die sog. latente HPV-Infektion mit ausschließlich labortechnischem Nachweis viraler DNA ohne klinischen, histologischen oder zytologisch auffälligen Befund, findet sich bei ca. 10% der Geschlechtsaktiven. In der Gesamtbevölkerung wird der Anteil der HPV-Antikörper-positiven Personen auf 60% geschätzt. Hierdurch wird eine aktuelle oder frühere HPV-Infektion angezeigt (Koutsky et al. 1997).

Weltweit liegt die Letalität aller an Zervixkarzinomen erkrankten Frauen bei 50% (DiSaia et al. 2002)

In Industrienationen mit guten sozioökonomischen Bedingungen konnte die Sterblichkeit durch Krebsfrüherkennungsprogramme deutlich gesenkt werden, wozu der zytologische Abstrich nach Papanicolaou (der sog. Pap-Test), der seit den 70er-Jahren auch in Deutschland eingesetzt wird, einen wesentlichen Beitrag geleistet hat. (Papanicolaou u. Traut 1943)

In den Entwicklungsländern dagegen ist das Zervixkarzinom immer noch die häufigste krebsbedingte Todesursache.

### *Ätiologische Bedeutung Humaner Papillomaviren für Epitheldysplasien der Portio bzw. für das Zervixkarzinom*

Ein kausaler Zusammenhang zwischen Infektionen mit Humanen Papillomaviren und der Entstehung des Zervixkarzinoms sowie seiner Vorstufen, den zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN), wurde erstmals in den 70er Jahren von zur Hausen vermutet (zur Hausen 1977) und ist in der Zwischenzeit durch zahlreiche epidemiologische Studien belegt (Bosch et al. 1995; Schiffman et al. 1993; Munoz et al. 1992; Walboomers et al. 1999)

Im Frühjahr 2009 erhielt Harald zur Hausen für seine wissenschaftlichen Verdienste bei der Erforschung der Ätiologie und Pathogenese des Zervixkarzinoms den Nobelpreis für Medizin.

Die humanen Papillomaviren sind epitheliotrope DNA-Viren. Sie infizieren ausschließlich die Haut oder die anogenitale oder oropharyngeale Schleimhaut, und können dort zur Entstehung von Papillomen, Kondylomen und auch in invasiven Karzinomen bzw. deren Vorstufen führen.

Die häufigsten Erreger sexuell übertragbarer Viruserkrankungen sind die Humanen Papillomaviren. Bei jungen Frauen gehören HPV-Infektionen mit einer Prävalenz bis zu 43% zu den häufigsten sexuell übertragenen Erkrankungen. (Evander et al. 1995; Ho et al. 1998)

Das Risiko für eine Frau, eine mittel- bis schwergradige CIN-Läsion (CIN II-III) zu entwickeln, liegt bei Patientinnen, die an einer HPV 16-Infektion erkrankt sind, um bis zu 100-fach höher als bei Frauen die zytomorphologisch unauffällig sind (Rozendaal et al. 1996)

Unter den HPV-16-infizierten Patientinnen wiederum, beträgt das individuelle Risiko eine CIN II- oder CIN III-Läsion zu entwickeln knapp 10% (Rozendaal et al. 1996)

Leichte Dysplasien zeigen gehäuft spontane Rückbildungen, schwere Dysplasien/Carcinoma in situ werden als Präkanzerosen betrachtet und in der Regel therapiert. So zeigen leichte bis mittelgradige Dysplasien (CIN I/II) spontane Regressionsraten von 60% bzw. 40% und gehen in nur ca. 1% bzw. 5% der Fälle in ein Zervixkarzinom über, was therapeutisch ein abwartendes Vorgehen rechtfertigt (Östör et al. 1994; Östör 1993; Koss 1989; Nasiell et al. 1986; Nasiell et al. 1983)

Prospektive Studien haben gezeigt, daß Patientinnen, bei denen eine Progression einer CIN-Läsion zu verzeichnen war, praktisch immer persistierende Infektionen, d.h. bei mindestens zwei konsekutiven Kontrolluntersuchungen nachweisbare Infektionen mit dem gleichen HR-Typ, z.B. HPV 16, aufwiesen (Remmink et al. 1995; Koutsky et al. 1992; Ho et al. 1998). Oft waren bei persistierenden Infektionen auch multiple HPV-Typen nachweisbar (Ho et al. 1998).

Schwere Epitheldysplasien der Portio (CIN III) zeigen, in Abhängigkeit des Beobachtungszeitraumes, eine Progressionsrate von 12% bis 22% und sind somit als behandlungsbedürftiger Befund zu betrachten (Östör 1993; McIndoe et al. 1984)

### *Produktive HPV-Infektion*

Der latenten HPV-Infektion, die sich ausschließlich molekularbiologisch durch sehr sensitive Methoden (PCR) nachweisen läßt und die noch keine Veränderungen am Epithel induziert hat, steht die produktive HPV-Infektion gegenüber. Bei der latenten HPV-Infektion liegt virale DNA in niedriger Kopienzahl episomal in den Basalzellen vor.

Dieses Stadium kann in eine „produktive HPV-Infektion“ übergehen, bei der eine gesteigerte Virusreplikation mit hoher Kopienzahl über die gesamte Epithelbreite nachweisbar ist. Das Virus kann jetzt typischerweise in den apikalen Zelllagen

infektiöse Virionen produzieren ( Middleton et al. 2003). Erst jetzt kommt es auch zu morphologischen Veränderungen aufgrund gesteigerter Zellproliferation mit Plattenepithelhyperplasie oder dem Auftreten von Koilozyten.

Die Faktoren bzw. Mechanismen, die dazu führen, dass eine latente in eine produktive HPV-Infektion übergeht, sind bis jetzt nicht geklärt. Diskutiert wird eine Schwäche der T-Zell-vermittelten Immunabwehr (Stanley M, 2006), der angeborenen Immunantwort im Bereich der Mucosa (Carrington M 2005). Andererseits werden dem humanen Leukozyten-Antigen DRB1\*1301 protektive Eigenschaften zugerechnet (Wang SS et al. 2003).

Somit gelten heute praktisch nur die HR-HPV-assoziierten CIN II-Läsionen und CIN III-Läsionen, als echte Präkanzerosen. CIN I-Läsionen und LR-HPV-assoziierte Infektionen dagegen gelten als Ausdruck zytopathologischer Effekte einer produktiven viralen Infektion (Castle PE et al, 2007; Schiffman et al. 2007; Snijders et al. 2006). CIN I-Läsionen haben eine Spontanregressionsrate von bis zu 90% innerhalb 36 Monaten (Moscicki et al. 2004), ein vermutlich auf einer viralen „Clearance“ beruhendes Phänomen (Trimble et al. 2005; Nobbenhuis et al. 2001)

### *Risikofaktoren*

Auch wenn die persistierende HR-HPV Infektion eine „conditio sine qua non“ ist, stellt die zervikale Karzinogenese ein multifaktorielles Geschehen dar und wird insbesondere auch vom Immunsystem des Wirts beeinflusst (Benton et al. 1996; Cromme et al. 1993; Helland et al. 1998). Langzeitimmunsuppression stellt ein Risikofaktor für die virale DNA Persistenz und die Progression zervikaler Läsionen dar (Petry et al. 1994). Promiskuität, niedriges Alter beim ersten Geschlechtsverkehr oder niedriger sozioökonomischer Status sind dagegen lediglich Risikofaktoren für die Aquirierung einer HPV-Infektion (Schiffman et al. 1993). Nikotinabusus und orale Kontrazeptiva erhöhen das Risiko einer Persistenz oder Progression einer HPV Läsion (Burger et al. 1993). Andere sexuell übertragenen Infektionen, wie z.B. Chlamydia trachomatis, chronische Entzündung und Ernährungsfaktoren spielen eine nur geringe Rolle.

Der Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer CIN-Läsion als Krebsvorstufe ist die Persistenz der HPV-Infektion mit Hochrisikotypen, bei der dann eine permanente Expression der viralen Onkogene E6 und E7 vermutet wird (Arends et al. 1998, Dyson et al. 1989; Nakagawa et al. 1995; Münger et al.,1991; Scheffner et al.1990; zur Hausen et al. 1991). Follow – up - Studien, die sich mit mehreren HR – HPV –

Typen auf DNA – Ebene befassten, sahen bei 15,2 % der HR – HPV – positiven Patientinnen nach 12 Monaten eine CIN III – Läsion ( Safaeian et al, 2007) und zwischen 17,7% und 24,5% nach 5 Jahren eine CIN III–Läsion sich entwickeln (Kjaer et al 2006).

Untersuchungen zeigen, dass Zervixkarzinome und CIN-Läsionen mit einer erhöhten Telomeraseaktivität assoziiert sind (van Duin M et al. 2003). Telomerase ist eine Reverse Transkriptase, ein Enzym, das während der Zellteilung von Stamm- oder Keimzellen aktiv wird und eine die Zellteilungsrate begrenzende Verkürzung der Telomeren verhindert.

Die erhöhte Expression der sog. Untereinheit hTERT deutet auf eine erhöhte Aktivität des Enzyms hin, was wiederum einen immortalen Phänotyp in HR-HPV-infizierten Epithelzellen resultiert. (Steenbergen et al. 2001). Es wird spekuliert, ob nur die Telomerase- positiven CIN I-Läsionen einen immortalen Phänotyp ausbilden, der keine Regression mehr zulässt. (van Duin et al. 2003)

Weiterhin wird dem Tumorsuppressorgen TDLC1 auf Chromosom 11 eine Rolle in der zervikalen Karzinogenese zugeschrieben. Es ist für die Zellpolarität und Zell-zu-Zell Kontakte und verantwortlich. Ist seine Expression reduziert, kommt es zur neoplastischen Transformationen und Metastasierung. (Shingai T et al.2003) Zusätzlich tritt das Tumorsuppressorgen TDLC1 mit einem T-Zell-assoziierten Rezeptor in Kontakt, ein Mechanismus, der v.a. in höhergradigen CIN-Läsionen vermindert ist und so die Immunantwort gegen neoplastische Zellen einschränkt (Steenbergen et al. 2004)

### **1.3. Klassifikation / Genomstruktur Humaner Papillomaviren und molekulare Pathogenese der viralen Onkoproteine**

Papillomaviren sind kleine, 50 nm große unbehüllten Viruspartikel, die ein doppelsträngiges, etwa 8000 Basenpaare umfassendes zirkuläres Genom besitzen. In den letzten 30 Jahren entwickelte sich eine Einteilung, die auf den Nucleotid-Sequenzen basiert. Dabei werden ganze Genom-Sequenzen bzw. subgenomische Abschnitte verglichen. Grundsätzlich dürfen zwischen zwei verschiedenen HPV-Typen maximal 50 % Homologien auftreten dürfen. Unterschiede zwischen 2% und 10% Homologien stellen einen Subtyp dar und weniger als 2% definieren eine Variante (Strickler, International Papillomavirus Workshop Quebec 1995)

Humane Papillomaviren wurden früher mit den Polyomaviren zusammengefasst, weil beide ein unbehülltes Kapsid und eine doppelsträngige DNA besitzen. Durch Sequenzierung stellten sich jedoch völlig unterschiedlich organisierte Genome in unterschiedlicher Länge heraus, die außerdem keine Homologien der Aminosäuresequenzen aufwiesen. Diese Unterschiede machten eine neue Einteilung in zwei verschiedene Familien erforderlich.

Die ersten kompletten Virusgenome wurden 1982 entschlüsselt, das Genom des HPV 1 (Danos et al., 1982), HPV 6 (Schwarz et al. 1983), und HPV16 (Seedorf et al. 1985).

Momentan sind alle isolierten HPV Genome voll sequenziert und fast 100 humane Papillomaviren beschrieben mit einer noch höheren Anzahl an Subtypen, basierend auf subgenomischen Amplifikaten. (de Villiers et al. 2004)

Die mucosotropen HPV-Genotypen, die u.a. in der Zervix uteri nachgewiesen werden, können in zwei Subgruppen unterteilt werden: Die kanzerogenen HPV-Genotypen, die sog. „high-risk“ Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 und 82) und die nichtkanzerogenen „low risk“ Typen (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 und CP 6108 (Munoz et. al. 2003)

80% der Zervixkarzinome weltweit sind mit nur 4 HPV-Typen assoziiert (16, 18, 45, 31), wobei es geographische Unterschiede gibt (Munoz et. al 2004)

In invasiven Karzinomen werden Teile der DNA der HR-HPV Genotypen häufig als Integrat innerhalb der humanen genomischen DNA gefunden. Immer ist dabei die URR/E6/E7 Region des Genoms erhalten und intakt, während andere Anteile insbesondere E1 und/oder E2 fehlen oder zumindest partiell destruiert sind. Dagegen enthalten die benignen genitalen Läsionen unintegrierte, zirkuläre DNA von „low-risk-Typen“ als sog. Episom.

Für die Pathogenese des Zervixkarzinoms sind nur die HR-HP-Viren von Bedeutung. Die folgende Diskussion wird sich daher auf ihre Rolle beschränken.

### *Molekulare Pathogenese der viralen Onkoproteine*

Das Genom von HPV-Genotypen besteht aus 8 Genen, wovon 6 der sogenannten „early region“ und 2 der „late region“ zugeteilt werden. Des weiteren gibt es eine nicht kodierende, sogenannte „upstream regulatory region“ (URR) (Pfister, 1984; Seedorf et al. 1985). Die URR besteht aus ca. 400 Basenpaaren, die den kodierenden Regionen vorausgehen und enthält sog. cis-Elemente, die für die

Transkription notwendig sind, ebenso wie für die Replikation des viralen Genoms. An ihr binden verschiedene Transkriptionsaktivatoren und –repressoren. Damit kommt der URR eine transkriptionsregulierende Aktivität der „early und late regions“ zu.

Die ER und LR beinhalten die offenen Leseraster („open reading frames“, ORF's), jene DNA Segmente, die in Proteine translatiert werden können.

Das L1-Gen bietet eine Grundlage, um phylogenetische Vergleiche zu erstellen, da es bei allen bekannten HPV Spezies sehr ähnlich aufgebaut ist (Bernard et al. 1994) Es erlaubt damit eine Einteilung in Spezies und Genre (de Villiers et al. 2004) Das L1 und L2 Gen kodieren für zwei virale Kapsid Proteine, wobei das erstere etwas größer ist und das letztere eine größere Sequenzvariabilität aufweist. (Park et al. 1995)

Das E1 Gen kodiert für zwei Proteine und ist ein Replikationsfaktor (Blitz et al. 1991; Thorner et al. 1988, Bream et al. 1993). Am bovinen Papillomavirus BPV1 konnte gezeigt werden, dass die E1-Genprodukte in vitro an eine spezifische „cis-Sequenz“ in der Nähe des E6/E7 Promoters gebunden werden. (Thorner et al. 1993). Das E1 Protein hat ATPase – Aktivität (Seif 1984), Helikase Funktion (Yang et al.1993), sowie bei HPV 11, GTPase Aktivität (Brehm et al. 1999).

Das E2 Genprodukt, wie auch jenes von E1, ist für die in vivo Replikation unverzichtbar. (Chiang et al. 1992, Spalholz et al. 1993, Ustav et al. 1993, Remm et al. 1992, Lu et al. 1993). Es kodiert ebenfalls für zwei DNA – bindende Proteine, von denen eines als trans-Aktivator fungiert, das andere als Repressor. (Haugen et al. 1988, Romanczuk et al. 1990). Die Transkription der viralen Onkogene E6/E7 wird ebenfalls von dem viralen E2 Gen-Produkt reguliert (Bernard et al. 1989, Turek LP 1994). Durch die Linearisierung wird häufig das E2-Gen zerstört und somit verliert dieses seine Repressor-Funktion auf die Onkogene E6/E7. (Schwarz et al. 1985, Choo et al. 1987, Baker et al. 1987). Es resultiert eine Überexpression der viralen Onkogene E6/E7.. (Howley et al. 1991)

Das E4 Genprodukt soll spezifische Interaktionen mit HPV 16 eingehen , wodurch die zytoplasmatische Keratinmatrix zerstört und die Freisetzung von Viruspartikeln erleichtert wird. Die Lyse der Zytokeratinmatrix ist auch die Ursache der perinukleären Halobildung (Koilozytose) i.d. Regel Zeichen einer produktiven HPV-Infektion . (Doorbar et al. 1991)

Das E5 Gen kodiert für ein hydrophobes Protein, das bevorzugt im Golgi-Apparat und in Zytoplasmamembranen gefunden wird. (Burkhardt et al. 1989)

Das E5 Genprodukt wird in produktiven Infektionen exprimiert. Seine Rolle in der zervikalen Karzinogenese ist jedoch immer noch unklar, weil dieser Teil des Genoms

in Karzinomen, die integrierte HPV Fragmente enthalten, oft unterbrochen ist oder fehlt.

Die Gene E6 und E7 kodieren für die die viralen Onkoproteine und besitzen bei HR-HPV transformierende Eigenschaften. Sie spielen bei der Virusreplikation und Immortalisation eine entscheidende Rolle.

Eine der wichtigsten Tumor-Suppressor Faktoren der Wirtszelle, stellt das p53-Protein dar, welches nach genotoxischen Schädigungen überexprimiert wird und die Apoptose einleitet. Hierdurch wird die Weitergabe von Mutationen an Tochterzellen vermieden (Vogelstein und Kinzler, 1992)

Das E6 Onkogenprodukt bindet an das zelluläre Protein E6-AP („E6-assoziiertes-protein“) bindet (Huibregtse et al. 1991, Scheffner et al. 1993). Dieser Proteinkomplex bindet wiederum an p53 und vermittelt dessen vorzeitigen proteasomalen Abbau. Dadurch weisen E6-exprimierende Zellen einen verminderten p53-Level auf und die Weitergabe von DNA-Schäden an Tochterzellen wird vereinfacht.

Die Hauptbeobachtungen, die über E7 gemacht wurden, bestehen in der Demonstration der Bindung an die Tumorsuppressorproteine der Retinoplastomfamilie pRb, p107 und p130 (Dyson et al. 1989), welche die Freisetzung von E2F aus seiner Bindung an pRB zur Folge hat.

pRB reguliert durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Progression des Zellzyklus in der G1/S-Phase. Durch die Freisetzung dieser Transkriptionsfaktoren aus der E2F-Familie aus ihrer Bindung mit pRB wird die Transkription von Genen, welche die Zellproliferation regulieren, z.B. das inhibierende p16 INK4a Gen, ein cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor (Khleif et al. 1996), aktiviert und leiten die DNA-Synthese und damit die Zellzyklusprogression ein (Bagchi et al. 1990, Bandara et al. 1991).

Das E7 Gen Produkt von HR-HPV hat eine höhere Affinität zu Retinoblastomgenprodukt als E7-Proteine von LR-HPV. Dies resultiert in einer höheren Zell-Transformationsrate und Immortalisierungseffizienz (Di Maio 1991, Werness et al. 1991). Um Keratinozyten effektiv zu immortalisieren, ist eine Kooperation zwischen den E6 und E7 Genprodukten notwendig. (Halbert et al. 1991, Liu et al. 1999)

Durch die zunehmende chromosomale Instabilität bei E6/E7 exprimierenden Zellen kommt es bei Reparaturvorgängen gebrochener Chromosomenfragmente auch zur Integration von HPV-Genomfragmenten in die chromosomale Wirts-DNA bevorzugt

an Stellen, die als „fragile sites“ bezeichnet werden (Wentzensen et al., 2004). Interessanterweise sind die integrierten E6/E7 Gene stets intakt, wohingegen andere Gene durch den Integrationsmechanismus entweder inaktiviert oder zerstört werden. In Fusionstranskripten mit dem Wirtsgenom besitzen E6/E7 mRNAs eine deutlich höhere Stabilität und damit ein erhöhtes Transformationspotential. (Vinokurova et al. 2005) Die Mehrheit der Zervixkarzinome (80-100%) enthält integrierte virale DNA, während CIN-3-Läsionen nur 20% integratpositiv sind. (Klaes et al. 1999)

Die unterschiedlichen HPV-Typen weisen Unterschiede in der Frequenz der integrierten HPV- Genome auf: HPV 18 und 45 weisen in fast allen Fällen virale Genomintegrate auf, HPV 16 liegt zwischen 70 und 80% während bei HPV 31 und 33 weniger als 50% der assoziierten Läsionen ein virales Integrat nachweisen lassen. Vinokurova et al. sehen eine Korrelation zwischen integriertem HPV Typ und medianem Alter der Patientinnen, da durch HPV Typ 16, 18 und 45 assoziierte Präkanzerosen und invasive Karzinome bei wesentlich jüngeren Patientinnen diagnostiziert werden, während HPV Typ 31 und 33 assoziierte Präkanzerosen und invasive Karzinome bei älteren Patientinnen nachgewiesen werden. Man vermutet daher ein unterschiedliches Transformationspotential der einzelnen HR- HPV-Typen. (Vinokurova et al. 2008)

### *Transkription der viralen E6/E7 Onkogene*

Im Transformations- und Immortalisierungsprozess HPV- infizierter Zellen kommt der Transkription eine zentrale Rolle zu. Die Onkoproteinbiosynthese der E6/E7 Gene könnte auch ein Indikator für die DNA Integration ins Wirtsgenom sein. Die beiden Gene werden von einer gemeinsamen Promoterregion p97 aus transkribiert.

Das HPV-16 Genom enthält zwei Haupt-Promoter-Regionen. Der P97 Promoter liegt oberhalb des E6 ORF und ist für die frühe Gen-Expression verantwortlich (Smotkine et al. 1986) und der P670 Promoter, der im E7 ORF liegt, ist für die späte Gen-Expression verantwortlich (Grassmann et al. 1996). Der HPV-16 P97 Promoter steht unter der Kontrolle von cis- Elementen in der URR. Diese cis- Elemente, darunter auch vier Konsensus „E2-binding-sites“, interagieren auch mit zellulären Transkriptionsfaktoren und dem viralen Transaktivator/Repressor E2 und regulieren die Transkription von P97 sowohl in undifferenzierten Basalzellen, wie auch in ausdifferenzierten Superficialzellen (Bernard 2002). Die frühen daraus

resultierenden pre- mRNA's haben alle 3 Exons und Introns und werden alternativ gespliced und polyadenyliert, womit mindestens 14 mRNA Transkripte mit variierendem codierenden Potenzial produziert werden. (Dyson et al. 1989 u 1992; Boyer et al. 1996)

Promoter P 670 ist der Promoter für die späten Gene L1 und L2. Seine Aktivierung wird kann nur in differenzierten Keratinozyten gefunden. Die Aktivierung des späten Promoters von HPV- 31 wurde mit der Proteinkinase C Kaskade in Verbindung gebracht.(Brehm et al. 1999). Die Frage ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, wie die späten Promotoren aktiviert werden. Bodily et al. beschreiben, dass Zelldifferenzierungssignale allein ausreichen, um eine Aktivierung des späten Promoters von HPV-31 zu induzieren (Bodily et al. 2005).

An der Promoterregion starten die RNA- Polymerasen den Transkriptionsvorgang. Zunächst wird die DNA in eine prä- mRNA transkribiert, in welcher nur die kodierenden Abschnitte (Exons) enthalten sind und die nichtkodierenden Abschnitte (Introns) herausgeschnitten wurden. Die Verknüpfung der Exone wird als „splicing“ bezeichnet. Die E6/E7 Transkripte unterscheiden sich bei den einzelnen HPV Typen in ihrer Länge. Bei HPV 16 lassen sich zwei in ihrer Länge unterschiedliche E6-Transkripte nachweisen. Das kürzere wird als E6\*II und das längere als E6\*I bezeichnet. Das längste Produkt wird als sog. E6/E7 „full-length“ Transkript bezeichnet und enthält das gesamte Transkript des E6 Gens, wobei die gesplicten E6\*I und E6\*II Transkripte das gesamte E7 Genom enthalten, aber nur einen Teil der E6 Region.

#### **1.4. Zielsetzung der Arbeit**

Den wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN), als Vorstufe des Zervixkarzinoms, stellt eine persistierende Infektion mit sogenannten high-risk (HR)-HPV Typen dar. Das transformierende Potential dieser Infektion beruht auf der kontinuierlichen Expression der viralen Onkogene E6 und E7 mit der Folge einer Inaktivierung der zellulären Tumorsuppressorproteine p53 und pRB.

In dieser Arbeit sollte die prognostische Bedeutung des Nachweises der transkriptionellen Aktivität der viralen Onkogene E6 und E7 für die Entstehung und den Verlauf, gekennzeichnet durch Persistenz, Progression oder Regression, einer CIN untersucht werden. Dabei sollte überprüft werden, ob sich der Nachweis von

E6/E7 mRNA, neben dem Nachweis der viralen DNA, als Biomarker für ein erhöhtes Risiko für eine Entstehung oder Progression einer CIN eignet. Hierzu wurde mit Unterstützung der Deutschen Krebshilfe eine prospektive Studie durchgeführt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten im Speziellen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Bestimmung der Prävalenz von HR- HPV DNA und E6/E7 mRNA in Abstrichmaterial von Patientinnen unterschiedlicher Dysplasiegrade
- Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des Nachweises von HR- HPV DNA einerseits und E6/E7 mRNA andererseits
- Untersuchung der prognostischen Bedeutung der transkriptionellen Aktivität der E6/E7 Onkogene auf die Dynamik (Entstehung, Progression, Persistenz, Regression) einer CIN- Läsion
- Untersuchung der Auswirkungen von HR-HPV Mehrfachinfektionen auf HR- HPV DNA-Ebene, wie auch auf E6/E7 mRNA-Ebene auf die Prävalenz und Dynamik von CIN-Läsionen.

## 2. Patientinnen, Material und Methoden

### 2.1. Aufnahmekriterien und Studiendesign

Das Studienkollektiv setzte sich aus 1699 Patientinnen zusammen, die zwischen 2000 und 2003 in die kolposkopische Sprechstunde der Frauenklinik Tübingen zur bioptischen und kolposkopischen Kontrolluntersuchung wegen suspekter oder pathologischer zytologischer Befunde von niedergelassenen Gynäkologinnen und Gynäkologen überwiesen wurden.

Routinemäßig werden Patientinnen mit zytologisch manifesten Portiodysplasien, entsprechend der Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft für Kolposkopie und Zervixpathologie, in die Kolposkopiesprechstunde wieder einbestellt:

Patientinnen ohne Dysplasien des Portioepithels werden routinemäßig nach einem Jahr wieder einbestellt, bzw. von niedergelassenen Gynäkologinnen und Gynäkologen weiter betreut. Patientinnen mit leichten Dysplasien werden aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit einer Remission in ca. 4- 6 monatigen Abständen rekrutiert. Solche Frauen mit mittelschweren Dysplasien werden engmaschiger kontrolliert. Weist das Portioepithel eine schwere Dysplasie auf, werden Patientinnen in der Regel einer ablativen Therapie zugeführt. In seltenen Ausnahmefällen, z.B. bei Kinderwunsch, kann eine sehr engmaschige Kontrolle in Erwägung gezogen werden. Bisher wurden Patientinnen, bei denen keine kontroll- oder therapiebedürftigen Befunde nachgewiesen werden konnten, wieder weiter von niedergelassenen Gynäkologinnen und Gynäkologen betreut.

Im Rahmen dieser Studie sollten Patientinnen mit einer HPV- 16 Infektion in ca. 6-monatigen Intervallen zu Kontrollbesuchen einbestellt werden, um die Auswirkung der HPV-Infektion auf das Portioepithel beobachten zu können. Um ein größeres Studienkollektiv rekrutieren zu können, wurde später das Spektrum auf alle High- risk Typen: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 68 ausgeweitet und Patientinnen, die an einer Einfach- oder Mehrfach- Infektion mit o.g. HR-Viren litten aufgenommen. Zunächst wurde eine Mindestbeobachtungszeit von zwei Jahren angestrebt.

Für die gesamte Studie waren drei Jahre anberaumt und während des ersten Studienjahres sollten weitere Patientinnen aquiriert werden. Da jedoch im ersten Jahr weniger Patientinnen aufgenommen werden konnten als geplant, wurden auch kürzere Beobachtungszeiträume als zwei Jahre akzeptiert und nicht als Ausschlußkriterium gewertet.

Somit wurden auch noch während des zweiten und dritten Studienjahres Patientinnen neu rekrutiert.

Patientinnen, mit bekannten morphologischen Vorbefunden wurden mit in die Studie einbezogen. Daher ergaben sich vereinzelt längere Beobachtungszeiträume als drei Jahre, über die die Studie verlief.

Um eine Patientin in die Studie aufnehmen zu können wurde ein Informationsgespräch geführt, um über die Hintergründe, Ziele und den Ablauf der Studie aufzuklären und damit eine gute Compliance zu erreichen. Dieses Gespräch diente auch dazu sämtliche Patientinnenfragen zu klären und am Ende des Gesprächs oder nach erwünschter Bedenkzeit, eine schriftliche Einverständniserklärung einzuholen.

Grundsätzlich wurden Patientinnen mit nachgewiesenen Portiodysplasien über die verschiedenen Therapiemöglichkeiten beraten. Unter Einschätzung ihrer individuellen Gesamtsituation ließ man die Patientin entscheiden, sich einer Therapie zu unterziehen oder den Befund beobachten zu lassen und in die Studie aufgenommen zu werden. Der jeweilige HPV- Status änderte an diesem Vorgehen nichts. Entschied sich eine Patientin jedoch sofort für eine Therapie, wurde dies als Ausschlusskriterium gewertet und die Patientin nicht in die Studie aufgenommen. Ebenfalls wurde ein Therapiewunsch seitens der Patientin, ohne morphologischen Nachweis einer Progression, als Ausschlußkriterium gewertet.

### **Auswahl des Basiskollektivs:**

Bei 120 Patientinnen wurde initial HVP 16 nachgewiesen. HPV 16 stellte in unserem Studienkollektiv den mit Abstand am häufigsten nachgewiesenen Genotyp dar mit fast 45,6 % (365 von 800). Bei 800 Intervallen wurden HR-HP-Viren des o.g. Spektrums nachgewiesen. Diese 120 Patientinnen mit 265 Untersuchungsintervallen: Erstuntersuchung mit Folgeuntersuchungen, stellen das Basiskollektiv für die Untersuchungen unter 3.6 bis 3.8 dar und werden im Folgenden näher beschrieben.

Im Laufe der Beobachtungszeit wurden bei diesen 120 initial HPV 16– positiven Patientinnen, jedoch auch sämtliche weiteren „high- risk“- HPV- Typen des in unserer Studie untersuchten Spektrums nachgewiesen. Diese weiteren „high- risk“- HP- Typen zeigten einen häufigen Typwechsel, traten teilweise in Kombination mit HPV 16 oder singular bzw. multipel ohne HPV 16 auf. Da in Anbetracht der hohen DNA als auch mRNA- Nachweisraten der weiteren HR- HPV- Typen ein „selektives

Betrachten“ der morphologischen Befunde als ausschließlich „HPV 16- induziert“ als unrealistisch erschien, wurden die molekularbiologischen Befunde der weiteren HR-HPV- Typen mit in die Auswertung aufgenommen und mitberücksichtigt (Auswertung 3.6 bis 3.10)

„Low- risk“- Viren flossen lediglich als Kontrolle (HR-HPV neg.) in die Auswertung mit ein.

### **Untersuchung der prognostischen Bedeutung der transkriptionellen Aktivität der E6/E7 Onkogene von HR-HP-Viren**

Einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von CIN- Läsionen stellt die persistierende Infektion mit HR- HPV- DNA dar. Durch die kontinuierliche Expression von den Onkogenen E6/E7 werden die Tumorsuppressorproteine p53 und pRB unterdrückt. Eine der zentralen Untersuchungen dieser Arbeit ist der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein bzw. nicht Vorhandensein von HR- HPV- mRNA und die Auswirkungen auf die Dynamik der morphologischen Befunde (Progression, Persistenz, Regression).

Für die „virologische Persistenz“ gibt es noch keine anerkannte Definition, da diese von „ungenauen Faktoren“ wie der Länge der Intervalle zwischen zwei Tests und dem eigentlich unbekanntem Eintritt der HPV-Infektion (kurz vor dem Test oder kurz nach dem vorhergehenden Test), abhängt. Die Sensitivität der verwendeten Nachweismethode spielt ebenfalls eine Rolle (Woodman et al. 2007).

Dennoch ist es der bislang wichtigste Risikofaktor für die Entstehung von höhergradigen CIN- Läsionen (Plummer et al. 2007; Kjaer S et al. 2006). Deshalb wurde in dieser Arbeit der Nachweis von einem oder mehreren HR- HPV- Typen in mindestens zwei aufeinander folgenden Untersuchungsintervallen gewertet, was in der Medianen einem Zeitintervall von ca. einem Jahr entspricht. Dies entspricht dem momentan in der Literatur empfohlenen Beobachtungsintervall von mindestens einem Jahr. (Bulkman et al. 2007)

Die Vorteile der halbjährigen Untersuchungsintervalle sind erstens die Möglichkeit einer engmaschigen Kontrolle und zweitens Einblicke in die sich oft schnell ändernden molekularbiologischen Vorgänge wie Typwechsel, Mehrfachinfektionen, Regressionen ect. und die damit assoziierten morphologischen Veränderungen zu erhalten.

Unter 3.4. wurde zunächst die Prävalenz von HR- HPV- DNA und E6/E7 mRNA in Abstrichmaterial von Patientinnen unterschiedlicher Dysplasiegrade bestimmt und miteinander verglichen. Die Sensitivität und Spezifität wurden unter 3.5. untersucht.

Da die Histologie nicht bei jedem Untersuchungsintervall erhoben wurde, wird hier bei 835 Intervallen keine Aussage bezüglich der Morphologie getroffen. Diese 835 Intervalle werden jedoch in den nachfolgenden Auswertungen (3.6. bis 3.10.) anhand des zytologischen Befundes entsprechend den histologischen Ergebnissen integriert in die Auswertung aufgenommen.

Mit der Auswertung unter 3.6. wurde die Dynamik einer Portiodysplasie, was Entstehung, Progression, Persistenz oder Regression der morphologischen Befunde, in Abhängigkeit vom Nachweis der HR-HPV-DNA bzw. dem Nachweis der transkriptionellen Aktivität, der viralen Onkogene E6/E7 anbetrifft, untersucht.

Diese Untersuchung wurde anhand des Basiskollektivs der 120 Patientinnen mit 265 Untersuchungsintervallen vorgenommen. Wie unter 2.1. beschrieben, wurden die 120 Patientinnen des Basiskollektivs aufgrund ihrer initial HPV 16 positiven Befunde ausgewählt, doch während des weiteren Studienverlaufs wurden bei diesen Patientinnen auch weitere HR- HP- Viren nachgewiesen, die sich auf das gesamte Spektrum der hier nachgewiesenen 14 HR- HP- Viren ausdehnten. In diese und die weiteren Auswertungen flossen die weiteren HR- Typen ebenfalls mit ein.

Es wurden folgende Untergruppen verglichen:

In die erste Gruppe wurden jene Untersuchungsintervalle aufgenommen, bei welchen keine HR- HPV- DNA nachgewiesen werden konnte. Diese wurde als Kontrollgruppe im Untersuchungsmaterial bezeichnet.

Die zweite Gruppe bildet Untersuchungsintervalle, bei welchen ausschließlich HR- HPV- DNA im Abstrichmaterial nachgewiesen werden konnte, jedoch keine gesplizeten E6/E7 Onkogentranskripte.

In der dritten Gruppe wurden schließlich jene Untersuchungsintervalle aufgenommen, bei denen neben HR- HPV- DNA außerdem E6/E7 mRNA nachgewiesen wurde, bei denen also eine sichere transkriptionelle Aktivität der E6/E7 Onkogene vorlag.

Auf morphologischer Ebene wurden ebenfalls in jeder Gruppe

(HR- HPV- DNA neg./ HR- HPV- mRNA neg; 2. HR- HPV- DNA pos. / HR- HPV- mRNA neg.; 3. HR- HPV- DNA pos. / HR- HPV- mRNA pos) die Häufigkeit von Progressionen, Persistenzen und Regressionen untersucht. Als Entstehung einer Portiodysplasie wurde das Auftreten nach mindestens einem befundfreien

Beobachtungsintervall gewertet, eine Progression zum mindestens nächst höheren histologischen oder zytologischen Stadium, eine Persistenz wurde also solche eingeordnet, wenn über mindestens zwei Kontrollintervalle, entsprechend der virologischen Persistenz von ca. einem Jahr, ein gleich bleibender pathologischer Befund erhoben wurde und eine Regression bezeichnete eine Befundänderung zum mindestens nächst niedrigeren histologischen bzw. zytologischen Stadium oder zum negativen Befund.

Unter 3.7. und 3.8. wurden die Prävalenz von Portiodysplasien bei HR- HPV Einfach- und Mehrfachinfektionen verglichen und die Sensitivität und Spezifität bestimmt.

Die Auswertung unter 3.9. untersucht die Auswirkungen der Dynamik von Portiodysplasien im Vergleich bei HR- HPV- Einfach- und Mehrfachinfektionen.

## **2.2. Auswertungen / Statistik**

Die Auswertungen unter 3.5. und 3.9. betrachten die histologischen und zytologischen Befunde und untersuchen die Assoziation der morphologischen Befunde und dem Vorhandensein von HR- HPV- DNA bzw. dem zusätzlichen Nachweis von HR-HPV- mRNA zu einem bestimmten Zeitpunkt im zunächst gesamt aufgenommenen Studienkollektiv von 1699 Proben der Studienpatientinnen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Sensitivität und Spezifität des Nachweises von „high-risk“ HPV- DNA einerseits und „gespliceten“ E6/E7 Onkogentranskripten andererseits für das Fehlen und die Präsenz von Portiodysplasien bestimmt.

### **Sensitivität:**

In der Statistik bezeichnet die Sensitivität (auch Richtigpositiv-Rate, Empfindlichkeit oder Trefferquote; englisch sensitivity oder true positive rate) eines statistischen Tests oder einer anderen Klassifizierung die Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich positiven Sachverhalt auch durch ein positives Testergebnis zu erkennen. Sie gibt also den Anteil der richtig als positiv (richtig positiv) erkannten Sachverhalte an der Gesamtheit der in Wirklichkeit positiven Sachverhalte an. Die Sensitivität entspricht der bedingten Wahrscheinlichkeit.

$$P(\text{pos. erkannt} / \text{tatsächlich pos.}) = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven}}{\text{Anzahl der richtig positiven} + \text{Anzahl der falsch negativen}}$$

## Spezifität:

In der Statistik bezeichnet die Spezifität (auch Richtignegativ-Rate oder kennzeichnende Eigenschaft; englisch: specificity oder true negative rate) eines statistischen Tests oder einer anderen Klassifizierung die Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich negativen Sachverhalt auch durch ein negatives Testergebnis zu erkennen. Sie gibt also den Anteil der richtig als negativ (richtig negativ) erkannten Sachverhalte an der Gesamtheit der in Wirklichkeit negativen Sachverhalte an.

Die Spezifität entspricht der bedingten Wahrscheinlichkeit:

$$P(\text{neg. erkannt} / \text{tatsächlich neg.}) = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen}}{\text{Anzahl der richtig negativen} + \text{Anzahl der falsch negativen}}$$

### 2.3. Klinische Befunde und Dokumentation

Zur Befunddokumentation wurde ein entsprechender Dokumentationsbogen entwickelt. Erfasst wurden, neben allgemeinen und speziellen anamnestischen Angaben, Angaben zu Nikotinkonsum, zur Verwendung von Kontrazeptiva und zum Sexualverhalten, was in nachfolgenden Auswertungen jedoch nicht mit einfluss.

Die Anamnese wurde bei jeder Kontrolluntersuchung erneut erhoben.

Bei allen Patientinnen wurde ein bakteriologischer Abstrich und ein Spezialabstrich zum Nachweis von Chlamydien entnommen. Desweiteren wurde der Scheiden-PH-Wert ermittelt und ein Kalilaugen-Test durchgeführt.

Die kolposkopische Inspektion der Portio wurde bei allen Patientinnen grundsätzlich bei der Eingangsuntersuchung und bei den Nachfolgeuntersuchungen vorgenommen und im Befunddokumentationsbogen festgehalten.

Des weiteren wurde ein zytologischer Abstrich der Endo- und Ektozervix bei jeder Erst- und Folgeuntersuchung entnommen und bei kolposkopischem Verdacht auf eine Dysplasie zusätzlich eine Biopsie zur histologischen Untersuchung durchgeführt.

### 2.4. Kolposkopische Diagnostik

Diese Methode ist in Deutschland nur selten routinemäßiger Bestandteil der Vorsorge. In der Kolposkopiesprechstunde der Universitäts-Frauenklinik Tübingen, war die Kolposkopie jedoch fester Bestandteil jeder Untersuchung.

Bei der Kolposkopie wird die Portio zunächst im Nativzustand durch eine binokulare Lupe betrachtet. Anschließend wird die Schiller'sche Jodprobe und Essigprobe durchgeführt.

Die objektive Befunderhebung umfaßt zwei Zeichnungen: Eine stellt die Essigprobe dar und die andere zeigt das Ergebnis der Schiller'schen Iodprobe. Dabei werden die sich positiv darstellenden Areale in ein kreisrundes Diagramm, das in 12 Segmente unterteilt ist, eingezeichnet und durch eine entsprechende Fotodokumentation ergänzt.

#### *Essigprobe:*

Essigsäure hat die Eigenschaft atypisches Epithel zum Aufquellen zu bringen. Die Portio erscheint normalerweise rot, da das Epithel das tiefer liegende, gut durchblutete Stroma durchscheinen läßt. Nach Applikation von 3 %iger Essigsäure erfährt das Epithel eine Niveauzunahme und vermindert die Lichtdurchlässigkeit. Atypische Bezirke stellen sich nun weiß dar. So können Areale, die im Nativzustand bei kolposkopischer Betrachtung unauffällig waren, entdeckt bzw. besser beurteilt werden. (Hinselmann 1938)

#### Schiller'sche Jodprobe:

Jodlösung hat die Eigenschaft mit Glykogen zu reagieren und eine tief braune Farbe anzunehmen. Normales Epithel enthält Glykogen und färbt sich daher bei Betupfen mit 1 %iger Iodlösung tief braun. Atypisches Epithel enthält kein Glykogen und färbt sich gelbbraunlich. Besonders anschaulich läßt sich die Begrenzung zwischen gesundem und atypischem Epithel hervorheben. (Schiller 1929)

## **2.5. Zytologische Diagnostik**

### *Methoden*

Unter kolposkopischer Sicht wurde mit einem Watteträger ein Abstrich an Endo- und Ektozervix vorgenommen. Das erhaltene Material wurde auf einem Objektträger ausgerollt, fixiert und nach Papanicolaou eingefärbt. Die Beurteilung der Abstriche erfolgte im zytologischen Labor der Frauenklinik Tübingen.

## Nomenklatur

Nach der Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Zytologie wird die Münchner Nomenklatur II (ergänzte und differenzierte Fassung von 1975) verwendet. Hierbei wurde der Begriff der Dysplasie mit aufgenommen, um zytologische und histologische Befunde aneinander anzugleichen. Die Einteilung in fünf Gruppen, die auf Papanicolaou & Traut (1943) zurückgeht, wurde beibehalten.

Tabelle 1: Zytologische Einteilung/ Münchner Nomenklatur II

| Gruppe | Begriffsdefinition  |
|--------|---|
| I      | Normales Zellbild, dem Alter entsprechend, einschließlich leichter und degenerativer Veränderungen sowie bakterieller Zytolyse  |
| II     | Deutlich entzündliche Veränderungen an Zellen des Platten- und zervikalen Zylinderepithels. Zellen aus Regenerationsepithel, unreife metaplastische Zellen, stärkere degenerative Zellveränderungen, Para- und Hyperkeratosezellen. Normale Endometriumzellen, auch nach der Menopause. Ferner spezielle Zellbilder wie folliculäre Zervizitis, Zelländerungen bei IUP, Zeichen einer HPV-Infektion ohne wesentliche Kernveränderungen, Zeichen einer Herpes- oder Zytomegalievirusinfektion. |
| III D  | Zellen einer Dysplasie leichten bis mäßigen Grades (Zeichen einer HPV-Infektion sollten besonders erwähnt werden).  |
| IV a   | Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ  |
| IV b   | Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ, Zellen eines invasiven Karzinoms nicht auszuschließen.  |
| V      | Zellen eines malignen Tumors<br>Zellen eines Plattenepithelkarzinoms (verhornend oder nicht verhornend)<br>Zellen eines Adenokarzinoms, möglichst mit Hinweis, ob endometrialen, endozervikalen oder extrauterinen Ursprungs.<br>Zellen sonstiger maligner Geschwulste  |
| III    | Unklarer Befund:<br>Schwere entzündliche, degenerative oder iatrogene Zellveränderungen, die eine sichere Beurteilung zwischen gut- und bösartig nicht zulassen.<br>Auffällige Zellen eines Drüsenepithels, deren Herkunft aus einem Karzinom nicht sicher auszuschließen ist, möglichst ein Hinweis, ob die Zellen endometrialen, endozervikalen oder extrauterinen Ursprungs sind.  |

## **2.6. Histologische Diagnostik**

### *Methoden*

In einem Biopsat lassen sich Zellen in ihrem ursprünglichen Gewebsverband betrachten und beurteilen. Dadurch ist es möglich, die Epithelarchitektur zu beurteilen und die Basalmembran auf ihre Intaktheit hin zu bewerten. Die histologische Untersuchung stellt somit eine Methode dar, Gewebsveränderungen definitiv zu beurteilen.

Die Gewebeentnahme erfolgte unter kolposkopischer Sicht nach Durchführung der Essig- und Jodprobe, um eine erhöhte Treffsicherheit zu erlangen. Mit einer Schuchardzange wurde mindestens eine Biopsie entnommen. Diese wurden im histologischen Labor des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen aufgearbeitet und befundet. Wurden innerhalb eines Präparates unterschiedliche Schweregrade der dysplastischen Läsion diagnostiziert, so wurde grundsätzlich der höhergradige in die kritische Begutachtung aufgenommen.

Wurde aus therapeutischen Indikationen eine Konisation oder Hysterektomie erforderlich, so wurden diese Präparate ebenfalls im Institut für Pathologie aufgearbeitet.

### *Nomenklatur*

Die Klassifikation der dysplastischen Veränderungen entsprach der histopathologischen Definition von kondylomatösen Veränderungen und zervikalen intraepithelialen Neoplasien nach dem II. Weltkongreß zu Zervixpathologie und Kolposkopie (Burghardt 1978)

Tabelle 2: Klassifikation der kondylomatösen Veränderungen und zervikalen intraepithelialen Neoplasien

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Kondylomatöse Veränderungen | Plattenepithelwucherungen mit meist erhaltener Schichtung, oft Unterteilung durch Stromapapillen, tiefere Schichten weitgehend normal, Zellen der oberen Schichten zytopathisch umgewandelt, besonderes Kennzeichen: Koilozyten (Zellen mit perinukleärer Aufhellung, teils mehrkernig, Kerne oft hyperchromatisch, pyknotisch oder degeneriert) |
| CIN I                       | Leicht erhöhter Zellreichtum, in den basalen Schichten vermehrt Mitosen und Zellen mit Zeichen der zellulären Atypie (Zellpolymorphie, Kernpolymorphie, -polychromasie und hyperchromasie), oft erhöhte Stromapapillen, weitgehend erhaltene Epithelschichtung, oft Koilozyten)  |
| CIN II                      | Mäßig erhöhter Zellreichtum, Mitosen u. zelluläre Atypie umfassen von basal mindestens die Hälfte der Epitheldicke, oft erhöhte Stromapapillen, gestörte Epithelschichtung, selten Koilozyten  |
| CIN III                     | Stark erhöhter Zellreichtum, Epithel vollständig atypisch umgewandelt, vermehrte Mitosen im gesamten Epithel, oft erhöhte Stromapapillen, Epithelschichtung aufgehoben, praktisch nie Koilozyten   |

## 2.7. Virusdiagnostik

Im Anschluß an den zytologischen Kontrollabstrich wurden zwei weitere Abstriche zur DNA- Isolierung und für die Gewinnung von RNA entnommen. Es wurden dazu sterile Wattetupfer verwendet. Der Tupfer für die DNA- Isolierung wurde in Proteinase K- Puffer aufgenommen, der Tupfer für die Isolierung von RNA in sog. Solution D. Beide Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 70°C aufbewahrt. Die molekularbiologische Diagnostik fand im Labor des Pathologischen Institutes Tübingen der Abteilung für allgemeine Pathologie und Pathologischer Anatomie statt.

### *Extraktion von DNA*

Zunächst wurde durch Vortexen das Zellmaterial vom Tupfer entfernt, anschließend müssen die Zellmembranen zerstört werden, um die DNA zu extrahieren. Die Proben wurden dafür zunächst in Proteinase- K- Puffer ca. 5 min bei 94 °C gekocht, danach kurz auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die zellulären Proteine nach Zugabe von Proteinase- K zwei Stunden bei 55°C inkubiert und verdaut.

Die Proteinfraction konnte dann durch Aufreinigung mit PCI- Lösung (Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol, VV 25:25:1) und Zentrifugation abgetrennt werden. Die wässrige Oberphase enthielt die DNA und konnte abpipettiert werden. Zum Ausfällen der DNA wurden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  unter Zugabe von Lithiumchlorid inkubiert und anschließend gründlich bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das zurückgebliebene Pellet wurde mit Ethanol zur Reinigung gewaschen und das Präzipitat vakuumgetrocknet. In destilliertem Wasser konnte es resuspendiert und die Konzentration im Photometer bestimmt werden.

### *Polymerasekettenreaktion (PCR)/ Nachweis der viralen DNA*

In Vorarbeiten wurden bereits diagnostische molekularbiologische Methoden (nested- PCR mit L1- Konsensus-Primern) zur Typisierung von Infektionen mit Humanen Papillomviren entwickelt, die eine Steigerung der Sensitivität des HPV-Nachweises um 30% zeigen (Sotlar et. al 2004).

Der etablierte nested- PCR- Assay mit L1- Konsensus-Primern wurde bereits an mehreren Hundert Portio- Abstrichen von Patientinnen der Kolposkopischen Ambulanz der Universitäts- Frauenklinik eingesetzt. Da jedoch in Portio- Abstrichen wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht, wurde eine Methode entwickelt, die aus sehr wenig Material eine umfassende HPV- Typisierung erlaubt, die sog. E6-nested- Multiplex- PCR (Sotlar et. al 2004)

Zunächst mußte die strukturelle Integrität der DNA mittels Amplifikation des humanen  $\beta$ - Globin- Gens überprüft werden (Saiki et al. 1988). Nur die positiven Fälle wurden weiter untersucht.

Dabei wurde in einem ersten Schritt ein Teilstück des E6-Gens aus einem breiten Spektrum verschiedener HPV-Typen ( u.a. HPV-6, -11, -16, -31, -33, -35, -42, -43, -44, -45 -52, -56, -58) mit Hilfe von den in der Literatur häufig benutzten L1-Konsensus-Primern MY09/11 und GP5+/6+ amplifiziert, da innerhalb des L1- Gens große Sequenzhomologien nachzuweisen sind. (de Roda Husman et al. 1995; Manos et al. 1989). Die MY09/11 bzw. GP5+/6+ positiven Fälle gingen in die Multiplex- PCR ein, um die zu Grunde liegenden HPV- Typen zu identifizieren.

In einem zweiten Schritt erfolgt die Typisierung. Dabei werden die Primer für die nested- PCR auf vier verschiedene Mixe zu jeweils vier bis fünf Primerpaaren so verteilt, daß sich die Amplifikationsprodukte in ihrer Länge deutlich unterschieden und identifiziert werden konnten (Multiplex-PCR). (Sotlar et al. 2004)

Damit konnte zudem die Anzahl der PCR-Läufe verringert werden.

Die Spezifität der Methode wurde mit HPV- Plasmidcocktails überprüft.

In jenen Fällen, bei denen eine Infektion mit High- Risk- Viren (HPV- 16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -59, -66 und -68) nachgewiesen wurde, wurde aus dem zweiten Abstrichtupfer die gesamte RNA extrahiert.

### *Gelelektrophorese*

Die Analyse der PCR- Produkte erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in 2%-igen Agarose- Gelen und Visualisierung mittels Ethidiumbromid unter UV- Licht.

## **2.8. Nachweis von mRNA der viralen Onkogene E6/E7**

Eine der zentralen Fragestellungen dieser Studie beschäftigt sich mit dem Vorhandensein von HR- HPV E6/E7 mRNA im Sinne einer transkriptioneller Aktivität der E6/E7 Onkogene der „high- risk“- HPV- Typen. Dazu wurde ein spezieller RT-PCR- Assay etabliert. (Sotlar, et al. 2004)

Dazu mußte zunächst die RNA extrahiert werden, anschließend einer Reverse-Transkriptase-Reaktion zugeführt um dadurch in eine cDNA umgeschrieben zu werden.

### *Extraktion der RNA*

Die RNA wurde auf einem von Chomczynski und Sacchi et al. 1987 beschriebenen Protokoll mit kleinen Modifikationen extrahiert (Selinka et al. 1998) Während der Arbeitsschritte mußte die Ribonuklease durch Anwesenheit von Guanidinium Thiozyanat inhibiert werden. Durch langsames Auftauen und Zwischenlagern auf Eis wurde eine Degradation der RNA verhindert. Nach Vortexen, zur Trennung des Zellmaterials vom Tupfer, wurde anschließend durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff die Zellmembranen zerstört. Die RNA konnte in der wässrigen Phase, nachdem mit PCI- Lösung zentrifugiert wurde, abpipettiert werden. Zum Ausfällen der RNA wurden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit Isopropanol eingefroren. Das erhaltene Präzipitat wurde mit 75%igem DEPC Ethanol gewaschen, das Pellet vakuumgetrocknet und schließlich in Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration konnte bei 260 nm photometrisch bestimmt werden.

### *cDNA-Synthese mit typspezifischen Primern*

Die RNA wurde im Anschluß einer Reversen Transkriptase-Reaktion zugeführt und in komplementäre DNA überführt (cDNA). Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA- Polymerase und synthetisiert in 5'- 3' Richtung, mit einer einzelsträngigen RNA als Matrize, eine komplementäre DNA (cDNA). Es wurden Typ- spezifische Primer in einer Multiplex- Reaktion gleichzeitig eingesetzt. Für den Nachweis eines „housekeeping“ Gens wurde ein Zytokeratin- 13- spezifischer Primer eingesetzt. Die Inkubation erfolgte nach Standardverfahren (Sotlar et al. 2004)

### *nested RT-PCR*

Die in cDNA umgeschriebene RNA wurde jetzt amplifiziert mit ähnlichen E6-Konsensus-Primern, die schon zur HPV- Typisierung zum Einsatz kamen. Für die nested- PCR wurden interne Primer kreiert, die speziell dafür ausgewählt wurden, die jeweiligen E6- Splice- Stellen sicher einzuschließen. Hierauf wurde besonderer Wert gelegt, da Amplifikate, welche sich über die volle Länge der E6/E7 Onkogene erstrecken, sog. „full-length“ Transkripte, sich nicht von einem Amplikon der genomischen DNA unterscheiden lassen (Johnson et al. 1990)

Desweiteren wurde eine hot start PCR mit Verwendung einer besonderen DNA-Polymerase verwendet, damit möglichst keine unspezifischen Hybridisierungen während des Pipettierens bei Raumtemperatur entstanden.

3 µl aus dem RT- PCR- Produkt wurde als Template in die nested- RT- PCR eingesetzt. In RT- PCR und nested RT- PCR folgten nach 10-minütiger Denaturierung bei 94°C, 35 PCR- Amplifikationszyklen mit spezieller Temperaturführung, die aus je 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Annealing bei 56°C und 45 sec Elongation bei 72°C bestanden.

### *Gelelektrophorese zur Identifikation der Splice-Stellen*

Die Identifikation der Splice-Stellen erfolgte durch den Vergleich mit einem Längenstandard. Dadurch konnten die Amplifikationsprodukte einem bestimmten Splice- Produkt zugeordnet werden (E6/E7 „full-length“-Transkript, E6\*I, E6\*II).

## **2.9. Genehmigung der Studie durch die Ethik-Kommission**

Eine Genehmigung durch die Ethik- Kommission der Universität Tübingen (Vorsitzender Prof. Dr. med. Dr. theol. D. Rössler) liegt vor. Das Votum der Ethik-Kommission liegt unter der Nummer Pr.Nr. 192/99 vor.

## **2.10. Wissenschaftliche Auswertung**

Die statistischen Auswertungen der Studienergebnisse erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Klaus Dietz, geschäftsführender Direktor des Instituts für Medizinische Biometrie des Universitätsklinikums Tübingen

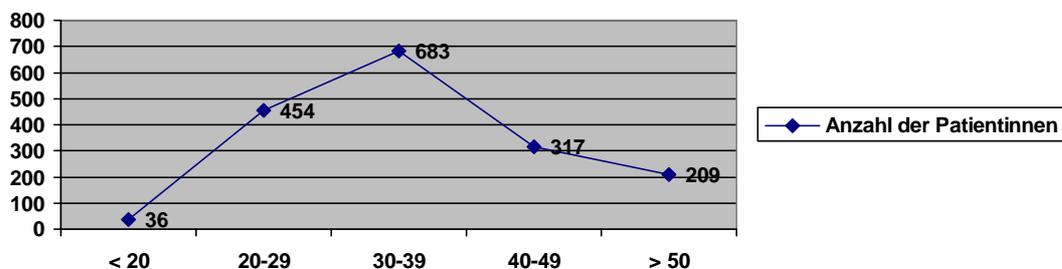
### 3. Ergebnisse:

#### 3.1. Altersstruktur der Patientinnen

Die Altersverteilung der 1699 zunächst untersuchten Patientinnen lag zwischen 12 und 93 Jahren.

36 Patientinnen waren jünger als 20 Jahre, im Alter zwischen 20 und 29 Jahren stellten sich 454 Patientinnen vor, 683 Patientinnen lagen im Alter zwischen 30 und 39 Jahren, 317 Patientinnen lagen zwischen 40 und 49 Jahren und 209 Patientinnen waren mindestens Jahre alt.

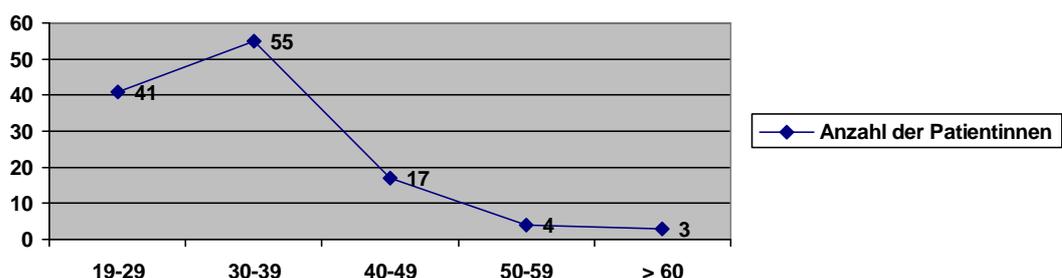
Abbildung 1: durchschnittliche Altersverteilung des Studienkollektivs



Zu Beginn der Studie im Jahr 2000 lag bei den 120 Patientinnen, die sich initial mit HPV 16 positivem Befund präsentierten, das mediane Alter bei 33 Jahren.

41 Patientinnen lagen zwischen 19 und 29 Jahren, der Altersgipfel wurde zwischen 30 und 39 Jahren mit 55 Patientinnen erreicht, 17 Patientinnen wiesen ein Alter von 40 bis 49 Jahren auf, zwischen 50 und 59 Jahren wurden 4 Patientinnen aufgenommen und älter als 60 Jahre waren 3 Patientinnen.

Abbildung 2: durchschnittliche Altersverteilung des Basiskollektivs



### 3.2. Beobachtungszeiträume

Die 120 Patientinnen wurden über unterschiedliche Zeiträume beobachtet; die in diese Auswertung und in das Basiskollektiv aufgenommenen Untersuchungseinheiten, nachfolgend als Intervalle bezeichnet, ergaben ein medianes Beobachtungsintervall von 7,3 Monaten und bestehen aus einer Gesamtzahl von 265 Intervallen zwischen jeweils 2 Untersuchungen. Ausgewertet wurden pro Patientin zwischen einem und 8 Intervallen. Der Durchschnitt lag bei 3,04 Intervallen pro Patientin.

### 3.3. HPV-Typen Verteilung

HPV- Typ 16 war im Gesamtkollektiv der mit Abstand am häufigsten nachgewiesene High- Risk- Typ mit 30,7 % (365/1699). HPV 31 wurde am zweithäufigsten nachgewiesen mit 9,7% (115/1699) , gefolgt von HPV 51, 52 und 56 zwischen 7,1 % und 6,4%. Für HPV 66, 58 und 33 lag die Prävalenz zwischen 6,4% und 5,4 % und für HPV 18 bei 4,4%. HPV 68, 45, 39, 35 waren zwischen 4,2% und 2,3%. HPV 59 wurde am seltensten nachgewiesen (2,2%; 26/1699). Tabelle 5 gibt die HPV-Prävalenz in absteigender Reihenfolge wieder:

Tabelle 5: Detektionsraten der HR-HP-Viren

| HPV-Typ                | 16   | 31  | 51  | 52  | 56  | 66  | 58  | 33  | 18  | 68  | 45  | 39  | 35  | 59  |
|------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Anzahl<br>Intervalle N | 365  | 115 | 103 | 85  | 78  | 76  | 71  | 64  | 53  | 50  | 44  | 32  | 27  | 26  |
| %-Anteil               | 30,7 | 9,7 | 8,7 | 7,1 | 6,5 | 6,4 | 6,0 | 5,4 | 4,4 | 4,2 | 3,7 | 2,7 | 2,3 | 2,2 |

### 3.4. Assoziation der histologischen Befunde mit dem Nachweis von HR-HPV DNA im Vergleich zum zusätzlichen Nachweis der transkriptionellen Aktivität der HR-HPV Onkogene E6 und E7

Diese Auswertung wurde anhand der Daten der zunächst 1699 in die Studie aufgenommenen Patientinnen, erhoben. In dieser Auswertung sollten ausschließlich die histologischen Befunde von CIN 0 bis CIN III mit der Häufigkeit des Nachweises von HR- HPV DNA im Vergleich zum zusätzlichen Nachweis von E6/E7- Transkripten untersucht werden. Von den 1699 Patientinnen wurde bei 864 Untersuchungsintervallen histologische Befunde erhoben (CIN 0, n= 400; CIN I-III,

n= 464). Der Zusammenhang der molekularbiologischen Ergebnisse des Nachweises von HR- HPV- DNA bzw. mRNA wurde mit diesen morphologischen Befunden verglichen und ausgewertet.

Bei 400 Intervallen lag CIN 0 vor, wovon bei 149 Intervallen (37,3%) (149/400) HR-DNA nachgewiesen wurde und davon bei 41 Intervallen (10,3%) (41/400) auch E6/E7- mRNA. Unter den 149 HR-DNA-positiven Untersuchungsintervallen, waren somit 27,5% der Infektionen transkriptionell aktiv.

199 Biopsien zeigten eine CIN I- Läsion, wovon bei 108 Intervallen (54,3%; 108/199) HR- DNA nachweisbar war und bei 37 Intervallen (18,6%; 37/199) zusätzlich E6/E7 Transkripte, entsprechend 43,3 % (37/108) der HR- DNA- positiven- Intervalle.

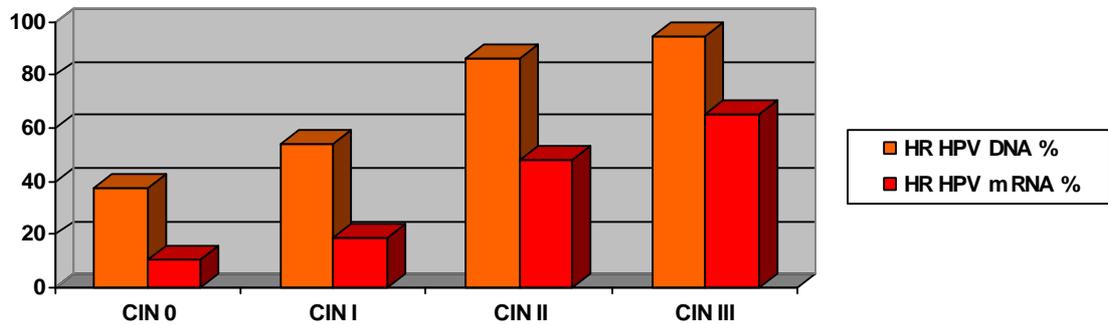
In der Gruppe der CIN II- Läsionen mit einer Anzahl von 119 Intervallen wurde bei 103 Proben (86,6%; 103/119) HR- DNA nachgewiesen und bei 57 Proben (47,9%; 57/ 119) mRNA. Von den 103 HR- DNA- positiven Proben waren somit 55,4% der Infektionen (57/103) transkriptionell aktiv.

Die letzte Gruppe mit 146 Intervallen, die morphologisch einer CIN III- Läsion zugeordnet werden konnten, zeigten auf DNA- Ebene bei 138 Intervallen, also in 94,5% (138/146) ein positives Ergebnis, wobei auf mRNA- Ebene 96 Proben (65,7 %; 96/146) ein positives Ergebnis aufwiesen. Somit waren von den 138 HR-DNA-pos. Intervallen 96 (69,6%) transkriptionell aktiv. (Tabelle 6 u. Abbildung 3)

Tabelle 6: histologische Befunde in Assoziation mit den Nachweisraten von HR-HPV-DNA bzw. mRNA

| <b>Morphologie</b> | <b>Gesamt</b><br>n = (864/1699) | <b>HR-DNA pos</b><br>n = (%) | <b>HR-mRNA</b><br>n = (%) | <b>mRNA/ DNA</b><br>(%) |
|--------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>CIN 0</b>       | <b>400</b>                      | <b>149 (37,3)</b>            | <b>41 (10,3)</b>          | <b>27,5</b>             |
| CIN I              | 199                             | 108 (54,3)                   | 37 (18,6)                 | 43,3                    |
| CIN II             | 119                             | 103 (86,6)                   | 57 (47,9)                 | 55,4                    |
| CIN III            | 146                             | 138 (94,5)                   | 96 (65,7)                 | 69,56                   |

Abbildung 3: histologische Befunde in Assoziation mit den Nachweisraten von HR-HPV-DNA bzw. mRNA



### 3.5. Sensitivität und Spezifität für die Ermittlung von zervicalen Dysplasien

Es wurde die Sensitivität, die Spezifität des Nachweises von HR- HPV- DNA und mRNA (gesplitted E6-Onkogen transkripte) einerseits für die Präsenz und andererseits für das Fehlen von Portiodysplasien bestimmt.

Für den positiven Vorhersagewert von Portiodysplasien (CIN I– III bzw. Pap III d – Pap IV a) lag die Sensitivität basierend auf dem high- risk HPV- DNA- Nachweis bei 74,7 %, (349/464) die Sensitivität auf Grund des mRNA- Nachweises bei 40,7 (190/467) %.

Im Gegensatz dazu zeigte die Spezifität bei Abwesenheit einer Portiodysplasie (CIN 0 bzw. Pap II) beim high- risk HPV- DNA- Nachweis 62,75 % (149/400) und beim E6- Onkogen transkript- Nachweis 89,75 % (41/400).

Tabelle 8: Vergleich der Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von HR-HPV-DNA bzw mRNA

| High-risk HPV (Histo/ Zyto integriert) | Sensitivität (%) | Spezifität (%) |
|--|------------------|----------------|
| DNA                                    | 75,2 %           | 62,8 %         |
| E6/E7 mRNA                             | 40,9 %           | 89,8 %         |

### **3.6. Untersuchung der Dynamik der morphologischen Befunde im Zusammenhang mit dem Nachweis von HR-HPV-DNA bzw. HR-HPV-mRNA**

Mit dieser Auswertung wurde die Dynamik einer Portiodysplasie, was Entstehung, Progression, Persistenz oder Regression der morphologischen Befunde, in Abhängigkeit vom Nachweis der HR- HPV- DNA bzw. dem Nachweis der transkriptionellen Aktivität, der viralen Onkogene E6/E7 anbetrifft, untersucht.

Die Kontrollgruppe, die auf HR- HPV- DNA- und E6/E7- mRNA- Ebene ein negatives Ergebnis aufwies, bestand aus 76 Patientinnen, von denen 117 Untersuchungsintervalle ausgewertet werden konnten. Bei 17 dieser HR- HPV- negativen Kontrollintervallen konnten jedoch LR- HPV- DNA nachgewiesen werden. In 18 Intervallen (15,4% ,18/117) (16 Patientinnen) entstand, persistierte oder progredierte eine zervikale Dysplasie: Darunter waren es 12 Intervalle (10,3% , 13/117), von 11 Patientinnen, in denen eine Portiodysplasie neu entstand oder eine bestehende Dysplasie eine Progression zeigte. In den anderen 6 dieser Intervalle (5,1 % ; 6/117; 6 Patientinnen), konnte trotz negativer molekularbiologischer Befunde eine persistierende Portiodysplasie, also ein Bestehen über mindestens 2 Beobachtungsintervalle, festgestellt werden. Bei den Intervallen bei denen eine zervikale Dysplasie neu entstand oder progredierte, handelte es sich bei allen 12 Intervallen um eine CIN I- Läsion, bei den 6 Intervallen, die eine persistierende Infektion zeigten, handelte es sich bei 5 Intervallen um eine CIN I- Läsion und bei einem Intervall um eine CIN III- Läsion. Bei 15 Untersuchungsintervallen (12,8%; 15/117), von 13 Patientinnen kam es zu einer kompletten Regression einer Dysplasie, so dass keine Portiodysplasie mehr nachgewiesen werden konnte (CIN 0).

Von den 117 Beobachtungsintervallen der Kontrollgruppe, konnten in 84 Intervallen keine Veränderung des Befundes festgestellt werden. Diese 76 Frauen blieben somit innerhalb des Beobachtungszeitraumes bezüglich einer Zervixdysplasie „gesund“.

Die zweite Gruppe mit insgesamt 48 Untersuchungsintervallen von 40 Patientinnen, die im HR- DNA- Nachweis ein positives Ergebnis und im HR- mRNA- Nachweis ein negatives Ergebnis aufwiesen, entwickelte in 18 Untersuchungsintervallen (37,5 %; 18/48; 18 Patientinnen) eine Portiodysplasie, zeigte eine Progression einer bestehenden Dysplasie oder deren Persistenz.

Davon entwickelte sich in 4 Intervallen (8,3%; 4/48; 4 Patientinnen) eine Portiodysplasie bzw. eine bestehende Dysplasie zeigte eine Progression in das

nächst höhere Stadium. Es handelte sich dabei einmal um eine CIN I– Läsion, zwei mal um eine CIN II– Läsion und einmal um eine CIN III– Läsion.

In 14 Untersuchungsintervallen (29,2%; 14/48, 14 Patientinnen) der HR- HPV- DNA- positiven Proben zeigte sich ein Persistieren einer bestehenden Portiodysplasie. Die morphologischen Befunde entsprachen hier in 5 Untersuchungsintervallen einer CIN I- Läsion, in weiteren 6 Intervallen einer CIN II- Läsion und in 3 Intervallen einer CIN- III- Läsion.

Bei 8 Intervallen (16,7% ; 8/48; 8 Patientinnen) der DNA pos / mRNA neg. Intervallen konnte eine jeweils komplette Regression verzeichnet werden. In den restlichen 22 (45,8%) Intervallen waren auch im Verlauf keine Portiodysplasien nachweisbar.

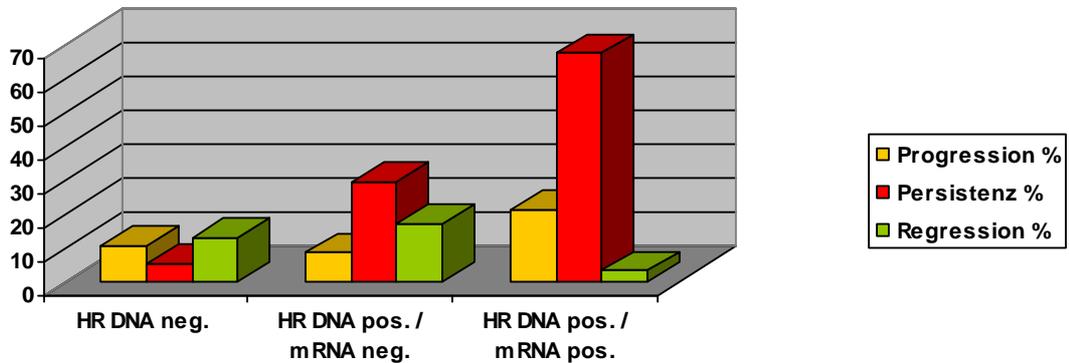
In der dritten Gruppe mit insgesamt 100 Untersuchungsintervallen von 74 Patientinnen mit transkriptionell aktiver HR-HPV Infektionen, entwickelte sich in 88 Untersuchungsintervallen (88% ; 88/100) eine Portiodysplasie bzw. ein bestehende Dysplasie persistierte oder progredierte ins nächst höhere Stadium über mindestens 2 Kontrollintervalle. Bei 21 dieser Intervalle handelte es sich um eine Progression ins nächst höhere Stadium, bei 67 Intervallen persistierte die Infektion über 2 Beobachtungsintervalle. Bei 21 Untersuchungsintervallen (21% - 21/100) (18 Patientinnen) entwickelte sich eine Portiodysplasie oder progredierte in ein höheres Stadium. Hier handelte es sich 4 mal um eine CIN I– Läsion, weitere 4 mal um eine CIN II– Läsion und in 13 Intervallen um eine CIN III– Läsion. In 67 Untersuchungsintervallen (67%; 67/100; 60 Patientinnen) persistierte eine bestehende Portiodysplasie. Bei 30 Intervallen wurde eine CIN I– Läsion diagnostiziert, bei 19 Intervallen eine CIN II– Läsion und bei 18 Intervallen eine CIN III– Läsion.

Nur in 3 Untersuchungsintervallen (3% - 3/100) (3 Patientinnen) konnten Regressionen einer Portiodysplasie festgestellt werden. Bei diesen 3 Untersuchungsintervallen, bei denen morphologisch eine Regression, trotz positivem molekularbiologischen Befund, zu verzeichnen war, führte in einem Untersuchungsintervall zum Verschwinden einer Dysplasie (CIN 0) ausgehend von einer CIN I- Läsion. In 2 Untersuchungsintervallen wurde noch eine geringe Dysplasie (CIN I) diagnostiziert, ausgehend von einer CIN II- Läsion und einmal von einer CIN III- Läsion.

Tabelle 9: Dynamik der morphologischen Befunde in Assoziation des Nachweises von HR-HPV-DNA bzw. mRNA

| HPV 16<br>DNA /<br>E6/E7<br>mRNA | Anzahl N Intervalle<br>Insg. 265<br>Anzahl<br>Patientinnen ( )<br>N | Entstehung /<br>Progression/<br>Persistenz einer<br>Portiodysplasie<br>N (%) | Regression<br>Einer<br>Portiodysplasie<br>N (%) | status<br>gesund<br>idem | Morphologische<br>Befunde              | Anzahl N der<br>der Patientinnen |
|----------------------------------|---|--|---|--------------------------|--|----------------------------------|
| HR-DNA neg. -/-                  | 117<br>(76 Pat.)  | 18 (15,4%)   |   |                          | CIN I: 17<br>CIN III: 1                | 17                               |
|                                  |   |  | 15 (12,8 %)                                     |                          | CIN 0: 15                              | 13                               |
|                                  |   |  |   | 84<br>(71,7%)            |  | 46                               |
| HR-DNA pos. /<br>mRNA neg + / -  | 48<br>(40 Pat.)   | 18 (37,5%)   |   |                          | CIN I: 6<br>CIN II: 8<br>CIN III: 4    | 18                               |
|                                  |   |  | 8 (16,7%)                                       |                          | CIN 0: 8                               | 8                                |
|                                  |   |  |   | 22<br>(45,8%)            |  | 14                               |
| HR-DNA pos. /<br>DNA pos. + / +  | 100<br>(74 Pat.)  | 88 (88%)   |   |                          | CIN I: 34<br>CIN II: 23<br>CIN III: 31 | 65                               |
|                                  |   |  | 3 (3%)  |                          | CIN 0: 1<br>CIN I: 2                   | 3                                |
|                                  |   |  |   | 9 (9%)                   |  | 6                                |

Abbildung 5: Darstellung der Dynamik in Assoziation des Nachweises von HR-HPV-DNA bzw mRNA



### 3.7. Korrelation der morphologischen Befunde im Vergleich mit Einfach- und Mehrfachinfektionen auf HR-DNA-Ebene und im Transkriptnachweis

In dieser Auswertung wurden die morphologischen Befunde bei HR- HPV- Einfach- und HR- HPV- Mehrfachinfektionen verglichen. In beiden Gruppen wurden darüber hinaus die morphologischen Befunde von lediglich HR- HPV- DNA positiven Samples denen mit zusätzlich positivem E6/E7 Onkogen- Transkriptnachweis gegenüber gestellt. In der Gruppe mit nachgewiesener HR- HPV Mehrfachinfektion wurden zusätzlich die morphologischen Befunde der Intervalle mit einfacher transkriptionell aktiver HR- HPV- Infektion und die morphologischen Befunden der Intervalle mit mehrfach transkriptionell aktiver HR- HPV- Infektion verglichen.

Es wurden entsprechend Tabelle 7 die zytologischen und histologischen Befunde integriert. Da unter die zytologische Diagnose „Pap IIID“ sowohl Befunde CIN I und CIN II subsummiert werden, ist die Zuordnung der zytologischen zu den histologischen Befunden nur bedingt möglich. Daher wurden die Dysplasiegrade „gering“, „mäßig“ und „schwer“ zusammengefasst und unter dem Begriff „krank“ subsummiert. Die Abwesenheit einer Portiodysplasie wurde entsprechend dem Begriff „gesund“ bezeichnet.

Die erste Untergruppe, die ein ausschließlich HR- HPV- DNA positives Ergebnis aufwies bestand aus 31 Intervallen, was 31,6 % (31/98) der Einfachinfektionen ausmacht. Die zweite Untergruppe bestand aus 67 Intervallen, was 68,4% (67/98)

der Einfachinfektionen ausmacht, bei denen zusätzliche HR- HPV- Transkripte nachweisbar waren.

Bei erster Untergruppe wurde bei 12 Intervallen (38,7%) eine Dysplasie diagnostiziert. Morphologisch wurden die Dysplasien in 4 Fällen einer CIN I- Läsion zugeordnet, in 4 Fällen einer CIN II- Läsion und in weiteren 4 Fällen einer schweren Dysplasie.

Die zweite Untergruppe der Einfachinfektionen mit zusätzlichem E6/E7- Onkogen-Transkriptnachweis, die aus 67 Intervallen bestand, wies bei 56 Fällen (83,6%) eine Dysplasie auf: Bei 26 Intervallen lag eine CIN I- Läsion zugrunde, in 11 Fällen eine CIN II- Läsion und in 19 Fällen eine CIN III- Läsion.

Die zweite Gruppe umfasst die der Mehrfachinfektionen mit insg. 50 Untersuchungsintervallen, welche nochmals in zwei Untergruppen geteilt wurde. Bei erster Untergruppe mit 18 Intervallen (36% der Mehrfachinfektionen), war lediglich HR- HPV- DNA nachweisbar, bei zweiter Untergruppe mit 32 Intervallen (64 % der Mehrfachinfektionen) zusätzlich HR- HPV- mRNA. Diese Intervalle wurden weiter differenziert in „einfach transkriptionell aktiv“ bzw. „mehrfach transkriptionell aktiv“. Bei der Untergruppe der Mehrfachinfektionen mit ausschließlichem HR- HPV- DNA Nachweis wurden bei 6 Untersuchungsintervallen (33,3%) eine Portiodysplasie diagnostiziert. Die morphologischen Befunde entsprachen zweimal einer CIN I- Läsion und viermal einer CIN II- Läsion.

Die zweite Untergruppe der Mehrfachinfektionen mit HR- HPV- E6/E7 Transkriptnachweis zeigte bei 24 Untersuchungsintervallen nur einen transkriptionell aktiven HR- HPV- Typen und bei 8 Untersuchungsintervallen eine transkriptionelle Aktivität durch mehrere HR- HPV- Typen.

Bei den 24 Untersuchungsintervallen mit Nachweis einfacher transkriptioneller Aktivität wurde bei 20 Untersuchungsintervallen (83,3%) eine Portiodysplasie festgestellt, wobei 5 mal eine CIN I- Läsion zu Grunde lag, 9 mal eine CIN II- Läsion und in 6 Fällen eine CIN III- Läsion.

Interessanterweise zeigt sich in allen 8 Untersuchungsintervallen mit mehrfacher transkriptioneller Aktivität das Vorliegen einer Portiodysplasie. In einem Fall lag eine einer CIN I- Läsion zu Grunde, in zwei Fällen eine CIN II- Läsion und in 5 Fällen eine CIN III- Läsion.

Tabelle 10: Vergleich der morphologischen Befunde in Assoziation mit HR-HPV-Einfach- bzw. Mehrfachinfektion

|   | Anzahl<br>Intervalle    | Dysplasie ja / nein                               |                                     | morphologischer<br>Befund   |  |
|---|-------------------------|---|-------------------------------------|---|--|
|   | DNA / mRNA              |   |                                     |   |  |
| HR- Einfachinfektion<br>Anzahl N = 98 Intervalle  | + / -<br>N = 31 (31,6%) | gesund: n = 18 (58,1 %)<br>krank: n = 12 (38,7 %) |                                     | CIN 0: 18<br>CIN I : 4<br>CIN II: 4<br>CIN III: 4<br><br>Pap III: 1     |  |
|   | + / +<br>N = 67 (68,4%) | gesund: n = 9 (13,4 %)<br>krank: n = 56 (83,6%)   |                                     | CIN 0 : 9<br>CIN I : 26<br>CIN II : 11<br>CIN III: 19<br><br>Pap III: 2 |  |
| HR- Mehrfachinfektion<br>Anzahl N = 50 Intervalle | + / -<br>N = 18 (36%)   | gesund: n = 12 (66,7 %)<br>krank: n = 6 (33,3 %)  |                                     | CIN 0: 12<br>CIN I : 2<br>CIN II: 4                                     |  |
|   | + / +<br>N = 32 (64%)   | 1x mRNA+<br>Anzahl N= 24                          | > 1x mRNA+<br>Anzahl N= 8           | 1x mRNA +<br>Anzahl N= 24   | > 1x mRNA +<br>Anzahl N= 8               |
|   |                         | gesund: 4<br>(16,6%)<br><br>krank: 20<br>(83,3%)  | gesund: 0<br><br>krank: 8<br>(100%) | CIN 0: 4<br><br>CIN I : 5<br>CIN II: 9<br>CIN III: 6                    | CIN I : 1<br><br>CIN II: 2<br>CIN III: 5 |

### 3.8. Vergleich der morphologischen Befunde zwischen einfach- und mehrfach transkriptionell aktiven HR-HPV-Infektionen

In dieser Tabelle wurden nochmals die Ergebnisse der morphologischen Befunde bei Abwesenheit von mRNA, bei einfach transkriptioneller Aktivität und bei mehrfach transkriptioneller Aktivität verglichen und graphisch gegenübergestellt. Weiterhin wurde untersucht von jeweils wievielen Patientinnen die Intervalle stammen.

Eine HR- HPV- Infektion ohne nachweisbare transkriptionelle Aktivität der E6/E7 Onkogene lag bei 49 Untersuchungsintervallen vor (31 aus der Gruppe der Einfachinfektionen mit HR- HPV- DNA und 18 aus der Gruppe der Mehrfachinfektionen), davon wurde in 30 Intervallen (61,2 %; 30/49) keine Dysplasie nachgewiesen, in lediglich 18 Intervallen (36,7 %; 18/49) wurde eine Portiodysplasie diagnostiziert. Die 30 Intervalle „ohne Dysplasie“ stammen von 25 Patientinnen, die 18 Intervalle „mit Dysplasie“ beziehen sich auf 18 Patientinnen.

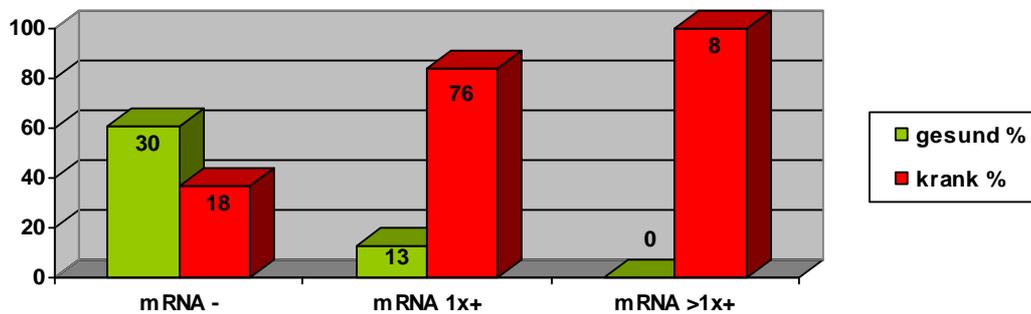
In 91 Untersuchungsintervallen lag eine einfach transkriptionelle Aktivität der Onkogene vor (67 aus der Gruppe der HR-DNA-Einfachinfektionen und 24 aus der Gruppe der HR- HPV- DNA- Mehrfachinfektionen), wovon bei 13 Intervallen (14,3 %) (13/91) nicht dysplastisches Portioepithel vorlag und in 76 Intervallen (83,5 %) (76/91) eine Portiodysplasie diagnostiziert wurde. Die 13 Intervalle „ohne Dysplasie“ beziehen sich auf 13 unterschiedliche Patientinnen und die 76 Intervalle mit Nachweis von dysplastischem Epithel stammen von 70 Patientinnen.

Bei 8 Untersuchungsintervallen wurde eine mehrfach transkriptionelle Aktivität nachgewiesen und bei diesen lag interessanterweise zu 100 % eine Portiodysplasie vor. Die 8 Intervalle stammen von 7 Patientinnen.

Tabelle 11: Vergleich der morphologischen Befunde in Assoziation mit einfach- bzw. mehrfach transkriptioneller Aktivität oder Abwesenheit von transkriptioneller Aktivität

| transkriptionelle Aktivität | Anzahl N Intervalle | Dysplasie ja / nein                               | morphologische Befunde   | Anzahl N Patientinnen          |
|-----------------------------|---------------------|---|--|--------------------------------|
| mRNA -                      | 49                  | gesund: n = 30 (61,2 %)<br>krank: n = 18 (36,7 %) | CIN 0: 30<br>CIN I : 6<br>CIN II: 8<br>CIN III: 4<br>Pap III: 1    | gesund: n= 25<br>krank: n= 18  |
| mRNA 1x +                   | 91                  | gesund: 13 (14,3 %)<br>krank: 76 (83,5 %)         | CIN 0: 13<br>CIN I : 31<br>CIN II: 21<br>CIN III: 25<br>Pap III: 2 | gesund: n =13<br>krank: n = 70 |
| mRNA > 1x +                 | 8                   | krank: 8 (100 %)                                  | CIN I : 1<br>CIN II : 2<br>CIN III: 5                              | krank: n = 7                   |

Abbildung 6: morphologische Befunde bei einfach- bzw. mehrfach transkriptioneller Aktivität oder Abwesenheit von transkriptioneller Aktivität



### 3.9. Sensitivität und Spezifität für den Nachweis einer CIN- Läsion bei einfach transkriptioneller Aktivität, mehrfach transkriptioneller Aktivität und Abwesenheit von mRNA

Es wurden vergleichsweise für jede oben genannte Gruppe, Abwesenheit von mRNA-, einfach transkriptionelle Aktivität mRNA 1+ und mehrfach transkriptionelle Aktivität, die Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von CIN- Läsionen berechnet.

In der Gruppe ohne Transkriptnachweis lag die Sensitivität bei 36,7 % und die Spezifität bei 38,8 %.

Bei einfach transkriptioneller Aktivität lag die Sensitivität bei 77,8 % und die Spezifität bei 85,7%. Bei mehrfach transkriptioneller Aktivität lag Sensitivität bei 100% vor. Die Spezifitätsrate ist nicht berechenbar, da der Anteil der Gesunden gleich 0 ist.

Tabelle 12: Vergleich der Sensitivität und Spezifität bei einfacher bzw. mehrfacher transkriptioneller Aktivität bzw. bei Abwesenheit von transkriptioneller Aktivität

|             | Sensitivität (%) | Spezifität (%) |
|-------------|------------------|----------------|
| mRNA –      | 36,7 %           | 38,8 %         |
| mRNA 1x +   | 77,8 %           | 85,7%          |
| mRNA > 1x + | 100%             | -              |

### **3.9. Vergleich der Dynamik einer Portiodysplasie in Abhängigkeit von einfach- und mehrfach transkriptioneller Aktivität**

In dieser Auswertung wurden die Auswirkungen von einfacher- bzw. mehrfacher transkriptioneller Aktivität auf die Dynamik von Portiodysplasien in 3 unterschiedlichen Gruppen untersucht: In die erste Gruppe wurden ausschließlich Intervalle aufgenommen, die HR- HPV- mRNA negativ waren. Darunter sind Intervalle mit sowohl HR- HPV- DNA Einfachinfektionen als auch HR- HPV- Mehrfachinfektionen enthalten. Die Gruppe besteht aus 48 Untersuchungsintervallen, die von 40 Patientinnen stammen. 4 Intervalle ( 8,3%) progredierten ins nächst höhere Dysplasiestadium in einem Intervall auf eine CIN I- Läsion, in zwei Intervallen auf ein CIN II- Läsion und in einem Fall auf eine CIN III- Läsion. In 14 Intervallen zeigten sich eine Persistenz von Dysplasien; bei 5 Intervallen handelte es sich um eine CIN I- Läsion, bei 6 Intervallen um eine CIN II- Läsion und bei 3 Intervallen um eine CIN III- Läsion. Bei 9 (18,8%) Intervallen kam es zu einer Regression (CIN 0) und in 21 Intervallen (43,7%) waren keine Dysplasien nachweisbar.

In die zweite Gruppe wurden alle Intervalle aufgenommen, in denen eine einfache transkriptionelle Aktivität nachgewiesen wurde, unabhängig davon, ob auf HR- HPV- DNA Ebene eine Einfach- bzw. Mehrfachinfektion vorlag. Diese Gruppe enthielt 92 Intervalle, die von 76 Patientinnen stammten. 18 Intervalle (19,6%) unterlagen einer Progression, wobei es sich bei je 4 Intervallen um eine CIN I- Läsion und bei 4 Intervallen um eine CIN II- Läsion handelte. Bei 10 Intervallen handelte es sich um eine CIN III- Läsion. Bei 63 Intervallen (68,3%) konnte eine Dysplasie-Persistenz beobachtet werden, wobei es sich bei 29 Intervallen um eine CIN I- Läsion handelte, bei 17 Intervallen um eine CIN II- Läsion und bei 16 Intervallen um eine CIN III- Läsion. 3 Intervalle (3,2%) wiesen eine Regression (CIN 0) auf. Bei 8 Intervallen wurde ein gesundes Portioepithel beobachtet.

Die dritte Gruppe umfasst die Intervalle, bei denen eine mehrfach transkriptionelle Aktivität nachgewiesen wurde, die aus 8 Intervallen bestand und von 7 Patientinnen stammten. In dieser Gruppe konnten ausschließlich Dysplasie- Progressionen (n=3; 37,5%) und Persistenzen (n=5; 62,5%) nachgewiesen werden. Bei 3 Intervallen (37,5%) lag eine Progression vor, bei 5 Intervallen (62,5%) eine Persistenz. Bei den 3 Intervallen mit Dysplasieprogression handelte es sich jeweils um eine CIN III- Läsion, bei den 5 persistierenden Intervallen einmal um eine CIN I- Läsion, zweimal um eine CIN II- Läsion und zweimal um eine CIN III- Läsion.

Tabelle 13: Vergleich der Dynamik einer Portioplasmie in Abhängigkeit von einfach- und mehrfach transkriptioneller Aktivität

| transkriptionelle Aktivität  | Anzahl Intervalle<br>N | Entstehung / Progression / Persistenz einer Portiodyplasie<br>N (%) | Regression Einer Portiodyplasie<br>N (%) | status idem<br>gesund | morphologische Befunde  | Anzahl N der Patientinnen |
|--|------------------------|---|--|-----------------------|---|---------------------------|
| mRNA –<br>aus HR- DNA -Einfach- und Mehrfachinfektion                  | 48                     | Progr: 4 (8,3%)<br>Pers: 14 (29,2%)                                 |  | 21 (43,7%)            | Progr:<br>CIN I: 1<br>CIN II: 2<br>CIN III: 1   | 40                        |
|  |                        |   | Regr: 9 (18,8%)<br>(CIN 0)               |                       | Pers:<br>CIN I: 5<br>CIN II: 6<br>CIN III: 3  |                           |
| mRNA 1x +<br>aus HR- HPV- DNA- Einfachinfektion- und Mehrfachinfektion | 92                     | Progr: 18 (19,6%)<br>Perst: 63 (68,5%)                              |  | 8 (8,7%)              | Progr:<br>CIN I: 4<br>CIN II: 4<br>CIN III: 10<br>Pers:<br>CIN I: 29<br>CIN II: 17<br>CIN III: 16<br>Pap III: 1 | 76                        |
|  |                        |   | Regr: 3 (3,2%)<br>(CIN 0)                |                       |   |                           |
| mRNA > 1x +  | 8                      | Progr: 3 (37,5%)<br>Pers: 5 (62,5%)                                 |  |                       | Progr:<br>CIN III: 3<br>Pers:<br>CIN I: 1<br>CIN II: 2<br>CIN III: 2  | 7                         |
|  |                        |   | Regr: 0                                  |                       |   |                           |

## 4. Diskussion

Den wichtigsten bekannten Risikofaktor für die Entwicklung von zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) und dem Zervixkarzinom, welches das dritthäufigste Malignom weltweit darstellt, stellen Infektionen mit den sog. „high- risk“- Typen der humanen Papillomaviren (HPV) dar. (zur Hausen 1991,1994)

Der einmalige Nachweis einer „high- risk“- HPV- Infektion einerseits ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung zervikaler Dysplasien, ist jedoch andererseits kein sicherer Parameter, um das Vorliegen einer Dysplasie bzw. eines invasiven Karzinoms vorherzusagen. (Bosch et al. 1995) Eine bis zu 30- fache Steigerung des Krebsrisikos bringt allerdings die persistierende HPV-HR-Infektion mit sich. (Ylitalo et al. 2000)

Da durch eine einmalige HPV- Testung nicht sicher vorhersagbar ist, ob es sich um eine transiente oder ein persistierende HPV- Infektion handelt und wie sich diese auf das Portioepithel auswirken wird, werden weitere prognostische Marker benötigt, um das individuelle Risiko für HPV- positive Patientinnen besser einschätzen zu können. Im Rahmen dieser Studie sollte die prognostische Bedeutung des Nachweises der transkriptionellen Aktivität für die Entstehung, die Persistenz, die Progression oder die Regression einer zervikalen, intraepithelialen Neoplasie untersucht werden um das individuelle Risiko für HPV- positive Patientinnen präziser definieren zu können. Dies würde das Monitoring und ggf. auch die Therapieplanung von HPV- positiven Patientinnen individuell besser gestalten helfen.

In dieser prospektiv angelegten Longitudinalstudie wurden zunächst 1699 Patientinnen gescreent, die sich in der kolposkopischen Ambulanz der Universitätsfrauenklinik Tübingen zwischen 2000 und 2003 aufgrund atypischer, zytologischer Befunde vorstellten bzw. von niedergelassenen Gynäkologen übersandt wurden. Um die Beeinflussung der Studienergebnisse, bedingt durch eine unterschiedliche Virulenz der verschiedenen HR- HPV- Typen, möglichst zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Dissertation primär Patientinnen mit initialer HPV- 16 Infektion, dem weltweit häufigsten HR- HPV- Typ, untersucht. Innerhalb dieses Studienkollektives von 120 Frauen wurde der Einfluss der transkriptionellen Aktivität der viralen E6/E7 Onkogene auf die Entstehung und den Verlauf von Portiodysplasien untersucht. Da während der Beobachtungszeit bei diesen Frauen auch andere Typen der HPV- Hochrisikogruppe teils einzeln bzw. multipel, teils in Kombination mit HPV Typ 16 auftraten, wurden diese ebenfalls in der Auswertung

mitberücksichtigt, insbesondere was den Einfluss einer Mehrfachinfektion mit HPV-HR- Typen und speziell den Nachweis einer mehrfachen transkriptionellen Aktivität auf das Portioepithel betrifft.

#### **4.1. Prävalenz der HPV-Typen**

Im untersuchten Kollektiv von 1699 Frauen lag eine Prävalenz der HR- Viren von 47.1% vor, was nicht auf die generelle Prävalenz von HR- HP- Infektionen in der süddeutschen Population übertragen werden kann, da es sich bei dem Patientengut dieser Studie um ein präselektioniertes Studienkollektiv der kolposkopischen Ambulanz der Tübinger Universitäts-Frauenklinik (atypische zytologische Vorbefunde als Einsendekriterium im die UFK) und nicht um eine zufällige Reihenuntersuchung handelte, können diese Nachweisraten nicht auf die Allgemeinbevölkerung übertragen werden.

HPV 16 war mit 30,7 % der am häufigsten nachgewiesene Typ, so auch in anderen Studien z.B. lag in Schweden die Detektionsrate bei 56% (Ylitalo et al. 2000). HPV 18 stand erstaunlicherweise an 9. Stelle von den 14 untersuchten HR- Typen mit 4,4%.

Eine ähnliche HR- HPV Typenverteilung konnte 2001 von der englischen Studiengruppe von Liaw et al. nachgewiesen werden, die sich mit dem gleichen HR- HPV- Spektrum befasste. In der Häufigkeit hinter HPV 16 folgten in höhergradigen intraepithelialen Läsionen bzw. invasiven Karzinomen HPV 51 und 31. Am seltensten wiesen Liaw et al. HPV 33 und 45 nach. Ebenfalls vergleichbar war das in Japan von Sasagawa et al. 2000 nachgewiesene HR- HPV- Spektrum mit am häufigsten nachgewiesenen HPV- 16- Infektionen gefolgt von HPV 51, 52 und 58.

In West-Afrika wurden HPV 16 und am häufigsten in Assoziation zu CIN II / III - Läsionen und invasiven Karzinomen nachgewiesen (Xi et al. 2003). In Südafrika dagegen werden HPV- 16- Infektionen, gefolgt von HPV 18, 33 und 31 Infektionen am häufigsten nachgewiesen. Mit cervicalen intraepithelialen Neoplasien assoziiert ist hier ebenfalls HPV 16, gefolgt von HPV 18, 33 und 31- Infektionen am häufigsten anzutreffen. Dagegen wurde HPV- 18 am seltensten nachgewiesen.

Herrero et al. führten 2000 in Costa Rica eine bevölkerungs-basierte Studie durch und wiesen eine allgemeine HPV- Prävalenz von 11% nach. CIN- I- Läsionen waren dort am häufigsten mit HPV- 16 (12 %) assoziiert, gefolgt von HPV 51, 56, 58, 52, 31

und 39. CIN II/III- Läsionen waren noch deutlicher mit HPV 16 assoziiert (45%) gefolgt von HPV 58 (10%). Nahezu derselbe Anteil invasiver Karzinome war mit HPV 16 assoziiert (47%), gefolgt von HPV 18 (15%) und HPV 58 (12%). Anders bei Munoz et al. 2003, deren Metaanalyse 11 Studien aus 9 verschiedenen Ländern (Marocco, Philippinen, Spanien, Kolumbien, Lateinamerika, Peru) umfasste. Hier wurde HPV Typ-18 an zweithäufigster Stelle nachgewiesen. Wie bei allen anderen Autoren stand die Prävalenz von HPV 16 ebenfalls an erster Stelle, während HPV 45, 31, 33, 52, 58 und 35 in absteigender Reihenfolge der Häufigkeit nachgewiesen wurden. Dieser Untersuchung zufolge bedingen HPV Typ 16, 18, 45, 31 und 33 90% des Risikos von CIN- Läsionen und Zervixkarzinomen. Zum gleichen Ergebnis kommen Kraus et al. 2004, die in zervikalen Biopsien zu 94 % o.g. 5 HPV- Typen nachgewiesen hatten.

Diese Daten zeigen die großen regionalen Unterschiede in der Verteilung zumindest für bestimmte HR- HPV- Typen, könnten allerdings auch methodisch durch die Auswahl der Primer bedingt sein.

#### **4.2. Assoziation der morphologischen Befunde mit dem Nachweis von HR-HPV DNA im Vergleich zum zusätzlichen Nachweis der transkriptionellen Aktivität der HR-HPV Onkogene E6 und E7**

Das Ziel der dargestellten Auswertungen war es, die Prävalenz von HR- HPV- DNA und mRNA in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dysplasiegrade zu untersuchen und zu vergleichen.

Es wurden die Untersuchungsintervalle mit ausschließlich histologischen Befunden auf die Häufigkeit des Vorhandenseins von HPV- DNA und mRNA untersucht. Bei den histologischen Befunden liegt die Detektionsrate (bei unauffälliger Morphologie) für DNA bei 37,3% und für mRNA bei 10,3 %.

Zunächst soll erörtert werden, warum trotz morphologisch unauffälliger Befunde eine positive Detektionsrate sowohl für DNA als auch für mRNA vorliegt: Eine HPV- Infektion kann bereits vorliegen, bevor dysplastische Zellveränderungen histologisch sichtbar werden (Moscicki et al. 1998; Nobbenhuis et al. 2001)

Dass sehr hohe DNA- bzw. mRNA- Nachweisraten bei histologisch und zytologisch negativen Befunden vorliegen, ist durch das Studienkollektiv bedingt. Kraus et al. führten 2004 eine Studie durch, bei der sie 190 Cervix-Biopsien auf HPV- DNA bzw. mRNA untersuchten. Sie fanden bei CIN 0 eine Nachweisrate von 18% HR- HPV- mRNA. In der eigenen Studie lag die Nachweisrate für Transkripte bei den

ausschließlich histologischen Befunden bei 10,3 %. Auch Scheurer et al. fanden höhere Nachweisraten für HR- HPV E6/E7 mRNA bei morphologisch negativen Fällen als wir mit 27%. Molden et al. lagen mit deren Detektionsraten für HR- HPV- mRNA bei zytologisch negativen Befunden bei 30% für HPV 16, bei 56% für HPV 18 und für HPV 31 sogar bei 75%. Falcinelli et al. 1993 beobachteten dagegen keine E6/E7 Onkogen- Transkription bei zytologisch negativen Fällen.

In der eigenen Studie steigt die HPV- DNA - Prävalenz als auch die HPV- mRNA- Prävalenz mit zunehmendem Dysplasiegrad an. Während bei den geringen Dysplasien in 54,3% der Fälle HR- HPV- DNA nachweisbar ist, ist bei den mäßigen in 86,6 % und bei den hochgradigen Dysplasien in 94,5% der Fälle HR- HPV- DNA nachweisbar. Eine transkriptionelle Aktivität der E6/E7 Onkogene ließ sich bei den niedrig gradigen Dysplasien in 18,6% der Fälle nachweisen. Weiter ansteigend war die Transkriptionsrate bei den mäßigen Dysplasien mit 47,9% und bei den hochgradigen Dysplasien mit 65,7% zu beobachten.

Die Ergebnisse von Molden et al. 2006 bestätigen die der eigenen Studie. Sie untersuchten in einer Querschnittsstudie mit 283 zytologisch unauffälligen Frauen den Zusammenhang zwischen der Prävalenz von HR- HPV- mRNA und einem erhöhten Risiko für dysplastische Veränderungen im Vergleich zum alleinigen Nachweis von HR- HPV- DNA, was eine wesentlich geringere prognostische Bedeutung hat.

Die ansteigenden Nachweisraten von HR- HPV- DNA bzw. mRNA in der eigenen Studie, sind größtenteils mit den Daten der bereits genannten und folgenden Literatur vergleichbar.

Teilweise ist die Vergleichbarkeit nur tendenziell gegeben, da unterschiedliche Nachweismethoden und morphologische Klassifikationen angewendet wurden. Kraus et al. untersuchten histologisch gesicherte Karzinome auf DNA und mRNA und fanden in 97% der Fälle HR- HPV- DNA und in 92% der Fälle HR- HPV- mRNA. Invasive Karzinome kamen in unserem Untersuchungsgut nicht vor. Die Nachweisraten von HR- HPV- DNA und HR- HPV- mRNA sind bei den hochgradigen Läsionen jedoch nahezu identisch. Zum gleichen Schluss kommen Molden et al. 2006, die bei den hochgradigen Läsionen ebenfalls fast identische Nachweisraten von HR- HPV- DNA und HR- HPV- mRNA beobachteten. Sie führten eine Querschnittsstudie durch, welche die Nachweismethoden zum HR- HPV- DNA und HR- mRNA- Nachweis verglich und verwendete die Bethesda-Klassifikation (low grade squamous intraepithelial lesion / high grade squamous intraepithelial lesion),

welche Dysplasien in LSIL und HSIL unterteilt. Je nach Nachweismethode konnte hier bei 2-3 mal mehr Proben HR- HPV- DNA als HR- HPV- mRNA bei den niedriggradigen Läsionen nachgewiesen werden und bei morphologisch negativen Befunden fielen die Proben des HR- DNA- Nachweises vier mal öfters positiv aus im Gegensatz zum HR- mRNA- Nachweis. Im Vergleich dazu wurden in unserer Studie somit wesentlich höhere mRNA-Nachweisraten bei den morphologisch unauffälligen und niedriggradigen Dysplasien beobachtet, was möglicherweise darauf zurück geführt werden kann, daß Molden et al. nur 5 HR- HPV- Typen untersuchte im Gegensatz zur eigenen Auswertung mit 14 HR- HPV- Typen.

Kraus et al. 2004 untersuchten allerdings die gleichen 5 HR- HPV- Typen, die aus 190 zervikalen Biopsien mit Befunden zwischen CIN I bis CIN III extrahiert wurden und beobachteten fast ähnliche Nachweisraten wie die eigenen. Der mRNA-Nachweis wurde an einer separaten Biopsie durchgeführt, was eventuell die negative Nachweisrate von mRNA bei CIN I- Läsionen erklären kann. Ansonsten sind die Nachweisraten mit 10% bei den morphologisch unauffälligen Fällen, 53% bei den CIN II- Läsionen und 92% bei den CIN III- Läsionen im ähnlichen Bereich wie die eigenen Ergebnisse. Scheurer et al. 2005, weisen bei HSIL- Läsionen wesentlich weniger HR- HPV- mRNA mit nur 37% nach als im eigenen Untersuchungsgut. Bei den LSIL Läsionen liegen deren Ergebnisse im gleichen Bereich mit einer Rate des E6/E7- Transkriptionsnachweises von 40% und bei den morphologisch negativen Befunden weisen Scheurer et al. 27% HR-HPV-mRNA nach. Die niedrigen Nachweisraten bei HSIL- Läsionen erklärt sich sehr wahrscheinlich daraus, dass Scheurer et al. nur HPV- Typ 16 und 18 untersuchten, während in der eigenen Studie insgesamt 14 HR- HPV- Typen untersucht wurden.

Bedingt durch die unterschiedlichen Fragestellungen, Nachweismethoden und Klassifikationen bedingt, ergeben sich bei den anderen Autoren Abweichungen von unseren Ergebnissen, doch grundsätzlich zeigen sich bei allen vergleichbaren Studien ähnliche Tendenzen mit einem Anstieg der HPV- DNA- bzw. mRNA- Prävalenz mit zunehmendem Dysplasiegrad.

Abschließend sollen nun noch die möglichen Ursachen betrachtet werden, warum in 45,6% der gering gradigen Läsionen bzw. in 41,1% der mäßig und in 4,8% der hochgradigen Dysplasien keine HPV- DNA / mRNA nachweisbar war . Es wird in der Literatur diskutiert, ob CIN I in allen Fällen mit HPV korreliert: Crum et al. 1999 sehen keine strikte Korrelation zwischen CIN I, HPV- Infektionen und Präkanzerosen und fordern noch weitere Untersuchungen, um diese These zu bestätigen.

Eine weitere Möglichkeit, warum bei den geringgradigen Läsionen keine HPV- DNA nachweisbar sein könnte, besteht darin, dass die morphologischen Zellabnormalitäten eine Regression erfahren, bedingt durch eine bereits ablaufende virologische Remission. (Nobbenhuis et al. 2001) Auch für diesen Erklärungsversuch bedarf es noch weiterer Erkenntnisse, denn die Faktoren, die eine virale Regression / Remission bewirken sind bisher noch unbekannt (Kraus et al. 2004)

Weitere Gründe für nicht HPV- assoziierte Zervixläsionen könnten auch HR- HPV- Typen sein, welche durch die verwendeten Primer nicht erfaßt wurden. So haben Clifford et al. 2003, die HPV- Typen 73 und 82 ebenfalls als karzinogen eingestuft. Diese sind in der eigenen Studie im molekularbiologischen Nachweisspektrum (noch) nicht erfasst.

Ein fehlender Nachweis von für HR- HPV- mRNA könnte durch eine inkonstante E6/E7 Onkogenexpression mit vorübergehend niedriger Transkriptionsrate bedingt sein, weniger wahrscheinlich sind Mutationen in den Regionen, an denen die Primer hybridisieren.

#### **4.3. Sensitivität und Spezifität des Nachweises von DNA und mRNA**

Da sich Amplifikationsprodukte ungesplicerter Transkripte aufgrund ihrer Länge nicht von denen der genomischen DNA unterscheiden lassen, wurden für den Transkriptnachweis der viralen Onkogene E6/E7 ausschließlich die „gesplicer“ Transkripte der viralen Onkogene bei der Auswertung berücksichtigt (Cornelissen et al. 1990). Dabei wird in Kauf genommen, dass die tatsächliche Prävalenz transkriptionell aktiver HR- HPV- Infektionen möglicherweise geringfügig höher ist als die hier berücksichtigte, was die niedrigere Sensitivität des mRNA- Nachweises (40,7%) im Vergleich zum DNA- Nachweis (74,7%) zumindest zum Teil erklären könnte. Eine geringere analytische Sensitivität der benutzten Primer für die nested- RT- PCR im Vergleich zu den Primern der nested- Multiplex- PCR konnte in Voruntersuchungen ausgeschlossen werden. (Sotlar et al. 2004) Eine im Vergleich mit der Literatur hervorragende Sensitivität und Spezifität konnte sowohl beim HR- DNA Nachweis als auch beim mRNA- Nachweis durch die eigens etablierten Methoden gezeigt werden (Sotlar et al. 2004)

Cuschieri et al. 2004 führten eine 2- Jahres Follow- up- Studie in Schottland mit 54 zytologisch unauffälligen Frauen durch. Alle Patientinnen waren HR- HPV- pos und

wurden sowohl auf das Vorhandensein von DNA und mRNA getestet. Der morphologische Befund wurde zytologisch erhoben. In der schottischen Studie wurde ebenfalls, wie in der eigenen Studie eine höhere Spezifität für den mRNA- Nachweis (81,4%) festgestellt im Vergleich zum DNA- Nachweis (44,2%) mit vergleichbaren Ergebnissen. Im Gegensatz dazu berichten Molden et al. 2005 aus Norwegen von einer ca. gleich hohen Sensitivität (85,7%) beim HPV- DNA Nachweis und mRNA Nachweis. Die Spezifität des HPV- mRNA Nachweises (84,9%) war ebenfalls wie in der eigenen Studie gegenüber dem HPV- DNA Nachweis (50%) erhöht. Ihre Studie war ebenfalls prospektiv angelegt: 77 Frauen mit zytologisch geringer Dysplasie wurden auf das Vorhandensein von HR- HPV- DNA und mRNA der 5 HR- HPV- Typen 16, 18, 31, 33 und 45 untersucht. Nach einem Jahr wurde die Studie durch eine histologische Untersuchung abgeschlossen. In der eigenen Studie wurden sowohl beim DNA- als auch beim mRNA- Nachweis 14 HR- HPV- Typen erfasst, was den Vorteil hatte, dass bei allen nachgewiesenen HPV- Typen auch auf mRNA- Ebene die transkriptionelle Aktivität nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden konnte. Da bei den Studien, sowohl von Cuschieri et al. als auch von Molden et al. der mRNA- Nachweis ausschließlich auf 5 Typen (HPV-Typ 16, 18,31, 33 und 45) beschränkt war, jedoch der DNA- Nachweis durch die Consensus- PCR für mehr als 20 Typen möglich ist, könnten in höhergradigen Läsionen durchaus weitere transkriptionell aktive Typen nicht erfasst worden sein. Auf der anderen Seite gehen Munoz et al. 2003 davon aus, dass gerade diese 5 HPV- Typen (s.o.) die häufigsten HR- HPV- Typen darstellen, die 90% des HR- HPV- Spektrums in Zervixkarzinomen abdecken. Kraus et al. 2006 bestätigen diese Zahlen mit der von ihnen berichteten Prävalenz von 89%.

#### **4.4. Untersuchung der Dynamik der morphologischen Befunde in Abhängigkeit des Nachweises von HR-HPV-DNA bzw. mRNA**

Die zentrale Fragestellung dieser Studie besteht in der Untersuchung der Dynamik einer Portioläsion in Bezug auf Progression, Regression oder Persistenz in Korrelation zum molekularbiologischen HPV- Befund.

Ausgehend von der Vorstellung, dass die HPV- assoziierten Zellveränderungen aufgrund der onkogenen Aktivität Von E6/E7 ein zeitlich dynamischer Prozess sind (Moscicki et al. 1998; Nobbenhuis et al. 2001), stellt sich die Frage, welche Auswirkung das Vorhandensein einer transkriptionellen Aktivität bzw der Nachweis

derselben, in Bezug auf Häufigkeit von Progression, Persistenz oder Regression einer cervicalen intraepithelialen Neoplasie hat.

Follow-up Studien, die sich mit mehreren HR- HPV-Typen ausschließlich auf DNA-Ebene befassten, fanden bei 15,2 % der HR- HPV- positiven Patientinnen nach 12 Monaten ( Safaeian et al. 2007) bzw. bei 17,7% und 24,5% nach 5 Jahren eine CIN III- Läsion ( Kjaer et al. 2006).

Da in der eigenen Studie die morphologischen und molekularbiologischen Befunde halbjährlich erhoben wurden, konnten pathologische Befunde engmaschig beobachtet und in Relation zum jeweils vorhergehenden Befund interpretiert und als „Progression, Persistenz oder Regression“ eingestuft werden.

Eine Stärke der eigenen Auswertung ist die „sequenzielle Betrachtung“ der einzelnen Untersuchungsintervalle; dies erlaubt einen Einblick in die unmittelbaren Auswirkungen wechselnder viraler Infektionsverhältnisse bzw. Onkogenaktivitäten auf morphologischer Ebene. Leider umfassten die Beobachtungszeiträume in der eigenen Studie nur einen kurzen Zeitrahmen und ließen somit Aussagen über die langfristigen Folgen nur in begrenztem Umfang zu.

#### 4.4.1. Persistenz einer Zervixdysplasie

Die größte Anzahl von persistierenden Läsionen fand sich in der Gruppe von Frauen, in der eine transkriptionelle Aktivität von E6/E7 nachgewiesen werden konnte. Mit 67% lag diese - mehr als doppelt so hoch als bei ausschließlich HR- HPV- DNA- positivem Befund 29,2 %. Persistierende Läsionen traten in der Gruppe mit HR- HPV- mRNA positivem Befund, sogar mehr als 15 mal so häufig auf, als im Vergleich zur Gruppe von Frauen mit HR- HPV- DNA negativem Befund. In der Gruppe mit ausschließlich HR- DNA positivem Ergebnis (ohne Nachweis von E6/E7 Transkription), war die Häufigkeit einer Persistenz von Zervixdysplasien 7- fach so hoch, als bei molekularbiologisch negativen Befunden mit 4,3%.

#### 4.4.2. Progression einer Zervixdysplasie

Die höchste Anzahl der Untersuchungsintervalle mit morphologischen Progressionen (neu aufgetretene Dysplasie oder Progression einer bestehenden Dysplasie), fand sich in der Gruppe von Frauen, in der eine transkriptionelle Aktivität der E6/E7 Onkogene nachweisbar war. Mit 21% lag die Rate der Progressionen doppelt so hoch wie die Rate in der Gruppe, mit ausschließlich positivem HR- HPV- DNA

Befund), welche sich kaum von der Rate der Kontrollgruppe, mit molekularbiologisch negativem Ergebnis, unterschied 11,1%.

Anders betrachtet, ist interessanterweise trotz HR- HPV DNA- und mRNA negativem Ergebnis eine morphologische Progressionsrate von 11,1 % vorhanden. Auf mögliche Ursachen wird in diesem Kapitel ausführlich eingegangen. Die Untersuchung, bei der die Dynamik von Portiondysplasien bei einfacher-, mehrfacher bzw. Nichtvorhandensein von transkriptioneller Aktivität verglichen wurde, zeigte eine Steigerung der Progressionen von Portiodysplasien: Beim Nichtvorhandensein von transkriptioneller Aktivität lag die Progressionsrate bei 8,3 %, bei einfach nachgewiesener transkriptioneller Aktivität wurde eine Progressionsrate von 19,6 % verzeichnet und bei mehrfach nachgewiesener transkriptioneller Aktivität lag die Rate bei 37,5%.

#### 4.4.3. Regression einer Zervixdysplasie

Betrachtet man nun die Anzahl der Untersuchungsintervalle mit morphologischen Regressionen, so muss man feststellen, dass sich die Häufigkeit der Regressionen in der Gruppe mit HR- HPV- DNA negativem Befund (12,8%) und in der Gruppe mit ausschließlich positivem HR- HPV- DNA Befund (16,7 %) ebenfalls kaum unterscheiden. In der Gruppe, mit positivem Befund für die transkriptionelle Aktivität von E6/E7, liegt die Regressionsrate mit 3% um das 4- 5 fache niedriger als in den beiden anderen Gruppen.

Die Untersuchung der Dynamik von Portiodysplasien bei nachgewiesener einfach- und mehrfacher transkriptioneller Aktivität ergibt ein Abnehmen der Regressionsrate mit Ansteigen der Anzahl an transkriptionell aktiven HR- HPV- Typen: 18,8% bei fehlendem Nachweis von HR- HPV- mRNA und 3,2 % bei einfach nachgewiesener transkriptioneller Aktivität. Bei mehrfach nachgewiesener transkriptioneller Aktivität traten keine Regressionen auf.

Wenn man die morphologischen Befunde als dynamischen Prozess, als Antwort auf die molekularbiologischen Abläufe betrachtet, kann man argumentieren, dass in dem Fall, bei dem eine morphologische Progression trotz negativem HR- HPV- DNA Befund zu verzeichnen war, eine transiente Infektion vorgelegen haben könnte. Morphologisch hat sie bereits nachweisbare Veränderungen hervorgerufen, doch jetzt ihre virale bzw. transkriptionelle Aktivität, durch unbekannte, additive Faktoren eingestellt und ist somit auf molekularbiologischer Ebene nicht mehr nachweisbar.

Betrachtet man die zu Grunde liegenden histologischen oder zytologischen Befunde, so handelt es sich bei 16 Intervallen um eine CIN I- Läsion und bei einem Intervall um eine CIN II- Läsion und in einem weiteren Intervall um eine CIN III- Läsion, also überwiegend geringgradige Dysplasien. Gerade die Diagnose der CIN I- Läsion kann unter Umständen schwer von z.B. entzündlich bedingten Veränderungen (z.B. ASCUS) differenziert werden. Heute gelten auch die CIN I- Läsionen nicht mehr als Präkanzerosen. Nur noch ein Teil der CIN II- Läsionen gelten als echte Präkanzerosen, (Castle PE et al. 2007) Dadurch muss besonders die Progressionsrate von 15,4 % in erster Gruppe kritisch betrachtet werden, da es sich bei 16 von 18 Intervallen um eine CIN I- Läsion handelte und somit um eventuelle schwer entzündliche Veränderungen, die nicht viral verursacht wurden.

Daneben ist denkbar, dass eine PE einen „therapeutischen Effekt“ auf eine Läsion haben kann, da bei kleineren Läsionen dadurch eine Substanzverringering bis hin zur vollständigen Entfernung stattfinden kann oder aber eine Entzündungsreaktion induziert wird, die über eine Immunmodulation zu einem Verschwinden der Läsion führen kann. Ältere Veröffentlichungen vermuten, dass durch die ausgelösten Regenerationsvorgänge das dysplastische Epithel verdrängt wird (Richart 1966). Es gibt Autoren, die diesem Effekt eine so große Bedeutung beimessen, dass sie in ihren Studien völlig auf die histologische Diagnose verzichten (Remmink et al.1995). Bei den 18 HR- HPV- DNA- negativen Intervallen, bei denen trotzdem eine Progression bzw. ein Persistenz einer Zervixdysplasie zu verzeichnen war, war bei 6 Intervallen, die von 4 Patientinnen stammen, eine „Low-Risk“- HPV- Infektion nachzuweisen.

Bei einer Patientin wurden zweimal eine Infektion mit zwei „Low- Risk“- HP- Viren (HPV Typ 6/11 und HPV Typ 42) nachgewiesen, bei einer weiteren Patientin wurde bei zwei Intervallen eine HPV- Typ 42 Infektion nachgewiesen. Bei den zwei weiteren Intervallen, von zwei unterschiedlichen Patientinnen stammend, wurde bei beiden jeweils HPV- Typ 42 nachgewiesen. Es ist denkbar, daß die Epithelveränderungen an der Portio, bei denen es sich bei allen zuvor beschriebenen Fällen, um eine CIN I- Läsion handelte, durchaus durch die „Low-Risk“- HP- Viren verursacht worden sind. Da es sich bei zwei Patientinnen (4 Intervalle) um persistierende „Low- Risk“- Typen handelte, ist es durchaus vorstellbar, daß die Epithelveränderungen an der Portio durch diese hervorgerufen wurden. Dies müßte jedoch in weiteren Auswertungen mit höheren Fallzahlen untersucht werden.

Im Fall der drei regredienten Beobachtungsintervalle trotz E6/E7- Transkriptnachweis kann ebenso „dynamisch“ betrachtet argumentiert werden, dass auf eine rückläufige Dysplasie eine erneute transkriptionelle Aktivität wirkt, indem z.B. eine Reinfektion stattgefunden und diese sich auf morphologischer Ebene noch nicht manifestiert hat. Es könnte somit eine größere zeitliche Inkonstanz der Onkogenexpression vorliegen, die sich im morphologischen Befund (noch nicht) widerspiegelt.

Die Bedeutung der transkriptionellen Aktivität für den Verlauf von cervikalen intraepithelialen Neoplasien zeigt die steigende Anzahl persistierender Dysplasien bei positivem HR- DNA Befund einerseits und bei zusätzlichem HR- HPV- Transkriptnachweis andererseits. Ebenso sind bei Nachweis transkriptionell aktiver HR- HPV- Typen eine Zunahme von persistierender Portiodysplasien zu beobachten im Vergleich bei fehlendem Nachweis von transkriptionell aktiven Typen.

Desweiteren kann postuliert werden, dass bei Abwesenheit von HR- HPV Transkripten, die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, dass sich eine cervikale intraepitheliale Neoplasie regressiv bzw. transient verhält.

Den mRNA- Nachweis als primären Test bei Vorsorgeuntersuchungen mit einzubeziehen wäre somit hilfreich, Patientinnen, die ein erhöhtes Risiko haben, eine cervikale Dysplasie zu entwickeln bzw. eine bereits persistierende oder transformierende Läsion haben, zu erkennen und engmaschiger zu kontrollieren bzw. ohne weitere Verzögerung unverzüglich zu behandeln (Castle et al. 2007; Varnai et al. 2008)

Zu einem vergleichbaren Ergebnis in der aktuellen Literatur kommen Molden et al. 2005. Sie führten eine vergleichbare Follow-up-Studie durch, in der 77 Frauen mit niedriggradigen cervikalen Läsionen und HPV- DNA bzw. mRNA- positivem Ergebnis über 2 Jahre beobachtet wurden. Bei der Baseline- Untersuchung wiesen doppelt so viele Frauen ein HR- DNA- positives Ergebnis im Gegensatz zum HR- mRNA- positiven Ergebnis auf. Zudem hatten Frauen mit mRNA- positivem Befund ein 69,8- fach höheres Risiko eine CIN II- Läsion zu entwickeln im Gegensatz zu Frauen mit mRNA negativen Befund. Im Vergleich dazu hatten Frauen mit ausschließlich DNA- positivem Befund lediglich ein 5,7- fach höheres Risiko eine CIN II- Läsion zu entwickeln im Gegensatz zu Frauen mit DNA negativem Befund.

Zur gleichen Schlussfolgerung kommen Cuschieri et al. 2004, die ebenfalls eine Follow- up-Studie über 2 Jahre durchführten und zytologisch unauffällige Frauen mit gleichzeitigem HR- HPV- DNA und E6/E7- mRNA- positivem Befund beobachteten. Frauen mit Typ- spezifischen, persistierenden HPV- Infektionen hatten dabei ein

signifikant höheres Risiko eine cervikale Dysplasie zu entwickeln. Weiterhin hatten Frauen, mit bei der Baseline-Untersuchung positivem HR- HPV- mRNA- Befund eine höhere Wahrscheinlichkeit eine persistierende Infektion zu entwickeln. Somit reihen sich unsere Ergebnisse in die sich auch in der Literatur abzeichnenden Tendenzen mit ein.

#### **4.5. Vergleich der morphologischen Befunde zwischen Einfach- und Mehrfachinfektionen auf HPV- HR- DNA- Ebene sowie zwischen einfach- und mehrfach transkriptionell aktiven HR- HPV- Infektionen**

Als letzter Aspekt dieser Studie sollen die morphologischen Befunde bei Einfach- und Mehrfachinfektion auf DNA- Ebene bzw. bei transkriptioneller Aktivität eines bzw. mehrerer HR- HPV-Typen verglichen werden.

Um zu vermeiden, daß die resultierenden Subgruppen zu klein werden, wurden bei dieser Auswertung die morphologischen Befunde bei Vorliegen von pathologischen Befunden (CIN I- CIN III bzw. Pap III d bis Pap IV a) als „krank“ bezeichnet und bei Fehlen von zervikalen Dysplasien als „gesund“ bezeichnet.

##### **4.5.1. Vergleich der Einfach – und Mehrfachinfektionen mit ausschließlich HPV– DNA– Nachweis**

Im Vergleich der Einfach- HPV- DNA- Infektion zur Mehrfach- HPV- DNA- Infektion besteht keine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer cervikalen Dysplasie. Bei den Einfach- HPV- DNA- Infektionen waren pathologische Befunde bei 41,4 % und bei den Mehrfach- HPV- DNA- Infektionen sogar leicht niedriger bei 33,3 % der untersuchten Präparate nachweisbar.

Cuschieri et al. 2004 kamen zu dem gleichen Ergebnis, sie untersuchten die Assoziation von HPV- DNA- Mehrfachinfektionen und dem Schweregrad der Läsionen in einer Querschnittsstudie und konnten ebenfalls keine erhöhte Assoziation zwischen HPV- DNA- Mehrfachinfektion und dem Schweregrad der cervikalen Dysplasie im Vergleich zur Einfachinfektion feststellen. Ebenso sehen Rolon et al. 2000, kein erhöhtes Risiko für ein cervikales Karzinom durch HPV- Mehrfachinfektion im Vergleich zur Einfachinfektion.

Zu einem anderen Ergebnis kommen Sasagawa et al. 2001, sie stellten eine leicht abnehmende Prävalenz von HPV- DNA- Mehrfachinfektionen mit zunehmendem Schweregrad der Läsion fest (27% bei LSIL und 17 % bei HSIL), jedoch eine zunehmende Häufigkeit von HR- HPV- Typ Kombinationen bei höhergradigen Läsionen. Zur Häufigkeit der Prävalenz von Mehrfachinfektionen werden in der

Literatur sehr unterschiedliche Angaben gemacht: 17,5 % in einer gynäkologischen Klinik- Population (Peyton CL, 2001); 46 % in cervikalen Karzinomen (Bachtiary B, 2002) und bis zu 56 % in niedrig gradigen Dysplasien (ALTS Group, 2000).

Multiple HR- HPV- Infektionen werden jedoch häufiger in cervikalen Dysplasien nachgewiesen als in cervikalen Karzinomen ( Cuschieri et al. 2004, Huang et al. 2004, Park et al. 2004).

Weitere Fragen stellen sich in Bezug auf direkte (virale) bzw. indirekte (immunologische) Interaktionen: So untersuchten Liaw et al. 2000 in einer prospektiven Studie mit initial HPV 16 positiven Patientinnen das Verhalten von Infektionen mit weiteren HPV- Typen und stellten fest, dass eine Infektion mit HPV 16 Infektionen mit weiteren HPV- Typen begünstigte, jedoch nicht deren Persistenz beeinflusste, was in der Literatur kontrovers diskutiert wird (Hildesheim et al. 1994; Franco et al. 1999). Darüber hinaus konnten keine spezifischen Typkombinationen nachgewiesen werden, die häufiger bzw. weniger häufig miteinander assoziiert waren als andere, z.B. aufgrund einer phylogenetischen Verwandtschaft der Viren. So wurde schon über eine protektive Kreuzreaktion spekuliert, nämlich dass Infektionen mit HPV- Typen aus phylogenetisch enger Verwandtschaft eher seltener nachzuweisen seien als solche aus unterschiedlichen „Zweigen“, da durch zellvermittelte Immunität inhibitorische Wirkungen gegen eng verwandte HPV- Typen zu erwarten sein könnten. Dies ließ sich in den HPV- Nachweisraten jedoch wiederum nicht bestätigen.

Anhand der eigenen Daten sind Wechselwirkungen inhibitorischer oder fördernder Art in Bezug auf die transkriptionelle Aktivität nicht erkennbar, denn bei Mehrfachinfektionen waren interessanterweise fast gleich viele HPV- Typen transkriptionell aktiv (64%) wie bei den Einfachinfektionen mit 69,5%.

Ob sich diese Erkenntnisse auf das Verhalten bzw. das Vorhandensein von bestimmten HPV-Typ- Kombinationen in Bezug auf ihre transkriptionellen Aktivität übertragen lassen, müsste in weiteren Studien an größeren Fallzahlen untersucht werden.

#### 4.5.2. Vergleich der Einfach- und Mehrfachinfektionen mit transkriptionell aktiven HPV- Typen

Die Assoziation von mehrfach transkriptionell aktiven HR- HPV- Infektionen mit dem Vorhandensein von Zervixdysplasien wurde nach bestem Wissen der Autorin in dieser Form zum ersten Mal untersucht.

Besonders bemerkenswert sind die Ergebnisse bei Nachweis von mehreren transkriptionell aktiven HR- HPV- Typen im Vergleich zu einfacher transkriptioneller Aktivität bzw. zum völligen Fehlen von E6/E7 mRNA. In letzterer Gruppe (Fehlen von E6/E7-mRNA) lagen lediglich in 38,3% der Beobachtungsintervalle CIN- Läsionen vor; bei einfacher transkriptioneller Aktivität in 85,5 % der Intervalle und bei Nachweis mehrerer transkriptionell aktiver HR- HPV- Typen lagen zu 100% CIN- Läsionen vor, mit ansteigender Häufigkeit des Schweregrads der Läsionen.

Somit ist die Wahrscheinlichkeit einer cervikalen Dysplasie bei Infektion mit einem transkriptionell aktiven HR- HPV- Typen deutlich erhöht, im Vergleich zum alleinigen Nachweis von HR- HPV- DNA. Die Wahrscheinlichkeit einer cervikalen Dysplasie ist weiterhin durch eine Mehrfachinfektion mit mehr als einem transkriptionell aktiven HR- HPV- Typ im Vergleich zur Einfachinfektion mit einem transkriptionell aktiven HPV- Typen deutlich erhöht. Somit steigt die Sensitivität bei Vorhandensein von mehrfach transkriptionell aktiver Typen im Vergleich bei Nachweis von nur einem transkriptionell aktiven Typen. Während bei einfach transkriptioneller Aktivität die Sensitivität bei 77,8 % und die Spezifität bei 85,6% liegt, liegt die Sensitivität bei mehrfach transkriptioneller Aktivität bei 100%. Kraus et al. 2006, untersuchten die E6/E7 Prävalenz von 5 HPV- Typen und konnten bei den Mehrfachinfektionen jeweils nur einen transkriptionell aktiven HPV- Typen nachweisen, somit ist an dieser Stelle kein Vergleich zu den eigenen Daten möglich.

Hiermit kann postuliert werden, dass ein deutlich erhöhtes Risiko einer cervikalen Dysplasie vorliegt, wenn eine Infektion mit mehrfach transkriptionell aktiven HPV- Typen nachgewiesen werden kann im Vergleich zur Infektion, bei der nur ein transkriptionell aktiver HR- HPV- Typ nachgewiesen wird.

## 5. Zusammenfassung

Den wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN), als Vorstufe des Zervixkarzinoms, stellt eine persistierende Infektion mit sogenannten high-risk (HR)- HPV Typen dar. Das transformierende Potential dieser Infektion beruht auf der kontinuierlichen Expression der viralen Onkogene E6 und E7 mit der Folge einer Inaktivierung der zellulären Tumorsuppressorproteine p53 und pRB.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die prognostische Bedeutung des Nachweises der transkriptionellen Aktivität der viralen Onkogene E6 und E7 für die Entstehung und den Verlauf einer CIN, gekennzeichnet durch deren Persistenz, Progression oder Regression, untersucht werden. Im Speziellen sollte untersucht werden, ob sich der Nachweis von E6/E7 mRNA, neben dem Nachweis der viralen DNA, als Biomarker für ein erhöhtes Risiko einer Entstehung, Persistenz oder Progression einer CIN eignet. Hierzu wurde mit Unterstützung der Deutschen Krebshilfe eine prospektive Studie über einen Zeitraum von 3 Jahren durchgeführt, in welcher 120 Patientinnen mit initial belegter HPV-16 Infektion untersucht wurden. Dabei zeigte sich, daß mit steigendem Dysplasiegrad das Vorhandensein der E6/E7 Onkogentranskripte von ca. 10% in dysplasiefreier Schleimhaut auf ca. 66% in CIN III Läsionen zunimmt. Insbesondere steigert der Nachweis der E6/E7- Transkripte gegenüber dem alleinigen Nachweis der HR-HPV-DNA die Spezifität für die Vorhersage einer CIN-Läsion von 63% auf 90%. Bei Vorliegen einer mehrfach transkriptionell aktiven HR-HPV-Infektion steigt dieser Wert sogar auf 100% - das heißt, alle Frauen mit einer mehrfach transkriptionell aktiven HR-HPV Infektion sind bereits an einer Portiodysplasie erkrankt. Die prognostische Bedeutung des Nachweises der E6/E7 Onkogentranskripte für die Dynamik einer Portiodysplasie zeigt in 67% der positiven Fälle eine persistierende und in 21% eine progredierende Portiodysplasie an. Dagegen traten Regressionen von Portiodysplasien bei positivem E6/E7 Transkriptnachweis lediglich in 3% der Fälle ein. Somit kann der Nachweis der E6/E7 Onkogentranskripte als prognostischer Faktor betrachtet werden, um das mögliche Vorliegen einer CIN- Läsion spezifischer anzuzeigen und insbesondere jene Dysplasien zu identifizieren, die zur Persistenz oder Progression neigen, also einer besonders engmaschigen Kontrolle bzw. frühzeitigen Therapie bedürfen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

|            |  |
|------------|--|
| ATP        | - Adenosintriphosphat                            |
| BPV        | - bovines Papillomavirus                         |
| CIN        | - zervicale intraepitheliale Neoplasie           |
| CIS        | - Carcinoma in situ                              |
| cDNA       | - copy Desoxyribonukleinsäure                    |
| DEPC       | - Diethylpyrocarbonat                            |
| DNA        | - Desoxyribonukleinsäure                         |
| ER         | - early region                                   |
| GTP        | - Guanosintriphosphat                            |
| HPV        | - humanes Papillomavirus                         |
| HR-DNA -   | -“high-risk-DNA”                                 |
| HR-HPV-Typ | -„high-risk“ HPV-Typ                             |
| HSIL       | - high squamous intraepithelial lesion           |
| LR         | - late region                                    |
| LSIL       | - low squamous intraepithelial lesion            |
| mRNA       | - messenger Ribonukleinsäure                     |
| ORF        | - open reading frame                             |
| Pap-Test   | - Abstrich nach Papanicolaou                     |
| PCR        | - Polymerasekettenreaktion                       |
| PCI-Lösung | - Phenol – Chloroform - Isoamylalkohol           |
| RB         | - Retinoblastom Genprodukt                       |
| RNA        | - Ribonukleinsäure                               |
| RT-Enzym   | - Reverse Transkriptase Enzym                    |
| RT-PCR     | - Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion |
| SIL        | - squamöse intraepitheliale Läsion               |
| URR        | - upstream regulatory region                     |

## 7. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Zytologische Einteilung/ Münchner Nomenklatur II
- Tabelle 2: Klassifikation der kondylomatösen Veränderungen und zervikalen intraepithelialen Neoplasien
- Tabelle 5: Detektionsraten der HR-HP-Viren
- Tabelle 6: histologische Befunde in Assoziation mit den Nachweisraten von HR-HPV-DNA- bzw. mRNA
- Tabelle 7: morphologische Befunde in Assoziation mit den Nachweisraten von HR-HPV-DNA bzw. mRNA
- Tabelle 8: Vergleich der Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von HR-HPV-DNA bzw mRNA
- Tabelle 9: Dynamik der morphologischen Befunde in Assoziation des Nachweises von HR-HPV-DNA bzw. mRNA
- Tabelle 10: Vergleich der morphologischen Befunde in Assoziation mit HR-HPV-Einfach- bzw. Mehrfachinfektion
- Tabelle 11: Vergleich der morphologischen Befunde in Assoziation mit Einfach- bzw. mehrfach transkriptioneller Aktivität oder Abwesenheit von transkriptioneller Aktivität
- Tabelle 12: Vergleich der Sensitivität und Spezifität bei einfacher bzw. mehrfacher transkriptioneller Aktivität bzw. bei Abwesenheit von transkriptioneller Aktivität
- Tabelle 13: Vergleich der Dynamik einer Portioplasmie in Abhängigkeit von einfach- und mehrfach transkriptioneller Aktivität

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: durchschnittliche Altersverteilung des Studienkollektivs
- Abbildung 2: durchschnittliche Altersverteilung des Basiskollektivs
- Abbildung 3: histologische Befunde in Assoziation mit den Nachweisraten von HR-HPV-DNA bzw. mRNA
- Abbildung 4: morphologische Befunde in Assoziation mit den Nachweisraten von HR-HPV-DNA bzw. mRNA
- Abbildung 5: Darstellung der Dynamik in Assoziation des Nachweises von HR-HPV-DNA bzw mRNA
- Abbildung 6: morphologische Befunde bei einfach- bzw. mehrfach transkriptioneller Aktivität oder Abwesenheit von transkriptioneller Aktivität

## 9. Literaturverzeichnis

ALTS Group (2000)

Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomised trial antiviral approaches

J Natl Cancer Inst 92: 397-402

Arends MJ, Buckley CH, Wells M (1998)

Aetiology, pathogenesis and pathology of cervical neoplasia

J Clin Pathol 51: 96-103

Bärfverstedt B (1967)

Condylomata acuminata – past and present.

Acta dermato-venereologica 47:376-381

Benton EC, Arends MJ (1996)

Human papillomavirus in the immunosuppressed. Lacey C. Papillomavirus reviews: current research on papillomaviruses. 271-279 Leeds, Leeds University Press

Bachtiary B, Obermair A, Dreier B, Birner P, Breitenecker G, Knocke TH, Selzer E, Pötter R (2002)

Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer

Int J Cancer 102(3): 237-43

Bagchi S, Raychaudhuri P, Nevins JR (1990)

Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation.

Cell 62: 659-69

Baker CC, Howley PM (1987)

Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues

EMBO J 6, 1027-1035

Bandara LR, Adamczewski JP, Hunt T, La Thangue NB (1991)

Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor.

Nature 352: 249-51

Bernard HU (2002)

Gene expression of human papillomaviruses and considerations on potential

Antiviral Ther 7(4): 219-37

Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M (1989)

The human papillomavirus type 18 (HPV 18) E2 gene product is a repressor of the HPV 18 regulatory region in human keratinocytes

J Virol 63, 4317-4324

Blitz I. L., and Laimins, L.A. (1991)

The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA binding phosphoprotein which associates with the E2 transkriptional activator in vitro  
J Virol 65, 649-656

Bodily JM, Meyers C (2005)

Genetic analyses of the human papillomavirus type 31 differentiation-dependent late promoter  
J Virol 79(6): 3309-21

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV (1995)

Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective  
International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group  
J Natl Cancer Inst 87: 796-802

Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H (1984)

A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer and in cell lines derived from genital cancer  
EMBO J 3(5): 1151-7

Boyer SN, Wazer DE, Band V (1996)

E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway  
Cancer Res 56: 4620-4

Bream GL, Ohmstede CA, Phelps WC (1993)

Characterization of human papillomavirus type 11 E1 und E2 proteins expressed in insect cells  
J Virol 67, 2655-2663

Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ (1999)

The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to Promote cell growth  
EMBO J 18: 2449-58

Bulkmans NW, Berkhof J, Bulk S, et al. (2007)

High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening.  
Br J Cancer 96: 1419-24

Burger MP, Hollema H, Gouw HS, Pieters WJ, Quint WG (1993)

Cigarette smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality  
BMJ 306 (6880): 749-752

Burghardt E, Holzer E, Jordan JA (1978)

Workshop Session Histological Terminology, Chairman's Report.  
Selected papers from the Second World Congress of Cervical Pathology and Colposcopy  
Thieme Stuttgart, 131-133

- Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT, Schlegel R (1989)  
The E5 Onkoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes  
Virology 170:334-9
- Carrington M, Wang S, Marin MP, et al. (2005)  
Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci.  
J Exp Med 201: 1069-75
- Castle PE, Dockter J, Giachetti C, Garcia FA, McCormick MC, Mitchell AL, Hallyday AB, Kolk, DP (2007)  
A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer  
Clin Cancer Res 13(9): 2599-605
- Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH (1982)  
The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome  
Nature 299: 529-534
- Ciuffo G (1907)  
Innesto positivo filtrato die verruca volgare.  
Giornale italiano delle malattie veneree e della pelle 48: 12-17
- Chiang CM, Dong G, Broker TR, Chow LT (1992)  
Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins  
J Virol 66, 5224-5231
- Choo KB, Pan CC, Han SH:  
Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames.  
Virology (1987) 161: 259-261
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S (2003)  
Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis  
Br J Cancer 88: 63-73
- Cornelissen MT, Smits HL, Briet MA, van den Tweel JG, Struyk AP, van der Noorda J, ter Schegget J (1990)  
Uniformity of the splicing pattern of the E6/E7 transcripts in human papillomavirus type 16-transformed human fibroblasts, human cervical premalignant lesions and carcinomas  
J Gen Virol 71: 1243-1246

Cromme FV, Meijer CJ, Snijders PJ, Uyterlinde A, Kenemans P, Helmerhorst T, Stern PL, van-den Brule AJ, Walboomers JM (1993)  
Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions  
Br J Cancer 67: 1372-1380

Crum CP, Genest DR, Krane JF, Hogan C, Sun D, Bellerose D, Kostopoulou E, Lee KR (1999)  
Subclassifying atypical squamous cells in Thin-Prep cervical cytology correlates with detection of high-risk human papillomavirus DNA  
Am J Clin Pathol 112(3): 384-90

Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, Gilkisson G, McGoogan E (2004)  
Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia an young women in a cervical screening population  
J Clin Pathol 57(1): 68-72

Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA (2004)  
Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence – implications for cervical disease progression and monitoring  
J Med Virology 73(1):65-70

Danos O, Katinka M, Yaniv M (1982)  
Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among Papovaviridae  
EMBO J 1, 231-236

Danos, O., Katinka, M., Yaniv, M., 1982.  
Human papillomaviruses and cancer.  
Cancer Res. 39, 545-546

de Roda Husman AM, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF (1995)  
The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR  
J Gen Virol 76: 1057-1062

De Villiers, E.-M., Fauquet, O., Broker, T., Bernard, H.-U., zur Hausen, H., 2004.  
Classification of papillomaviruses.  
Virology 324 (2004) 17-27

DiMaio D (1991)  
Transforming activity of bovine and human papillomaviruses in cultured cells  
Adv Cancer Res 56: 133-59

DiSaia PJ, Creasman W (2002)  
Clinical Gynecologic Oncology. St. Louis, Missouri: Mosby Inc., 2002

Doorbar J (1991)  
An emerging function for E4  
Papillomavirus Rep 2: 145-147

- Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H (1983)  
A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions.  
Prod Natl Acad Sci USA 80(12): 3812-5
- Dürst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE, Gissmann L (1987)  
Molekular and cytogenic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA  
Oncogene 1(3): 251-6
- Dyson N, Howley PM, Munger K & Harlow E (1989)  
The human papilloma virus-16, E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product  
Science 243: 934-937
- Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G (1995)  
Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study  
J Infect Dis 171(4): 1026-30
- Falcinelli C, van Belkum A, Schrauwen L, Seldenrijk K, Quint WG (1993)  
Absence of human papillomavirus type 16 E6 transcripts in HPV-16 infected, cytologically normal cervical srappings  
J Med Virol 40(4): 261-5
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP (1999)  
Epidemiology of aquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer  
J Infect Dis 180: 1415-23
- Galvin GA, Jones HW, TeLinde RW (1955)  
The significance of basal-cell hyperactivity in cervical biopsies  
Am J Obstet Gynecol 70: 808-821
- Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T (1996)  
Identifikation of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures in a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA.  
J Virol 70(4): 2339-49
- Halbert CL, Demers GW, Galloway DA (1991)  
The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells  
J Virol 65: 473-478
- Haugen TH, Turek LP, Mercurio FM, Cripe TP, Olson BJ, Anderson RD, Seidl D, Karin M, Schiller J (1988)  
Sequence specific and general transcriptional activation by the bovine papillomavirus 1 E2 trans-activator require a N-terminal amphipathic helix containing E2 domain  
EMBO J 7, 4245-4253

Hawley M, Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT (1989)  
HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes  
EMBO J 8: 3905-10

Helland A, Karlsen F, Due EU, Holm R, Kristensen G, Borresen-Dale A (1998)  
Mutations in the TP53 gene and protein expression of p 53, MDM 2 and p21/WAF-1  
in primary cervical carcinomas with no or low human papillomavirus load  
Br J Cancer 78: 69-72

Helland A, Olsen AO, Gjoen K, Akselsen HE, Sauer T, Magnus P, Borresen, Dale  
AL, Ronningen KS (1998)  
An increased risk of cervical intra-epithelial neoplasia grade II-III among human  
papillomavirus positive patients with the HLA-DQA1\*0602 haplotype: a population-  
based case-control study of Norwegian women  
Int J Cancer 76: 19-24

Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J,  
Balmaceda I, Greenberg MD, Alfaro M, Burk RD, Wacholder S, Plummer M,  
Schiffman M (2000)  
Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in  
rural Costa Rica  
J Natl Cancer Inst 92(6): 464-74

Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt P (1994)  
Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically  
normal women in Portland, Oregon  
J Infect Dis 169:235-40

Hinselmann H (1938)  
Die Essigsäureprobe, ein Bestandteil der erweiterten Kolposkopie.  
Deutsche Medizinische Wochenschrift, 40-42

Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD (1998)  
Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women  
N Engl J Med 338: 423-428

Howley PM (1991)  
Role of the human papillomaviruses in human cancer.  
Cancer Res 51 (18): 5019s-5022s

Huang LW, Chao SL, Chen PH, Chou HP (2004)  
Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing  
in archival tissues  
J Clin Virol 29: 271-276

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991)  
A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human  
papillomavirus types 16 or 18  
EMBO J 10(13): 4129-35

- Jagella HP, Stegner HE (1974)  
Zur Dignität der Condylomata acuminata – Klinische, histopathologische und cytophotometrische Befunde  
Archiv für Gynäkologie 216: 119-132
- Johnson MA, Blomfield PI, Bevan IS, Woodman CB, Young LS (1990)  
Analysis of human papillomavirus type 16 E6/E7 transcription in cervical carcinomas and normal cervical epithelium using the polymerase chain reaction  
J Gen Virol 71: 1473-79
- Khleif SN, DeGregory J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, Howley PM (1996)  
Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity  
Proc Natl Acad Sci USA 93(9): 4350-4
- Kjaer S, Hogdall E, Frederiksen K, Munk C, van den Brule A, Svare E, Meijer C, Lorincz A, Iftner T (2006)  
The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period  
Cancer Res 66(21): 10630-6
- Klaes R, Woerner S, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, Knebel-Doeberitz M, (1999)  
Detection of high risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes  
Cancer Research 59: 6132-6136
- Koss LG (1989)  
The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy  
JAMA 261: 737-747
- Koutsky L (1997)  
Epidemiology of genital human papillomavirus infection  
Am J Med 102: 3-8
- Koutsky LA, Holmes K, Crichlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Galloway DA, Vernon D, Kiviat NB (1992)  
A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection  
N Engl J Med 327: 1272-1278
- Kraus I, Molden T, Erno LE, Skomedal H, Karlsen F, Hagmar B (2004)  
Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones  
Br J Cancer 90(7): 1407-1413
- Kraus I, Molden T, Holm R, Lie AK, Karlsen F, Kristensen GB, Skomedal H (2006)  
Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33 and 45 in the majority of cervical carcinomas  
J Clin Microbiol 44(4): 1310-7

- Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Glass AG, Anderson SM, Schiffman M (2001)  
A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types  
J Infect Dis 183(1): 8-15
- Liu Y, Chen JJ, Gao Q, Dalal S, Hong Y, Mansur CP, Band V, Androphy EJ (1999)  
Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells  
J Virol 73(9): 7297-307
- Loeffler F, Frosch P (1898)  
Berichte der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.  
Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, Bd. 23, 1. Abt., 371-391
- Lu JZ, Sun YN, Rose RC, Bonnez W, Mc Cane DJ (1993)  
Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin.  
J Virol 67 (12): 7131-9
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989)  
The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses  
Cancer Cells 7: 209-214
- Marsh MR (1952)  
Papilloma of the cervix.  
Am J Obstet Gynecol 64(2): 281-291
- Mc Indoe WA, McLean MR, Jones RW, Mullins PR (1984)  
The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix  
Obstet Gynecol 64: 451-458
- Meisels A, Fortin R (1976)  
Concylomatous lesions of the cercix and vagina I. cytologic patterns  
Acta Cytologica 20(6): 505-509
- Meisels A, Fortin R, Roy M (1977)  
Concylomatous lesionx of the cercix. II. Cytologic, colposcopsis and histopathologic study  
Acta Cytologica 21(3), 379-390
- Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J (2003)  
Organisation of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers  
J Virol 77(19): 10186-201

Molden T, Nygard JF, Kraus I, Karlsen F, Nygard M, Skare GB, Skomedal H, Thoresen SO, Hagmar B (2005)  
Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-Proofer and consensus PCR: a 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear  
Int J Cancer: 114 (6): 973-976

Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygard JF, Hagmar B (2005)  
Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: A cross-sectional study of 4,136 woman > 30 years of age with a 2-year follow-up of high grade squamous intraepithelial lesion  
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14(2): 367-72

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

Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, Darragh TM, Brescia R, Kanowitz S, Miller SB, Stone J, Hanson E, Palefski J (1998)  
The natural history of human papillomavirus infection is measured by repeated DNA testing in adolescent and young women  
J Pediatr 132 (2): 277-84

Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, Miller S, Canjura-Clayton KL, Farhat S, Broering JM, Darragh TM (2004)  
Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women.  
Lancet 364: 1678-83

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu, Navarro C, Martos C, Ascunce N, Gonzalez LC, Kaldor JM, Guerra E, Lörincz A, Santamaria M, Alonso de Ruiz P, Aristizabal N, Shah K (1992)  
The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population-based case-control study in Columbia and Spain  
Int J Cancer 52: 743-749

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S et al. (2003)  
Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer  
N. Engl J Med 348: 518-527

Munoz N, Bosch FX, Castellsague X et al. (2004)  
Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen?  
The international perspective.  
Int. J Cancer 111:278-285

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group (2003)  
Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer  
N Engl J Med 348(6): 518-27

- Münger K, Phelps WC, Bupp V, Howley PM, Schlegel R (1989)  
The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes  
J Virol 63(10): 4417-21
- Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E & Howley PM (1991)  
Biochemical and biological differences between E7 oncoproteins of the high- and low-risk human papillomavirus types are determined by amino-terminal sequences  
J Virol 65: 3943-3948
- Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E & Howley PM (1991)  
Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product  
EMBO J 8: 4099-4105
- Nakagawa S, Watanabe S, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T (1995)  
Mutational analysis of human papillomavirus 16 E6 protein: transforming function for human cells and degradation of p53 in vitro  
Virology 212: 535-542
- Nasiell K, Nasiell M, Vaclavinkova V (1983)  
Behavior of moderate cervical dysplasia during long-term follow-up  
Obstet Gynecol 61: 665-669
- Nasiell K, Roger V Nasiell M (1986)  
Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up  
Obstet Gynecol 67: 665-669
- Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, et al. (2001)  
Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear.  
Lancet 358: 1782-1783
- Nobbenhuis MA, Meijer CJ, van den Brule AJ, Roozendaal L, Voorhorst FJ, Risse EK, Verheijen RH, Helmerhorst TJ (2001)  
Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia  
Br J Cancer 84(6): 796-801
- Östör AG (1993)  
Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review  
Int J Gynecol Pathol 12: 186-192
- Östör AG, Rome RM (1994)  
Micro invasive squamous cell carcinoma of the cervix: a clinicopathologic study of 200 cases with long-term follow-up  
Int J Gynecol Pathol 4: 257- 264
- Papanicolaou GM, Traut HF (1943)  
Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear.  
Commonwealth Fund, New York

- Park TW, Fujiwara H, Wright TC (1995)  
Molecular biology of cervical cancer and its precursors  
Cancer 76: 1902-1913
- Park TC, Kim CJ, Koh YM, Lee KH, Yoon JH, Kim JH, N, Namkoong SE, Park JS (2004)  
Human papillomavirus genotyping by the DNA chip in the cervical neoplasia  
DNA Cell Biol 23: 119-125
- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS (2001)  
Cancer burden in the year 2000. The global picture.  
Eur J Cancer (Suppl 8): S4-66
- Petry KU et al. (1994)  
Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions  
Int J Cancer 57: 836-840
- Peyton CL, Gravitt PE, Hunt WC, Hundley RS, Zhao M, Apple RJ, Wheeler CM (2001)  
Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population  
J Infect Dis 183 (11): 1554-64
- Pfister H (1984)  
Biology and biochemistry of papillomaviruses  
Rev Physiol Biochem Pharmacol 99: 111-181
- Pirisi L, Yasumoto S, Fellery M, Doninger JK, DiPaolo JA (1987)  
Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA  
J Virol 61(4): 1061-6
- Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM; ALTS Group (2007)  
A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion.  
J Infect Dis 195: 1582-9
- Reagan JW (1953)  
The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix  
Cancer 6(2): 224-235
- Remm M, Brain R, Jenkins JR (1992)  
The E2 binding sites determine the efficiency of replication for the origin of human papillomavirus type 18  
Nucleic Acids Res 20, 6015-6021

Remmink AJ, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Risse EKJ, Meijer CJLM, Kenemans P (1995)  
The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months  
Int J Cancer 61: 306-311

Richart RM (1966)  
Influence of diagnostic and therapeutic procedures on the distribution of cervical intraepithelial neoplasia  
Cancer 19: 1635-393

Richart RM, Barron BA (1969)  
A follow-up study of patients with cervical dysplasia  
Am J Obstet Gynecol 105(3): 386-393

Rigoni-Stern (1842)  
Fatti statistici alle malattie cancerose che servono di base alle poche cose dette dal dott. Rigoni-Stern il di 23 settembre alla Sotto-sezione di chirurgia del IV Congresso degli scienziati Italiani.  
Giornale per servire ai progressi della patologia e della terapeutica 2 ser 2: 499-517

Rogers S, Kidd J, Rous P (1960)  
Relationships of the Shope papillomavirus to the cancers it determines in domestic rabbits  
Acta Unio Int. Cancarum 16, 129-130

Rolon PA, Smith JS, Munoz N, Klug SJ, Herrero R, Bosch X, Llamasas F, Meijer CJ, Walboomers JM (2000)  
Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay  
Int J Cancer 85(4): 486-91

Romanczuk H, Thierry F, Howley PM (1990)  
Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters  
J Virol 64, 2849-2859

Rozendaal L, Walboomers JM, van-der Linden JC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Helmerhorst TJ, Van Ballegooijen M, Meijer CJ (1996)  
Pcr- based high-risk HPV test for cervical cancer screening gives objective risk assessment of women with cytologically normal cervical smears  
Int J Cancer 68: 766-769

Rosenfeld WD, Rose E, Vermund SH et al. (1992)  
Follow-up evaluation of cervicovaginal human papillomavirus infection in adolescents  
J Pediatr 121: 307-311

Safaeian M, Solomon D, Wacholder S, Schiffman M, Castle P (2007)  
Risk of precancer and follow-up management strategies for women with human papillomavirus-negative atypical squamous cells of undetermined significance  
Obstet Gynecol 109(6): 1325-31

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase

Science 239: 487-491

Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M (2001)

High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 10: 45-52

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993)

The HPV-16 E6 and E6 AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53

Cell 75(3): 495-595

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990)

The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53

Cell 63: 1129-1136

Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Guillaud M, Follen M, Chen Z, Dillon LM, Adler-Storthz K (2005)

Correlation of human papillomavirus type 16 and human papillomavirus type 18 E7 messenger RNA levels with degree of cervical dysplasia

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14(8): 1948-52

Schiffman M, Castile PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S (2007)

Human papillomavirus and cervical cancer

Lancet 370: 890-907

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell M, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, Stanton K, Manos MM (1993)

Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia.

Journal of the National Cancer Institute 85(12): 958-964

Schiller W (1929)

Jodpinselung und Abschabung des Portioepithels

Zentralblatt für Gynäkologie 53:1056-64

Schottländer J, Kermauner F (1912)

Zur Kenntnis des Uteruskarzinoms: Monographische Studie über Morphologie, Entwicklung, Wachstum. Nebst Beiträgen zur Klinik der Erkrankung. S Karger, Berlin

Schwarz E, Dürst M, Demankowski O, Lattermann R, Zech E, Wolfsberger S, Suhai S, zur Hausen H (1983)

DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b  
EMBO J 2, 2341-2348

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Rogenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H (1985)

Structure and transkription of human papillomavirus type 18 and 16 sequences in cervical carcinoma cells  
Nature 314: 111-114

Seedorf K, Krämmer G, Dürst M, Suhai S, Röwekamp WG (1985)  
Human papillomavirus type 16 DNA sequence  
Virology 145 (1): 181-5

Seif I, (1984)  
Sequence homology between the large tumor antigen of polyoma viruses and the putative E1 protein of papilloma viruses  
Virology 138, 347-352

Selinka HC, Sotlar K, Klingel K, Sauter M, Kandolf R, Bültmann B (1998)  
Detection of human papillomavirus 16 transcriptional activity in cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions and cervical carcinomas by nested reverse transcription-polymerase chain reaction and in situ hybridization  
Lab Invest 78: 9-18

Serra A (1908)  
Ricerche istologiche e sperimentali sul condiloma acuminato, i papillomi del capo e la verruca volgare. Contributo all'etiologie, patogenesi, filtrabilita.  
Giornale italiano delle malattie veneree e della pelle 49: 11-42

Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, Morimoto K, Takekuni K, Itoh S, et al. (2003)  
Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells.  
J Biol Chem 278: 35421-35427

Shope RE (1933)  
Infectious papillomatosis of rabbits.  
Journal of Experimental Medicine 58: 607-624

Smotkine D, Wettstein FO (1986)  
Transkription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell and identification of the E7 protein  
Proc Natl Acad Sci USA 83: 4680-4684

Snijders P, Steenbergen R, Heideman D, Meijer C (2006)  
HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications  
J Pathol 208: 152-164

Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B (2004)  
Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR  
J Clin Microbiol 42(7): 3176-84

- Spalholz BA, McBride AA, Sarafi T, Quintero J (1993)  
Binding of bovine papillomavirus type 1 to the origin is not sufficient for DNA replication  
Virology 193, 201-212
- Sprague DL, Philips SL, Mitchell CJ, Berger KL, Lacey M, Turek LP, et al.  
Telomerase activation in cervical keratinocytes containing stably replicating human papillomavirus type 16 episomes  
Virology 301: 247-254
- Stanley M (2006)  
Immune responses to human papillomavirus.  
Vaccine 24: 16-22
- Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis GJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, et al. (2004)  
TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia  
J Natl Cancer Inst 96: 294-305
- Steenbergen RD, Kramer D, Meijer CJ, Walboomers JM, Trott DA, Cuthbert AP, et al. (2001)  
Telomerase suppression by chromosome 6 in a human papillomavirus type 16-immortalized keratinocyte cell line and in a cervical cancer cell line  
J Natl Cancer Inst 93: 865-872
- Strickler HD, Burk R, Shah K, Viscidi R, Jackson A, Pizza G, Bertoni F, Schiller JT, Manns A, Metcalf R, Qu W, Goedert JJ (1995)  
A multifaceted study of human papillomavirus and prostate carcinoma  
International Papillomavirus Workshop Quebec (1995)
- Thorner LK, Bucay N, Choe J, Botchan M (1988)  
The product of the bovine papillomavirus type 1 modulator gene (M) is a phosphoprotein  
J Virol 62(7): 2474-82
- Thorner, L. K., Lim, D. A, Botchan, M.R. (1993)  
DNA binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects  
J Virol. 67, 6000-6014
- Trimble CL, Piantadosi S, Gravitt P, Ronett B, Pizer E, Elko A, et al. (2005)  
Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype  
Cancer Res 11: 4717-4723
- Turek LP: (1994)  
The structure, function and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer  
Adv Virus Res 44: 305-356

- Ustav E, Ustav M, Szymanski P, Stenlund A (1993)  
The bovine papillomavirus origin of replication requires a binding site for the E2 transkriptional activator  
Proc Natl Acad Sci USA 90, 898-902
- Van Duin M, Steenbergen RD, de Wilde J, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Risse EK, Meijer CJ, Snijders PJ (2003)  
Telomerase activity in high-grade cervical lesions is associated with allelic imbalance at 6Q14-22  
Int J Cancer 105: 577-582
- Varnai AD, Bollmann M, Bankfalvi A, Speich N, Schmitt C, Griefingholt H, Kovacs K, Klozoris C, Bollmann R (2008)  
Predictive testing of early cervical precancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: diagnostic and prognostic implications  
Oncol Rep 19(2): 457-65
- Vinokurova S, Wentzensen N, Eienkel J, Klaes R, Ziegert C, Melsheimer P, Sartor H, Horn LC, Hockel M, von Knebel-Doeberitz M (2005)  
Clonal history of papillomavirus-induced dysplasia in the female lower genital tract.  
J Natl Cancer Inst 97(24): 1816-21
- Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, Kisseljov F, Dürst M, Schneider A, von Knebel Doeberitz M (2008)  
Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions.  
Cancer Res 68 (1): 307-13^
- Vogelstein B, Kinzler KW (1992)  
P 53 function and dysfunction  
Cell 70(4): 523-6
- Waelsch L (1917)  
Übertragungsversuche mit spitzem Kondylom  
Archiv für Dermatologie und Syphilis 124: 625-646
- Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Jeyar CJLM, Munoz N (1999)  
Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide  
J Pathol 189:12-19
- Wang SS, Hildesheim A (2003)  
Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression.  
J Natl Cancer Inst Monogr 31: 35-40
- Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel-Doeberitz M (2004)  
Systematic review of genomic sites of human papillomavirus sites in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract  
Cancer Res 64(11): 3878-84

- Werness BA, Münger K, Howley PM (1991)  
Role of the human papillomavirus oncoproteins in transformation and carcinogenic progression  
Important Adv Oncol 1991; 3-18
- Woodman CB, Collins SI, Young LS (2007)  
The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues  
Nat Rev Cancer 7 (1): 11-22
- Woodruff JD, Peterson WF (1958)  
Concytomata acuminata of the cervix  
Am J Obstet Gynecol 75(6): 1354-1362
- Xi LF, Toure P, Critchlow CW, Hawes SE, Dembele B, Sow PS, Kiviat NB (2003)  
Prevalence of specific types of human papillomavirus and cervical squamous intraepithelial lesions in consecutive, previously unscreened, West-African women over 35 years of age  
Int J Cancer 103(6): 803-9
- Yang L, Mohr I, Fouts E, Lim D.A., Nohaile M, Botchan M (1993)  
The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase  
Proc Natl Acad Sci USA 90, 5086-5090
- Yi W, Wang JL, Li XH, Wei LH (2008)  
Correlations of high-risk human papillomavirus to cervical intraepithelial neoplasia grades, expression of Ki-67 and P6ink4a and follow-up  
Ai Zeng 27(5): 520-4
- Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, Sörensen P, Frisch M, Andersen PK, Sørensen P, Gustafsson M, Magnusson P, Ponten J, Gyllensten U, Adami HO (2000)  
A prospective study showing long-term infection with Human Papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ  
Cancer Res 60(21): 6027-6032
- Ylitalo N, Sørensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, Adami HO, Gyllensten UB, Melbye M (2000)  
Detection of genital human papillomavirus by single-tube nested PCR and type-specific oligonucleotide hybridization  
J Clin Microbiol 33: 1822-28
- Zehbe I, Wilander E (1996)  
Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for human papillomavirus detection in cervical biopsies: A study of sensitivity  
Hum Pathol 27: 812-812
- zur Hausen H (1977)  
Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas  
Current Topics in Microbiology and Immunology 78: 1-30
- zur Hausen et al. (1991)  
Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer  
Virology 184: 9-13

zur Hausen H (1994)

Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types

Curr Top Microbiol Immunol 186: 131-156

## 10. Danksagung

Herrn Professor Dr. Bültmann danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl Sotlar für die Betreuung dieser Arbeit, die Durchsicht des Manuskripts, für viele wertvolle Ratschläge und anregenden Diskussionen, sowie die angenehme Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt Fr. Sema Colak und Hr. Perikles Kosmidis für die Einsicht in die Erhebung der molekularbiologischen Befunde und die labortechnischen Aspekte der Arbeit.

Das Untersuchungsmaterial wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. M. Menton aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen zur Verfügung gestellt.

Meinen herzlichen Dank möchte ich auch allen Mitarbeitern der kolposkopischen Ambulanz der Universitätsfrauenklinik Tübingen für die Hilfe bei der Suche nach den Patientenakten in den Archiven, aussprechen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Chef Dr. med dent Peter Burg für die flexible Arbeitszeitgestaltung, um das Fertigstellen dieser Arbeit zu erleichtern und die vielen aufmunternden Worte.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich mit Rücksichtnahme und Verständnis durch das Studium und diese Arbeit begleitet haben.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Mann Aaron, der mich während des Studiums und dieser Arbeit in jeder erdenklichen Weise unterstützt und getragen hat.

## 11. Lebenslauf

Name: Sonja Sigrid Schulz geb. Muckle  
Geburtsdatum und Ort: 14.04.1976 in Tübingen  
Familienstand: verheiratet

1982 bis 1986: Grundschule Balingen-Endingen  
1986 bis 1992 Schulzentrum Buhren, Balingen-Frommern  
Realschule  
1992 bis 1993 Freiwilliges Soziales Jahr  
am Kreisklinikum Zollern-Alb, Balingen  
1993 bis 1996 Krankenpflegeschule Balingen  
Abschluss: Staatlich examinierte Krankenschwester  
03/96 bis 07/96 Newbold College Bracknell Berkshire, England  
School of English, Sprachkurs  
1996 bis 1999 Friederike-Rösler-Schule Balingen  
Ernährungswissenschaftliches Gymnasium  
Abitur  
1999 bis 2003 Eberhard-Karls-Universität Tübingen:  
Vorklinischer Abschnitt des Studiums der Zahnheilkunde  
03/2001 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
03/2003 Zahnärztliche Vorprüfung  
2003 bis 2006 Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Zentrum für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde  
Tübingen  
Klinischer Abschnitt des Studiums der Zahnheilkunde  
02/06 bis 06/06 Staatsexamen Zahnmedizin  
10/06 bis heute: Praxis Dr. med dent Peter Burg  
zahnärztliche Tätigkeit als Assistentin / angestellte  
Zahnärztin