

Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
Direktorin: Prof. Dr. med. Petra Ambrosch
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**HPV-DNA, -mRNA-Expression und p16^{INK4A}-IMMUNHISTOCHEMIE IN KARZINOMEN DES
KOPF-HALS-BEREICHES: DIE ROLLE VON p16^{INK4A} ALS SURROGATMARKER ZUR
IDENTIFIKATION AKTIVER HUMANER PAPILLOMVIRUS-INFEKTIONEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

CLAUDIA BURKHARDT

aus Berlin

Kiel, 2012

1. Berichtstatter:

Priv.-Doz. Dr. Hoffmann

2. Berichtstatter:

Prof. Dr. Schröder

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Juli 2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

10. Juli 2013

gez.: Prof. Dr. Dr. Kneba

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
2. FRAGESTELLUNG	4
3. MATERIAL UND METHODEN	5
3.1 Material	5
3.1.1 Gewebeproben.....	5
3.1.2 Patienten und klinische Daten	5
3.2 Methoden.....	6
3.2.1 Extraktion der Nukleinsäuren.....	6
3.2.1.1 DNA-Extraktion	6
3.2.1.2 RNA-Extraktion	7
3.2.1.3 Photometrische Bestimmung der RNA-/DNA-Konzentration.....	7
3.2.2 Polymerasekettenreaktion	8
3.2.2.1 Detektion von HPV-DNA mittels Polymerasekettenreaktion.....	9
3.2.2.2 Primer zur Detektion von HPV-DNA	9
3.2.2.3 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	10
3.2.3 DNA-/RNA-Analyse	11
3.2.3.1 HPV-DNA-Genotypisierung.....	11
3.2.3.2 HPV E6*I mRNA-Analyse in gefrorenem Frischgewebe	14
3.2.4 Angewandte Färbungen.....	14
3.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	14
3.2.4.2 p16 ^{INK4A} -Immunhistochemie.....	14
3.2.5 Statistische Analyse.....	16
4. ERGEBNISSE.....	17
4.1 β -Globin-Nachweis	17
4.2 HPV-DNA-Nachweis.....	17
4.3 Expression der E6*I mRNA – biologisch aktive vs. inaktive HPV-Infektionen.....	18
4.4 Immunhistochemischer Nachweis der p16 ^{INK4A} -Expression in Korrelation zu der HPV-DNA und E6*I mRNA-Expression.....	19
4.5 Follow-up: Die Präsenz von HPV-DNA, E6*I mRNA-Expression und p16 ^{INK4A} -Überexpression und das Gesamtüberleben	22
5. DISKUSSION	23
5.1 Infektionsbedingte Kanzerogenese	23
5.2 Humane Papillomviren (HPV)	24
5.2.1 Aufbau der Papillomviren	25
5.2.2 Pathophysiologie der HPV-Infektion	27
5.2.3 Mit humanen Papillomviren assoziierte Läsionen	29
5.3 HPV-Prävalenz in Plattenepithelkarzinomen	30
5.3.1 HPV-Prävalenz in oropharyngealen Karzinomen	32
5.3.2 HPV-Prävalenz in nicht-oropharyngealen Karzinomen.....	33
5.4 mRNA-Expression der Onkogene E6 und E7	34
5.5 Bedeutung des Expressionsmusters der p16 ^{INK4A} -Immunhistochemie	35
5.6 Korrelation der HPV-DNA-, mRNA- und p16 ^{INK4A} -Ergebnisse der oropharyngealen Karzinome	37
5.7 Korrelation der HPV-DNA-, mRNA- und p16 ^{INK4A} -Ergebnisse der nicht-oropharyngealen Karzinome	38
5.8 Prognostische Bedeutung bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen	39
5.9 HPV-Impfung.....	41
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	43

7. LITERATURVERZEICHNIS	46
8. ANHANG.....	60
DANKSAGUNG.....	66
LEBENS LAUF, Promotion, Publikation.....	68
ERKLÄRUNG	70

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E-Region	Early Region
EV	Epidermodysplasia verruciformis
G1	Histopathologisches Grading (UICC), gut differenzierter Tumor
G2	Histopathologisches Grading (UICC), mäßig differenzierter Tumor
G3	Histopathologisches Grading (UICC), schlecht differenzierter Tumor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV	Humane Papillomviren
HPVD+	HPV-DNA-positiv
HPVD-	HPV-DNA-negativ
HPVR+	HPV-RNA-positiv
HPVR-	HPV-RNA-negativ
HR	high-risk HPV-Typen
L-Region	Late Region
LCR	Long Control Region
LR	low-risk HPV-Typen
MFI	Mittlere Fluoreszenz-Intensität
MPG	Multiplex HPV-Genotypisierung
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NMSC	Non melanoma skin cancer
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE-KHB	Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich
pRb	Retinoblastoma-Genprodukt
RNA	Ribonukleinsäure

RRP	rezidivierende respiratorische Papillomatose
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion
Taq	Thermus aquaticus
TNM-System	T: Tumorausdehnung; N: Lymphknotenmetastasen; M: Fernmetastasen
Tris-HCL	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan– Hydrochlorid
TSCC	Tonsillar squamous cell Carcinoma
UICC	Union internationale contre le cancer
URR	Upstream Regulatory Region

1. EINLEITUNG

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (PE-KHB) sind in der Mundhöhle, in dem Naso-, Oro-, Hypopharynx und Larynx lokalisiert und gehören zu der sechstgrößten Malignomgruppe weltweit. In den westlichen Industrienationen werden jährlich 80.000 Kopf-Hals-Karzinome, bei einer weltweiten Inzidenz von schätzungsweise 570.000 Fällen pro Jahr, neu diagnostiziert (Parker et al. 1996). Dies entspricht ungefähr einem Anteil von 5 % aller Malignome (Kamanger et al. 2006). Die 5-Jahres-Überlebensrate aller Kopf-Hals-Karzinome liegt im Durchschnitt bei 40-50 % (Ferlay et al. 2010, Leemans et al. 2011). Es ist in den vergangenen Jahren deutlich geworden, dass neben den traditionellen Risikofaktoren für die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich, wie chronischer Tabak- und Alkoholkonsum (Lewin et al. 1998), die Infektion mit humanen Papillomviren (HPV) eine wichtige Rolle in der Initiierung und Progression dieser Karzinome spielt (E. M. Smith et al. 2010).

Epidemiologische Untersuchungen zeigen eine HPV-Prävalenz von 25-35 % in allen Kopf-Hals-Karzinomen (Hoffmann et al. 1998, Kreimer et al. 2005, Termine et al. 2008) und heben Tonsillenkarcinome des Waldeyer'schen Rachenringes (TSCC) mit einem HPV-Vorkommen von bis zu 60 % als für eine solche Infektion besonders prädestiniert hervor (Klussmann et al. 2001, Hoffmann et al. 2010). Ribeiro und Mitarbeiter dagegen berichten über HPV-Prävalenzen von unter 10 % aller Kopf-Hals-Karzinome in Zentraleuropa und Lateinamerika (Ribeiro et al. 2011). Der Hochrisiko-Genotyp HPV16 ist dabei jeweils in über 90 % der Karzinome im Kopf-Hals-Bereich für die Infektionen verantwortlich (Smeets et al. 2007).

Die genaue Prävalenz von HPV-Infektionen in Kopf-Hals-Karzinomen sowie deren Bedeutung ist Gegenstand intensiver Diskussionen, da die in der Literatur angegebenen Ergebnisse erhebliche Diskrepanzen aufweisen: Es wird aus Schweden eine HPV-Prävalenz in Tonsillenkarcinomen von bis zu 90 % beschrieben (Näsman et al. 2009), während diese Prävalenz in Deutschland und den Niederlanden mit 60 % und 40 % angegeben wird (Straetmans et al. 2009, Hoffmann et al. 2010). Die Mehrheit der in der gegenwärtigen Literatur beschriebenen epidemiologischen Untersuchungen berichtet dabei insgesamt über eine Zunahme HPV-positiver Karzinome im Kopf-Hals-Bereich, speziell des Oropharynx (Näsman et al. 2009, Blomberg et al. 2011, Marklund et al. 2011).

Patienten mit HPV-positiven Karzinomen zeigen im Vergleich zu Tumorpatienten mit negativem HPV-Status eine bessere Prognose bezüglich der Gesamtüberlebenszeit und Rezidivfreiheit. Diese Erkenntnis wird auf eine erhöhte Sensibilität der HPV-positiven Karzinome auf die Therapie, insbesondere die Strahlentherapie zurückgeführt (Gillison et al. 2009, Ang et al. 2010, E. M. Smith et al. 2010, Tribius et al. 2011).

Es existieren zahlreiche Untersuchungen, die einen kausalen Zusammenhang zwischen HPV-Infektionen in Oropharynxkarzinomen, v. a. Tonsillenkarcinomen, nachweisen (O'Regan et al. 2008, Hoffmann et al. 2010, Jung et al. 2010, Smeets et al. 2011), so dass zunehmend die Meinung vorherrscht, dass alleinig Oropharynxkarzinome HPV-bedingt sind und nur Patienten mit solchen Karzinomen von innovativen Therapiestrategien profitieren. Die Datenlage bezüglich der nicht-oropharyngealen Karzinome ist jedoch für einen generellen Ausschluss „aktiver“ HPV-Infektionen in diesen Bereichen und deren Folgen spärlich.

Interaktionen der HPV16-Onkoproteine E6 und E7 mit zwei der Hauptregulatoren des Zellzyklus, dem p53-Protein (p53) und dem Retinoblastoma-Genprodukt (pRb), sind von besonderer Bedeutung für die Entstehung HPV-bedingter Karzinome (Mantovani und Banks 2001, Munger et al. 2001, Munger und Howley 2002). E6 bindet an p53, einem zellulären Tumorsuppressorprotein, welches im regelrechten Zellzyklus Mutationen oder Fremd-DNA erkennt und darauf die Apoptose der betroffenen Zelle einleitet. Das E6-Onkoprotein ist in der Lage eine p53-Degradation zu induzieren oder p53 durch Komplexierung zu inaktivieren. Die infolgedessen bedingte Störung des p53-Schutzmechanismus führt zu einer erhöhten genetischen Instabilität der Zelle, in deren Folge DNA-Mutationen akkumulieren können (Munger et al. 2001, Malanchi et al. 2002). Die zelluläre Telomerase wird des Weiteren von E6 aktiviert. Die Lebensdauer der infizierten Zelle wird dadurch verlängert. E7 inaktiviert über zwei wichtige Mechanismen das Retinoblastoma-Genprodukt (pRb), welches im Zellzyklus den G1-S-Phasenübergang kontrolliert. Die Inaktivierung erfolgt zum einen über die direkte Bindung von E7 an pRb, zum anderen über die Bindung von E7 an die Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) (p21), welche die Produktion von inaktivem (phosphoryliertem) pRb steigern (Jones et al. 1997). Beide Mechanismen führen so zu einer Freisetzung des E2F-Transkriptionsfaktors, welcher von dem unphosphorylierten pRb gebunden wird. Das Eintreten der Zelle in die S-Phase und die Synthese viraler DNA wird nachfolgend ermöglicht (zur Hausen 2002). Beide von den Onkoproteinen E6 und E7

bewirkten Effekte führen zur Replikation der infizierten Zelle, was für den Lebenszyklus der über kein eigenes Replikationssystem verfügenden Viren lebensnotwendig ist.

Das zelluläre Protein p16^{INK4A} ist ebenfalls ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen und vermindert somit die Phosphorylierung des pRb. Das Protein p16^{INK4A} wirkt im geregelten Ablauf des Zellzyklus antiproliferativ. Es besteht ein negativer Feedbackmechanismus von pRb auf p16^{INK4A}, der bei einer Inaktivierung des Retinoblastoma-Genproduktes (pRb) durch E7 zu einer immunhistochemisch messbaren Überexpression von p16^{INK4A} führt (Klaes et al. 2001). Die benannten Fehlfunktionen von p53 und pRb mit folgender p16^{INK4A}-Überexpression sind in HPV-positiven Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches bereits mehrfach beschrieben worden (Andl et al. 1998, Wiest et al. 2002).

Es existieren Hinweise darauf, dass sich p16^{INK4A} in Kombination mit dem Nachweis von HPV-DNA als Surrogatmarker für die Identifizierung von biologisch aktiven – d.h. transkriptional aktiven – HPV-Infektionen in Kopf-Hals-Karzinomen als qualifiziert erweist. Es ist entsprechend der oben beschriebenen Mechanismen und Effekte für die Identifizierung von biologisch aktiven HPV-Infektionen in Kopf-Hals-Karzinomen ein Algorithmus aufgestellt worden, welcher die initiale p16^{INK4A}-Immunhistochemie mit nachfolgendem HPV-DNA-Nachweis bei positiver p16^{INK4A}-Färbung empfiehlt (Smeets et al. 2007). Das Vorhandensein und der Nachweis viraler mRNA in den infizierten Zellen und Geweben sind allerdings einzig beweisend für eine transkriptional aktive HPV-Infektion. Demzufolge ist der Nachweis viraler mRNA einziger verlässlicher Hinweis auf eine HPV-Beteiligung in der Karzinogenese und auf das biologische Verhalten von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.

Es ist vor diesem Hintergrund Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit, weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen HPV-DNA, E6/E7-mRNA und p16^{INK4A} in oropharyngealen und v. a. auch in nicht-oropharyngealen Karzinomen zu gewinnen. Anhand dieser Ergebnisse soll hinterfragt werden, ob sich HPV-Infektionen mit biologischer Aktivität tatsächlich auf Karzinome des Oropharynx beschränken und p16^{INK4A} als Surrogatmarker für die Identifizierung biologisch aktiver HPV-Infektionen in Karzinomen aller anatomischen Regionen geeignet ist.

2. FRAGESTELLUNG

Mit der Bestimmung des HPV-DNA-Status, der Expression der viralen E6*I mRNA und der Korrelation dieser Ergebnisse mit dem p16^{INK4A}-Expressionsmuster in 78 Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches lässt sich das Ziel der vorliegenden Arbeit mit der Beantwortung folgender Fragestellung avisieren:

1. Kann die vorliegende Arbeit die zuvor aufgeführten HPV-DNA-Prävalenzen von 50-60 % für die oropharyngealen Karzinome und 20-25 % für die nicht-oropharyngealen Karzinome in den untersuchten Gewebeproben bestätigen?

Zunächst ist die Prävalenz einer Infektion mit humanen Papillomviren bei 78 Patienten mit histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen mittels HPV-DNA-Nachweis mit den derzeit sensitivsten und spezifischsten Nachweismethoden bestimmt worden.

2. Lässt sich bei den (HPV-DNA-positiven) Karzinomen regelmäßig virale mRNA nachweisen?

Die Identifizierung biologisch aktiver HPV-Infektionen, also das Vorkommen viraler mRNA der Onkogene E6/E7, ist an aus den Karzinombiopsaten extrahierter RNA mittels RT-PCR (reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion) und Multiplex-HPV-Genotyping-Assay/Luminex untersucht und mit den Daten der HPV-DNA-Diagnostik korreliert worden.

3. Sind die biologisch aktiven Fälle durch ein Nachweisverfahren bestehend aus der Kombination von HPV-DNA-Detektion und p16^{INK4A}-Immunhistochemie markierbar? Oder ist für den Nachweis einer biologischen Aktivität die Bestimmung viraler mRNA notwendig?

Das Expressionsmuster von p16^{INK4A} ist mittels Immunhistochemie semiquantitativ bestimmt und mit den Ergebnissen der HPV-DNA- und mRNA-Untersuchungen korreliert worden.

4. Zeigen die oropharyngealen und die nicht-oropharyngealen Plattenepithelkarzinome mit aktiver HPV-Infektion vergleichbare Überlebensdaten der Patienten? Können statistische Aussagen zur Verlaufsprognose der Patienten anhand der Daten abgeleitet werden?

Die in den Untersuchungen gewonnenen Daten sind statistisch ausgewertet und interpretiert worden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Gewebeproben

Gewebeproben von 78 Patienten wurden in einem Zeitraum zwischen 2004 und 2009 in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gewonnen. Die Proben wurden den Patienten im Rahmen von diagnostischen und therapeutischen Eingriffen entnommen. Es wurde entsprechend einer von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Kiel befürworteten Einverständniserklärung von allen Patienten die Zustimmung zur wissenschaftlichen Bearbeitung des Gewebes eingeholt (D 438/10). Molekulargenetische Analysen der Gewebeproben bezüglich der Prävalenz und Typisierung von HPV-DNA-Sequenzen erfolgten, nachdem die Proben in histopathologischen Untersuchungen am Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. med. Röcken) des Universitätsklinikums als Plattenepithelkarzinome diagnostiziert wurden. Die in Paraffin fixierten Gewebeproben der vorliegenden Untersuchung wurden vom o. g. Institut zur Verfügung gestellt.

Von jeder intraoperativ entnommenen Gewebeprobe wurde unter Wahrung der Resektionsgrenzen ein Teil für Routineuntersuchungen in der Pathologie aufbereitet und ein Teil in sterile Reaktionsgefäße (Safe-Lock Reaktionsgefäß 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg) überführt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Es wurden für die Durchführung der Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung und der immunhistochemischen p16^{INK4}-Färbung von jeder Gewebeprobe – mittels eines Mikrotomes (Reichert-Jung Supercut, Cambridge Instruments GmbH, Nußloch) – mehrere Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt.

3.1.2 Patienten und klinische Daten

Es wurden 78 Gewebeproben aus Karzinomen von 66 Männern und zwölf Frauen untersucht. Das Alter der Patienten reichte von 43 bis 76 Jahren. Das mittlere Alter lag bei 59,95 Jahren. Die anatomischen Lokalisationen der untersuchten Primärtumoren waren auf den Oropharynx (n= 20) [Tonsilla palatina (n= 14), Tonsilla lingualis (n= 6)], den Larynx (n= 22), den

Hypopharynx (n= 24), den Zungenrand (n= 8) und den weichen Gaumen (n= 4) verteilt (Tabelle 1, Anhang).

Der Zungenrand gehört definitionsgemäß zur anatomischen Region der Mundhöhle und der weiche Gaumen (Palatum molle) zum Oropharynx. Beide zeigen histologisch an ihren Oberflächen ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel. In der vorliegenden Arbeit sind Karzinome des Zungenrandes und des weichen Gaumens unter der Lokalisation „Mundhöhle“ zusammengefasst betrachtet worden, da es sich bei der Schleimhaut des weichen Gaumens nicht um tonsilläres Gewebe handelt und HPV-Prävalenz sowie biologisches Verhalten eher Karzinomen der Mundhöhle gleicht als HPV-assoziierten Karzinomen der Tonsillen.

Das histologische Grading ergab bei vier Karzinomen eine gute Differenzierung, bei 56 Karzinomen eine mäßige Differenzierung, bei drei Karzinomen eine mäßige bis schlechte sowie bei 15 Karzinomen eine schlechte Differenzierung.

3.2 Methoden

3.2.1 Extraktion der Nukleinsäuren

3.2.1.1 DNA-Extraktion

Die Isolation der DNA aus den jeweiligen Gewebeproben erfolgte mit dem QIAamp® DNA Mini Set (QIAGEN® GmbH, Hilden) nach folgenden Arbeitsschritten:

Es wurden jeweils 25 mg schockgefrorene Karzinombiopsate zu einem feinen Pulver homogenisiert, in ein Eppendorfhütchen überführt und durch Zugabe von 180 µl des mitgelieferten Lysepuffers (ATL Buffer) aufgelöst. 20 µl einer 1 mg/ml Proteinase-K-Lösung wurden den Proben für eine Proteininaktivierung beigemischt. Die vollständige Lyse der Gewebeproben erfolgte während der Inkubation im Wasserbad (Typ 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) bei 56 °C für drei Stunden, sowie durch weitere Zugabe von 200 µl des mitgelieferten AL Buffers und abschließende Inkubation im Wasserbad bei 70 °C für zehn Minuten. Die DNA wurde durch Hinzufügen von 200 µl Ethanol (96-100 %) präzipitiert und zusammen mit dem Ethanol über die Membran der QIAamp® Extraktionssäule geschichtet. Das Gemisch wurde bei 8.000 U/min in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) bearbeitet und die DNA während der Zentrifugation selektiv von der Silicium-Gel-Membran der Extraktionssäule absorbiert.

Polysaccharide und Proteine wurden nicht an die Matrix gebunden und dadurch entfernt. Das Waschen der gebundenen DNA erfolgte anschließend in zwei Zentrifugationsschritten mittels der im Set enthaltenen Waschpuffer AW1 und AW2. Es wurden zunächst 500 µl des Waschpuffers AW1 hinzugefügt und für eine Minute bei 8.000 U/min zentrifugiert. Nach Hinzufügen von AW2 folgte die Zentrifugation für drei Minuten bei 14.000 U/min. Störende Kontaminationen konnten durch den Waschvorgang aus der Membran entfernt werden und der Reinheitsgrad der DNA wurde erhöht. Die DNA wurde durch zweimalige Hinzugabe von 200 µl AE-Puffer und einer jeweiligen einminütigen Zentrifugation bei 8.000 U/min in ein Sammelplastikhütchen (Sarstedt AG & CO, Nümbrecht) eluiert. Das Gemisch wurde vor der Zentrifugation für je eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.1.2 RNA-Extraktion

Die Gesamtzell-RNA wurde mittels des pegGOLD TriFast™ Reagenz (PeqLab, Erlangen) nach dem Herstellerprotokoll aus den gleichen Gewebeproben isoliert. Die schockgefrorenen Biopsate wurden in einem sterilen Mörser zu einem feinen Pulver homogenisiert. Die vollständige Lyse der Proben erfolgte durch die Zugabe von 1 ml TriFast™ zu jeweils 50-100 mg Gewebe. Eine Phasentrennung wurde durch die Zugabe von 0,2 ml Chloroform zu jeweils 1 ml TriFast™ und Zentrifugation bei 12.000 U/min für fünf Minuten erreicht. Die in der wässrigen Phase gelöste RNA wurde durch die anschließende Zugabe von 0,5 ml Isopropanol zu jeweils 1 ml TriFast™ präzipitiert. Es folgte zweimaliges Waschen der RNA-Pellets in 75 %-iger Ethanollösung und eine weitere Zentrifugation für zehn Minuten bei 12.000 U/min. Die RNA-Proben wurden abschließend an der Luft getrocknet und in 50 µl 40 %-iger Formamid-Lösung gelöst.

3.2.1.3 Photometrische Bestimmung der RNA-/DNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem UV-Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg). Eine Eichung des Photometers mit 40 %-iger Formamid-Lösung erfolgte vor der ersten Messung. Die RNA-Konzentrationen der Proben ließen sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz aus den ermittelten Absorptionen errechnen:

$$30 \mu\text{l} / \text{ml} : 1 = X \mu\text{g} / \text{ml} : \text{gemessene Absorption.}$$

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte ebenso photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm im UV-Spektralphotometer. Das Photometer wurde vor jeder Messreihe und nach jeder vierten Messung mit AE-Puffer geeicht. UV-transparente Einmalküvetten (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) wurden für die Messungen benutzt.

Die DNA-Konzentrationen der Proben wurden nach der folgenden Verhältnisgleichung ermittelt:

$$50 \mu\text{l} / \text{ml} : 1 = X \mu\text{g} / \text{ml} : \text{gemessene Absorption.}$$

3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die 1983 von K. B. Mullis beschriebene Polymerasekettenreaktion (PCR) (Ma 1995) dient der enzymatischen *in-Vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Genomisches Material (z. B. DNA) von einigen hundert bis einigen tausend Basenpaaren kann mittels PCR exponentiell vervielfacht werden.

Das Reaktionsverfahren besteht aus 30-40 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Teilschritten besteht: Denaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und Extension (Polymerisation). Es erfolgt zunächst die Denaturierung der DNA bei 94 °C. Die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die komplementären DNA-Stränge miteinander verbinden, werden bei dieser Temperatur gelöst und die DNA-Stränge somit zum Auseinanderweichen gebracht. Diese Trennung ist erforderlich, damit sich synthetisch hergestellte Oligonukleotidprimer an jeweils einen der beiden DNA-Einzelstränge anlagern können (Annealing). Als Primer werden Oligonukleotide bezeichnet, die von DNA-replizierenden Enzymen wie der DNA-Polymerase als Startpunkt benötigt werden. Sie lagern sich spontan an einen DNA-Strang mit komplementärer Nukleotidabfolge und ermöglichen damit die Replikation. Die Temperatur wird in der Annealingphase auf 55 °C gesenkt, so dass sich Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Einzelsträngen und den Primern ausbilden können. Die Extension der Primer bei 72 °C schließt sich als letzter Teilschritt an. Das thermostabile Enzym Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*: Taq) synthetisiert von den Primern ausgehend die komplementären Stränge zu den vorhandenen DNA-Ausgangssträngen in 3`-5`-Richtung, wobei die dazu benötigten Nukleotide im Überschuss in den PCR-Reaktionsgefäßen vorhanden sein müssen.

Die gesuchte DNA-Sequenz wurde mittels dieser Reaktionsabfolge einmal amplifiziert. Die gesuchten Gensequenzen wurden durch mehrfaches Durchlaufen dieses Thermozyklus exponentiell amplifiziert. DNA-Sequenzen können innerhalb von Stunden mit der

Polymerasekettenreaktion millionenfach mit hoher Spezifität amplifiziert werden und ermöglichen damit weitere Detektionen und Analysen (Scharfetter et al. 1991).

3.2.2.1 Detektion von HPV-DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die folgenden Arbeitsschritte wurden zur Vermeidung von Kontaminationen auf einer sterilen Arbeitsfläche durchgeführt. Die PCR-Reagenzien wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäße (Multiply®-µstrip 0,2 ml Kette, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht) pipettiert, welche vorab in einem Autoklaven (EK Laborautoklav, Systec GmbH Laborsystemtechnik, Wettenberg) sterilisiert worden sind. Alle Reagenzien waren während des Pipettierens auf Eis gelagert. Die Reaktionsansätze enthielten 5 µl von dem 10x Dream Taq-Puffer, 5 µl 2 mM dNTP-Mix, jeweils 2,5 µl typenspezifische Oligonukleotide, 200 ng genomische DNA der zu untersuchenden Probe und 0,5 µl der Dream Taq-DNA-Polymerase. Das Gesamtvolumen wurde mit 0,01 %-igen Diethylpyrocarbonat (DEPC) -haltigem Wasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) auf ein Volumen von 50 µl eingestellt (Der PCR-Puffer, der dNTP-Mix und die Taq-Polymerase wurden von Fa. Fermentas Life Sciences bezogen). Zusätzlich zu den HPV16-typenspezifischen Primern und den General-Primern (GP5/GP6) wurden zur Sicherstellung der Amplifizierbarkeit der DNA die konstitutive Expression des β -Globin-Gens durch Verwendung β -Globin-Gen-spezifischer Primer nachgewiesen (Eurofins MWG Operon, Ebersberg).

Die Amplifizierung der DNA-Fragmente erfolgte in einem Thermocycler (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9600, USA), wobei ein Amplifikationszyklus sich aus einer einminütigen Denaturierungsphase bei 94 °C, einer einminütigen Annealingphase bei 55 °C und einer zweiminütigen Extensionsphase bei 72 °C zusammensetzte. Es wurden insgesamt 39 Amplifikationszyklen durchlaufen. Positiv- und Negativkontrollen wurden in jeder PCR mitgeführt. Die HPV16-positive Zervixkarzinomzelllinie SiHa wurde als Positivkontrolle verwendet (bereitgestellt von der Abteilung Angewandte Tumorstudiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg). In der Negativkontrolle wurde DNA durch DEPC-haltiges Wasser substituiert. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert.

3.2.2.2 Primer zur Detektion von HPV-DNA

Die DNA jeder Gewebeprobe wurde in Anlehnung an die Methode von Saiki (1988) unter Verwendung von β -Globin-Primern amplifiziert. Diese Primer sind spezifisch für ein 268

Basenpaar langes Fragment des humanen β -Globin-Gens.

Es folgten PCR-Amplifikationen für den spezifischen Nachweis von HPV16 sowie Amplifikationen zum unspezifischen Nachweis von HPV mittels des General-Primers GP5+/GP6+ (Snijders et al. 1990, Jacobs et al. 1995). Die Primer der HPV16-spezifischen PCR binden im Bereich der „Upstream Regulatory Region (URR)“, die zwischen den einzelnen Typen variabel ist. Eine typenspezifische, hochsensitive PCR ist hierdurch möglich.

Der Primer GP5+/GP6+ mit einer Länge von 20 Nukleotiden wurde bei der General-Primer-PCR eingesetzt. Die Zielsequenz umfasste eine Region von ca. 140-150 Basenpaaren der verschiedenen HPV-Genome und erlaubte den Nachweis von mindestens 26 verschiedenen HPV-Typen. Klinische Proben, die nach Untersuchung mittels General-Primer HPV-positiv waren, konnten nochmals mit typenspezifischen Primern amplifiziert werden. Diese Methode wurde modifiziert, indem hoch konservierte Sequenzen in der Nähe des 3'-Endes der GP5- und GP6-Primer mit eingeschlossen wurden (drei Nukleotide für GP5 und fünf Nukleotide für GP6). Zwischen zehn und 200 HPV-Kopien konnten durch die Benutzung dieser verlängerten Primer (GP5+/GP6+) je nach vorliegendem HPV-Typ nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Primer	Nukleotidsequenz
β -Globin	5'-CAACCTCATCCACGTTCCACC-3'
β -Globin	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'
HPV 16-S	5'-TGCTAGTGCTTATGCAGCAA-3'
HPV 16-AS	5'-ATTTACTGCAACATTGGTAC-3'
GP 5+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'
GP 6+	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATAAT-3'

Tabelle 2: Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide.

3.2.2.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden von überschüssigen Salzen und Nukleotiden gemäß des QIAquick® Herstellerprotokolls wie folgt entfernt: Es wurde zunächst ein Volumenanteil PCR-Lösung mit fünf Volumenteilen des mitgelieferten Puffers PB vermischt. Die Lösung war basisch, wenn sich beim Mischvorgang eine orange-violette Färbung einstellte. 10 μ l Natrium-Acetat (pH 5,0) wurden nach Farbeinstellung hinzugefügt und die Farbe veränderte sich ins Gelbliche als Zeichen für einen neutralen pH-Wert. Das Gemisch wurde anschließend

auf die mitgelieferten QIAquick®-Säulchen aufgetragen und mit der Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler GmbH, Hamburg) für eine Minute bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es wurden zum Waschen 0,75 ml Puffer PE hinzugefügt und das Gemisch zweimal für je eine Minute zentrifugiert. Die QIAquick®-Säulchen wurden anschließend in 1,5 ml Eppendorf-Hütchen (Sarstedt AG & CO, Nümbrecht) gesetzt und die DNA mit 40 µl DEPC-haltigem Wasser (0,01 %) eluiert. Die Lösung wurde für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA-Konzentration zu erhöhen. Die DNA-Lösung wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.3 DNA-/RNA-Analyse

3.2.3.1 HPV-DNA-Genotypisierung

Es fanden zwei verschiedene Methoden zur Ermittlung von HPV-DNA in den Gewebeproben Verwendung. Multiplex-HPV-Genotyping-Assay/Luminex-Analyse und der HPV^{Type} 3.5 LCD-Array. Beide Verfahren basieren auf der vorherigen Durchführung einer PCR. Die Durchführung von zwei verschiedenen Methoden erhöhte die Genauigkeit der Validität und Reliabilität der HPV-DNA-Diagnostik:

1.) Multiplex-HPV-Genotyping-Assay/Luminex-Analyse

Wissenschaftler am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg entwickelten einen HPV-Genotyping-Assay für 27 Typen Humaner Papillomviren (HPV) (Schmitt et al. 2006, 2008 und 2010). Das Verfahren ist geeignet für die simultane Detektion von multiplen „low-risk“ (LR) - und „high-risk“ (HR) -Typen.

Das Luminex-Verfahren (Abbildung 1) basiert auf der Amplifikation von Genfragmenten der 27 wichtigsten HPV-Typen mit dem General-Primer BSGP5+/- biotinierter BSGP6+ (Multiplex PCR Set, Qiagen, Hilden, Germany). Die Amplifikation des β -Globin-Gens erfolgte zusätzlich mittels PCR zur Überprüfung der Intaktheit der zu untersuchenden humanen DNA. MS3 und 5'-biotiniliertes MS10 wurden als β -Globin-Primer verwendet. Es erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen PCR-Produkte und die Hybridisierung der Zielsequenzen mit HPV-typenspezifischen Oligonukleotidsonden zur Detektion der verschiedenen HPV-Typen.

Fluoreszenz-markierte Polystyrol-Beads (Luminex SeroMAP Beads) sind an HPV-

typenspezifischen Oligonukleotidsonden gebunden. Die Beads unterscheiden sich durch ihre unterschiedlichen Absorptionsspektren. Der Nachweis der Hybridisierung erfolgte mittels fluoreszenzmarkiertem Streptavidin im Luminex-Analysegerät, welches an die biotinylierten PCR-Produkte bindet. Das Hybridisierungsgemisch enthielt außerdem eine β -Globin-Gen-spezifische Sonde, welche zusätzlich zur Kontrolle der Hybridisierung verwendet wurde. Ein zusätzlicher Waschvorgang eliminierte den nicht-gebundenen Fluoreszenzfarbstoff.

Zur Auswertung diente abschließend das Luminex-Analysegerät, welches die unterschiedlichen Fluoreszenz-Spektren der Beads misst. Die einzelnen Ergebnisse wurden als mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) von mindestens 100 Beads pro Durchlauf ausgedrückt. Das Gerät entspricht weitgehend einem Durchflusszytometer mit zwei Lasern.

Die Bewertung der HPV-Signale erfolgte durch die Ermittlung des relativen HPV-MFI-Signals (%) für jede positive Reaktion. Dieses relative HPV-MFI-Signal errechnet sich aus dem gemessenen HPV-MFI-Wert geteilt durch den ermittelten maximalen typenspezifischen MFI-Wert. Die maximalen MFI-Werte der einzelnen HPV-Typen wurden aus typenspezifischen PCR-Produkten zuvor ermittelt. Der relative MFI-Wert (%) wurde schließlich durch den gemessenen β -Globin-MFI-Wert geteilt, um einen nicht-deskriptiven viralen Belastungswert zu bilden (% HPV MFI/ β -Globin MFI). Eine hohe virale Belastung wurde für Netto-MFI-Werte größer fünf festgelegt – sog. Cutoff-Wert (Schmitt et al. 2006). Proben wurden in der vorliegenden Untersuchung als HPV-DNA-positiv eingestuft, wenn eine hohe virale Belastung ermittelt werden konnte. Dieser hohe virale Cutoff-Wert erwies sich als zuverlässig auch für extrahierte DNA aus frisch-gefrorenen Gewebeproben (Holzinger et al. eingereicht). Es wurden Negativkontrollen in jedem PCR-Durchlauf mitgeführt. In den Negativkontrollen wurde DNA durch DEPC-haltiges Wasser substituiert. Es konnten keine PCR-Kontaminationen nachgewiesen werden.

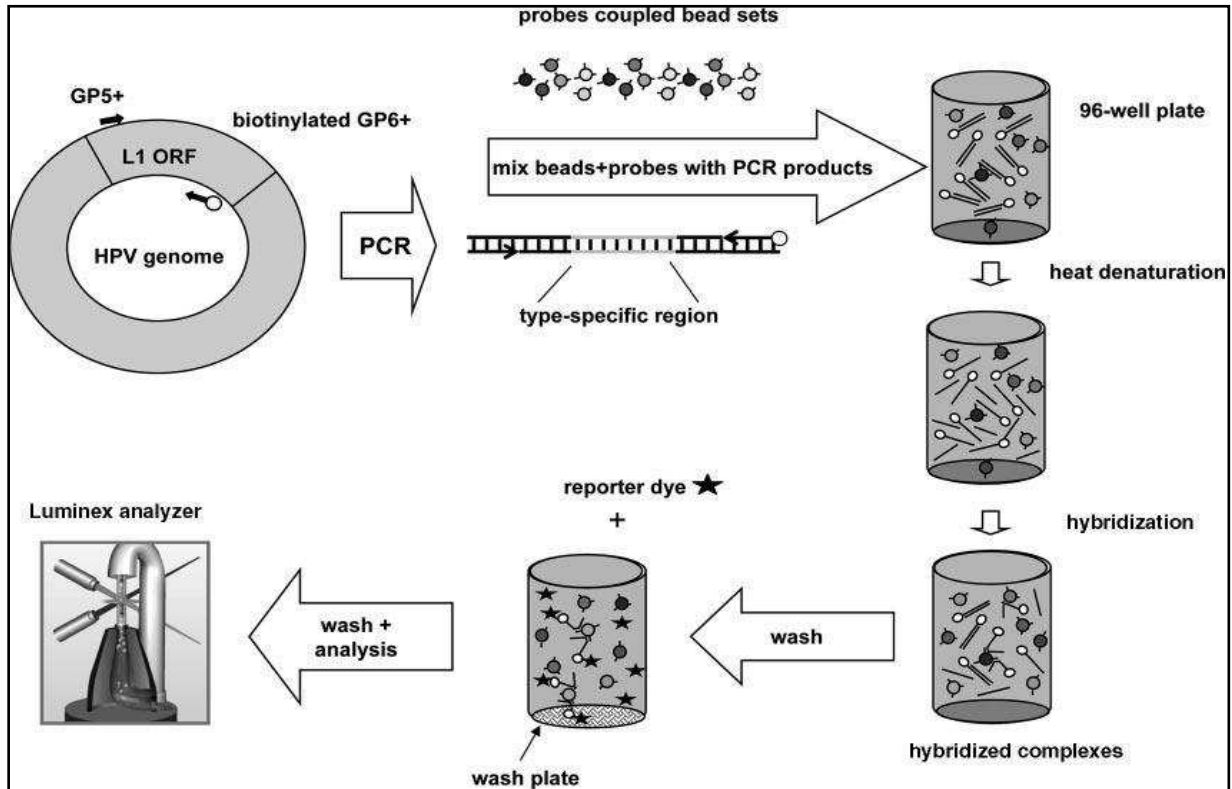


Abbildung 1: Schematische Darstellung der HPV-Genotypisierung der GP5+/6+ -PCR-Produkte mittels der Luminex-Analyse (Schmitt et al. 2006).

2.) HPV^{Type} 3.5 LCD-Array

Eine hochqualitative PCR wurde in allen Fällen zusätzlich durchgeführt, um die Qualität der Untersuchung zu steigern. Die PCR erfolgte mit vier Primerpaaren. Diese Primer amplifizieren DNA-Regionen zwischen 100, 200, 300 und 400 Basenpaaren (van Dongen et al. 2003).

Die HPV-Detektion und -typisierung der extrahierten DNA erfolgte mittels einer Chip-basierten Detektionsmethode (HPV^{Type} 3.5 LCD-Array-Set, Chipron GmbH, Berlin). Der Hybridisierungsarray HPV 3.5 genotypisierte 32 verschiedene HPV-Typen: HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 90 und 91. HPV-spezifische DNA-Segmente (L1-Region) wurden mittels zweier Primerpaare – HPV MY11/09 (~430 bp) und HPV „125“ (~125 bp) – amplifiziert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung von jeweils 10 µl der biotinylierten PCR-Produkte gegen die als Array immobilisierten Subtyp-spezifischen Fängersonden auf der LCD-Chip-Oberfläche. Zwei stringente Waschschrte folgten, bei denen ungebundene Komponenten

entfernt wurden. Die gebundenen PCR-Produkte wurden mittels Reaktion eines Enzyms mit einem chromogenen Substrat als blaues Präzipitat sichtbar gemacht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch optische Kontrolle mittels einer Mustermatrix (LCD-Array-Set). Die Hybridisierungs-, die Waschvorgänge und die Identifizierung der HPV-PCR-Fragmente erfolgten nach den entsprechenden Herstellerempfehlungen (chipron®).

3.2.3.2 HPV E6*I mRNA-Analyse in gefrorenem Frischgewebe

54 RNA- Proben waren insgesamt für weitere Analysen verfügbar. Es wurden jeweils 2 µl Gesamt-RNA in ultra-kurzer-typenspezifischer Reverse Transkriptase (RT) -PCR untersucht. Halec et al. (2012) entwickelten diese Methode zum Nachweis der Amplifikation von ~ 65 bp der E6*I mRNA von zwölf high-risk- (HR) und acht putativen high-risk- (pHR) HPV-Typen. Der Nachweis der RNA-Integrität erfolgte durch zusätzliches Amplifizieren von 85 bp langen Ubiquitin-C-Transkripten. Die weitere Detektion der PCR-Produkte erfolgte anschließend mittels der Luminex-Hybridisierung. Es wurden typen- und Spleißlage-spezifische HPV-E6*I- und Ubiquitin-C-Sonden verwendet. Reaktionen mit einem netto MFI-Wert über fünf (Cutoff-Wert) wurden als HPV-E6*I mRNA positiv definiert (Schmitt et al. 2008). Es wurde DEPC -haltiges Wasser als Negativkontrolle in jedem (RT) -PCR-Durchlauf mitgeführt. Es konnten keine PCR-Kontaminationen erfasst werden.

3.2.4 Angewandte Färbungen

3.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die histologischen Schnitte wurden mittels Xylol (Vogel, Giessen) 2x 10 Minuten entparaffiniert. Die Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung mit Meyers Hämalaun 1:1 (Meyers Hämalaunlösung, Merck KgaA, Darmstadt) erfolgte für vier Minuten und anschließend mit 0,5 %-igem Eosin (SIGMA-Aldrich®, Chemie-GmbH, Steinheim) für eine Minute. Die Schnitte wurden wie unter Punkt 3.2.5.2 beschrieben mit Ethanol unterschiedlicher Konzentrationen entwässert und mit Eukitt (Fluka, Sigma Albrich Chemie GmbH, Steinheim) eingedeckt.

3.2.4.2 p16^{INK4A}-Immunhistochemie

Die Färbung der Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE) 5 µm dicken Schnitte erfolgte mittels des CINtec® Histology-Set (mtm laboratories AG, Heidelberg) nach folgendem Färbeprotokoll:

Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und in Alkohol unterschiedlicher Konzentrationen rehydriert:

2x 10 min Xylol

2x 10 min 100 % Ethanol (J.T. Baker, Deventer Niederlande)

5 min 96 % Ethanol (BÜFA Chemkalien GmbH & Co, Hude)

5 min 80 % Ethanol

5 min 70 % Ethanol

30 s Spülen mit Aqua dest.

Die Schnitte wurden zur Epitopdemaskierung in Citronensäure-Monohydrat [Roth Chemie GmbH, Karlsruhe (1:10 in Aqua dest.)] für zweimal sieben Minuten in der Mikrowelle bei 450 W erhitzt und dabei mit 50 ml Aqua dest. aufgefüllt. Nach 15-minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für fünf Minuten mit Waschpuffer (1:10 in Aqua dest.) gewaschen. Das Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte anschließend durch eine fünfminütige Inkubation mit Peroxidase-Blockierungsreagenz (Methanol mit 1 % H₂O₂). Nach weiterem Waschen für fünf Minuten mit 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,9 % NaCl (TBS) wurden die Schnitte für 30 Minuten mit dem monoklonalen Mausantikörper (Klon E6H4®) bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin erneut für fünf Minuten gespült in TBS. Die Inkubation mit Visualisierungsreagenz erfolgte für 30 Minuten. Anschließend fand die Inkubation mit der Substrat-Chromogenlösung (DAB - (3,3'-Diaminobenzidin) Chromogenlösung) für zehn Minuten statt. Die Gegenfärbung erfolgte nach Spülen mit Aqua dest. mit frisch gefilterter Hämalaun-Lösung (1:2) für fünf Sekunden. Die Entwässerung und die Einbettung mit Eukitt (Fluka, Sigma Albrich Chemie GmbH, Steinheim) schlossen sich zuletzt an.

Auswertung der Färbung

Positivkontrollen von Karzinomen der Zervix uteri wurden zur Auswertung der p16^{INK4A}-Immunhistochemie verwendet. Die Schnitte wurden von zwei unabhängigen Experten ausgewertet. Eine zusätzliche Überprüfung erfolgte durch einen erfahrenen Pathologen (Prof. Dr. med. Röcken, Direktor: Institut für Pathologie). Es wurden sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Färbungen als positiv gewertet. Alle Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (bei 400-facher Vergrößerung) semiquantitativ nach der Einteilung von Klaes und Mitarbeitern (2001) ausgewertet:

negativ	<1 %
sporadisch positiv	1-5 %
fokal positiv	5-25 %
diffus positiv	>25 % der Zellen gefärbt.

Die Einstufung der Ergebnisse erfolgte abhängig von dieser Einteilung in negativ (-), schwach (+), moderat (++) und stark (+++) (Tabelle 3, Anhang). Moderate p16^{INK4A}-Färbungen wurden zur Minimierung falsch-negativer Ergebnisse als positiv betrachtet (Smeets et al. 2007).

3.2.5 Statistische Analyse

Kaplan-Meier-Schätzungen wurden für die Überlebensanalyse verwendet. Das Gesamtüberleben der Patienten war der primäre statistische Endpunkt.

Das Geschlecht, die Tumorgöße (T entsprechend der TNM-Klassifikation der UICC 1992), die Inzidenz, das Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung (N entsprechend der TNM-Klassifikation der UICC 1992), der HPV-DNA- und mRNA-Status, sowie der p16^{INK4A}-Expressionsstatus der Gewebeproben wurden als Einflussgrößen in die statistische Wertung mit einbezogen. Der Logrank-Test wurde für signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen verwendet. Für die Korrelation von HPV-positiven Ergebnissen mit der p16^{INK4A}-Färbung und der E6*I mRNA -Expression erfolgte die Anwendung des exakten Fisher-Tests. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. P-Werte unter 0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der klinischen und pathologischen Bewertungen wurden in der Tabelle 3 im Anhang zusammengefasst. Diese Tabelle beinhaltet die quantitativen Ergebnisse der HPV-Genotypisierung mittels der MPG/Luminex-Methode, die Resultate des LCD-Chip-Arrays, die Ergebnisse der E6*I mRNA-Analyse und die Ergebnisse der p16^{INK4A}-Immunhistochemie. Der Algorithmus, welcher für die Interpretation der zusammengefassten Ergebnisse verwendet wurde, wird detailliert in der Legende der Tabelle 3 (Anhang) beschrieben.

4.1 β -Globin-Nachweis

Die DNA aller 78 Gewebeproben wurde nach der Extraktion auf die Amplifizierbarkeit einer Gensequenz des humanen β -Globins untersucht. Das DNA-Segment des humanen β -Globins und somit die erfolgreiche Amplifizierbarkeit aller 78 Karzinomgewebeproben ließ sich im Rahmen der Multiplex-HPV-Genotypisierung/Luminex-Analyse nachweisen.

4.2 HPV-DNA-Nachweis

Der HPV-DNA-Nachweis erfolgte in insgesamt 78 Proben von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. 70 von 78 untersuchten Gewebeproben zeigten Signale für HPV-DNA in der MPG/Luminex-Analyse, wobei 21 (26,9 %) von 78 Proben hohe Viruslasten zeigten, wenn der im Kapitel 3.2.3.1 (HPV-DNA-Genotypisierung) beschriebene Cutoff-Wert verwendet wurde. Karzinome mit hoher Viruslast wurden als HPV-DNA-positiv gewertet (HPVD+). Der LCD-Array wurde zur Verbesserung der methodischen Genauigkeit der Ergebnisse zusätzlich durchgeführt. Diese Methode erfolgte an den gleichen DNA-Proben, welche auch für die MPG/Luminex-Analyse verwendet wurden. Der LCD-Array konnte in 20 von den 21 Fällen, die die MPG-Methode als HPVD+ registrierte, ebenfalls positive Signale für HPV-DNA detektieren. Die MPG-Methode konnte bei einem Fall (Tabelle 3, Fall: 25) hohe Viruslast nachweisen, wohingegen der LCD-Array keine HPV-DNA registrierte. Die E6*I mRNA-Analyse verblieb in diesem Fall ebenfalls negativ, sodass die Karzinomprobe insgesamt als HPV-DNA-negativ (HPVD-) klassifiziert wurde.

Drei DNA-Proben (Tabelle 3, Fall: 20, 23 und 54) waren in der LCD-Array-Untersuchung HPV-DNA-positiv, wohingegen die MPG-Methode nur niedrige Viruslasten aufzeigte. Virale mRNA konnte in zwei dieser drei Gewebeproben (Fall 20 und 23) nachgewiesen werden, sodass diese folglich insgesamt als HPVD+ betrachtet wurden. Der Fall mit positivem

Ergebnis in dem LCD-Array bei gleichzeitig niedriger Viruslast in der MPG-Methode wurde bei fehlendem Nachweis viraler mRNA dagegen als HPVD-gewertet.

Es wurden insgesamt 22 der 78 (28,2 %) untersuchten Karzinomproben nach der Auswertung beider DNA-Nachweismethoden als HPVD+ gewertet. Die HPV-Genotypen 16 und 18 konnten dabei in beinahe allen HPV-DNA-positiven Fällen identifiziert werden: HPV16 wurde in 20 von 22 Proben (90,9 %) und HPV18 in einer von 22 Proben (4,5 %) nachgewiesen. Eine Doppelinfektion mit HPV16 und HPV18 zeigte sich dagegen in einem Fall (4,5 %).

Positive Signale für HPV-DNA konnten in zwölf (60 %) von insgesamt 20 untersuchten Tonsillenkarzinomen nachgewiesen werden. Die Fälle der HPV18-Infektion bzw. der HPV16/18-Doppelinfektion ließen sich auch dieser anatomischen Region (Tonsilla palatina) zuordnen. Der HPV-Typ 16 wurde dagegen als einziger Genotyp in den nicht-oropharyngealen Gewebeproben identifiziert. Der HPV-DNA-Nachweis war in vier (16,6 %) von 24 Hypopharynxkarzinomen, in vier (18,1 %) von 22 Karzinomen des Larynx und in zwei (16,6 %) von zwölf Karzinomen des Zungenrandes und des weichen Gaumens positiv für HPV-DNA (Tabelle 4).

HPV-DNA-Status	Karzinomlokalisierung			
	Tonsille	Larynx	Zungenrand/weicher Gaumen	Hypopharynx
HPVD+	12	4	2	4
HPVD-	8	18	10	20
Total	20	22	12	24

Tabelle 4: Verteilung des HPV-DNA-Status auf die anatomischen Lokalisationen.

4.3 Expression der E6*I mRNA – biologisch aktive vs. inaktive HPV-Infektionen

Eine HPV-typenspezifische E6*I mRNA-Analyse erfolgte in solchen Fällen bei denen auch die RNA-Extraktion aus den Gewebeproben erfolgreich war (n= 54). Hybridisierungssignale für HPV oder Ubiquitin-C zeigten die Präsenz intakter mRNA (HPVR+), wobei damit sowohl die E6- als auch die E7-mRNA nachgewiesen wurde, da die E6*I mRNA für beide Sequenzen kodiert.

mRNA-Hybridisierungssignale ließen sich in 17 von 54 Fällen nachweisen. 14 der 17 RNA-positiven Fälle konnten jeweils einem HPV-DNA-positiven Fall zugeordnet werden (HPV16: n= 13; HPV18: n= 1). Drei weitere Gewebeprouben (Tabelle 3, Fall: 15, 29 und 30) zeigten zwar Signale für vorhandene virale mRNA, die HPV-DNA-Nachweismethoden konnten jedoch keine virale DNA in diesen Proben nachweisen.

mRNA war in 18 von insgesamt 22 HPV-DNA-positiven Fällen verfügbar. Vier HPVD+ mit verfügbarer RNA zeigten keinen Nachweis von viraler mRNA. Diese vier Fälle wurden als biologisch inaktive HPV-Infektionen eingestuft (HPVR-). Die anderen 14 HPVD+ Fälle mit detektierbarer viraler mRNA wurden als biologisch aktive HPV-Infektionen gewertet (HPVR+).

Entsprechende mRNA war in weiteren vier HPV-DNA-positiven Fällen nicht verfügbar. Der p16^{INK4A}-Expressionsstatus wurde in diesen vier Fällen zur Entscheidung zwischen aktiver bzw. inaktiver Infektion herangezogen: Ein starkes Färbemuster in der p16^{INK4A}-Immunhistochemie zeigte sich in drei von diesen vier Fällen. Diese drei HPVD+ Fälle wurden demnach als aktive HPV-Infektionen bezeichnet. Der vierte Fall wies eine schwache Färbung auf und wurde als biologisch inaktiv gewertet.

17 (77,3 %) der 22 HPV-DNA-positiven Fälle wurden zusammenfassend als biologisch aktive Infektionen klassifiziert. Aktive HPV-Infektionen ließen sich in zwölf von zwölf HPVD+ Tonsillenzarzinomen, in zwei von vier HPVD+ Plattenepithelkarzinomen des Larynx, in zwei von zwei HPVD+ Zungenrandkarzinomen und in einem von vier HPVD+ Plattenepithelkarzinomen des Hypopharynx nachweisen. Die restlichen fünf HPV-DNA-positiven Fälle wurden als biologisch inaktive Infektionen klassifiziert.

4.4 Immunhistochemischer Nachweis der p16^{INK4A}-Expression in Korrelation zu der HPV-DNA und E6*I mRNA-Expression

Die p16^{INK4A}-Immunhistochemie erfolgte bei allen untersuchten Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (n= 78). Eine p16^{INK4A}-Überexpression zeigte sich in 45 von 78 Proben. Die p16^{INK4A}-Expression war – entsprechend der Einteilung von Klaes und Mitarbeitern (2001) – in 16 Karzinomen schwach (+), in zwölf Karzinomen moderat (++) und in 17 Karzinomen stark (+++) ausgeprägt (Tabelle 5, Tabelle 6, Abbildung 2).

Es zeigte sich bei der Betrachtung der p16^{INK4A}-Expression der 22 HPV-DNA-positiven Karzinome in 14 Fällen eine starke, in zwei Fällen eine moderate, in zwei weiteren Fällen eine schwache und in vier Fällen eine negative Färbung. Die Immunhistochemie zum Nachweis einer p16^{INK4A}-Expression zeigte zusammenfassend in 16 (72,7 %) der 22 HPV-DNA-positiven Fälle eine Überexpression.

Fälle mit fehlender bzw. schwacher p16^{INK4A}-Färbung wurden in der Immunhistochemie als p16^{INK4A}-negativ gewertet und moderate bzw. starke p16^{INK4A}-Färbungen wurden als p16^{INK4A}-positiv betrachtet. Die Verteilung der Ergebnisse der p16^{INK4A}-Immunhistochemie und der HPV-DNA-Analyse war dementsprechend wie folgt: HPVD+ und p16^{INK4A}-positiv: n= 16; HPVD+ und p16^{INK4A}-negativ: n= 6; HPVD- und p16^{INK4A}-negativ: n= 43; HPVD- und p16^{INK4A}-positiv: n= 13. Der Zusammenhang zwischen der p16^{INK4A}-Expression und dem HPV-DNA-Status, sowie die Korrelation der beiden Faktoren mit dem E6*I mRNA-Expressionsstatus hat sich als statistisch hoch signifikant erwiesen (p<0.0001).

HPV-DNA-Status	P16 ^{INK4A}				Total
	- (negativ)	+	++	+++	
HPVD+	4	2	2	14	22
HPVD-	29	14	10	3	56
Total	33	16	12	17	78

Tabelle 5: P16^{INK4A}-Färbemuster aufgetragen in Abhängigkeit zum HPV-DNA-Status.

HPV-DNA/ RNA-Status	p16 ^{INK4A}				Total
	- (negativ)	+	++	+++	
HPVD+/HPVR+	3	0	1	10	14
HPVD+/HPVR-	1	1	1	1	4
HPVD-/HPVR-	18	10	4	1	33
HPVD-/HPVR+	1	0	2	0	3
Total	23	11	8	12	54*

Tabelle 6: P16^{INK4A}-Färbemuster aufgetragen in Abhängigkeit zum HPV-DNA-Status und E6*I mRNA-Status. *RNA war in 54 von insgesamt 78 Proben verfügbar.

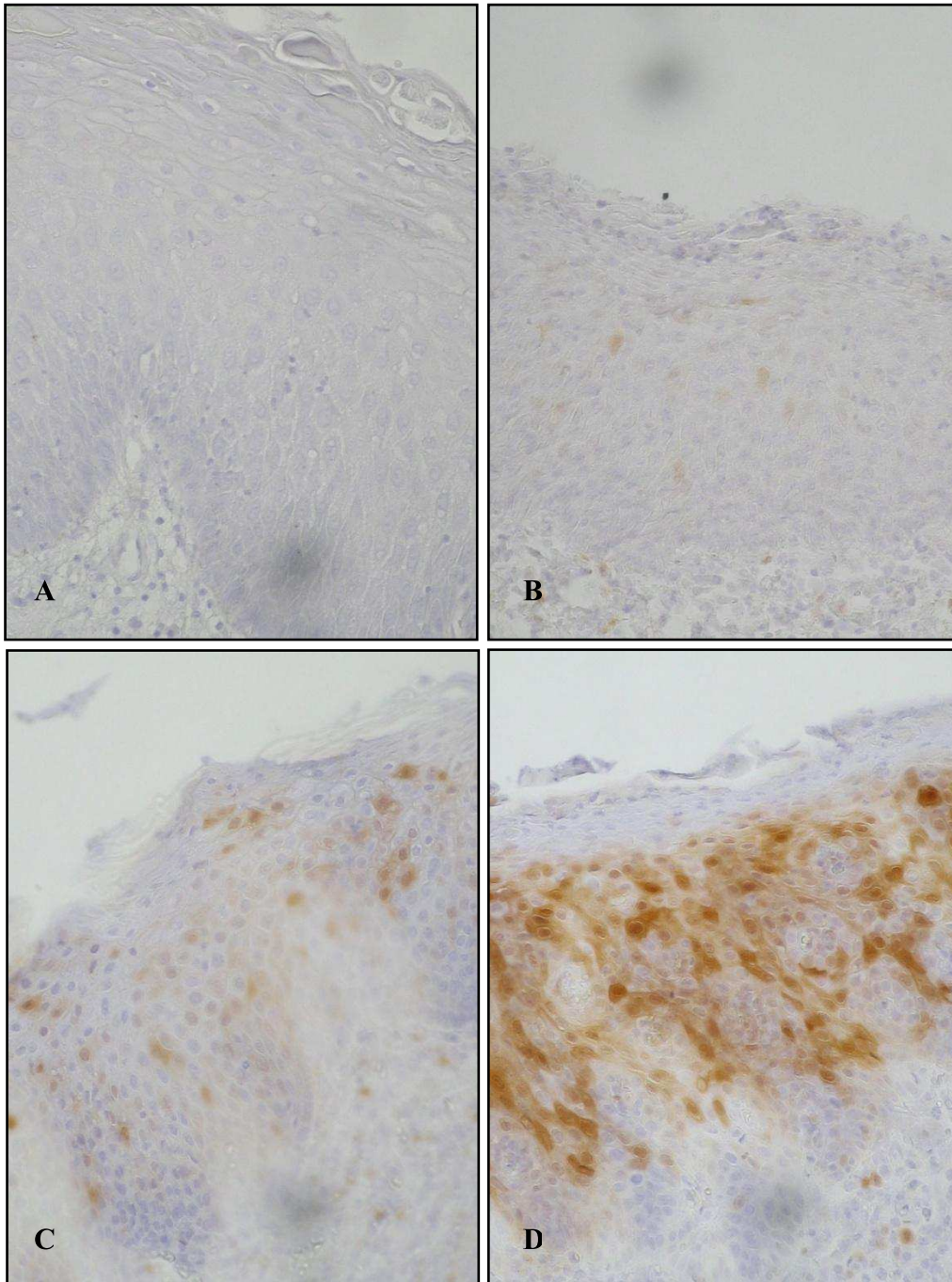


Abbildung 2: P16^{INK4A}-Immunhistochemie (CINtec[®]) von Plattenepithelkarzinomen des Larynx mit Einteilung des Färbemusters in:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| (A) p16 ^{INK4A} negativ (-): | pT3N2cM0, G2-3 (Tabelle 1: Fall 31), |
| (B) p16 ^{INK4A} schwach (+): | pT3N0M0, G2 (Tabelle 1: Fall 32), |
| (C) p16 ^{INK4A} moderat (++): | pT2N0M0, G2 (Tabelle 1: Fall 25) und |
| (D) p16 ^{INK4A} stark (+++): | pT4N1M0, G2 (Tabelle 1: Fall 37). |

4.5 Follow-up: Die Präsenz von HPV-DNA, E6*I mRNA-Expression und p16^{INK4A}-Überexpression und das Gesamtüberleben

Die Patienten wurden für einen Median von 20,3 Monaten (Interquartilbereich zwischen 8,2 bis 29,7 Monaten) beobachtet.

Kaplan-Meier-Schätzungen zeigten, dass die einzelne Betrachtung der HPV-DNA keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben in dem hier untersuchten Patientenkollektiv hat ($p=0.5593$). Die E6*I mRNA-Expression beschreibt eine Aktivität der viralen Onkogene. Dieser Parameter allein betrachtet erreichte annähernd eine statistische Signifikanz für das bessere Gesamtüberleben der Patienten ($p=0.0693$), trotz der eher niedrigen Zahl an untersuchten Fällen ($n= 54$). Es zeigten sich in der Analyse der Parameter, welche auf eine "aktive Infektion" hinweisen deutliche Unterschiede im Gesamtüberleben für negative, inaktive und aktive Fälle ($p=0.0908$). Die aktiven Fälle korrelierten dabei mit dem besten Gesamtüberleben. Die negativen und inaktiven Fälle hingegen zeigten schlechte Gesamtüberlebensdaten.

Die p16^{INK4A}-Überexpression ist ein Surrogatmarker, der auf eine Aktivität schließen lässt. Er zeigte bei seiner einzelnen Betrachtung keinen Unterschied im Gesamtüberleben auf ($p=0.4295$).

Der HPV-DNA-Status zeigte verbesserte Gesamtüberlebensraten nur in Kombination entweder mit dem E6*I mRNA- oder dem p16^{INK4A}-Status. Dies gilt für Patienten bei denen beide Parameter positiv getestet wurden. Diese Kombinationen erreichten dennoch keine statistische Signifikanz (entsprechend: $p=0.2987$ und $p=0.1139$).

5. DISKUSSION

5.1 Infektionsbedingte Kanzerogenese

Die Zellproliferation ist den verschiedensten Ansprüchen des Körpers und seiner Organe angepasst. Sie unterliegt einer exakten Regulation. Es entstehen bei einem Versagen dieses Kontrollsystems der Zellproliferation Zellen, die sich unkontrolliert teilen. Dieses Versagen bildet die Basis jeglicher Kanzerogenese.

Die unkontrollierte Proliferation von Zellen beruht häufig auf Mutationen des Erbgutes somatischer Zellen, sog. somatischen Mutationen. Eine Karzinomzelle entsteht allerdings nicht infolge einer einzigen somatischen Mutation, sondern ist Ergebnis einer Serie von Mutationen unterschiedlicher Gene, die über Jahre hinweg akkumulieren. Es sind im Allgemeinen vier bis sieben somatische Mutationen zur Transformation – zur Umwandlung einer normalen Zelle in eine Karzinomzelle – notwendig. Zellen, deren Erbgut bereits Veränderungen aufweisen (genetische Prädisposition) sind bei einer geringeren Zahl an Mutationen gefährdet, maligne zu entarten (Rassow et al. 2006). Solche somatischen Mutationen betreffen v. a. Gene, die für die Regulation des Zellwachstums und der Zellproliferation zuständig sind: Protoonkogene- und Tumorsuppressorgene. Protoonkogene sind Gene, die die Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zelle stimulieren. Onkogene sind Protoonkogene, deren Genprodukte (Onkoproteine) aufgrund somatischer Mutationen ständig eine erhöhte Aktivität zeigen oder übermäßig exprimiert werden, wodurch die Kontrolle normaler Wachstums- und Differenzierungsprozesse gestört ist und Karzinomzellen entstehen. Tumorsuppressorgene (Anti-Onkogene) sind Gene, die die Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zelle hemmen, deren Inaktivierung also die Entstehung von Karzinomzellen ebenfalls fördern kann. Der Verlust funktionaler Tumorsuppressorproteine und/oder die Überaktivität oder -expression zellulärer Onkoproteine sind nach gegenwärtigem Kenntnisstand stets eine Komponente in der mehrstufigen Kanzerogenese (Rassow et al. 2006).

Bestimmte Viren und auch Bakterien können unabhängig von somatischen Mutationen eine maligne Transformation humaner Zellen induzieren.

Es lassen sich heute ca. 20 % aller weltweit auftretenden Tumoren generell auf eine Infektion und davon 15 % auf Infektionen mit DNA-Viren zurückführen (zur Hausen 2001 und 2006).

Es existieren hinsichtlich der infektionsbedingten Kanzerogenese jedoch große, von geographischen Gesichtspunkten abhängige Unterschiede. In Ost-Asien und in Sub-Sahara-Afrika sind bis zu 40 % aller Karzinome infektionsbedingt, wohingegen in Europa und Nordamerika weniger als 10 % der Malignome mit Infektionen assoziiert sind (Munoz et al. 2004).

Viren produzieren Proteine, die die normalen Wachstums- und Vermehrungskontrollmechanismen der Zelle und deren Apoptose stören. Infektionen mit DNA- und RNA-Viren oder Bakterien können so zur Karzinomentstehung beisteuern. Für DNA-Tumor-Viren, die für virale Onkoproteine kodieren und bei Infektion Krebs auslösen können, ist dieser Zusammenhang bislang am besten verstanden. Humane Papillomviren (HPV), die mit dem Karzinom der Zervix uteri assoziiert sind, das Hepatitis B-Virus (HBV), das mit dem primären Leberzellkarzinom im Zusammenhang steht oder das Epstein-Barr-Virus (EBV), das mit mehreren menschlichen Tumoren assoziiert ist (u. a. Burkitt-Lymphom, Nasopharynxkarzinom), sind einige Beispiele (Hsieh et al. 1996, zur Hausen 2001, Rassow et al. 2006). Das humane T-lymphotrope Virus 1 (HTLV-1), ein Retrovirus, welches die adulte T-Zell-Leukämie verursacht, und das Hepatitis C-Virus (HCV), das auch mit dem primären Leberzellkarzinom verknüpft ist, sind Beispiele für humane, kanzerogene RNA-Viren (Rassow et al. 2006). Chlamydia trachomatis, das im Zusammenhang mit der Entwicklung von Karzinomen der Zervix uteri stehen soll (J. S. Smith et al. 2004), Helicobacter pylori und Helicobacter bilis, die mit gastrointestinalen Karzinomen (v. a. mit dem Corpus- und Antrumkarzinom) in Verbindung gebracht werden (Menaker et al. 2004), sind Exemplare für Bakterien mit onkogenem Potential.

5.2 Humane Papillomviren (HPV)

Hinweise auf die infektiöse Genese von Hautwarzen wurden erstmalig Ende des 19. Jahrhunderts entdeckt. Infektionsversuche mit virulentem Material aus Warzen sind zunächst von McFadyean und Hobday (1898) bei Tieren und später von Ciuffo (1907) beim Menschen beschrieben worden. Es gelang Shope in den 30er Jahren der Nachweis der Übertragbarkeit einer Papillomatose zwischen amerikanischen Wildkaninchen. Shope beobachtete ein generalisiertes Warzenwachstum mit gehäuftem Auftreten maligner epithelialer Tumoren in den induzierten Läsionen (Shope und Hurst 1933). Diese Erkenntnis leitete die Entdeckung des ersten DNA-Virus, des Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV), ein. Dieses Virus ist in der Lage bei Säugetieren Tumoren zu induzieren (zur Hausen 1995). Der erste Nachweis der

Papillomvirus-Partikel gelang im Jahre 1949 mittels der Elektronenmikroskopie (Strauss 1949). Das Genom des doppelsträngigen DNA-Moleküls wurde Anfang der 60er Jahre erstmals beschrieben (zur Hausen 1994). Erste Isolierungen und Typisierungen von HPV aus Läsionen der Schleimhaut des Genitaltraktes erfolgten in den 70er Jahren (zur Hausen 1977). Die humanen Papillomviren (HPV16 und HPV18) wurden 1995 von der WHO (World Health Organization) als auslösende Faktoren für die Entstehung des Karzinoms der Zervix uteri anerkannt (IARC Monographs Vol. 64, 1995).

Papillomviren sind ursprünglich sowohl aufgrund biologischer Merkmale, als auch aufgrund im Elektronenmikroskop sichtbarer oberflächlicher Eigenschaften zur Gruppe der Papovaviridae zugeordnet worden (Melnick et al. 1974). Diese Klassifikation ist nach neueren genetischen und molekularen Untersuchungen nicht mehr gültig. Papillomviren bilden seit 2001 vielmehr eine eigene Virusfamilie mit signifikanter Unterscheidbarkeit zu den Papovaviridae in DNA-Sequenz, in RNA-Synthese und in der Verarbeitung, dem sog. processing (H.U. Bernard et al. 1994). Nach phylogenetischen Analysen werden die Papillomviren auf der Grundlage ihrer DNA-Sequenz in fünf übergeordneten Gruppen von A bis E eingeteilt (IARC Monographs Vol. 90, 2007) Die humanpathogenen Papillomviren gehören zu den Gruppen A, B und E (Chan et al. 1995). Es hat sich in Abhängigkeit des Tropismus der Infektionen durch die verschiedenen Genotypen des Weiteren eine Einteilung in kutane und mukosale HPV-Typen bewährt.

5.2.1 Aufbau der Papillomviren

Humane Papillomviren haben alle die gleiche äußere Erscheinung: HPV bestehen aus einem zentralen DNA-Innenkörper (core) und aus einer Proteinkapsidhülle. Das Virus hat die Form eines Ikosaeders, der Durchmesser beträgt 55-60 nm (Lazarczyk et al. 2009). Das Kapsid besteht aus 72 Kapsomeren, die aus den zwei viralen Strukturproteinen L1 und L2 aufgebaut werden (Pfister und Fuchs 1987 und 1994, Zhou et al. 1994, Faridi et al. 2011). Die gereiften Viruspartikel besitzen keine membranöse Umhüllung (sog. envelope), was sie gegenüber Inaktivierung, Frost und Austrocknung resistent macht (Chang et al. 1991). Die doppelsträngige, zirkuläre DNA (dsDNA), die aus ca. 8.000 Basenpaaren (bp) besteht, befindet sich innerhalb dieses Kapsids. Die DNA-Sequenz enthält nur auf einem der Stränge hoch konservierte offene Leserahmen („open reading frames“, ORF), die in drei Bereiche unterteilt werden (Chen et al. 1982). Die frühe E-Region („early region“) besteht aus 6-8 offenen Leserahmen (E1-E8). Diese E-Gene kodieren für regulatorische Proteine, die für die

Virusreplikation, die virale Persistenz und die maligne Transformation der Wirtszelle verantwortlich sind. Die späte L-Region („late region“) enthält die Leserahmen L1 und L2, die für Strukturproteine des viralen Kapsids kodieren (Abbildung 3).

Ein nicht-kodierendes DNA-Segment von ca. 1.000 bp Länge befindet sich zwischen dem 3'-Ende der L-Region und dem 5'-Ende der E-Region. Dieses Segment wird als Upstream Regulatory Region (URR) oder Long Control Region (LCR) bezeichnet und enthält regulierende Elemente, die für die Replikation der viralen DNA und für die Kontrolle der Genexpression notwendig sind (Galloway und McDougall 1989, Faridi et al. 2011). Dieses Segment besitzt eine Reihe von Bindungsstellen sowohl für diverse zelluläre Transkriptionsfaktoren als auch für virale Proteine, z.B. für die viralen E2- und E1-Proteine, die durch ihre Bindung die Aktivität des Virusgenoms induzieren und/oder inhibieren. Die Proteine werden je nach Funktion als „enhancer“ oder „silencer“ bezeichnet (zur Hausen 1996). Die URR enthält den Ursprung der viralen Replikation (origin of replication, ori). Bei HPV-Typen mit hohem onkogenen Transformationsrisiko (s. u.) liegen in der URR glukokortikoid-sensitive Elemente vor. Diese steigern das immortalisierende Potenzial erheblich (Dell und Gaston 2001).

E1- und E2-Proteine werden zuerst exprimiert, interagieren mit der DNA der Wirtszelle und kontrollieren die Replikation und Transkription. E1 ist für die Initiation der Replikation verantwortlich und kodiert für eine ATP-abhängige Helikase (Del Vecchio et al. 1992, Chiang et al. 1992). E2 kodiert für ein Protein, dessen Domänen Transkriptionsaktivatoren, Bindungs- und Dimerisierungsdomänen beinhalten (Bouvard et al. 1994). E4 kodiert für ein Zinkfinger-Protein und wird in der späten Phase des viralen Zyklus exprimiert (zur Hausen 1996). E5 kodiert für ein Protein, das durch Bindung an zelluläre Transmembranproteine wachstumsstimulierende Signalkaskaden aktiviert (Crusius et al. 1997). Die E6- und E7-Proteine besitzen die Fähigkeit, Zellen zu transformieren und zu immortalisieren (zur Hausen 2000). Das karzinogene Potential resultiert aus einer Wechselwirkung dieser viralen Proteine mit verschiedenen zellulären Proteinen, die eine Rolle in der Zellwachstums-Kontrolle spielen (s. u.). L1 ist das Hauptstrukturprotein des Viruskapsids. Die L1-Leserahmen sind hochkonserviert in einer Vielzahl von HPV-Typen. Der L1-ORF beinhaltet die Zielsequenzen, die durch die General-Primer amplifiziert werden. L2-Proteine sind für die Bindung und Verpackung des Virusgenoms zuständig (Zhou et al. 1994, Zhao et al. 1998).

Es werden heute mehr als 200 HPV-Typen aufgrund von Sequenzunterschieden gegeneinander abgegrenzt (Burd 2003). Etwa 150 Typen können beim Menschen nachgewiesen werden. Direkte Nukleotidsequenzvergleiche der Leseraster im L1-ORF definieren einen neuen Papillomvirus-Typ, wenn die Sequenzen weniger als 90 % Homologie zu bekannten Typen aufweisen (Stoler 2000). Es handelt sich um einen Subtypen, wenn Homologien zwischen 90-98 % vorliegen. Das Virus wird als Variante eines bekannten Subtyps bezeichnet bei Homologien von über 98 % (Burk et al. 2009). Die Nummerierung der Genotypen erfolgt in der Reihenfolge ihrer Entdeckung (Eversole et al. 2000).

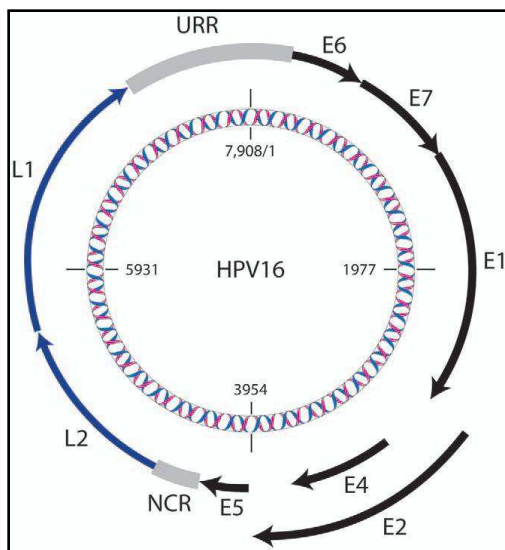


Abbildung 3: Genomorganisation der humanen Papillomviren am Beispiel von HPV16 (B. Smith et al. 2011).

5.2.2 Pathophysiologie der HPV-Infektion

Papillomviren sind weit verbreitet und kommen bei nahezu allen Wirbeltieren vor. Sie sind streng wirts- und gewebespezifisch und können sich beim Menschen nur in differenzierenden Keratinozyten vermehren (Howley und Schlegel 1988, Frattini et al. 1996). Der Infektionszyklus der Viren ist an den Differenzierungsstatus des epithelialen Gewebes geknüpft. Eine Infektion erfolgt, indem das Virus über Mikroläsionen des Stratum corneum in die Epidermis eindringt. Heparinsulfatproteoglykane und das L2-Epitop der Virushülle dienen vermutlich als Virusrezeptoren und ermöglichen so eine Virus-Wirtszellinteraktion (Giroglou et al. 2001, Kawana et al. 2001). Die undifferenzierten, teilungsfähigen Zellen des Stratum basale werden folgend infiziert (Dürst et al. 1985, Lazarczyk et al. 2009, Faridi et al. 2011). Die virale DNA liegt in den infizierten Basalzellen episomal vor (Syrjänen 2005). Die Genexpression der viralen Proteine ist in der Basalzellschicht relativ gering. Eine gesteigerte Replikation des Virusgenoms und eine erhöhte Expression der viralen Onkoproteine E6 und

E7 findet mit der Differenzierung der Epithelzellen im Stratum spinosum und Stratum granulosum statt (Dürst et al. 1992). Die Expression der Hüllproteine L1 und L2 und die Zusammenlagerung des Viruskapsids sind charakteristisch für die stark differenzierten Keratinozyten des Stratum granulosum und Stratum corneum (Jansen und Shaw 2004). Die reifen, infektiösen Viren werden anschließend aus den terminal differenzierten, abgestorbenen Keratinozyten des Stratum corneum freigesetzt und bleiben extern der Wirtszelle für lange Zeit stabil. Diese Tatsache begünstigt Infektionen neuer Zellen.

Die viralen Onkoproteine E6 und E7 interagieren mit den zellulären Tumorsuppressorproteinen p53 und pRb (Retinoblastoma-Genprodukt). P53 überwacht die Intaktheit der DNA. Das Protein wird in Zellen mit DNA-Schäden aktiviert. Cyclin D-abhängige Kinasen (CDK) -Inhibitoren (p21) werden folglich induziert und die Zelle wird am G1/S-Checkpoint im Zellzyklus arretiert, bis der Schaden durch Nukleasen behoben worden ist. P53 kann durch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität direkt Fehler in der DNA-Synthese eigenständig beheben. P53 kumuliert in der Zelle, wenn der Schaden irreperabel ist und leitet dadurch die Apoptose ein (Rassow et al. 2006). Das Onkoprotein E6 ist in der Lage, p53 zu degradieren oder durch Komplexierung zu inaktivieren, wodurch es zu einem intrazellulären Mangel an letzterem kommt. Die folglich bedingte Störung des p53-Schutzmechanismus führt als Konsequenz zu einer gesteigerten Mutationsrate in den infizierten Zellen (Munger et al. 2001, Malanchi et al. 2002). Die zelluläre Telomerase wird zusätzlich von E6 aktiviert, wodurch die Lebensdauer der infizierten Zelle verlängert wird.

Das Retinoblastoma-Genprodukt (pRb) spielt eine zentrale Rolle im Zellzyklus bei der Kontrolle des Eintritts der Zelle in die Synthese-Phase. PRb liegt im regelrechten Zellzyklus, in der G1-Phase, im unphosphorylierten Zustand vor und bindet den Transkriptionsfaktor E2F. PRb wird durch die CDKs phosphoryliert, sodass E2F aus der Bindung freigesetzt wird und die Synthese-Phase eingeleitet werden kann. Das Onkoprotein E7 ist in der Lage mittels zweier Mechanismen pRb zu degradieren, wodurch es zu einer gesteigerten Freisetzung von E2F kommt. Die pRb-Inaktivierung erfolgt zum einen über die direkte Bindung von E7 an pRb, zum anderen über die Bindung von E7 an die CDK-Inhibitoren (p21), welche die Produktion von inaktivem (phosphoryliertem) pRb steigern (Jones et al. 1997). Die Zelle kann hierdurch in den Zellzyklus eintreten und virale DNA synthetisieren (zur Hausen 2002). Beide von den Onkoproteinen E6 und E7 bewirkten Effekte führen zur Replikation der infizierten Zelle, was für den Lebenszyklus der über kein eigenes Replikationssystem

verfügbaren Viren lebensnotwendig ist. pRb übt eine negative Rückkopplung auf das zelluläre Protein p16^{INK4A} aus: Durch Herabregulierung von pRb wird p16^{INK4A} in den infizierten Zellen überexprimiert (Klaes et al. 2001, Klussmann et al. 2009). P16^{INK4A} ist ebenfalls ein Inhibitor der CDKs, verhindert die Phosphorylierung des pRb und wirkt im geregelten Ablauf des Zellzyklus antiproliferativ.

Die Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom wird als Schlüsselereignis für die durch HPV-induzierte Läsionen angesehen (zur Hausen 1991). Die Integrationsstellen der HPV-DNA im Wirtsgenom sind vorzugsweise in der Nähe von chromosomalen Bruchpunkten, fragilen Regionen, Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen lokalisiert (Kahn et al. 1994, IARC Monographs 1995). Die Integration des Virus in das Wirtsgenom bewirkt regelmäßig einen Bruch des viralen DNA-Ringes. Der E2-ORF wird dabei gespalten und die E6/E7-ORF bleiben erhalten (Choo et al. 1987). Das E2-Protein stellt einen wichtigen negativen Transkriptionsregulator für die HPV-Expression dar, ist also ein sog. *silencer*. Der Verlust seiner Aktivität bedingt eine intragenomische Dysregulation, welche zu einer gesteigerten Expression der E6/E7-Gene führt (Cripe et al. 1987, B. Bernard et al. 1989, Romanczuk und Howley 1992). Die ständige Expression der E6/E7-Gene gilt als Voraussetzung für den Erhalt des malignen Phänotyps HPV-bedingter Karzinome (Crook et al. 1989, Howley 1991, Nasseri et al. 1991, zur Hausen 2000).

5.2.3 Mit humanen Papillomviren assoziierte Läsionen

Die mukosalen HPV-Typen werden in zwei Gruppen unterteilt. Es werden anhand des onkogenen Transformationsrisikos die „low-risk“ (LR) -HPV-Typen und die „high-risk“ (HR) -HPV-Typen unterschieden (zur Hausen und de Villiers 1994, Gissmann 1992). HR-Typen sind überwiegend in Karzinombiopsaten nachgewiesen worden. Die LR-Typen induzieren fast ausschließlich benigne Läsionen (zur Hausen und de Villiers 1994, Stoler 2000). Die durch humane Papillomviren verursachten Krankheitsbilder weisen hyperplastische, papillomatöse oder verruköse Läsionen an kutanen, mukokutanen und mukösen Epithelien auf (Chang et al. 1991). Bestimmte HPV-Genotypen lassen sich mit spezifischen klinischen Entitäten assoziieren.

Die Condylomata acuminata ist eine HPV-assoziierte benigne Läsion. HPV6 und 11 sind hauptsächlich in den Läsionen identifiziert worden. Die Condylome treten meist in großer Zahl anogenital (Glans penis, Vestibulum vulvae, Zervix uteri) und seltener oral auf (Chuang 1987, Chang et al. 1991, Cardoso und Calonje 2011, Larke et al. 2011). Die fokale epitheliale Hyperplasie (M. Heck) zählt ebenso zu den benignen Läsionen wie die durch LR-Typen

induzierten Papillome im Bereich des Mundes, Rachens und der Konjunktiven. Das Krankheitsbild der rezidivierenden respiratorischen Papillomatose (RRP, früher „Larynxpapillomatose“) ist ein Beispiel für solche Papillome (Larson und Derkay 2010). Die Läsionen der seltenen, hereditären Hauterkrankung Epidermodysplasia verruciformis (EV) sind sowohl mit LR-Typen (HPV14, 20 und 21) als auch mit HR-Typen (5 und 8) assoziiert (Chang et al. 1991, Majewski et al. 1997). Es zeigen sich bei der EV klinisch Pityriasis versicolor-ähnliche makuläre Läsionen und flache Warzen (Vohra et al. 2010). In 30-50 % der Fälle entarten diese Warzen v. a. an sonnenexponierten Körperstellen in Nicht-Melanom-Hautkrebs (NMSC) (Majewski et al. 1997). Die Verrucae vulgaris, Verrucae plantares und Verrucae planares sind weitere Beispiele für HPV-infektiöse Hauterkrankungen. Sie sind hauptsächlich assoziiert mit den HPV-Subtypen 1, 2 und 4 (Cardoso und Calonje 2011).

Die HR-Typen können prämaligne und maligne Zelltransformationen bedingen. Sie gelten als bedeutsamer Risikofaktor für anogenitale Läsionen, wobei der Zusammenhang zwischen HPV-Infektionen und der zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN), sowie dem Plattenepithelkarzinom der Zervix uteri bisher am ausführlichsten beschrieben ist. Dieser Zusammenhang wurde erstmalig im Jahre 1976 von zur Hausen und Mitarbeitern postuliert (zur Hausen 1976). HPV-DNA kann in fast 100 % der Zervixkarzinome nachgewiesen werden. Die HR-Subtypen 16, 18, 31 und 45 sind in Karzinomen der Zervix uteri am häufigsten identifiziert worden (Peltecu et al. 2009). Die HPV-Infektion ist als wesentlicher Risikofaktor für die Neoplasien der Zervix uteri anerkannt worden (zur Hausen 1996, Bosch et al. 2002). Der HPV-Typ 16 lässt sich des Weiteren in bis zu 90 % der extragenitalen intraepidermalen Karzinome bei dem Morbus Bowen nachweisen, welche ebenfalls in invasiv wachsende Plattenepithelkarzinome transformieren können (Clavel et al. 1999). Infektionen mit Papillomviren sind auch in Läsionen der Tracheobronchialmukosa, des Ösophagus und der Urethra beschrieben worden (Chang et al. 1991, Campisi et al. 2007, Cardoso und Calonje 2011).

5.3 HPV-Prävalenz in Plattenepithelkarzinomen

22 (28,2 %) der 78 untersuchten Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches zeigen in der vorliegenden Untersuchung positive Signale für das Vorliegen von HPV-DNA. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, die aus eigenen Voruntersuchungen und der gegenwärtigen Literatur abgeleitet werden können (Hoffmann et al. 1998, Kreimer et al. 2005, Termine et al. 2008). HR-Typen sind dabei in allen 22 HPV-DNA-positiven

Karzinomen nachgewiesen worden, wobei die HPV-Genotypisierung mit einer Prävalenz von 90,9 % (20/22) den Genotypen 16 ergeben hat. Das Ergebnis entspricht ebenfalls den internationalen Literaturangaben, in denen der Hochrisiko-Genotyp HPV16 in über 90 % der Fälle als der regelmäßig für diese Infektionen verantwortliche Genotyp beschrieben wird (Smeets et al. 2007, Hoffmann et al. 2010, Jung et al. 2010, St Guily et al. 2011).

Kreimer et al. (2005) haben 60 verschiedene Untersuchungen, die sich mit HPV-Prävalenzen von Kopf-Hals-Karzinomen verschiedener anatomischer Lokalisationen beschäftigen, systematisch überprüft. Es sind insgesamt 5.046 Karzinome auf das Vorhandensein von HPV-DNA untersucht worden. Die HPV-Prävalenz aller anatomischer Lokalisationen in dieser Untersuchung beträgt 25,9 %. In der Untersuchung von Kreimer et al. (2005) ist die HPV-Prävalenzrate in Untersuchungen aus Nordamerika höher als in Untersuchungen aus Europa und Asien. Eine weitere Meta-Analyse hat 62 epidemiologische Publikationen untersucht (Termine et al. 2008) und beschreibt eine Gesamt-HPV-Prävalenz von 34,5 % in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Ribeiro et al. (2011) hingegen präsentieren Ergebnisse mit einer HPV-Prävalenz weit unter 10 % in Kopf-Hals-Karzinomen. In dieser Untersuchung zeigen sich lediglich sechs (3,1 %) von insgesamt 196 untersuchten Karzinomen als positiv für HPV-DNA. Es ist kritisch anzumerken, dass nur von einem kleinen Teil der Studienpopulation aus Lateinamerika DNA-Analysen an Frischgewebe oder Mundhöhlzellen durchgeführt worden sind, wohingegen der überwiegende Anteil der HPV-Prävalenzen anhand von Antikörper-Bestimmungen im Serum festgelegt worden sind. Die Ergebnisse dieser Publikation von Ribeiro et al. (2011) sind aufgrund der mangelnden Vergleichbarkeit mit anderen Studien mit großer Vorsicht zu interpretieren.

Diese Untersuchungen veranschaulichen, dass die Prävalenzen von HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen in den einzelnen Untersuchungen stark voneinander abweichen. Verschiedene Tumorlokalisationen und Gewebearten, unterschiedliche HPV-Detektionsmethoden, aber auch die Patientenkollektive aus verschiedenen geographischen Regionen stellen mögliche Ursachen für diese Prävalenzvariation dar (Smeets et al. 2007, Ribeiro et al. 2011).

44 Fälle der vorliegenden Untersuchung, deren Analyseergebnisse insgesamt als HPV-DNA-negativ interpretiert worden sind, zeigen in der MPG/Luminex-Analyse Signale einer niedrigen Viruslast für HPV16. Die Problematik der Interpretation solcher niedrigen

Viruslasten in Kopf-Hals-Karzinomen unter Verwendung dieser Nachweismethode ist bereits von Smeets et al. (2007) erfasst und diskutiert worden. Es sind diverse mögliche Erklärungen gefunden worden: Der Speichel der Patienten kann beispielsweise mit HPV besiedelt sein. Es kann sich um Gewebe mit einer ruhenden Infektion, welche den selbst HPV-DNA-negativen Tumor umgibt, handeln. Eine Kontamination der Gewebeproben während der Gewebeaufbereitung, der DNA-Gewinnung oder während der PCR könnte eine weitere mögliche Erklärung sein. Die Kontamination während der PCR ist dabei am unwahrscheinlichsten, da sich alle durchgeführten Negativkontrollen als HPV-DNA-negativ erwiesen haben. Diese 44 Fälle mit niedriger Viruslast sind insgesamt als HPV-D- gewertet worden. Diese Einstufung lässt sich durch den LCD-Array, die zweite durchgeführte HPV-DNA-Nachweismethode, bestätigen. Die hohe Übereinstimmung der Ergebnisse beider Nachweismethoden stützt die Validität der Ergebnisinterpretation und die korrekte Bestimmung der HPV-DNA-positiven (HPVD+) und -negativen Fälle (HPVD-) in der vorliegenden Untersuchung.

5.3.1 HPV-Prävalenz in oropharyngealen Karzinomen

In der vorliegenden Arbeit zeigen sich zwölf (60%) von 20 untersuchten Tonsillenkarcinomen als positiv für HPV-DNA (HPVD+). Dieses Resultat steht im Einklang mit Ergebnissen eigener und anderer internationaler Untersuchungen. St Guily et al. (2011) beschreiben exemplarisch eine HPV-Prävalenz von 57 % in histologisch gesicherten Tonsillenkarcinomen (n= 185). D'Souza und Dempsey (2011) berichten über einen einheitlichen weltweiten Anstieg der Inzidenz HPV-bedingter Oropharynxkarzinome in den vergangenen Jahrzehnten (Robinson und Macfarlane 2003, Conway et al. 2006, Hammarstedt et al. 2007, Chaturvedi et al. 2008, Braakhuis et al. 2009).

Die Karzinome der Tonsillen zeigen erwartungsgemäß im Vergleich zu den anderen Lokalisationen einen besonders hohen Anteil an HPV-positiven Karzinomen. Es ist bisher unklar, warum Tonsillen für eine HPV-Infektion permissiver sind als andere Schleimhautlokalisationen im Kopf-Hals-Bereich. Es ist aber zu vermuten, dass das Kryptenepithel hier eine besondere Rolle spielt (Begum et al. 2005, Kim et al. 2007, Klusmann et al. 2009): Das lymphatische Gewebe der Tonsille ist an der Oberfläche durch ein mehrschichtiges Plattenepithel begrenzt, wie es auch in der sonstigen Oropharynx- und Mundschleimhaut zu finden ist. Die Kripten sind dagegen von einem ein- bis zweischichtigen Epithel ausgekleidet, das der Basalzellschicht entspricht und Zeichen geringer

Differenzierung aufweist. Der HPV-Replikationszyklus ist streng von der Zelldifferenzierung abhängig und humane Papillomviren können primär nur die Basalzellschicht infizieren. Die Krypten scheinen einer Infektion leicht zugänglich und fungieren vermutlich auch als Virusreservoir (Stubenrauch und Laimins 1999, Klusmann et al. 2003 und 2004).

5.3.2 HPV-Prävalenz in nicht-oropharyngealen Karzinomen

Es sind insgesamt 58 Karzinome nicht-oropharyngealen Ursprungs auf das Vorhandensein von HPV-DNA untersucht worden. In zehn dieser Gewebeproben ist das Vorhandensein von HPV-DNA gezeigt worden. Das Ergebnis liegt mit 17,2 % leicht unterhalb der beschriebenen internationalen Prävalenzen von 20-25 % HPV-positiven Fällen in solchen Entitäten und auch unterhalb der bisherig gemessenen Prävalenzen eigener Voruntersuchungen (Kreimer et al. 2005, Hoffmann et al. 2005). Die zunehmende Genauigkeit der neuen HPV-Detektionsmethoden ist eine mögliche Ursache für die geringe Abweichung der Prävalenzrate.

Es ist dabei in vier (18,1 %) von 22 untersuchten Larynxkarzinomen, in vier (16,6 %) von 24 untersuchten Hypopharynxkarzinomen und in zwei (16,6 %) von insgesamt zwölf untersuchten Gewebeproben des Zungenrandes und des weichen Gaumens HPV-DNA nachgewiesen worden. Es soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass in dieser Arbeit für die statistischen Auswertungen die anatomischen Lokalisationen des weichen Gaumens und des Zungenrandes unter der Lokalisation „Mundhöhle“ zusammengefasst betrachtet worden sind, obwohl der weiche Gaumen per Definition zur anatomischen Lokalisation des Oropharynx zählt. Die Karzinome des weichen Gaumens sind in ihrem biologischen Verhalten und der Assoziation zu HPV-Infektionen aber eher mit Karzinomen der Mundhöhle zu vergleichen, als mit Karzinomen des lymphoepithelialen Gewebes der Tonsillen. In zwei der acht (25 %) Zungenrandkarzinome und in keinem der vier Karzinome des weichen Gaumens hat sich ein positiver HPV-DNA-Status gezeigt. Die HPV-Prävalenzen in den nicht-oropharyngealen Karzinomen variieren erheblich: Kreimer et al. (2005) beschreiben eine Prävalenz von 24 % in Larynxkarzinomen und 23,5 % in Mundhöhlenkarzinomen, demgegenüber referieren Ribeiro et al. (2011) über eine HPV-Prävalenz von 3,8 % in Karzinomen des Larynx und Hypopharynx und von 0 % in Mundhöhlenkarzinomen. Eine weitere Untersuchung beschreibt ein HPV-DNA-Vorkommen von 16 % in frühen Larynxkarzinomen (Baumann et al. 2009), während Fakhry et al. (2008) in keinem der untersuchten Larynxkarzinomen HPV-DNA detektieren konnte. Die vorliegenden Ergebnisse

zeigen erneut, dass der Sachverhalt um die tatsächliche Prävalenz von HPV in Kopf-Hals-Karzinomen noch nicht hinreichend geklärt ist. Weitere ausführliche epidemiologische Untersuchungen hierzu scheinen auch deshalb von großer Bedeutung zu sein, da sich die Anzeichen dafür mehren, dass die Prävalenzen auch geographischen Einflüssen unterliegen.

5.4 mRNA-Expression der Onkogene E6 und E7

Die biologische Aktivität viraler Infektionen kann bei einem Nachweis viraler mRNA in den infizierten Zellen angenommen werden (Braakhuis et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit sind insgesamt 54 Gewebeproben auf das Vorhandensein viraler mRNA untersucht worden. In den übrigen 24 Fällen war die Qualität der extrahierten DNA für eine solche Untersuchung nicht ausreichend. 17 (31,4 %) der 54 Proben haben in dieser Untersuchung positive Signale für das Vorhandensein exprimierter E6*I mRNA, eine Gensequenz, die sowohl für E6- als auch für E7-mRNA kodiert, gezeigt. Es ist dabei in elf (64,7 %) von 17 untersuchten Tonsillenkarzinomen, in vier (33,3 %) von zwölf untersuchten Larynxkarzinomen, in zwei (25 %) von acht untersuchten Gewebeproben des Zungenrandes und des weichen Gaumens und in keinem Fall (0 %) der insgesamt 17 untersuchten Hypopharynxkarzinomen E6/E7-mRNA nachgewiesen worden.

14 der 17 E6/E7-mRNA-positiven Fälle können HPV-DNA-positiven Karzinomen zugeordnet werden, sodass insgesamt 63,6 % der 22 HPV-DNA-positiven Karzinome auch mRNA für E6/E7 aufweisen. Es kann aus diesen Daten abgeleitet werden, dass die auf DNA-Basis nachgewiesenen HPV-Infektionen nicht zwingend transkriptional aktiv und damit karzinogen sein müssen. Es werden ähnliche Ergebnisse in der bereits erwähnten Untersuchung von Smeets et al. (2007) beschrieben, in der von 48 untersuchten Kopf-Hals-Karzinomen nur 50 % der 24 HPV-DNA-positiven Karzinome Signale für E6*I mRNA aufweisen. Braakhuis et al. (2004) haben in einer vergleichbaren Untersuchung an 143 Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches 24 HPV-DNA-positive Karzinome beschrieben von denen ebenfalls nur die Hälfte mit zeitgleichem E6/E7-mRNA-Nachweis waren.

Es hat dagegen in drei (Oropharynx: n= 1, Larynx: n= 2) der 17 identifizierten mRNA-positiven Proben keine HPV-Infektion auf DNA-Ebene mit den beiden hier angewandten DNA-Nachweisverfahren nachgewiesen werden können. Eine mögliche RNA-Kontamination dieser Proben ist hingegen bei erfolgtem Nachweis von negativen Negativkontrollen eher

unwahrscheinlich. Es ist eher zu vermuten, dass in diesen drei Fällen der gewählte Cutoff-Wert des MPG/Luminex-DNA-Nachweisverfahrens zu einem falsch-negativen DNA-Ergebnis geführt hat. Alle drei Proben zeigen eine geringe Viruslast in der Untersuchung, sind aber aufgrund oben beschriebener Problematik mit geringer Viruslast als HPV-negativ eingestuft worden.

5.5 Bedeutung des Expressionsmusters der p16^{INK4A}-Immunhistochemie

Das zelluläre Protein p16^{INK4A} fungiert, wie eingangs ausführlich dargestellt, als Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und hemmt somit die pRb-Phosphorylierung. p16^{INK4A} trägt dadurch wesentlich zur Regulation der pRb-Aktivität bei (Serrano et al. 1993, Lukas et al. 1995). Das Bestehen einer inversen Korrelation zwischen pRb- und p16^{INK4A}-Expression wurde in diversen Untersuchungen beschrieben (Shapiro et al. 1995, Kinoshita et al. 1996). Das Onkoprotein E7 degradiert pRb. P16^{INK4A} wird in den infizierten Zellen durch den Wegfall des negativen Feedbacks überexprimiert (Klaes et al. 2001).

P16^{INK4A} ist als immunhistologischer Marker für dysplastische und maligne HPV-assoziierte Läsionen der Zervix uteri geeignet (Sano et al. 1998, Klaes et al. 2001). Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass p16^{INK4A} auch bei HPV-induzierten Oropharynxkarzinomen, v. a. bei Tonsillenkarzinomen, einen zuverlässigen immunologischen Marker darstellt (Klussmann et al. 2003, Cunningham et al. 2006, Reimers et al. 2007, Hoffmann et al. 2010). P16^{INK4A} wird vermehrt als ein Surrogatmarker für das Vorkommen von HPV-DNA und für das Vorliegen viraler Aktivität, im Sinne einer RNA-Transkription, in Kopf-Hals-Karzinomen diskutiert. Smeets et al. (2007) veröffentlichten einen Algorithmus, welcher initial die p16^{INK4A}-Immunhistochemie mit nachfolgendem HPV-DNA-Nachweis bei positiver p16^{INK4A}-Färbung beinhaltet.

Es ist in der vorliegenden Untersuchung an 78 Kopf-Hals-Karzinomen die p16^{INK4A}-Expression untersucht worden. 45 Proben zeigen eine p16^{INK4A}-Expression, 17 eine starke, zwölf eine moderate und 16 eine schwache. Bei der Betrachtung der p16^{INK4A}-Expression der 22 HPV-DNA-positiven Karzinome zeigt sich in 14 Fällen eine starke, jeweils in zwei Fällen eine moderate und schwache und in vier Fällen eine negative Färbung. Die Immunhistochemie, zum Nachweis einer p16^{INK4A}-Expression zeigt zusammenfassend in 16 (72,7 %) der 22 HPV-DNA-positiven Fälle eine Überexpression. Da bislang keine verfügbaren Daten existieren, die besagen, dass nur starke p16^{INK4A}-Färbungen (diffus positiv:

>25 %) transkriptional aktive HPV-Infektionen identifizieren, sind moderate Färbemuster (fokal positiv: 5-25 %) in der vorliegenden Untersuchung auch als p16^{INK4A}-positiv betrachtet worden.

Es ist interessanterweise festzustellen, dass eine Untergruppe der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches mit biologisch aktiven HPV-Infektionen (HPVD+/HPVR+) bei der Durchführung des benannten Algorithmus (Smeets et al. 2007) als falsch negativ identifiziert worden wäre. Drei (21,4 %) von insgesamt 14 HPVD+/HPVR+ Fällen zeigen keine p16^{INK4A}-Überexpression und wären entsprechend dem von Smeets et al. (2007) empfohlenen Algorithmus als HPV-DNA-negativ bzw. inaktiv eingestuft worden. Ein weiteres Beispiel für falsche Klassifizierung zeigen zwei von vier identifizierten HPV-DNA-positiven Hypopharynxkarzinomen. Diese zwei Proben weisen jeweils eine moderate und eine starke p16^{INK4A}-Färbung auf. Die mRNA-Analyse zeigt in beiden Karzinomen ein negatives Ergebnis, womit diese Karzinome – auch dem Algorithmus ohne mRNA- Analyse folgend – als Fälle mit biologischer Aktivität gewertet worden wären. Solche Patienten wären möglicherweise bei alleiniger Beurteilung des HPV-DNA-Status und des p16^{INK4A}-Expressionsmusters in klinischen Therapiestudien in den falschen Therapiearm randomisiert worden, was im ersten Fall unnötige Morbidität durch die Behandlung bedeutet hätte. Die fälschlicherweise als HPV-positiv gewerteten Patienten mit vermeintlicher Aktivität der Infektion wären möglicherweise durch eine Intensitätsminderung der Strahlentherapie ungenügend behandelt worden.

Die Feststellung vorhandener p16^{INK4A}-Überexpression bei einem negativem HPV-DNA-Status (HPVD-) in 13 Fällen ist eine weitere nennenswerte Auffälligkeit. Das Vorhandensein nicht-HPV-assoziiertes p16^{INK4A}-Überexpressionen in Gewebeproben der Kopf-Hals-Karzinome ist bereits mehrfach beschrieben worden: Klusmann et al. (2003) haben 34 Oropharynxkarzinome auf den p16^{INK4A}- und HPV-DNA-Status untersucht. p16^{INK4A}-Überexpressionen haben sich in gleichen Verhältnissen in HPV-DNA-positiven und -negativen Fällen gezeigt. Klingenberg et al. (2010) untersuchten 262 tumorfreie Tonsillen. Die Patienten sind aus nicht-onkologischen Gründen, wie rezidivierender Infekte oder Schnarchen, tonsillektomiert worden. P16^{INK4A}-Überexpressionen sind in 28 % der Fälle detektiert worden. Diese Untersuchungen implizieren, dass andere Mechanismen, als nur HPV-Infektionen, für eine p16^{INK4A}-Überexpression existieren müssen. Es ist ebenfalls bekannt, dass die alleinige p16^{INK4A}-Immunhistochemie bei Positivität eine Gruppe von

Patienten markiert, die tatsächlich alleine auf dem Boden dieser Tatsache bessere Überlebensdaten zeigen. Es ist demnach nicht verkehrt, unabhängig von HPV, d. h. basierend auf p16^{INK4A}-Ergebnissen über Therapiestrategieänderungen nachzudenken. P16^{INK4A} aber automatisch in Verbindung mit HPV zu bringen ist falsch.

McLaughlin-Drubin et al. (2011) haben kürzlich entdeckt, dass die durch das Onkoprotein E7 vermittelte p16^{INK4A}-Expression unabhängig von der pRb-Inaktivierung sein kann. Die p16^{INK4A}-Expression kann stattdessen auch durch eine Histon-Demethylase (KDM6B) herbeigeführt werden und hat keine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (E2F) zur Folge. Die Funktion von p16^{INK4A} als Surrogatmarker für die Identifikation aller biologisch aktiven HPV-Infektionen ist auch daher kritisch zu hinterfragen. Die molekularen Mechanismen und die Bedeutung der p16^{INK4A}-Überexpression in HPV-bedingter Kanzerogenese sind noch nicht abschließend geklärt. Eine gesteigerte p16^{INK4A}-Expression lässt demnach nicht immer und ausschließlich auf aktive HPV-Infektionen rückschliessen. Die beschriebenen Umstände könnten auch die drei in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen transkriptional aktiven, dennoch p16^{INK4A}-negative Fälle erklären.

5.6 Korrelation der HPV-DNA-, mRNA- und p16^{INK4A}-Ergebnisse der oropharyngealen Karzinome

Die Trias, bestehend aus HPV-DNA-, viraler mRNA-Detektion und p16^{INK4A}-Immunhistochemie, zeigt bei den Tonsillenkarcinomen überzeugende Ergebnisse, die p16^{INK4A} als Surrogatmarker weitestgehend bestätigen. Dies zeigt sich insbesondere darin, dass kein HPV-DNA-negatives Tonsillenkarcinom eine p16^{INK4A}-Überexpression aufgewiesen hat. Eine Infektion von zwölf detektierten biologisch aktiven HPV-Infektionen wäre aber auch in dieser Entität bei initialer Durchführung einer p16^{INK4A}-Immunhistochemie nicht detektiert worden (eine von zehn Fällen bei den HPV-DNA-positiven Fällen mit verfügbarer RNA), wenn dem empfohlenen Algorithmus von Smeets und Mitarbeitern (2007) Folge geleistet worden wäre.

Eigene Voruntersuchungen (Hoffmann et al. 2010) haben an 39 Tonsillenkarcinomen 21 HPV-DNA-positive Karzinome detektiert, von denen in elf (28,2 %) Proben E6*I mRNA nachgewiesen werden konnte. Diese elf Proben sind als aktive HPV-Infektionen (HPVD+/HPVR+) gewertet worden. In zehn von zwölf HPV-DNA-positiven Tonsillenkarcinomen der vorliegenden Untersuchung war die Qualität der extrahierten DNA

für eine RNA-Analyse ausreichend. Alle zehn Proben zeigten Signale für exprimierte E6/E7-mRNA (10/20). Es lässt sich demnach in Tonsillenkarcinomen des Kieler Patientenkollektives eine steigende Tendenz in der Prävalenz biologisch aktiver HPV-Infektionen (HPVD+/HPVR+) beobachten, hier exemplarisch von 28,2 % auf 50 %.

5.7 Korrelation der HPV-DNA-, mRNA- und p16^{INK4A}-Ergebnisse der nicht-oropharyngealen Karzinome

In der Untersuchung von Jung und Mitarbeiter (2010) ist HPV-DNA in 20 % der Fälle in Karzinomen des Hypopharynx und der Mundhöhle nachgewiesen worden. Keiner dieser HPV-DNA-positiven Fälle exprimierte jedoch virale mRNA, wohingegen die Hälfte der untersuchten HPV-DNA-positiven Oropharynxkarzinome Signale für virale mRNA zeigte. Diese Untersuchung bestärkt die überwiegend vorherrschende Ansicht, dass nicht-oropharyngeale HPV-DNA-positive Karzinome regelmäßig keine biologisch aktiven HPV-Infektionen enthalten. Der Nachweis von fünf aktiven Infektionen [8,6 % (Larynx, n= 2; Zungenrand, n= 2; Hypopharynx, n= 1)] in insgesamt 58 untersuchten nicht-oropharyngealen Karzinomen in dieser Untersuchung zeigt jedoch klar, dass diese Meinung zumindest nicht für alle geographischen Regionen zutreffend zu sein scheint. Fünf (50 %) der insgesamt zehn nicht-oropharyngealen HPV-DNA-positiven Karzinome (Larynx, n= 4; Zungenrand, n= 2; Hypopharynx, n= 4) zeigen somit biologisch aktive HPV-Infektionen. Dieses Ergebnis ist als eines der zentralen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zu werten, da sich erkennen lässt, dass sich die HPV-bedingte Kanzerogenese mitnichten nur auf Karzinome des Oropharynx, insbesondere auf die Tonsillen, begrenzt.

Aktive HPV-Infektionen in Karzinomen der Mundhöhle sind bislang nur in einer Untersuchung vorher beschrieben worden. Smeets et al. (2007) haben 30 Gewebeproben der Mundhöhle auf das p16^{INK4A}-Expressionsmuster, das HPV-DNA- und- mRNA-Vorkommen untersucht. 53 % (16/30) haben einen positiven HPV-DNA-Status gezeigt, wovon in 20 % (6/30) biologisch aktive Infektionen detektiert worden sind. In der vorliegenden Untersuchung zeigen sich mit 16,6 % (2/12) aktiver HPV-Infektionen in Mundhöhlenkarzinomen ähnliche Ergebnisse. Dies unterstützt die These, dass der anatomischen Region des Oropharynx zugeordnete Karzinome des weichen Gaumens sich hinsichtlich der HPV-Prävalenzen und HPV-Biologie eher wie Mundhöhlenkarzinome verhalten, weshalb sie in der Statistik dieser Arbeit auch in einer gemeinsamen Gruppe analysiert worden sind. Die HPV-bedingte Kanzerogenese bei Plattenepithelkarzinomen des

Hypopharynx ist vernachlässigbar gering. Drei der vier HPV-DNA-positiven Fälle exprimieren keine E6*I mRNA und sind als inaktive HPV-Infektionen gewertet worden. Für die vierte HPV-DNA-positive Probe war keine RNA verfügbar. Der p16^{INK4A}-Expressionsstatus ist in diesem Fall zur Entscheidung zwischen aktiver bzw. inaktiver Infektion herangezogen worden. Es zeigte sich ein starkes p16^{INK4A}-Färbemuster und der Fall wurde demnach als aktive HPV-Infektionen eingestuft.

5.8 Prognostische Bedeutung bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen

Die Prognose von Kopf-Hals-Karzinomen wird bislang im klinischen Alltag mittels des Tumorstadiums (TNM-Systems der UICC) und nach der Lokalisation des Primärtumors abgeschätzt. Solche Karzinome verhalten sich selbst bei identischer Primärtumorlokalisation und gleichem Stadium sehr heterogen, wodurch die Einschätzung der Prognose erschwert ist. Patienten mit biologisch aktiven HPV-Infektionen weisen erfahrungsgemäß bei Erstdiagnose im Vergleich zu HPV-negativen Patienten ein fortgeschritteneres Tumorstadium auf (Smeets et al. 2007, Hoffmann et al. 2010), oft mit einer kleinen T- und einer zugleich bestehenden hohen N-Kategorie. HPV-DNA-positive Kopf-Hals-Karzinome, v. a. die Tonsillenkarzinome, metastasieren früh in lokoregionäre Lymphknoten, wobei Patienten mit HPV-positiven Karzinomen dennoch häufig ein besseres Gesamt- und ein längeres rezidivfreies Überleben aufweisen, was auf ein besonders gutes Ansprechen der HPV-positiven Karzinome auf die Therapie, insbesondere die Strahlen- und Chemotherapie zurückgeführt wird (Andl et al. 1998, Gillison et al. 2000, Mellin et al. 2000, Lindel et al. 2001, Fakhry et al. 2008). Die Interaktionen zwischen den Onkoproteinen E6/E7 und den zellulären Tumorsuppressorproteinen (pRb/p53) können möglicherweise diese erhöhte Strahlen- und Chemosensibilität HPV-positiver Karzinome erklären, da die Tumorsuppressorproteine verminderte Fähigkeiten aufweisen, den Zellzyklus zur Reparatur von DNA-Schäden zu arretieren (Andl et al. 1998, Hoffmann et al. 2005).

Tribius und Mitarbeiter (2011) haben acht klinische Studien, welche sich mit den Therapien und Prognosen von Oropharynxkarzinomen auseinandersetzen, vergleichend ausgewertet. Sieben der acht Studien bestätigen ein signifikant besseres Gesamtüberleben für HPV-DNA-positive, v. a. aber für biologisch-aktive Karzinome.

Ang et al. (2010) untersuchten in der RTOG 0129-Studie 323 Oropharynxkarzinome auf das Vorhandensein von HPV-DNA, wovon 206 Karzinome einen positiven HPV-Status aufzeigten. Die Patienten sind mit Cisplatin und einer Standard- oder forcierten

Strahlentherapie behandelt worden. Die Ergebnisse der Untersuchung demonstrieren die Vorteile der HPV-positiven-Karzinompatienten im Vergleich zu den HPV-negativen Tumorpatienten hinsichtlich der 3-Jahres-Überlebensrate (82,4 % vs. 57,1 %) und dem progressionsfreien Überleben nach drei Jahren (73,7 % vs. 43,4 %). Die Untersuchung zeigt des Weiteren, dass Nikotinkonsum prognostisch ungünstig in beiden Gruppen ist und das Rezidiv- und Mortalitätsrisiko um je ein Prozent mit jedem weiteren pack-year ansteigt. Rischin et al. (2010) haben an 172 Patienten mit Oropharynxkarzinomen den HPV-DNA-Status und das p16^{INK4A}-Färbemuster im Rahmen der TROG 02.02-Studie analysiert. Die Patienten sind mit einer Radiochemotherapie behandelt worden. 102 Karzinomproben haben positive Signale für p16^{INK4A} gezeigt. 86 % der p16^{INK4A}-positiven Proben haben positive HPV-DNA-Nachweise aufzeigen können. Das Gesamtüberleben und die 2-Jahres-Rezidivfreiheit sind auch hier signifikant verlängert bei den HPV-DNA-positiven Karzinompatienten.

Zwei Studien (TROG 02.02, Tax 324) empfehlen, bei bekanntem schlechten Ansprechen auf die derzeitige Therapie, eine Intensivierung der Therapie bei Karzinompatienten mit negativen HPV-Status. Sie soll das Gesamt- und progressfreie Überleben im Vergleich zur Standardtherapie verbessern (Rischin et al. 2010, Posner et al. 2011). In der Gruppe der HPV-positiven Karzinompatienten diskutiert man hingegen, bei bekanntem guten Ansprechen auf die Standardtherapie, über eine Reduktion der Therapiemaßnahmen um mögliche Spätschäden durch die Therapie zu minimieren (Tribius et al. 2011). Die exakte Identifikation des HPV-Infektionsstatus in Kopf-Hals-Karzinomen erweist sich entsprechend den aufgeführten Untersuchungen aus therapeutischer Sicht als entscheidend wichtig.

Drei Kopf-Hals-Karzinome dieser vorliegenden Untersuchung zeigen ein negatives p16^{INK4A}-Expressionsmuster, bei gleichzeitig positivem DNA- und RNA-Status. Diese Patienten wären fälschlicherweise bei Durchführung des Algorithmus von Smeets et al. (2007) dem intensitätsgesteigerten Therapiearm zugeordnet worden. Zwei untersuchte Hypopharynxkarzinome wären umgekehrt bei starker p16^{INK4A}-Färbung und negativem RNA-Status dem Algorithmus folgend als HPV-positive bzw. aktive Infektionen gewertet worden. Diese Patienten hätten dadurch inkorrektweise eine intensitätsgeminderte Therapie erhalten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der mRNA-Status entsprechend einen besseren Marker für die Vorteile im Gesamtüberleben von HPV-positiven

Karzinompatienten darstellt als p16^{INK4A} oder der HPV-DNA-Status jeweils allein oder sogar in Kombination.

Kritisch anzumerken ist, dass keine der acht von Tribius et al. (2011) untersuchten Studien eine mRNA-Analyse der infizierten Tumorproben durchgeführt hat. Nur eine Studie verwendete lediglich die Kombination von HPV-DNA-Status und p16^{INK4A}-Expression zum Nachweis von HPV-Infektionen. Eine Studie verwendete ausschließlich die p16^{INK4A}-Expression, die anderen sechs Studien nur den HPV-DNA-Nachweis. Die Ergebnisse hinsichtlich des besseren Gesamtüberlebens HPV-positiver-Karzinompatienten sind bei schlechter methodischer Vergleichbarkeit mit Vorsicht zu interpretieren.

5.9 HPV-Impfung

Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass über 90 % der Zervixkarzinome von den HR-Typen 16, 18 und einigen anderen verursacht werden (Bosch und de Sanjosé 2003, Gillison et al. 2008). HPV-Infektionen mit den LR-Typen 6 und 11 sind zu 90 % für die Entstehung von anogenitalen Kondylomen verantwortlich (von Krogh 2001). Ein tetravalenter Impfstoff zur Prophylaxe von Infektionen mit HPV 6, 11, 16 und 18 (Gardasil®) und ein bivalenter Impfstoff gegen die HPV-Typen 16 und 18 (Cervarix®) sind in Deutschland seit 2007 zugelassen. Diese Impfstoffe enthalten gereinigte, rekombinant hergestellte L1-Proteine aus dem Kapsid der HPV-Subtypen, die sich spontan zu virusähnlichen Partikeln (VLPs = virus like particles) zusammenlagern (Faridi et al. 2011). Die Ständige Impfkommission des Robert-Koch-Institutes (STIKO) hat eine Empfehlung zur generellen HPV-Impfung aller Mädchen zwischen zwölf bis 17 Jahren vor dem ersten Geschlechtsakt im März 2007 veröffentlicht (STIKO 2007). Aktuelle Studien beschreiben eine 90-98 %-ige Wirksamkeit der Impfungen. Diese exzellenten Effektivitätsraten und die gute Verträglichkeit der Vakzine lassen vermuten, dass die Inzidenzen des Karzinoms der Zervix uteri in den folgenden Jahrzehnten in den geimpften Bevölkerungsgruppen fallen werden (Gillison et al. 2008, Faridi et al. 2011, Lehtinen et al. 2012).

HPV-bedingte Kopf-Hals-Karzinome erfahren in den letzten Jahren eine stark wachsende Bedeutung in der Ätiologie dieser Karzinome. Männer, die fünf- bis siebenmal häufiger von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich betroffen sind, werden jedoch in der Impfeempfehlung zur Prophylaxe HPV-bedingter Erkrankungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) des Robert-Koch-Institutes nicht berücksichtigt (Hoffmann 2012, in Bearbeitung).

Der kausale Zusammenhang zwischen Infektionen mit humanen Papillomviren (HPV6 und 11) und der rezidivierenden respiratorischen Papillomatose (RRP) gilt als gesichert. Die Vakzine sind jedoch derzeit zur Prophylaxe der RRP in Deutschland nicht zugelassen. Es fehlen aber gerade bei besonders schweren Verläufen der RRP erfolgsversprechende Therapiekonzepte (Mahnke et al. 1998). Heilversuche mittels Vakzinierung im Off-Label-Use mit dem tetravalenten Impfstoff Gardasil® erzielten jedoch eine therapeutische Wirkung, die in einigen Fällen darüber hinaus zu einer vollständigen Remission der RRP führte (Pawlita und Gissmann 2009).

Es darf künftig auch mit Änderungen der Inzidenz, insbesondere oropharyngealer aber auch nicht-oropharyngealer HPV-bedingter Karzinome bei Patientinnen die entsprechend geimpft worden sind, gerechnet werden (Albers et al. 2010). Es ist vor dem Hintergrund des durchschnittlichen Inzidenzpeaks der Kopf-Hals-Karzinome im Alter von 45-55 Jahren mit einem solchen Inzidenzrückgang erst in 20-25 Jahren zu rechnen. Die Tatsache, dass das Geschlechterverhältnis von Männern und Frauen 5-7 : 1 beträgt, verschiebt die zu erwartende Inzidenzminderung wahrscheinlich noch weiter in die Zukunft.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Humane Papillomviren (HPV) sind mittlerweile im Zusammenhang mit der Karzinogenese unterschiedlicher Tumorentitäten fest etabliert. Die Korrelation zwischen Infektionen mit Papillomviren und Schleimhautneoplasien des Genitaltraktes ist bislang am ausführlichsten untersucht und beschrieben worden. HPV verursachen im Kopf-Hals-Bereich benigne Veränderungen, wie die rezidivierende respiratorische Papillomatose und diverse Malignome. Die Prävalenz der Viren in Oropharynxkarzinomen ist mit einer HPV-DNA-Nachweisrate von etwa 60 % im Vergleich zu den anderen anatomischen Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereiches (20-25 %) deutlich erhöht. Epidemiologische- und Überlebensanalysen zeigen, dass infizierte Karzinompatienten mit einem aggressiveren Erscheinungsbild der Erkrankung bei Diagnosestellung, was sich u. a. in einer frühzeitigen und ausgedehnteren Lymphknotenmetastasierung widerspiegelt, dennoch ein vergleichsweise besseres Gesamtüberleben aufweisen als nicht infizierte Karzinompatienten.

Die viralen Onkoproteine E6 und E7 inaktivieren und/oder degradieren in infizierten Karzinomen die zellulären Tumorsuppressorproteine p53 und das Retinoblastoma-Genprodukt (pRb). Diese Tumorsuppressorproteine fungieren als zwei der Hauptregulatoren des humanen Zellzyklus. Es kommt in der Folge zu einer Akkumulation von DNA-Schäden, welche eine Transformation der Wirtszelle bedingen. Das zelluläre Protein p16^{INK4A} ist ein weiteres als Tumorsuppressor fungierendes Protein, das in einem negativen Feedbackmechanismus zum pRb steht, so dass bei Bindung des pRb's durch das virale Onkogen E7 eine p16^{INK4A}-Überexpression erwartet wird.

In der vorliegenden Arbeit werden (i) Zusammenhänge zwischen viraler DNA, mRNA und p16^{INK4A} in oropharyngealen und v. a. in nicht-oropharyngealen Karzinomen untersucht und (ii) mittels dieser Erkenntnisse die Frage beantwortet, ob sich p16^{INK4A} als ein zuverlässiger Surrogatmarker für die Identifizierung von biologisch aktiven HPV-Infektionen eignet.

Es sind zu diesem Zweck 78 Gewebeproben von Patienten mit oropharyngealen und nicht-oropharyngealen Karzinomen [Oropharynx (n= 20), Larynx (n= 22), Zungenrand (n= 8), weicher Gaumen (n= 4), Hypopharynx (n= 24)] auf das Vorhandensein von HPV-DNA unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließendem Multiplex-HPV-Genotyping-Assay/Luminex-Analyse und zusätzlichem HPV^{Type} 3.5 LCD-Array untersucht

worden. Aus denselben Gewebeproben extrahierte RNA wurde nach Reverse Transkriptase-PCR auf die Expression von mRNA der viralen Onkogene E6 und E7 untersucht. Histopathologische Schnitte derselben Karzinome sind mittels Immunhistochemie auf das Expressionsmuster von p16^{INK4A} untersucht worden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen eine HPV-Prävalenz von 28,2 % (22/78) aller anatomischer Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereiches. Tonsillenkarcinome zeigen dabei mit einer HPV-Prävalenz von 60 % (12/20) im Vergleich zu den anderen Lokalisationen [Larynx (4/22), Zungenrand (2/8), weicher Gaumen (0/4), Hypopharynx (4/24)] erwartungsgemäß einen besonders hohen Anteil an HPV-positiven Karzinomen. In den HPV-DNA-positiven Fällen liegt der Anteil biologisch aktiver HPV-Infektionen bei 77,3 % (17/22). In den zwölf detektierten HPV-DNA-positiven Tonsillenkarcinomen zeigen zehn Proben mit verfügbarer RNA in der RNA-Analyse Signale für exprimierte E6/E7-mRNA. In zwei DNA-positiven Fällen mit nicht vorhandener RNA zeigt die p16^{INK4A}-Immunhistochemie ein starkes Färbemuster. Diese zwei Proben sind folglich als biologisch aktive Infektionen gewertet worden. Insgesamt beinhalten 60 % der untersuchten Tonsillenkarcinome biologisch aktive HPV-Infektionen. Zehn (17,2 %) der 58 untersuchten nicht-oropharyngealen Karzinome zeigen sich ebenfalls als HPV-DNA-positiv. In vier dieser zehn Fälle [Larynx (n= 2), Zungenrand (n= 2)] ließ sich E6/E7-mRNA nachweisen. In einem weiteren HPV-DNA-positiven Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx stand keine RNA zur Verfügung. Es zeigte sich jedoch eine starke p16^{INK4A}-Expression in diesem Fall. Diese fünf (8,6 %) Fälle nicht-oropharyngealer Karzinome können folglich als biologisch aktive HPV-Infektionen interpretiert werden.

Die durchgeführte Immunhistochemie zeigt eine p16^{INK4A}-Überexpression in 45 von 78 untersuchten Gewebeproben. 17 Proben zeigen eine starke, zwölf eine moderate und 16 eine schwache p16^{INK4A}-Expression. Bei der Betrachtung der p16^{INK4A}-Expression der 22 HPV-DNA-positiven Karzinome zeigt sich in 14 Fällen eine starke, jeweils in zwei Fällen eine moderate und schwache und in vier Fällen eine negative Färbung.

Drei von 14 (21,4 %) HPV-DNA- und -RNA-positiver Karzinome zeigen auffallenderweise keine p16^{INK4A}-Überexpression. Diese drei Fälle wären fälschlicherweise bei alleiniger Durchführung der p16^{INK4A}-Immunhistochemie als biologisch inaktiv eingestuft worden. In

13 Proben mit negativem HPV-DNA und -RNA Status zeigt sich dagegen eine p16^{INK4A}-Überexpression.

Es lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Promotionsarbeit schlussfolgern, dass (i) vorherrschend die oropharyngealen, v. a. die Tonsillenkzinome, aber auch in geringerem Prozentsatz Karzinome des Larynx und des Zungenrandes mit aktiven HPV-Infektionen assoziiert sind und dass (ii) die alleinige Durchführung der p16^{INK4A}-Immunhistochemie nicht ausreichend ist, um biologisch aktive und inaktive HPV-Infektionen in der Gesamtheit der Kopf-Hals-Karzinome zu unterscheiden. 21,4 % der HPV-DNA- und -RNA-positiven Karzinome wären nicht identifiziert worden, wenn die p16^{INK4A}-Immunhistochemie die einzig angewandte Methode gewesen wäre. Die Funktion von p16^{INK4A} als Surrogatmarker für die Identifikation aller biologisch aktiven HPV-Infektionen bleibt daher kritisch zu hinterfragen.

Es ist weiterhin notwendig aktuelle epidemiologische Daten hinsichtlich der HPV-Aktivitäten in den verschiedenen Karzinomlokalisationen des Kopf-Hals-Bereiches zu bestimmen. Die präzise Kenntnis über exakte Inzidenzen aktiver HPV-Infektionen rechtfertigen mögliche diagnostische und therapeutische Veränderungen bei HPV-positiven und -negativen Karzinompatienten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Albers AE, Hoffmann TK, Klussmann JP, Kaufmann AM (2010): Prophylactic and therapeutic vaccines against human papilloma virus. *HNO* Volume 58 Number 8: 778-790
- Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, Klein W, Helbig M, Dietz A, Weidauer H, Bosch FX (1998): Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res* 58: 5-13
- Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R et al. (2010): Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363: 24-35
- Baumann JL, Cohen S, Evjen AN, Law JH, Vadivelu S, Attia A, Schindler JS, Chung CH, Wirth PS, Meijer CJ, Snijders PJ, Yarbrough WG, Slebos RJ (2009): Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 119: 1531-1537
- Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra Wh (2005): Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 5694-5699
- Bernard B, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M (1989): The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 63: 4317-4324
- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM (1994): Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 170: 1077-1085
- Blomberg M, Nielsen A, Munk C, Kjaer SK (2011): Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: Focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer* 129: 733-741
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV (2002): The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55: 244-265
- Bosch FX, de Sanjosé S (2003): Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 31: 3-13

- Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L (1994): Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J* 13: 5451-5459
- Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers, Leemans CR, Brakenhoff RH (2004): Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst* 96: 978-980
- Braakhuis BJ, Visser O, Leemans CR (2009): Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults. *Oral Oncol* 45: e85-89
- Burd EM (2003): Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 16: 1-17
- Burk RD, Chen Z, Doorslaer KV (2009): Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics* 12: 281-290
- Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, Di Liberto C, Scully C, Lo Muzio L (2007): Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol* 30: 813-823
- Cardoso JC, Calonje E (2011): Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: A review. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 20: 145-154
- Chan SY, Delius H, Halpen AL, Bernard HU (1995): Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 69: 3074-3083
- Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J, Syrjänen K (1991): Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. *J Oral Pathol Med* 20: 305-317
- Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML (2008): Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 26: 612-619
- Chen MJ, Shimada T, Moulton AD, Harrison M, Nienhuis AW (1982): Intronless human dihydrofolate reductase genes are derived from RNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7435-7439
- Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT (1992): Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5799-5803

- Choo KB, Pan CC, Han SH (1987): 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* 161: 259-261
- Chuang TY (1987): Condylomata acuminata (genital warts). An epidemiologic view. *J Am Acad Dermatol* 16: 376-384
- Ciuffo G (1907): Innesto positivo con filtrado di verrucae volgare. *G. Ital. MalVenereol* 48: 12-17
- Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P (1999): Hybrid Capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. *Br J Cancer* 80: 1306-1311
- Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya KA, Ogden G, Macpherson LM (2006): Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) -- recent trends and regional variation. *Oral Oncol* 42: 586-592
- Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG 3rd, Dürst M, Gissmann L, Roman A, Turek LP (1987): Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J* 6: 3745-3753
- Crook T, Morgenstern JP, Crawford L, Banks L (1989): Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-ras. *EMBO J* 8: 513-519
- Crusius K, Auvinen E, Alonso A (1997): Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 15: 1437-1444
- Cunningham LL, Pagano GM, Mengtao L, Tandon, R, Holm S, White DK, Subodh L (2006): Overexpression of p16^{INK4} is a reliable marker for human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102: 77-81
- D'Souza G, Dempsey A (2011): The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev Med* 53: 5-11

- Del Vecchio AM, Romanczuk H, Howley PM, Baker CC (1992): Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J. Virol* 66: 5949-5958
- Dell G, Gaston K (2001): Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol Sci* 58: 1923-1942
- Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L (1985): The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 66: 1515-1522
- Dürst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H (1992): Human papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* 189: 132-140
- Eversole LR (2000): Papillary lesions of the oral cavity: relationship to human papillomaviruses. *J Calif Dent Assoc* 28: 922-927
- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. (2008): Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100: 261-269
- Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M (2011): Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virol J* 8: 269
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917
- Frattini MG, Lim HB, Laimins LA (1996): In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3062-3067
- Galloway DA, McDougall JK (1989): Human papillomaviruses and carcinomas. *Adv Virus Res* 37: 125-171
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Wu L, Sidransky D (2000): Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Nat Cancer Inst* 92: 709-720
- Gillison ML, Chaturvedi AK, Lowy DR (2008): HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer* 113: 3036-3046
- Gillison ML (2009): HPV and prognosis for patients with oropharynx cancer. *Eur J Cancer* 45: 383-385

- Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M (2001): Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75: 1565-1570
- Gissmann L (1992): Human papillomaviruses and genital cancer. *Semin Cancer Biol* 3: 253-261
- Halec G, Schmitt M, Dondog B, Sharkhuu E, Wentzensen N, Gheit T, Tommasino M, Kommos F, Bosch FX, Franceschi S et al. (2012): Biological activity of probable/possible high-risk human papillomavirus types in cervical cancer. *Int J Cancer* doi: 10.1002/ijc.27605
- Hammarstedt L, Dahlstrand H, Lindquist D, Onelöv L, Ryott M, Luo J, Dalianis T, Ye W, Munck-Wikland E (2007): The incidence of tonsillar cancer in Sweden is increasing. *Acta Otolaryngol* 127: 988-992
- Hoffmann M, Kahn T, Mahnke CG, Görögh T, Lippert BM, Werner JA (1998): Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck determined by polymerase chain reaction and Southern blot hybridization: proposal for optimized diagnostic requirements. *Acta Otolaryngol* 118: 138-144
- Hoffmann M, Görögh T, Gottschlich S, Lohrey C, Rittgen W, Ambrosch P, Schwarz E, Kahn T (2005): Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8-year-survival analysis of 73 patients. *Cancer Lett* 218: 199-206
- Hoffmann M, Ihloff AS, Görögh T, Weise JB, Fazel A, Krams M, Rittgen W, Schwarz E, Kahn T (2010): p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer*; 127: 1595-1602
- Hoffmann M (in Bearbeitung): Humane Papillomvirus-Infektionen im Kopf-Hals-Bereich im öffentlichen Bewusstsein. Mahnung zu Präzision in Diagnostik und Öffentlichkeitsarbeit
- Holzinger D, Schmitt M, Dyckhoff G, Benner A, Pawlita M, Bosch FX (eingereicht): Viral RNA Patterns and High Viral Load Reliably Define Oropharynx Carcinomas with Active HPV16 Involvement. *Cancer Research*
- Howley PM, Schlegel R (1988): The papillomavirus. *Am J Med* 85: 155-158
- Howley PM (1991): Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res* 51: 5019-5022
- Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG, Hayward SD (1996): Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* 16: 952-959

- IARC (1995): IARC Monographs Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Human papillomaviruses, Vol 64, Lyon, France
- IARC (2007): IARC Monographs Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Human papillomaviruses, Vol 90, Lyon, France
- Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM (1995): Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 33: 901-905
- Jansen KU, Shaw AR (2004): Human papillomavirus vaccines and prevention of cervical cancer. *Annu Rev Med* 55: 319-331
- Jones DL, Alani RM, Munger K (1997): The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p 21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* 11: 2101-2111
- Jung AC, Briolat J, Millon R, de RA, Rickman D, Thomas E, Abecassis J, Clavel C, Wasylyk B (2010): Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 126: 1882-1894
- Kahn T, Turazza E, Ojeda R, Bercovich A, Stremlau A, Lichter P, Poustka A, Grinstein S, zur Hausen H (1994): Integration of human papillomavirus type 6a in a tonsillar carcinoma: chromosomal localization and nucleotide sequence on the genomic target region. *Cancer Res* 54: 1-8
- Kamangar F, Dores GM, Anderson WF (2006): Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24: 2137-2150
- Kawana Y, Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T (2001): Human papillomavirus type 16 minor capsid protein l2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol* 75: 2331-2336
- Kim SH, Koo BS, Kang S, Park K, Kim H, Lee KR, Lee MJ, Kim JM, Choi EC, Cho NH (2007): HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *Int J Cancer* 120: 1418-1425
- Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Mishina T, Akie K, Nishi M, Hiroumi H, Hommura F, Kawakami Y (1996): Altered p16^{INK4} and retinoblastoma protein status in non-small

cell lung cancer: potential synergistic effect with altered p53 protein on proliferative activity. *Cancer Res* 56: 5557-5562

- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M (2001): Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 92: 276-284
- Klingenberg B, Hafkamp HC, Haesevoets A, Manni JJ, Slootweg PJ, Weissenborn SJ, Klusmann JP, Speel EJ (2010): p16 INK4A overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV. *Histopathology* 56: 957-967
- Klusmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG (2001): Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 92: 2875-2884
- Klusmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003): Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol*; 162: 747-753
- Klusmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003): Human Papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol* 192: 129-132
- Klusmann JP, Dinh S, Guntinas-Lichius O, Wittekindt C, Weissenborn S, Wieland U, Dienes HP, Hoffmann T, Smith E, Turek L et al. (2004): HPV-assozierte Tonsillenkarcinome. Ein Update. *HNO* 52: 208-218
- Klusmann JP, Preuss SF, Speel EJ (2009): Humane Papillomviren und Oropharynxkarzinome. Molekulare Interaktion und klinische Auswirkung. *HNO* 57: 113-122
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005): Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 467-475
- Larke N, Thomas SL, Dos Santos Silva I, Weiss HA (2011): Male circumcision and human papillomavirus infection in men: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis* 204: 1375-1390
- Larson DA, Derkay CS (2010): Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS* 118: 450-154

- Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C, Jacob Y, Favre M (2009): EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 348-370
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2011): The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11: 9-22
- Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, Jaisamrarn U, Garland SM, Castellsagué X, Skinner SR, Apter D, Naud P, Salmerón J et al. (2012): Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol* 13: 89-99
- Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biorklund A, Rutqvist LE (1998): Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 82: 1367-1375
- Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM (2001): Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 15: 805-813
- Lukas J, Parry D, Aagaard L (1995): Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumor suppressor p16. *Nature* 375: 503-506
- Ma TS (1995): Applications and limitations of polymerase chain reaction amplification. *Chest* 108: 1393-1404
- Mahnke CG, Werner JA, Fröhlich O, Lippert BM, Hoffmann M, Rudert HH (1998): [Clinical and molecular biology studies of respiratory papillomatosis]. *Laryngorhinootologie* 77:157-164
- Majewski S, Jabłońska S, Orth G (1997): Epidermodysplasia verruciformis. Immunological and nonimmunological surveillance mechanisms: role in tumor progression. *Clin Dermatol* 15: 321-334
- Malanchi I, Caldeira S, Krutzfeldt M, Giarre M, Alunni-Fabbroni M, Tommasino M (2002): Identification of a novel activity of human papillomavirus type 16 E6 protein in deregulating the G1/S transition. *Oncogene* 2: 5665-5672
- Mantovani F, Banks L (2001): The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20 : 7874-7887

- Marklund L, Hammarstedt L (2011): Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *J Oncol* 2011: 509036
- McFadyean J, Hobday F (1898): Note on the experimental “transmission of warts in the dog”. *J Comp Pathol Ther* 11: 341
- McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, Munger K (2011): Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2130-2135
- Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E (2000): Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* 89: 300-304
- Melnick JL, Allison AC, Butel JS, Echart W, Eddy BE, Kit S, Levine AJ, Miles JAR, Pagano JS, Sachs L, Vonka V (1974): Papovaviridae. *Intervirology* 3: 106-120
- Menaker RJ, Sharaf AA, Jones NL (2004): Helicobacter pylori infection and gastric cancer: host, bug, environment, or all three? *Curr Gastroenterol Rep* 6: 429-435
- Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL (2001): Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20: 7888-7898
- Munger K, Howley PM (2002): Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89: 213-228
- Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJ (2004): Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 111: 278-285
- Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, Ahrlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D et al. (2009): Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer* 125: 362-366
- Nasser M, Gage JR, Lorincz A, Wettstein FO (1991): Human papillomavirus type 16 immortalized cervical keratinocytes contain transcripts encoding E6, E7, and E2 initiated at the P97 promoter and express high levels of E7. *Virology* 184: 131-140
- O'Regan EM, Toner ME, Finn SP, Fan CY, Ring M, Hagmar B, Timon C, Smyth P, Cahill S, Flavin R et al. (2008): p16(INK4A) genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas. *Hum Pathol* 39: 452-458

- Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA (1996) Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 46: 5-27
- Pawlita M, Gissmann L. (2009): [Recurrent respiratory papillomatosis: indication for HPV vaccination?]. *Dtsch Med Wochenschr* 134: 100-102
- Peltecu G, Bari M, Lancu G, Popa F (2009): Human papilloma virus and cervical preinvasive disease. *J Med Life* 2: 373-377
- Pfister H, Fuchs PG (1987): *Papillomavirus: Particles, genome organisation and proteins*. Heidelberg, Springer
- Pfister H, Fuchs PG (1994): Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* 37: 143-149
- Posner MR, Lorch JH, Goloubeva O, Tan M, Schumaker LM, Sarlis NJ, Haddad RI, Cullen KJ (2011): Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial. *Ann Oncol* 22: 1071-1077
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2006): *Duale Reihe - Biochemie* (1. Auflage), Thieme Stuttgart, Kapitel 17 (Molekulare Onkologie): S. 522-530
- Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stützer H, Preuss SF, Hoffmann TK, Speel EJ, Dienes HP, Pfister HJ, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP (2007): Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 120: 1731-1738
- Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V, Curado MP, Shangina O, Zaridze D et al. (2011): Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol* 40: 489-502
- Rischin D, Young RJ, Fisher R, Fox SB, Le QT, Peters LJ, Solomon B, Choi J, O'Sullivan B, Kenny LM, McArthur GA (2010): Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *J Clin Oncol* 28: 4142-4148
- Robinson KL, Macfarlane GJ (2003): Oropharyngeal cancer incidence and mortality in Scotland: are rates still increasing? *Oral Oncol* 39: 31-36
- Romanczuk H, Howley PM (1992): Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3159-3163

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T (1998): Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 153: 1741-1748
- Scharfetter K, Volkenandt M, Sorg R, Wlaschek M, Eckes B (1991): Die Polymerasekettenreaktion- Prinzip und Anwendung in der Medizin. *Hautarzt* 42: 477-483
- Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T (2006): Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 44: 504-512
- Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M (2008): Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* 46: 1050-1059
- Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M, Tommasino M, Gheit T (2010): Abundance of multiple high-risk human papillomavirus (HPV) infections found in cervical cells analyzed by use of an ultrasensitive HPV genotyping assay. *J Clin Microbiol* 48: 143-149
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707
- Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ, Rollins BJ (1995): Reciprocal Rb inactivation and p16^{INK4a} expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res* 55: 505-509
- Shope RE, Hurst EW (1933): Infectious papillomatosis of rabbits. *J Exp Med* 58: 607-624
- Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E-J, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2007): A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 121: 2465-2472
- Smeets SJ, van der Plas M, Schaaij-Visser TB, van Veen EA, van MJ, Braakhuis BJ, Steenbergen RD, Brakenhoff RH (2011): Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways. *Int J Cancer* 128: 1596-1605

- Smith EM, Pawlita M, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP (2010): Risk factors and survival by HPV-16 E6 and E7 antibody status in human papillomavirus positive head and neck cancer. *Int J Cancer* 127: 111-117
- Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP (2010): Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes Control* 21: 1369-1378
- Smith B, Chen Z, Reimers L, van Doorslaer K, Schiffman M, Desalle R, Herrero R, Yu K, Wacholder S, Wang T, Burk RD (2011): Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PLoS One* 6: e21375
- Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, Meijer CJ, Van Den Brule AJ, Franceschi S, Peeling RW et al. (2004): Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer* 111: 431-439
- Snijders PJ, van den Brule AJ, Schreijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM (1990): The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 71: 173-181
- St Guily JL, Clavel C, Okais C, Pr etet JL, Beby-Defaux A, Agius G, Birembaut P, Jacquard AC, L eocmach Y, Soubeyrand B et al. (2011): Human papillomavirus genotype distribution in tonsil cancers. *Head Neck Oncol* 3: 6
- STIKO (2007): Robert Koch-Institut: Epidemiologisches Bulletin Nr. 12 (23.03.2007), Online im Internet URL:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2007/Ausgabenlinks/12_07.pdf?__blob=publicationFile [Stand 27.08.2012]
- Stoler MH (2000): Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol* 19: 16-28
- Straetmans JM, Olthof N, Mooren JJ, de Jong J, Speel EJ, Kremer B (2009): Human papillomavirus reduces the prognostic value of nodal involvement in tonsillar squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 119: 1951-1957
- Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL (1949): Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med* 72: 46-50

- Stubenrauch F, Laimins LA (1999): Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 9: 379-386
- Syrjänen S (2005): Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 32: 59-66
- Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, Campisi G (2008): HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 19: 1681-1690
- Tribius S, Ihloff AS, Rieckmann T, Petersen C, Hoffmann M (2011): Impact of HPV status on treatment of squamous cell cancer of the oropharynx: What we know and what we need to know. *Cancer Lett* 304: 71-79
- van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, Garcia-Sanz R et al. (2003): Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17: 2257-2317
- Vohra S, Sharma NL, Shanker V, Mahajan VK, Jindal N (2010): Autosomal dominant epidermodysplasia verruciformis: a clinicotherapeutic experience in two cases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 76: 557-561
- von Krogh G (2001): Management of anogenital warts (condylomata acuminata). *Eur J Dermatol* 11: 598-603
- Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX (2002): Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 21: 1510-1517
- Zhao KN, Sun XY, Frazer IH, Zhou J (1998): DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1. *Virology* 243: 482-491
- Zhou J, Sun XY, Louis K, Frazer IH (1994): Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J Virol* 68: 619-625
- zur Hausen H (1976): Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 36: 794
- zur Hausen H (1977): Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 78: 1-30

- zur Hausen H (1991): Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 184: 9-13
- zur Hausen H (1994): Disrupted dichotomous intracellular control of human papillomavirus infection in cancer of the cervix. *Lancet* 343: 955-957
- zur Hausen H, de Villiers EM (1994): Human Papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 48: 427-447
- zur Hausen H (1995): Are human papillomavirus infections not necessary or sufficient causal factors for invasive cancer of the cervix? *Int J Cancer* 63: 315-316
- zur Hausen H (1996): Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288: 55-78
- zur Hausen H (2000): Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92: 690-698
- zur Hausen H (2001): Proliferation-inducing viruses in non-permissive systems as possible causes of human cancers. *Lancet* 357: 381-384
- zur Hausen H (2002): Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350
- zur Hausen H (2006): *Infections Causing Human Cancer*. Wiley-VCH, Weinheim/New York: 1-517

8. ANHANG

	Alter/ Geschlecht	Karzinomlokalisierung	TNM-Stadium/Grading
1	47/m	T. lingualis	T4N2bM0/G3
2	67/w	T. palatina	T2N0M0/G2
3	61/m	T. lingualis	T3N2bM0/G2
4	61/m	T. palatina	T4N2bM0/G2
5	63/m	T. palatina	T1N2bM0/G2
6	53/w	T. palatina	T2N1M0/G2
7	64/m	T. palatina	T1N1M0/G2
8	70/w	T. palatina	T3N1M0/G1
9	60/m	T. lingualis	T3N2bM0/G2
10	51/m	T. lingualis	T2N1M0/G3
11	76/m	T. lingualis	T4N0M0/G2
12	53/m	T. palatina	T1N2aM0/G3
13	52/m	T. palatina	T1N2bM0/G2
14	54/m	T. palatina	T3N0M0/G2
15	59/m	T. palatina	T2N0M0/G3
16	47/m	T. palatina	T4N2bM0/G3
17	67/w	T. palatina	T3N2cM0/G2
18	72/m	T. lingualis	T4N2bM0/G2
19	63/m	T. palatina	T4aN2cM0/G2
20	68/m	T. palatina	T2N0M0/G2
21	54/m	Larynx	T3N0M0/G2
22	53/w	Larynx	T4N0M1/G3
23	72/m	Larynx	T3N0M0/G2
24	52/w	Larynx	T2N2cM0/G2
25	69/m	Larynx	T2N0M0/G2
26	70/m	Larynx	T4aN1M0/G2
27	61/m	Larynx	T4aN2bM0/G2
28	55/m	Larynx	T3N2cM0/G2-3
29	73/w	Larynx	T3N2cM0/G2
30	48/w	Larynx	T3N0M0/G2
31	58/m	Larynx	T3N2cM0/G2-3
32	73/m	Larynx	T3N0M0/G2
33	54/w	Larynx	T4N2cM0/G2
34	75/m	Larynx	T4aN0M0/G2
35	54/m	Larynx	T3N1M0/G2
36	55/w	Larynx	T3N0M0/G1
37	58/m	Larynx	T4N1M0/G2
38	56/m	Larynx	T3N0M0/G2
39	69/m	Larynx	T1N2cM1/G2
40	73/m	Larynx	T3N0M0/G2
41	58/w	Larynx	T4aN2cM0/G2

42	64/m	Larynx	T3N3M0/G2
43	56/m	Zungenrand	T4N3M0/G2
44	57/m	Zungenrand	T4aN0M0/G2
45	53/m	Zungenrand	T4N2cMx/G2
46	43/m	Zungenrand	T4N2cM0/G2
47	57/m	Zungenrand	T3N2bM0/G3
48	58/m	Zungenrand	T2N1M0/G3
49	52/m	Zungenrand	T2N0M0/G2
50	44/m	Zungenrand	T2N0M0/G2
51	64/m	Pallatum molle	T3N2cM1/G1
52	53/w	Pallatum molle	T1N2bM0/G2
53	71/m	Pallatum molle	T3N2bM0/G3
54	52/m	Pallatum molle	T2N0M0/G1
55	59/m	Hypopharynx	T4N1M0/G2
56	63/m	Hypopharynx	T3N0Mx/G2
57	52/m	Hypopharynx	T4N2bM0/G2
58	60/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G2
59	64/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G2
60	72/m	Hypopharynx	T4N0Mx/G2
61	55/m	Hypopharynx	T2N2bMx/G2
62	68/m	Hypopharynx	T2N0M0/G2
63	52/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G2
64	79/m	Hypopharynx	T3N2cM0/G2
65	61/m	Hypopharynx	T1N2cM0/G2
66	52/m	Hypopharynx	T2N0M1/G2
67	43/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G3
68	69/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G3
69	62/m	Hypopharynx	T4N2cM0/G2
70	65/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G3
71	64/m	Hypopharynx	T2N2bM0/G3
72	47/m	Hypopharynx	T4N3M0/G3
73	61/m	Hypopharynx	T4N0M0/G2
74	75/m	Hypopharynx	T4N3M0/G2
75	57/m	Hypopharynx	T4N2cM0/G2
76	56/m	Hypopharynx	T4N2cM1/G3
77	58/m	Hypopharynx	T4N0M0/G2
78	66/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G2-3

Tabelle 1: Klinikopathologische Daten der untersuchten Patienten, anatomische Karzinomlokalisierung, Stadium und Grading der Karzinome (nach der TNM-Klassifikation der UICC 1992), benutzte Abkürzung: (m): männlich; (w): weiblich; (T): Tonsilla.

	Alter/ Geschlecht	Karzinom- lokalisation	TNM/Grading	HPV-DNA-Genotypisierung			RNA ³	p16 ^{INK4A} ⁴	Biolo- gische Aktivität ⁵	
				MPG/ Luminex ¹	LCD-Chip					End- ergebnis ²
					PCR	Array				
1	47/m	T. lingualis	T4N2bM0/G3	16 niedrig	-			-	++	
2	67/w	T. palatina	T2N0M0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	+++	Aktiv
3	61/m	T. lingualis	T3N2bM0/G2	16 hoch	+	16	HPV16		+++	Aktiv*
4	61/m	T. palatina	T4N2bM0/G2	16 niedrig	-			-	-	
5	63/m	T. palatina	T1N2bM0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	+++	Aktiv
6	53/w	T. palatina	T2N1M0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	+++	Aktiv
7	64/m	T. palatina	T1N1M0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	+++	Aktiv
8	70/w	T. palatina	T3N1M0/G1	16 hoch	+	16	HPV16	+	+++	Aktiv
9	60/m	T. lingualis	T3N2bM0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	+++	Aktiv
10	51/m	T. lingualis	T2N1M0/G3	16 hoch	+	16	HPV16	+	+++	Aktiv
11	76/m	T. lingualis	T4N0M0/G2	16 niedrig	-			-	++	
12	53/m	T. palatina	T1N2aM0/G3	16/42 niedrig	-				+	
13	52/m	T. palatina	T1N2bM0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	-	Aktiv
14	54/m	T. palatina	T3N0M0/G2	16 niedrig	-			-	++	
15	59/m	T. palatina	T2N0M0/G3	16 niedrig	-	-		+	-	
16	47/m	T. palatina	T4N2bM0/G3	16 niedrig	-			-	-	
17	67/w	T. palatina	T3N2cM0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	+++	Aktiv
18	72/m	T. lingualis	T4N2bM0/G2	16 niedrig	-			-	+	
19	63/m	T. palatina	T4aN2cM0/G2	16/18 hoch	+	18	HPV18		+++	Aktiv*
20	68/m	T. palatina	T2N0M0/G2	16 niedrig	+	16/18	HPV16/18	+	++	Aktiv
21	54/m	Larynx	T3N0M0/G2	16 niedrig	-			-	-	
22	53/w	Larynx	T4N0M1/G3	16 niedrig	-			-	+	
23	72/m	Larynx	T3N0M0/G2	16 niedrig	+	16	HPV16	+	-	Aktiv
24	52/w	Larynx	T2N2cM0/G2	16 hoch	-	16	HPV16	+	+++	Aktiv
25	69/m	Larynx	T2N0M0/G2	16 hoch	-	-		-	++	
26	70/m	Larynx	T4aN1M0/G2	16 hoch	+	16	HPV16		+	Inaktiv*
27	61/m	Larynx	T4aN2bM0/G2	0	-				-	
28	55/m	Larynx	T3N2cM0/G2-3	16 niedrig	-			-	-	
29	73/w	Larynx	T3N2cM0/G2	16 niedrig	-	-		+	++	
30	48/w	Larynx	T3N0M0/G2	16 niedrig	-	-		+	++	
31	58/m	Larynx	T3N2cM0/G2-3	0	-			-	-	
32	73/m	Larynx	T3N0M0/G2	16 niedrig	-			-	+	
33	54/w	Larynx	T4N2cM0/G2	16 hoch	-	16	HPV16	-	-	Inaktiv
34	75/m	Larynx	T4aN0M0/G2	0	-				-	
35	54/m	Larynx	T3N1M0/G2	16 niedrig	-				++	
36	55/w	Larynx	T3N0M0/G1	16 niedrig	-				-	
37	58/m	Larynx	T4N1M0/G2	16 niedrig	-				+++	
38	56/m	Larynx	T3N0M0/G2	16 niedrig	-			-	-	
39	69/m	Larynx	T1N2cM1/G2	16 niedrig	-			-	+	
40	73/m	Larynx	T3N0M0/G2	16/18 niedrig	-				-	
41	58/w	Larynx	T4aN2cM0/G2	16 niedrig	-				-	
42	64/m	Larynx	T3N3M0/G2	16 niedrig	-				+	
43	56/m	Zungenrand	T4N3M0/G2	16 niedrig	-				+++	
44	57/m	Zungenrand	T4aN0M0/G2	16/18 niedrig	-			-	-	
45	53/m	Zungenrand	T4N2cMx/G2	16 niedrig	-				+	
46	43/m	Zungenrand	T4N2cM0/G2	16 niedrig	-			-	-	
47	57/m	Zungenrand	T3N2bM0/G3	16 hoch	+	16	HPV16	+	+++	Aktiv
48	58/m	Zungenrand	T2N1M0/G3	16 hoch	-	16	HPV16	+	-	Aktiv
49	52/m	Zungenrand	T2N0M0/G2	16 niedrig	-			-	-	
50	44/m	Zungenrand	T2N0M0/G2	16 niedrig	-				+	
51	64/m	Pallatum molle	T3N2cM1/G1	16/18 niedrig	-			-	-	
52	53/w	Pallatum molle	T1N2bM0/G2	0	-				++	

53	71/m	Pallatum molle	T3N2bM0/G3	16 niedrig	-			-	+	
54	52/m	Pallatum molle	T2N0M0/G1	16 niedrig	+	16		-	+	
55	59/m	Hypopharynx	T4N1M0/G2	0	-			-	+	
56	63/m	Hypopharynx	T3N0Mx/G2	0	-				++	
57	52/m	Hypopharynx	T4N2bM0/G2	16 niedrig	-				-	
58	60/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G2	16 hoch	-	16	HPV16	-	+	Inaktiv
59	64/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G2	16 niedrig	-				-	
60	72/m	Hypopharynx	T4N0Mx/G2	16 niedrig	-			-	+	
61	55/m	Hypopharynx	T2N2bMx/G2	16 niedrig	-				++	
62	68/m	Hypopharynx	T2N0M0/G2	0	-			-	+++	
63	52/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G2	16 hoch	-	16	HPV16	-	+++	Inaktiv
64	79/m	Hypopharynx	T3N2cM0/G2	16 niedrig	-			-	+	
65	61/m	Hypopharynx	T1N2cM0/G2	16 niedrig	-			-	-	
66	52/m	Hypopharynx	T2N0M1/G2	16 niedrig	-			-	-	
67	43/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G3	16 niedrig	-			-	-	
68	69/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G3	16 niedrig	-			-	-	
69	62/m	Hypopharynx	T4N2cM0/G2	16 niedrig	-				-	
70	65/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G3	16 hoch	+	16	HPV16		+++	Aktiv*
71	64/m	Hypopharynx	T2N2bM0/G3	16 hoch	+	16	HPV16	-	++	Inaktiv
72	47/m	Hypopharynx	T4N3M0/G3	0	-			-	-	
73	61/m	Hypopharynx	T4N0M0/G2	16 niedrig	-			-	-	
74	75/m	Hypopharynx	T4N3M0/G2	16 niedrig	-			-	-	
75	57/m	Hypopharynx	T4N2cM0/G2	16 niedrig	-			-	-	
76	56/m	Hypopharynx	T4N2cM1/G3	16 niedrig	-			-	+	
77	58/m	Hypopharynx	T4N0M0/G2	16 niedrig	-			-	-	
78	66/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G2-3	16 niedrig	-				-	

Tabelle 3: Demographische und klinische Merkmale der Patienten und Ergebnisse der untersuchten Karzinome.

Anmerkungen: benutzte Abkürzung: (m): männlich; (w): weiblich; (T): Tonsilla

¹MPG/Luminex: Fälle mit niedriger viraler Belastung wurden als HPV-DNA-negativ (HPVD-) betrachtet und Fälle mit hoher viraler Belastung als HPV-DNA-positiv (HPVD+).

²Für die endgültige Bestimmung des HPV-DNA-Status und der HPV-Genotypisierung wurden die Ergebnisse der MPG/Luminex-, der LCD-Chip-Array -DNA-Analyse und die E6*I mRNA-Analyse betrachtet. Wenn zwei von den drei Methoden korrespondierende positive Ergebnisse erzielten, wurden die Fälle als HPV-DNA-positiv (HPVD+) eingestuft.

³Ergebnisse der E6*I mRNA-Analyse. Wenn keine RNA verfügbar war (n=24), ist kein Ergebnis angegeben.

⁴ p16^{INK4A}-Immunhistochemie-Ergebnisse: +++ stark positives Signal, ++ moderat positives Signal, + schwach positives Signal, - negativ.

⁵ Als biologisch aktive HPV-Infektionen wurden die Fälle betrachtet, wenn die E6*I mRNA-Analyse positiv und auch eine der beiden angewandten HPV-DNA-Detektionen positiv waren. Eine Ausnahme bilden die vier*-markierten Fälle. mRNA war in diesen Fällen nicht verfügbar, so dass in diesen Fällen mit zweifach positivem HPV-DNA-Nachweis die Ergebnisse der p16^{INK4A}-Immunhistochemie mitbetrachtet wurden. Dabei ist eine starke Färbung als biologisch aktiv und eine schwache Färbung als biologisch inaktiv gewertet worden.

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik - Schwannenweg 20 - 24105 Kiel

Schwannenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 0431 / 597-18 09
Telefax 0431 / 597-18 31

Datum:

20.7.2010

PD Dr. med. Markus Hoffmann
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
UKSH, Campus Kiel
Arnold- Heller- Str. 16, Haus 27

24105 Kiel

AZ.: D 438/10 (bitte stets angeben)
Antragsteller: PD Dr. med. Markus Hoffmann, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, UKSH, Campus Kiel
Ihr Schreiben vom: 13.7.2010

Sehr geehrter Herr Kollege Hoffmann,

vielen Dank für Ihr Schreiben. Nach Durchsicht durch die Geschäftsstelle bestehen gegen die vier Promotionsarbeiten von Seiten der Ethik-Kommission keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

Abbildung 4: Zustimmung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Kiel.

DANKSAGUNG

Für den Arbeitsplatz an der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und die dort vorgefundenen guten Arbeitsbedingungen danke ich der Direktorin, Frau Professor Dr. Petra Ambrosch.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Markus Hoffmann, leitender Oberarzt dieser Klinik, für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie für seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft während des gesamten Projektes.

Großer Dank gebührt Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Tibor Görögh aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie in Kiel für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und seine stets geduldige Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Promotionsarbeit.

Dr. Christian Cordes möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für seine freundliche und kompetente Unterstützung bei der Durchführung der Experimente danken.

Bei Frau Anne-Marie Roen bedanke ich mich für ihre immer freundliche und unverzichtbare Hilfe im Labor und für die netten aufmunternden Gespräche zwischendurch.

In Dankbarkeit verbunden bin ich Herrn Dr. Markus Schmitt, vom Forschungsschwerpunkt Infektionen und Krebs des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg, für eine hervorragende Zusammenarbeit sowie für seinen fachlichen Rat und die Ermöglichung der Durchführung der Luminex-Methode im Labor des Forschungsschwerpunktes.

Für die professionelle Begleitung in der Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte danke ich Herrn Professor Dr. Christoph Röcken, Leiter des Institutes für Pathologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Meiner sehr guten Freundin Lena danke ich für die außerordentlich gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und dafür, dass sie mir viele Stunden Laborarbeit verschönert hat. Darüber

hinaus danke ich ihr für das stets offene Ohr für medizinische Anfragen und v. a. für die privaten Gespräche.

Danken möchte ich auch meinen Großeltern für ihre liebevolle und tatkräftige Unterstützung während des gesamten Studiums.

Meinem Freund Benjamin danke ich für das entgegengebrachte Verständnis und seine große Geduld. Er hat mir stets starken Rückhalt bei allen meinen Entscheidungen gegeben und mich gerade in schwierigen Phasen sehr unterstützt.

In Liebe und ganz besonderer Dankbarkeit möchte ich diese Arbeit meinen Eltern widmen. Ohne sie wären das Studium und die Durchführung der Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für eure liebevolle Unterstützung.

LEBENS LAUF**Persönliche Angaben:**

Name: Claudia Burkhardt
 Geburtsdatum: 11.04.1987
 Geburtsort: Berlin
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

1993 – 1999 Falken-Grundschule in Berlin
 1999 – 2003 Otto-Nagel-Gymnasium in Berlin
 2003 – 2004 *Churchville-Chili High School in Rochester, New York, USA*
 2004 – 2006 Ernst-Haeckel-Oberschule in Berlin
 2006 Abitur

Studium:

2006-2008 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 2008 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 2008-2011 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 2011-2012 Praktisches Jahr im Rahmen des Medizinstudiums
 1. Tertial: Radiologie WKK Heide
 2. Tertial: Innere Medizin Städtisches Krankenhaus Kiel
 3. Tertial: Chirurgie UKSH Kiel
 Mai 2013 Approbation als Ärztin

Promotion:

2009-2012

Anfertigung der Dissertation an der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel mit dem Thema:
HPV-DNA, -mRNA-Expression und p16^{INK4A}-Immunhistochemie in Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches: Die Rolle von p16^{INK4A} als Surrogatmarker zur Identifikation aktiver humaner Papillomvirus-Infektionen.

Publikation:

HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker?

Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES, Henry H, Pfannenschmidt S, Burkhardt C, Görögh T, Halec G, Hoffmann AS, Kahn T, Röcken C, Haag J, Waterboer T, Schmitt M. Cancer Letters 2012 Oct 1, 323(1): 88-96. Epub 2012 Apr 3.

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation selbständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Diese Dissertation wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den _____

(Claudia Burkhardt)