

Aus der Frauenklinik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. G. Bender

# **HPV-Typisierung bei intraepithelialen Neoplasien von Vulva, Vagina und Anus, sowie bei Vulvakarzinomen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Heidi Barbro Marianne Sarajuuri

Als Inauguraldissertation gedruckt  
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Priv. Doz. Dr. med. Monika Hampf  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schaal

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Frau Privatdozentin Dr. med. Monika Hampl für die Ermöglichung und engagierte Betreuung dieser Arbeit. Auch in der Endphase der Fertigstellung, bei der uns zeitweise die Distanz zwischen Deutschland und Finnland voneinander trennte, stand Sie mir mit Rat und Tat zur Seite.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Hans G. Bender bedanken, in dessen Klinik ich diese Arbeit durchgeführt habe.

Herrn Dr. rer. nat. Dieter Niederacher und Frau Nora Hinssen aus dem Biomedizinischen Forschungszentrum danke ich für ihre unverzichtbare und unermüdliche Unterstützung und Beratung bei der Etablierung und technischen Realisation der molekularbiologischen Untersuchungen. Von ihnen erlernte ich die praktischen Fertigkeiten welche die Experimente erforderten und erfuhr auch insbesondere moralischen Beistand.

Frau Löhrmann aus der Frauenklinik danke ich für die Unterstützung bei der Präparation und Aufarbeitung des Probengewebes.

Bei den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie möchte ich mich für die Anfertigung und Befundung der histologischen Präparate bedanken.

Danken möchte ich auch insbesondere den Patientinnen, welche sich im Angesicht einer schwerwiegenden Erkrankung bereit erklärten, an der vorliegenden Untersuchung teilzunehmen, und hierdurch medizinischen Erkenntnisgewinn ermöglichten.

Meinen Freunden in Deutschland, insbesondere Anne Hachmöller, Bernd Graudejus und Esa Pasanen danke ich dafür, dass sie Deutschland, auch in schweren Phasen des Studiums, für mich zu einer zweiten Heimat gemacht haben.

Meine geliebten Eltern Frau Kyllikki Sarajuuri und Herr Erkki Sarajuuri sowie meine Geschwister Noora, Patrik und Mika unterstützten, bei all ihrer Sorge, meine Entscheidung zum Studium nach Deutschland zu gehen, um meinen Traum zu verwirklichen, Ärztin zu werden. Ohne ihre liebevolle Unterstützung hätte ich dieses Ziel niemals erreichen können und ich danke ihnen dafür von ganzem Herzen.

Mein abschließender Dank gilt meinem Freund Filip Scheperjans, der mich nicht nur mit seiner Erfahrung und muttersprachlichen Kompetenz bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützte, sondern es auch mit unermüdlicher Ausdauer schaffte, mich auch in Momenten der Verzweiflung wieder auf den richtigen Weg zu lotsen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Humane Papillomviren (HPV).....	1
1.1.1	Historischer Überblick.....	1
1.1.2	Morphologie und Klassifizierung.....	1
1.1.3	Epidemiologie der genitalen HPV-Infektion.....	2
1.1.4	Infektionsweg und Virusentwicklung.....	3
1.1.5	Virale Onkogenese.....	6
1.2	Anogenitale HPV-Manifestationen der Frau.....	7
1.2.1	Genitale Feigwarzen (Condylomata acuminata).....	7
1.2.2	Intraepitheliale Neoplasien.....	7
1.2.3	Maligne Erkrankungen.....	11
1.3	HPV-Nachweisverfahren.....	15
1.4	Immunprophylaxe der HPV-Infektion.....	15
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	Untersuchungsmaterial.....	17
2.2	Molekularbiologische Analysemethoden.....	18
2.2.1	DNA-Isolation.....	18
2.2.2	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	19
2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	20
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	22
2.2.5	DNA-Sequenzierung.....	23
2.3	Statistik.....	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>24</b>
3.1	Struktur der Stichprobe.....	24
3.2	Nachweis der HPV-Infektion.....	24
3.3	Verteilung der HPV-Typen.....	26
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>30</b>
4.1	Methodische Aspekte.....	30
4.2	HPV in anogenitalen Neoplasien und Karzinomen.....	31
4.2.1	Epidemiologische Aspekte.....	31
4.2.2	Molekularbiologische Aspekte.....	34
4.3	Effekt einer HPV-Immunprophylaxe auf die Epidemiologie der untersuchten Läsionen.....	36
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>39</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>40</b>
	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>54</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>55</b>

# 1 Einleitung

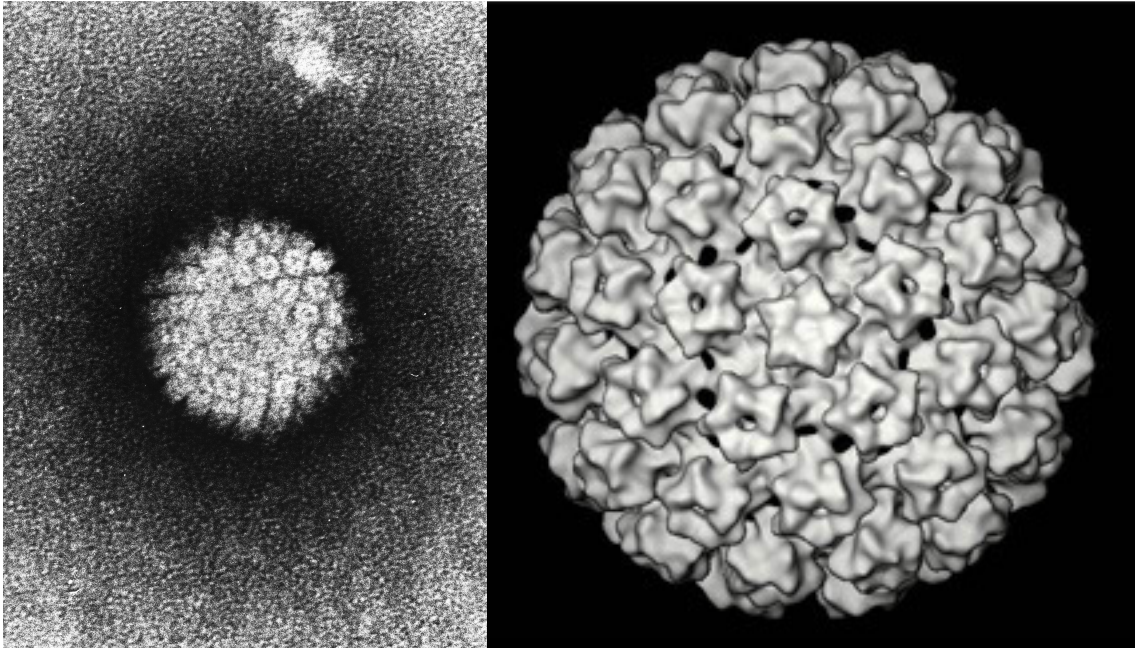
## 1.1 Humane Papillomviren (HPV)

### 1.1.1 Historischer Überblick

1954 wurde die HPV-Infektion bereits zu den sexuell übertragbaren Virusinfektionen gezählt. Damals gab es schon Hinweise darauf, dass bestimmte sexuelle Verhaltensweisen (z.B. Promiskuität, Aufnahme des Geschlechtsverkehrs in sehr jungen Jahren) Risikofaktoren für eine HPV-Infektion, und für das Entstehen des Zervixkarzinoms, darstellen [1-3]. 1956 wurde der Begriff „Koilozytose“ erstmals geprägt, das wichtigste zytologische Kriterium HPV-infizierter Zellen, welche sich im Abstrich durch helle Höfe um mehr oder weniger dysplastisch veränderte Zellkerne auszeichnen [4]. Vor knapp 40 Jahren wurde auf das Vorhandensein intranukleärer Virusteilchen in Condylomata acuminata hingewiesen [5]. Zytologische Beobachtungen ermöglichten im Jahre 1976 die Beschreibung virusbedingter zytologischer Kriterien bei kondylomatösen und dysplastischen Veränderungen in Abstrichen der Portio uteri [6,7]. Zur Hausen (1977) wies in großen epidemiologischen Studien an zytologischem Abstrichmaterial auf den Zusammenhang zwischen der Entstehung des Zervixkarzinoms und dem Nachweis von Desoxyribonukleinsäure (DNA) des humanen Papillomvirus hin [8]. Papillomviruspartikel wurden damals elektronenmikroskopisch in koilozytisch veränderten Zellen nachgewiesen. Derselbe Autor brachte Papillomviren auch mit der Entstehung des Vulvakarzinoms in Zusammenhang, nachdem HPV-DNA in epithelialen Neoplasien der Vulva und in Vulvakarzinomen nachgewiesen worden war [9,10].

### 1.1.2 Morphologie und Klassifizierung

Humane Papillomviren gehören zur Familie der Papovaviridae. Sie besitzen ein relativ kleines doppelsträngiges Genom aus zirkulärer DNA mit einer Länge von ca. 8.000 Basenpaaren. Die Virusteilchen haben einen Durchmesser von 55 nm und sind nicht von einer Membran umhüllt. Es wurden bisher über 100 Typen humanpathogener Papillomviren vollständig genetisch charakterisiert [Übersichtsarbeit: 11]. Alle weisen die gleichen morphologischen Merkmale auf (Abb. 1), unterscheiden sich jedoch in ihren biologischen Eigenschaften (Regulation der Genexpression, Gewebetropismus, Onkogenität). Das Genom aller HPV ist sehr ähnlich aufgebaut und umfasst Gene für die Strukturproteine L1 (Hauptkapsidprotein) und L2 (Nebenkapsidprotein), sowie Gene für die sogenannten frühen Proteine (engl. early proteins) E1 bis E8 (siehe 1.1.4) [Übersichtsarbeit: 12].



**Abb. 1: Struktur humaner Papillomviren (HPV).** Links: Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild eines negativ angefärbten humanen Papillomvirus [Laboratory of Tumor Virus Biology, National Cancer Institute, National Institutes of Health]. Rechts: Dreidimensionale Computer-Rekonstruktion der Virushülle (Kapsid) [Department of Genetics, Stanford University].

Die Genotypisierung von HPV erfolgt auf der Basis der Sequenzen von L1, E6 und E7. Basierend auf der Fähigkeit der malignen Transformation infizierter Zellen werden die genitalen HPV-Typen in Niedrigrisiko (engl. low-risk) HPV (z.B. HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108), Hochrisiko (engl. high-risk) HPV (z.B. HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) und potenziell Hochrisiko (engl. potentially high-risk) HPV (z.B. HPV 26, 53, 66) eingeteilt [13,14]. Für die übrigen genitalen HPV-Typen ist das onkogene Potential bislang nicht genau charakterisiert.

### 1.1.3 Epidemiologie der genitalen HPV-Infektion

Papillomviren sind für die meisten sexuell übertragbaren Infektionen weltweit verantwortlich. Die meisten HPV-Infektionen verlaufen jedoch asymptomatisch und heilen spontan innerhalb von 12-18 Monaten aus [15,16]. Die Übertragung auf Frauen erfolgt durch, meist asymptomatisch infizierte, männliche Geschlechtspartner. Mit Aufnahme der sexuellen Aktivität findet eine rasche Durchseuchung mit HPV statt, die einer dänischen Studie zufolge bereits nach 24 Monaten bei 34,5% liegt [17]. In einer Studie aus den USA wurde die kumulative Neuinfektionsrate mit HPV 16 und 18 bei 18-20 Jahre alten Studentinnen mit ca. 7% pro Jahr angegeben [18]. Mindestens 50% aller sexuell aktiven Menschen erwerben im Laufe ihres Lebens eine genitale HPV-Infektion, und es wird geschätzt, dass 70%-80% aller Frauen bis zum 50. Lebensjahr HPV infiziert waren [16,18-22]. Die Prävalenz der HPV-Infektion in der Bevölkerung, d.h. die Anzahl der zu einem bestimmten Zeitpunkt HPV-positiven Individuen, wird auf ca. 10% weltweit geschätzt, mit einer landesabhängigen Schwankungsbreite von ca. 2%-26% [23,24]. Die Prävalenz ist am höchsten in der Altersgruppe zwischen 20 und

24 Jahren (ca. 20%-25%) und nimmt danach deutlich ab [24,25]. In einer longitudinalen Studie an sexuell aktiven adolescenten Frauen wurde, in einem Beobachtungszeitraum von 2,2 Jahren, eine kumulative Prävalenz der HPV-Infektion von 81,7% in vaginalem und zervikalem Abstrichmaterial ermittelt [16]. Hochrisiko-HPV fanden sich in 38,6% der Proben [16]. Bevölkerungsbezogene Studien in den USA zeigten bei 18-25 Jahre alten Frauen eine Prävalenz für die Hochrisiko-Typen 16 und 18 von 7,8% [26]. 25% der 20-29 Jahre alten Frauen in den USA sind seropositiv für HPV 16 [27]. Die Seroprävalenz eines ausgewählten Kollektivs junger sexuell aktiver Frauen (16-24 Jahre) mit höchstens 4 Sexualpartnern wurde mit 24% angegeben [28]. Jedoch weisen nur etwa 60% aller infizierten Frauen nachweisbare Serumantikörper auf [29], so dass die wirkliche Prävalenz hierbei unterschätzt worden sein kann. Es wird geschätzt, dass weltweit insgesamt über 290 Millionen Frauen Träger von HPV-DNA sind [24]. Über 30% davon sind mit Typ 16 oder 18, oder mit beiden, infiziert [24].

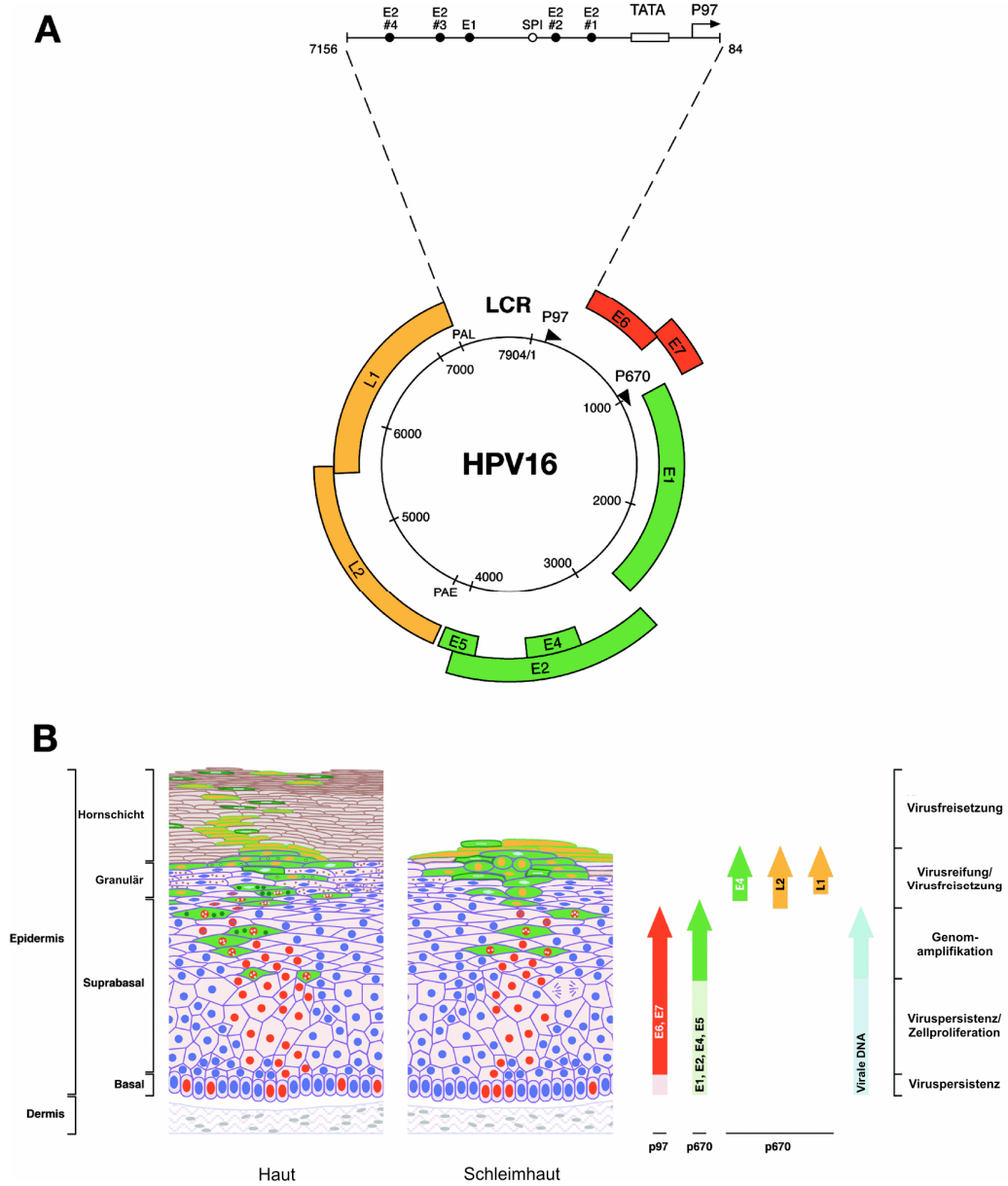
#### **1.1.4 Infektionsweg und Virusentwicklung**

Papillomviren können beim Menschen, bei zahlreichen Säugetieren und auch bei bestimmten Vögeln Warzen oder Papillome hervorrufen. Sie sind streng wirtsspezifisch, d.h. HPV infizieren ausschließlich den Menschen und animale Papillomviren können sich im Menschen nicht vermehren [Übersichtsarbeit: 30]. Der Mensch ist seit seinem Auftreten in der Evolution mit HPV infiziert. Humane Papillomviren haben sich in den letzten 2 Millionen Jahren parallel mit ihrem Wirtsorganismus entwickelt [31,32]. Phylogenetische Analysen von Varianten der HPV-Typen 16 und 18 sprechen dafür, dass HPV aus Afrika stammen und sich zusammen mit dem Menschen über die Erde verbreitet und entwickelt haben [33]. HPV sind nicht nur ausgesprochen wirtsspezifisch, sondern auch gewebespezifisch. Sie sind strikt epitheliotrop und infizieren ausschließlich mehrschichtige Plattenepithelien. Etwa die Hälfte aller HPV-Typen verursachen vorwiegend Infektionen der Schleimhäute, insbesondere im Anogenitalbereich (genitale HPV), und werden denjenigen die hauptsächlich verhornte Epithelien befallen (kutane HPV) gegenübergestellt [Übersichtsarbeit: 34]. Die Vermehrung von Papillomviren, d.h. vollständige Replikation, Genexpression und Virusreifung, sind nur in differenzierten, nicht mehr teilungsfähigen, Keratinozyten möglich. Nach einer mikroskopischen Hautverletzung gelangen die Viren zunächst in die unteren Schichten des Epithels. Damit wird ein Wachstumsreiz auf die befallenen Zellen ausgelöst. In diesem Stadium findet vornehmlich eine laterale Ausbreitung der Zellen in den basalen Epithelschichten statt und die Replikation der Virus-DNA, die üblicherweise in episomaler Form im Zellkern vorliegt, ist an die der Wirtszellen-DNA gekoppelt. Morphologische Zellveränderungen werden bei diesen sog. latenten Infektionen meist nicht beobachtet und es besteht aufgrund der fehlenden Viruspartikel-Reifung auch keine Infektiosität. Wahrscheinlich durch immunologische Vorgänge, kommt es meist zur spontanen Ausheilung der Läsion. Es kann jedoch auch zum Übergang in eine produktive Infektion kommen, bei der die Virus-DNA unabhängig von der Wirtszellen-DNA vervielfacht wird. Es erfolgt die Expression viraler Proteine. E1- und E2-Proteine spielen eine Rolle bei der viralen Replikation und Transkription, wohingegen E4 bei der Freisetzung des Virus aus der

infizierten Epithelzelle involviert ist. E5 interagiert mit Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Die für die kanzerogene Wirkung mancher HPV-Typen verantwortlichen Onkogene sind E6 und E7. Durch ihre Aktivität werden chromosomale Aberrationen begünstigt und ihre Produkte sind u.a. in der Lage Epithelzellen zu immortalisieren (siehe 1.1.5). Die Funktionen der Gene E3 und E8 sind bisher nicht vollständig geklärt. In den höheren Lagen der Epidermis setzt die Virusreifung (d. h. der Zusammenbau viraler Partikel) ein. Die beiden strukturellen Proteine L1 und L2 bauen die Kapsidhülle des Virus auf, welche die wesentlichen Epitope für eine Immunneutralisation beinhaltet. Im keratinisierten Bereich weisen einzelne Kerne zum Teil hohe Partikelkonzentrationen auf. Die fertigen Viren werden mit den sich abschilfernden Superficialzellen in die Umgebung freigesetzt und können neue Infektionen verursachen. Klinisch imponieren derartige Läsionen als Kondylome oder niedriggradige intraepitheliale Neoplasien (siehe 1.2) und heilen in der überwiegenden Zahl der Fälle spontan innerhalb von 6-12 Monaten aus [Übersichtsarbeit: 35].

**Abb. 2 (nächste Seite): Organisation des HPV-Genoms (A) und der virale Replikationszyklus bei produktiver Infektion (B).** A: Das zirkuläre Genom von HPV 16 (7904 Basenpaare) dargestellt als schwarzer Ring mit den durch Pfeile markierten frühen (early, p97) und späten (late, p670) Promotor-Regionen. Die 6 frühen offenen Leserahmen (ORF; E1, E2, E4 und E5 in Grün, sowie E6 und E7 in Rot) werden, ausgehend von entweder p97 oder p670, zu verschiedenen Phasen der epithelialen Zelldifferenzierung exprimiert. Nach einem Wechsel der Spleißmuster und der Polyadenylierungs-Stelle von PAE nach PAL werden die späten ORFs (L1 und L2 in Orange), ebenfalls ausgehend von p670, exprimiert. Alle viralen Gene sind auf einem Strang des doppelsträngigen zirkulären DNA-Genoms kodiert. Die lange Kontroll-Region (LCR von 7156 bis 7184) ist vergrößert um die E2-Bindungsstellen und das TATA-Element des p97-Promotors darzustellen. Die Position der E1- und SP1-Bindungsstellen (Transkriptionsfaktoren) ist ebenfalls dargestellt. B: Auf der linken Seite der Abbildung finden sich schematische Epidermis-Querschnitte (Haut bzw. Schleimhaut). Die zeitliche Abfolge und das Ausmaß der viralen Genexpression während des HPV-Replikationszyklus sind durch Pfeile auf der rechten Seite der Abbildung schematisch dargestellt. Die mit dieser geordneten Genexpression assoziierten Schlüsselereignisse sind am rechten Rand der Abbildung aufgelistet. Zellen der Epidermis, die Zellzyklus-Marker exprimieren, sind durch rote Zellkerne markiert. Das Auftreten derartiger Zellen oberhalb der Basalschicht ist eine Konsequenz der HPV-Infektion, insbesondere der Expression der viralen Onkogene E6 und E7. Die Expression von, für die Genom-Replikation notwendigen, viralen Proteinen findet in E6 und E7 exprimierenden Zellen, nach Aktivierung von p670 in den oberen epithelialen Schichten, statt (grüne Zellen mit roten Kernen). Die Gene L1 und L2 (orange) werden in einer Untergruppe von Zellen in den oberen epithelialen Schichten exprimiert, welche amplifizierte virale DNA enthalten. Zellen mit infektiösen Partikeln (grüne Zellen mit orangefarbenen Kernen) werden schließlich von der epithelialen Oberfläche abgeschilfert. Die Expression von E6 und E7, in der Gegenwart niedriger Konzentrationen von E1, E2, E4 und E5, ermöglicht die Persistenz des viralen Genoms (Viruspersistenz / Zellproliferation). Eine Erhöhung der Konzentration dieser Replikationsproteine erlaubt dessen Amplifikation. Das erste Auftreten von L2 erlaubt die Initiierung des Reifungsprozesses und die Expression von L1 schließlich die Formierung infektiöser Partikel. Die Akkumulation von E4 an der epithelialen Oberfläche verbessert möglicherweise die Effizienz der Virusfreisetzung [Übersichtsarbeit: 38].





Differenzierungsvorgänge der Keratinozyten scheinen somit eine wichtige Rolle im Replikationszyklus der HPV, und damit bei der Pathogenese von Papillomvirus-erkrankungen, zu spielen [12,14,36,37]. Eine detailliertere Darstellung der molekularbiologischen Organisation des HPV-Genoms und des Replikationszyklus liefert Abb. 2. Außerhalb der Wirtszelle bleiben HPV sehr lange stabil und infektiös. Der strikt epitheliale Replikationszyklus ermöglicht eine Minimierung des Kontaktes mit dem Immunsystem. Bemerkenswerterweise findet sich keine begleitende Entzündungsreaktion, und das angeborene Immunsystem wird bei akuten HPV-Infektionen nicht bzw. erst spät auf den Erreger aufmerksam. Insgesamt gilt es als Kennzeichen der HPV-Infektion, dass das Immunsystem des Wirtes das pathogene Agens lange Zeit ignoriert, was den chronischen und unvorhersagbaren Verlauf der natürlichen HPV-Erkrankung bedingt [Übersichtsarbeiten: 12,30,39]. Die hohe spontane Ausheilungsrate (siehe oben) demonstriert jedoch, dass das Immunsystem der infizierten Personen in der überwiegenden Zahl der Fälle in der Lage ist, die Infektion erfolgreich zu bekämpfen [15,16].

### 1.1.5 Virale Onkogenese

Wichtige Voraussetzung für die Induktion epithelialer Tumoren durch HPV ist die Fähigkeit der Viren, abnormales Zellwachstum zu stimulieren (gesteigerte Proliferation). Eine vorübergehende HPV-Infektion an sich ist jedoch nicht ausreichend für die Entstehung eines Karzinoms. Dies wird durch die Tatsache unterstrichen, dass nur ein kleiner Prozentsatz HPV-infizierter Patienten diese Tumoren, oder deren Vorstufen (hochgradige intraepitheliale Neoplasie), entwickelt.

In HPV-induzierten Karzinomen liegt offenbar eine Störung der produktiven, d.h. zur Virusfreisetzung führenden, Infektion vor. Reife Viruspartikel lassen sich daher in Karzinomen selten nachweisen. Die virale DNA persistiert jedoch (persistierende Infektion), und ist üblicherweise in das Wirtsgenom integriert [40,41]. Diese Integration stellt ein Schlüsselereignis bei der malignen Transformation der Zielzelle dar, da es hierdurch zu einer Stimulation der Expression der HPV-Gene E6 und E7 kommen kann, welche daraufhin ihre onkogene Aktivität entfalten. Sie interagieren mit zellulären Proteinen, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind. Beispielsweise inaktivieren sie die zellulären Tumorsuppressorproteine p53 (E6) und pRb (E7) [Übersichtsarbeiten: 12,14]. Die Deaktivierung solcher Tumorsuppressoren durch HPV-Proteine beeinflusst die Zelldifferenzierung und führt zu gesteigerter Proliferation, genetischer Instabilität und Akkumulation onkogener Mutationen, mit dem möglichen Endresultat einer malignen Transformation [Übersichtsarbeiten: 30,39,42].

Die meisten Daten liegen über die Interaktion von E6 genitaler Hochrisiko-HPV mit dem Tumorsuppressor p53 vor. p53 ist ein nukleäres Protein, dessen Hauptfunktion in der transkriptionellen Aktivierung von Genen liegt, deren Genprodukte für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität verantwortlich sind. Die p53-Expression wird als Antwort auf zelluläre DNA-Schäden erhöht. p53 aktiviert dann verschiedene Gene, die entweder zu einem Verharren des Zellzyklus in der G1-Phase führen, oder den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren. Das Verharren in der G1-Phase ermöglicht es der Zelle, DNA-Schäden zu reparieren, bevor sie in die S-Phase fortschreitet. Durch Apoptose werden Zellen mit schweren Genomschäden eliminiert [Übersichtsarbeit: 12]. Dieser Schutzmechanismus wird somit durch E6 gestört. E7 stimuliert seinerseits über die Inaktivierung von pRb den Eintritt der Zelle in die S-Phase und die Zellproliferation. Bezüglich der Proteine E6 und E7 existieren funktionelle Unterschiede zwischen Hoch- bzw. Niedrigrisiko-HPV-Typen, was ein wichtiger Grund für das unterschiedliche onkogene Potential dieser Virustypen sein dürfte.

Obwohl die Integration der Virus-DNA prinzipiell zufällig an einer beliebigen Stelle des Wirtsgenoms auftreten kann, scheint es diesbezüglich besonders prädisponierte Regionen zu geben. Möglicherweise spielen Veränderungen des Expressionsmusters von Genen an oder nahe der Integrationsstelle ebenfalls eine Rolle bei der Krebsentstehung [Übersichtsarbeit: 38].

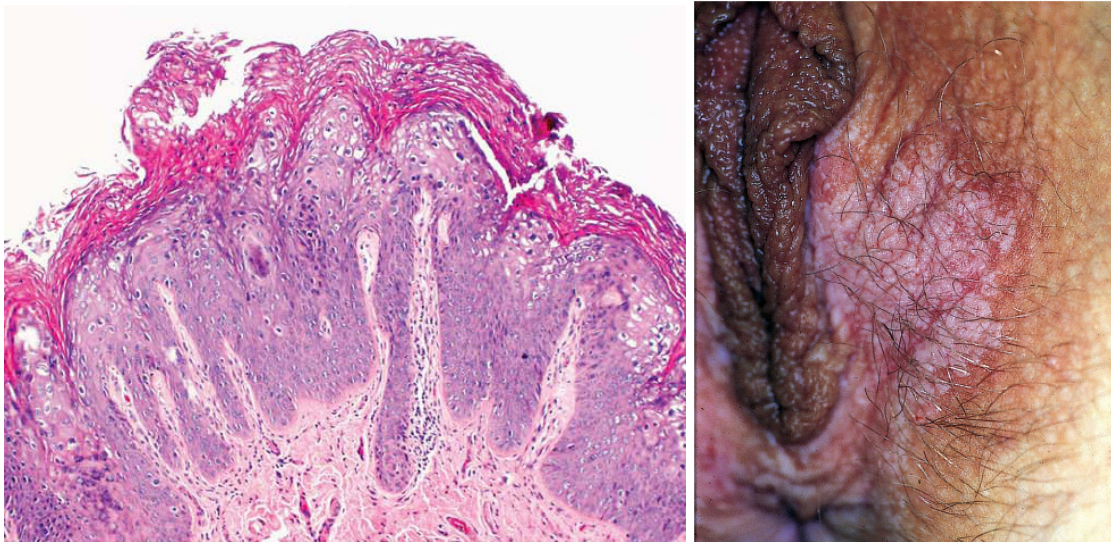
## 1.2 Anogenitale HPV-Manifestationen der Frau

### 1.2.1 Genitale Feigwarzen (*Condylomata acuminata*)

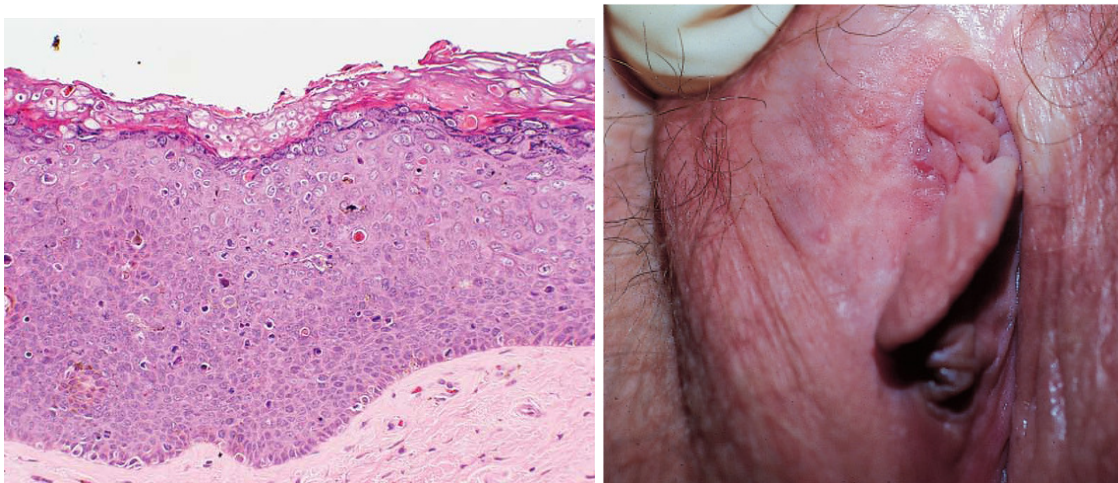
Es wird geschätzt, dass 1%-2% der sexuell aktiven Bevölkerung zwischen 15 und 49 Jahren von dieser Erkrankung betroffen sind [Übersichtsarbeit: 20]. Es handelt sich um anfangs kleine, stecknadelkopfgroße, mehr oder weniger pigmentierte Papeln, die sich im Verlauf beetförmig ausdehnen können, und in über 90% der Fälle von den Niedrigrisiko-HPV-Typen 6 und 11 hervorgerufen werden [Übersichtsarbeiten: 43,44]. Die Mehrzahl ist im Bereich der Vulva (meist hintere Kommissur) lokalisiert und bleibt asymptomatisch [Übersichtsarbeit: 45]. Beschwerden können jedoch durch Begleitentzündungen, wie z.B. Candidosen, auftreten. Eine histologische Evaluierung von neu aufgetretenen *Condylomata acuminata* bei Frauen unter 35 Jahren ist nicht notwendig. Bei älteren Frauen, sowie bei allen papulösen und makulösen Läsionen, bzw. bei Verdacht auf intraepitheliale Neoplasie (siehe 1.2.2), ist jedoch eine histologische Untersuchung, zum Ausschluss einer Malignität, unumgänglich [46,47]. In ca. 30% kommt es zur Spontanremission der Kondylome, insbesondere bei Schwangeren.

### 1.2.2 Intraepitheliale Neoplasien

Als intraepitheliale Neoplasie bezeichnet man eine histologisch nachweisbare Proliferation atypischer Zellen, die im Epithelverband (intraepithelial) bzw. im ursprünglichen Gewebskompartiment (in situ) liegen. Die Extremform, das Carcinoma in situ (CIS), zeigt die zytologischen Merkmale der Malignität (z.B. Zellpolymorphie, verschobene Kern-Plasma-Relation, Zunahme der Kerndichte) und gewebliche Differenzierungsstörungen. Es ist aber noch durch eine Basalmembran vom gefäßführenden Stroma abgegrenzt, und daher nicht zur Metastasierung befähigt [Übersichtsarbeit: 12]. Werden diese Vorläuferläsionen nicht therapiert, können sie, im Zeitraum von Jahren, eine allmähliche Progredienz zu einem invasiven Karzinom durchlaufen, und gelten somit als Präkanzerosen [48,49]. Je nach Lokalisation unterscheidet man in der Gynäkologie zervikale (CIN), vulväre (VIN), vaginale (VaIN) und anale (AIN) intraepitheliale Neoplasien [50,51]. Innerhalb jeder Gruppe wird der Schweregrad der Veränderung klassischerweise von 1 (niedriggradig) bis 3 (hochgradig) abgestuft, je nach der Ausdehnung der Atypien bzw. Dysplasie (1: basales Drittel des Epithels betroffen, Abb. 3; 2: basales und mittleres Drittel des Epithels betroffen; 3: basales, mittleres und oberes Drittel des Epithels betroffen, Abb. 4). Im englischen Sprachraum wird das CIS der Kategorie 3 zugeordnet [50,51]. Für zervikale Läsionen wurde diese Einteilung verlassen und, u.a. aufgrund eines besseren Verständnisses der Pathogenese, die Unterteilung in niedriggradige und hochgradige squamöse intraepitheliale Läsionen (LSIL bzw. HSIL) eingeführt [52,53].



**Abb. 3: VIN 1.** Links: Lichtmikroskopisches Bild mit ausgedehnten koilozytischen Veränderungen [54]. Rechts: Makroskopischer Aspekt mit unscharf begrenzter essigweißer Läsion, nativ lediglich als erythematöse Veränderung erkennbar [55].



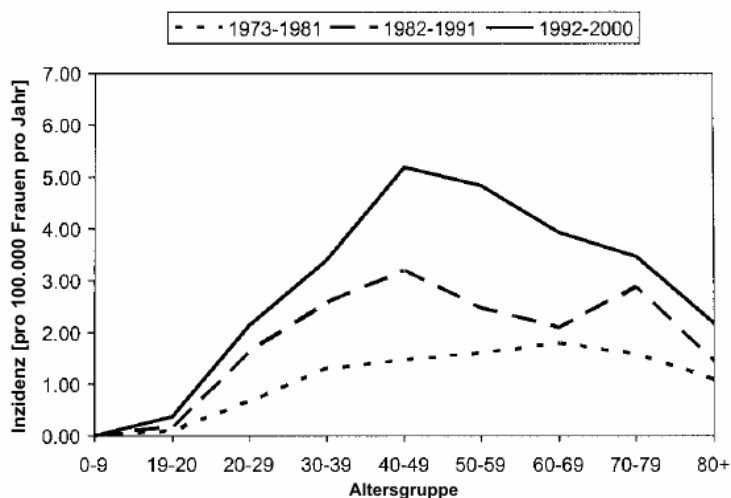
**Abb. 4: VIN 3.** Links: Lichtmikroskopisches Bild [54]. Rechts: Makroskopischer Aspekt mit unifokaler papillomatöser Läsion in periklitoridaler Lokalisation [55].

Die VIN ist, nach den zervikalen, die zweithäufigste dieser Läsionen (Abb. 3 u. 4). Der Begriff VIN enthält alle früher verwendeten Begriffe wie Bowen Krankheit, Bowenoide Papulose, Bowenoide Dysplasie, Erythroplasia de Queyrat, hyperplastische Dystrophie mit Atypien und Carcinoma simplex [50]. Bei der VIN 3 (Abb. 4) werden basaloide, kondylomatöse (beide werden nach neuer Nomenklatur als „klassische“ oder „gewöhnliche“ VIN bezeichnet; [Leitlinie: 56]) und differenzierte histologische Subtypen unterschieden. Die klassische VIN wird häufiger bei Frauen jünger als 55 Jahren gefunden und ist nahezu immer mit HPV-Infektionen assoziiert [Übersichtsarbeit: 57].

Bei der Inzidenz der VIN war eine deutliche Steigerung in den letzten 30 Jahren, besonders bei jüngeren Frauen, zu beobachten (Abb. 5) [58-62]. In den siebziger und achtziger Jahren hat sich die Inzidenz der VIN um den Faktor 2 bis 3 erhöht

[58,59,61,63]. Im Jahre 2000 (ca. 2,9 Fälle pro 100.000 Frauen pro Jahr) lag sie bereits fünfmal so hoch wie noch 1973 (ca. 0,6 : 100.000), und der Anstieg war am stärksten bei Frauen die jünger als 65 waren (Abb. 5) [62]. Während der Anteil von Frauen unter 50 Jahren mit VIN 2 oder 3 von 1985 bis 1988 noch bei 41% lag, lag er im Zeitraum von 1994 bis 1997 bei 60% [60].

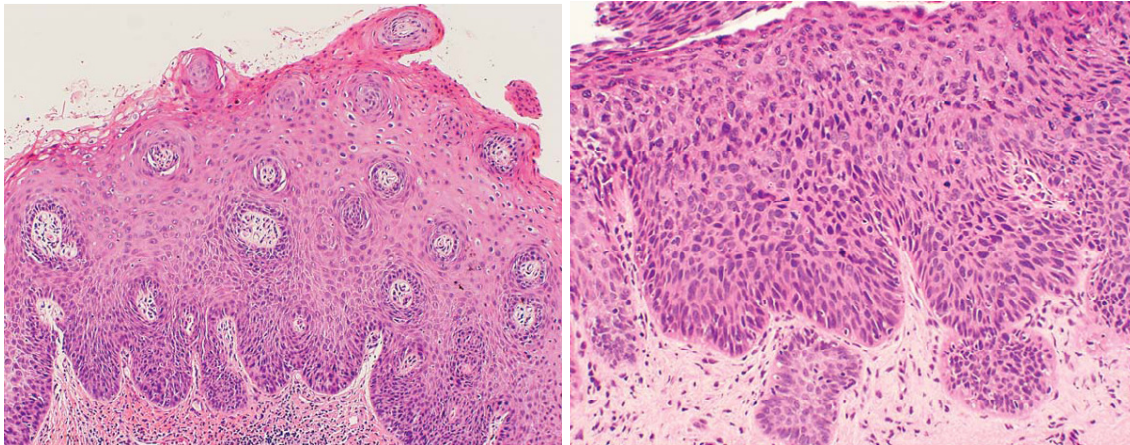
Als Gründe für diesen Anstieg kommen eine steigende Inzidenz von HPV-Neuinfektionen des unteren Genitaltraktes und/oder Verbesserungen diagnostischer Verfahren in Betracht. Die hochgradige VIN ist eine Präkanzerose und die Progressionsrate von der unbe-



behandelten VIN 3 zum invasiven Karzinom wurde in einer systematischen Übersichtsarbeit auf 9% geschätzt [64]. Die VIN, insbesondere die hochgradige, tritt nicht selten multifokal auf und rezidiert häufig (ca. 30%) [49,65,66]. Des Weiteren erhöht sie das Risiko für andere genitale Neoplasien (z.B. das Zervixkarzinom) [Übersichtsarbeit: 55].

Für die VIN wurden, analog zur CIN, die vorhandenen Einteilungen [50,51,67] kürzlich revidiert, da sie den natürlichen Verlauf einer VIN nicht adäquat berücksichtigten [Leitlinie: 56]. Demnach ist die VIN 1 ein seltener histologischer Befund der auf basalen Zellveränderungen oder minimalen Atypien basiert (Abb. 3). Diese Befunde sind häufig reaktiv oder HPV-Effekte. Es gibt keine Beweise dafür, dass die VIN 1 eine Karzinomvorstufe ist, und daher wäre in diesem Fall der Begriff „intraepitheliale Neoplasie“ für eine benigne Läsion irreführend. Hinzu kommt, dass mehrere Studien beachtliche Variationen innerhalb und zwischen Untersuchern bei der Diagnose von VIN 1 demonstrierten, und feststellten, dass diese diagnostische Kategorie nicht reproduzierbar ist [68,69]. Es wurde daher vorgeschlagen, den Begriff VIN 1 nicht weiter zu verwenden, sondern derartige Befunde als „flaches Condyloma acuminatum“ oder „HPV-Effekt“ zu bezeichnen [Leitlinie: 56]. Die meisten VIN-Läsionen wurden bisher als VIN 2 oder VIN 3 kategorisiert (Abb. 4). Um eine bessere histologische Einigkeit zu erreichen, wurde vorgeschlagen, VIN 2 und VIN 3 zu einer einzigen Kategorie zusammenzufassen („hochgradige VIN“) [56,69]. Diese Einteilung wurde in der vorliegenden Studie angewendet unter der Bezeichnung „VIN 2/3“. Diese Kategorie beinhaltet jedoch 2 Typen von Läsionen, die sich in Morphologie, Biologie und ihren klinischen Eigenschaften unterscheiden [Leitlinie: 56]. Nicht alle Autoren befürworten diese neue Klassifizierung, da auch in niedriggradigen Neoplasien Hochrisiko-HPV gefunden werden, wenn auch seltener als in hochgradigen Läsionen [54].

Die VaIN ist mit einer Neuerkrankungsrate von 0,2 : 100.000 seltener als die VIN. Von der Erkrankung sind jedoch im Mittel jüngere Frauen betroffen, wobei der Altersgipfel im 53. Lebensjahr liegt [70]. Die Kriterien für die Graduierung (Grad 1–3) der VaIN wurden für die vorliegende Studie denen der VIN angeglichen, d.h. VaIN 2 und 3 wurden zu „VaIN 2/3“ zusammengefasst (Abb. 6).



**Abb. 6: Lichtmikroskopisches Bild der VaIN.** Links: VaIN 1. Rechts: VaIN 3 [54].

Die genaue Inzidenz der AIN ist nicht bekannt [Übersichtsarbeit: 71]. Sie wird jedoch mit zunehmender Häufigkeit bei Patienten mit Immunschwächesyndromen (z.B. HIV-Infektion) gefunden [Übersichtsarbeiten: 72-74]. In einer Studie an über 600 homosexuellen Männern wurde eine AIN bei 52% der HIV-positiven und bei 17% der HIV-negativen Patienten nachgewiesen [75]. Die Progressionsrate der AIN 3 zum invasiven Karzinom wurde auf 5% geschätzt [76,77]. In der vorliegenden Studie wurden aus Gründen der Einheitlichkeit auch die AIN-2- und AIN-3-Läsionen zu „AIN 2/3“ zusammengefasst.

Bei der Pathogenese der intraepithelialen Neoplasien spielt wahrscheinlich eine persistierende HPV-Infektion (siehe 1.1.4), welche weniger als 10% der HPV-infizierten Frauen betrifft, eine Rolle [Übersichtsarbeit: 48]. Hochrisiko-HPV-Typen werden am häufigsten identifiziert. Niedrigrisiko-HPV-Typen (z.B. HPV 6, 11, 40, 42-44) finden sich in intraepithelialen Neoplasien häufiger als in Karzinomen [12,66,78-89], und in niedriggradigen Läsionen häufiger als in hochgradigen [54,81,90,91]. Daten über die Prävalenz von HPV-Infektionen und -Typen bei intraepithelialen Neoplasien liegen hauptsächlich für Zervixläsionen vor. Vergleichbare Daten für VIN, VaIN und AIN sind spärlich, was teilweise durch das seltenere Auftreten dieser Erkrankungen begründet sein dürfte (siehe oben).

Bei zervikalen, vulvären, vaginalen und analen Neoplasien muss, aufgrund der gemeinsamen HPV-assoziierten Pathogenese, in bis zu 50% der Fälle mit einem multifokalen Geschehen gerechnet werden [55,66,92]. Aus diesem Grund ist bei der Untersuchung im gesamten Anogenitalbereich besonderes Augenmerk auf eine syn- oder metachrone Entstehung plattenepithelialer Tumoren zu legen.

### 1.2.3 Maligne Erkrankungen

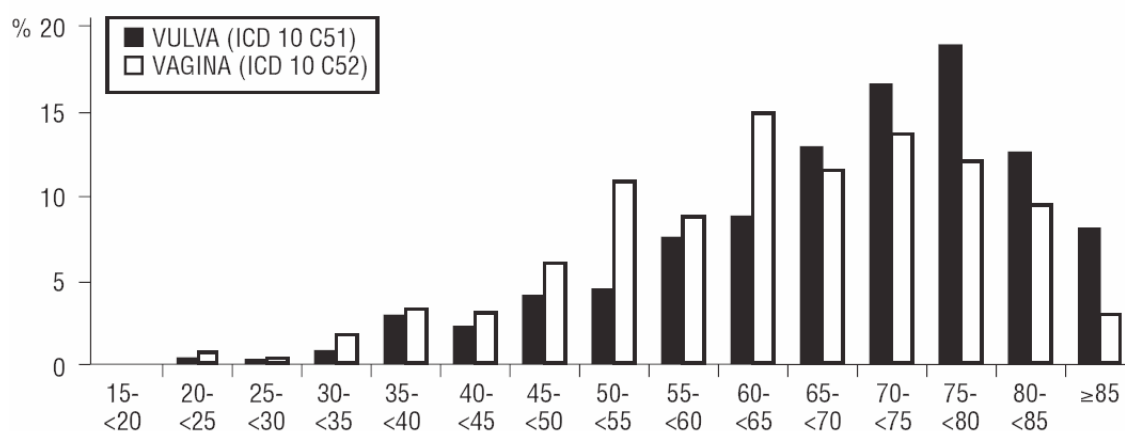
Durch die oben beschriebenen intrazellulären Prozesse können HPV (in erster Linie Hochrisiko-Typen) zu einer malignen Transformation ihrer Zielzellen führen. Unter den malignen epithelialen Tumoren ist die ätiologische Bedeutung von HPV für die Entstehung des Zervixkarzinoms gesichert [13,93,94]. Gemessen von der Primärinfektion bis zum Auftreten eines invasiven Zervixkarzinoms zieht sich dieser Prozess wahrscheinlich über bis zu 12 Jahre hin [Übersichtsarbeiten: 48,95]. Für andere anogenitale Karzinome fehlen entsprechende Daten. Epidemiologische Studien an Zervixkarzinom-Proben zeigten, dass 99,7% dieser Tumoren HPV-positiv sind. Die Inzidenz des Zervixkarzinoms liegt bei 12-15 : 100.000 [Übersichtsarbeit: 96]. Das mittlere Alter bei der Erstdiagnose des Zervixkarzinoms beträgt 54,1 Jahre [Übersichtsarbeit: 96]. In Deutschland ereignen sich ca. 6.500 Neuerkrankungen und 1.600 Todesfälle pro Jahr [97]. Bei den unter 50-jährigen Frauen ist das Zervixkarzinom die zweithäufigste Krebserkrankung nach dem Brustkrebs. Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt in Deutschland ca. 55% [Übersichtsarbeit: 96].

Auch in anderen Karzinomen des weiblichen Anogenitalbereiches (Vulvakarzinom, Vaginalkarzinom, Analkarzinom) [98-100] sowie in Peniskarzinomen [Übersichtsarbeit: 101] und Krebserkrankungen des Kopfes und Halses [102,103] wurden HPV (meist Hochrisiko-Typen) nachgewiesen [Übersichtsarbeit: 12]. Die Datenlage ist jedoch weit spärlicher als für das häufigere Zervixkarzinom. Das Vulvakarzinom (siehe 1.2.3.1) ist nach dem Zervixkarzinom die häufigste anogenitale Krebserkrankung (Inzidenz in Deutschland 1,5-3,6 : 100.000) [Übersichtsarbeit: 96]. Das Analkarzinom findet sich bei Frauen seltener (Inzidenz 0,9 : 100.000). Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung ist 61 Jahre [104]. Erwähnenswert ist, dass sich die Inzidenz in den letzten 20 bis 30 Jahren bei Männern um 96% und bei Frauen um 39% erhöht hat, und jährlich weiter steigt [72,105]. Bei HIV-positiven homosexuellen Männern finden sich heute Inzidenzen von bis zu 35 : 100.000, bei HIV-negativen sind sie nur halb so hoch [106,107]. Analkarzinome sind meist Plattenepithelkarzinome. Letzteres trifft auch für das Vaginalkarzinom zu (Inzidenz 0,4 : 100.000; 0,2 : 100.000 für CIS). Das primäre Vaginalkarzinom macht lediglich 1%-2% der malignen gynäkologischen Tumoren aus, und das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 60 und 65 Jahren [108,109]. In ca. 30% geht ein intraepitheliales oder invasives Zervixkarzinom voraus. Die meisten malignen Tumoren in der Vagina sind per continuitatem aus der Zervix, der Vulva, der Urethra oder der Harnblase in die Vagina eingewachsen [Leitlinie: 110]. Ist die Portio befallen und die Region des Muttermundes erreicht, gilt der Tumor als Zervixkarzinom, ist die Vulva gleichzeitig befallen, gilt der Tumor als Vulvakarzinom. Daneben ist die Vagina häufig Lokalisation von Metastasen genitaler Tumoren, weswegen für die Diagnose eines primären Vaginalkarzinoms die Tumorfreiheit von Vulva, Zervix und Corpus uteri zu fordern ist [Leitlinie: 110]. Dies gilt sowohl für die Primär- als auch für die Rezidiv-erkrankung. Erst beim Vorliegen eines krankheitsfreien Intervalls von 5 Jahren, nach der Primärdiagnose eines anderen genitalen Karzinoms, darf die Manifestation eines vaginalen plattenepithelialen Tumors als Zweiterkrankung eingeordnet werden.

Da von den genannten Karzinomen das Vulvakarzinom in die vorliegende Studie aufgenommen wurde, und es das häufigste HPV-assoziierte Karzinom nach dem Zervixkarzinom ist, soll auf dieses im Folgenden näher eingegangen werden.

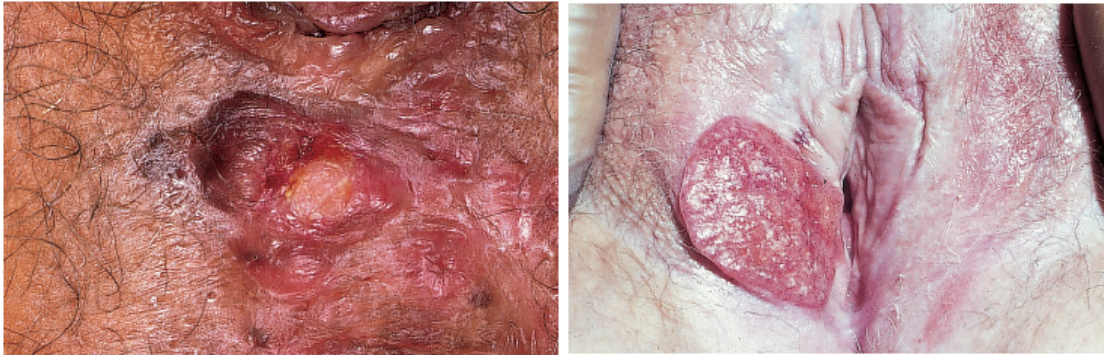
### 1.2.3.1 Vulvakarzinom

Das Vulvakarzinom ist das vierthäufigste gynäkologische Karzinom. Es ist fünfmal seltener als das Zervixkarzinom. Schätzungen besagen, dass sich in den USA im Jahr 2006 3.740 Neuerkrankungen (Inzidenz 2,2 : 100.000 zwischen 2000 und 2003) und 880 Todesfälle (Mortalität im selben Zeitraum 0,4 : 100.000) durch Vulvakarzinome ereigneten [104]. In Deutschland erkrankten jährlich ca. 1.600 Frauen und 650 starben im Jahr 2000 an Vulvakarzinomen (Inzidenz ca. 2,5 : 100.000; Mortalität ca. 1,3 : 100.000) [Übersichtsarbeit bzw. Leitlinie: 111,112]. Die Inzidenz steigt von 0,4 : 100.000 bei den 30-jährigen auf 20 : 100.000 bei den über 70-jährigen Frauen an [Leitlinie: 112]. Im Zeitraum von 1996 bis 1997 lag das mediane Alter bei der Diagnosestellung eines Vulvakarzinoms in Deutschland bei 70 Jahren (USA 2000 bis 2003: 69 Jahre; [104]), ungefähr 5-10 Jahre höher als beim Vaginalkarzinom (siehe oben; Abb. 7) [Übersichtsarbeit: 111]. 24,2% der Patientinnen in Deutschland waren bei Diagnosestellung jünger als 60 Jahre (1977-1999) [Übersichtsarbeit: 111]. In den USA fanden sich ungefähr 0,2% der Karzinome bei Frauen jünger als 20 Jahre und 26,9% bei Frauen unter 55 Jahren. Die meisten Neuerkrankungen (25,2%) traten in den USA zwischen dem 75 und 84 Lebensjahr auf. Wie auch bei der hochgradigen VIN (siehe 1.2.2), jedoch geringer ausgeprägt, fand sich in den letzten Jahrzehnten ein Anstieg der Inzidenz, besonders bei jüngeren Frauen [58,60,62,84,88,113]. Es zeigte sich in den USA zwischen 1975 und 2003 ein jährlicher Anstieg der Inzidenz des Vulvakarzinoms um 0,6% [104]. Eine andere Arbeit berechnete eine Steigerung von 20% zwischen 1973 und 2000 [62]. Jedoch stieg in einer österreichischen Studie der Anteil von unter 50-jährigen Patientinnen von 5% im Zeitraum von 1985 bis 1988 auf 16% im Zeitraum von 1994 bis 1997, was einer Verdreifachung entspricht [60].



**Abb. 7: Altersverteilung der Patientinnen mit Vulva- bzw. Vaginalkarzinom.** Der prozentuale Anteil verschiedener Altersgruppen ist angegeben. Das mediane Alter bei Diagnosestellung ist beim Vulvakarzinom 5-10 Jahre höher als beim Vaginalkarzinom [111].

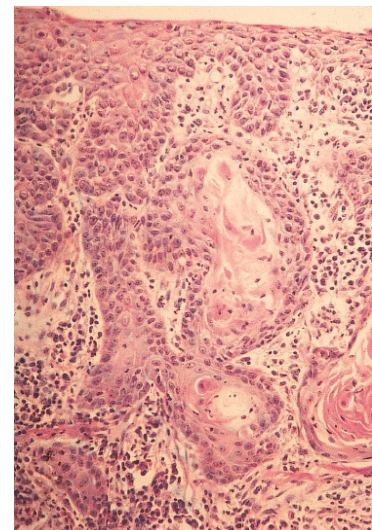




**Abb. 8: Makroskopischer Aspekt des Vulvakarzinoms.** Links: FIGO Ia inmitten einer VIN-3-Läsion mit beginnender Stromainvasion. Rechts: FIGO II mit invasiv wachsendem Tumor (Durchmesser = 4 cm) [114].

Beim Staging des Vulvakarzinoms wird im Frühstadium das oberflächlich invasive Karzinom abgegrenzt, welches durch eine maximale Invasionstiefe von 1 mm bei einem maximalen Durchmesser von 2 cm definiert ist (entspricht pT1a, FIGO Stadium Ia; Abb. 8) [114,115]. In diesem Stadium haben die Patientinnen noch eine sehr gute Prognose [57,116]. 61% der Vulvakarzinome werden im lokal begrenzten Stadium (entspricht  $\leq T2$ , FIGO Stadium  $\leq II$ ; Abb. 8) diagnostiziert. Bei 28% findet sich zum Diagnosezeitpunkt bereits eine regionale Lymphknotenmetastasierung oder Umgebungsinfiltration (entspricht  $\geq T3$  oder  $\geq N1$ , FIGO Stadium III-IVa). Bei 4% existieren bereits Fernmetastasen (M1, FIGO Stadium IVb) [104,114,115]. Die 5-Jahres-Überlebensrate in den USA wird für den Zeitraum von 1996 bis 2002 mit 78,1% angegeben (93,2% für lokalisierte Befunde, 55,1% für Befunde mit Lymphknotenmetastasierung oder Umgebungsinfiltration, 18,0% für Tumoren mit Fernmetastasen) [104]. In Deutschland liegt die mittlere Überlebenszeit bei 3,1 Jahren [111]. Der Anteil des Vulvakarzinoms an den krebisbedingten Sterbefällen in Deutschland betrug 1999 0,5% [111,117].

Das Plattenepithelkarzinom ist mit einem Anteil von 95% der häufigste maligne Tumor der Vulva (Abb. 9). Die Subtypen, welche sich pathogenetisch sowie bezüglich ihrer Aggressivität und Altersverteilung unterscheiden, werden im Folgenden beschrieben [57,89,118-121]. Das invasive verhornende Plattenepithelkarzinom zeigt selten eine HPV-Assoziation und findet sich meist als solitäre Läsion bei älteren Frauen (Altersgipfel bei 77 Jahren) [Übersichtsarbeit: 57]. Es ist häufig assoziiert mit nicht-neoplastischen Epithelläsionen der Vulva, wie z.B. Lichen sclerosus (siehe unten) [122,123]. Die entsprechenden Vorläuferläsionen werden als „einfache VIN“ bezeichnet und sind nicht immer leicht von nicht-neoplastischen Veränderungen zu unterscheiden [Leitlinie: 56]. Die



**Abb. 9: Vulvakarzinom unter dem Lichtmikroskop.** Hochdifferenziertes Plattenepithelkarzinom mit Infiltration des subepithelialen Bindegewebes [57].

meisten dieser Karzinome sind verhornend und weisen eine gute Differenzierung mit kompaktem Wachstumsmuster auf (Abb. 9). Diese Karzinome sind meist aggressiver und neigen früher zu Rezidiven und Metastasen als HPV-positive Tumoren [85,124]. Bei jüngeren Frauen treten häufiger HPV-positive Varianten (Altersgipfel bei 55 Jahren) in Form von nicht verhornenden, basaloiden oder kondylomatösen, Karzinomen auf [57,58,84,88,125,126]. HPV 16 ist der am häufigsten in diesen Tumoren nachgewiesene Virustyp [79,80,82,86,87,98,127-131]. Sie sind häufig mit einer hochgradigen VIN oder einer anderen HPV-induzierten genitalen Neoplasie assoziiert [66,120,121,123]. Diese Karzinome wurden in den letzten Jahrzehnten häufiger diagnostiziert und haben vermutlich eine bessere Prognose als HPV-negative Tumoren [Übersichtsarbeit: 85]. Neben dem Basaliom (Basalzellkarzinom) existiert, als weitere seltenere Variante, das, mit HPV 6 und 11 assoziierte, verruköse Karzinom (Buschke-Löwenstein-Tumor, Condyloma giganteum). Diese seltene Sonderform des Condyloma acuminatum (siehe 1.2.1) unterscheidet sich von diesem durch invasives, destruierendes Wachstum ohne Metastasierung, und tritt u.a. bei älteren oder immunsupprimierten Patienten auf [Übersichtsarbeit: 57]. Der Morbus Paget und das Melanom sind, im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom, weitaus seltenere vulväre Neoplasien und nicht mit HPV assoziiert.

Als Risikofaktoren für die Entwicklung von Vulvakarzinomen sind, neben persistierenden HPV Infektionen und damit assoziierten VIN, auch andernorts lokalisierte anogenitale intraepitheliale Neoplasien oder Karzinome, sowie Herpes genitalis, Syphilis und Immunschwächesyndrome (z.B. AIDS) identifiziert worden [98,132]. Nicht infektiösaasoziierte Faktoren, die das Risiko für ein Vulvakarzinom erhöhen, sind das Rauchen, nordeuropäische Abstammung, sowie vulväre Dystrophien [133]. Die atrophische Form der Vulvadystrophie wird heute als Lichen sclerosus (alte Bezeichnung: Craurosis vulvae) bezeichnet, und ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen der Vulva (Abb. 10). Es handelt sich um eine entzündliche Erkrankung, welche sich meist in der Postmenopause, manchmal jedoch auch früher, erstmals mit Jucken, Brennen und Schmerz bemerkbar macht.

Das klinische Bild zeigt eine blasse, weißliche Hautfarbe, wobei Hyperkeratosen, Einblutungen, Fissuren, Erosionen oder Ulzerationen vorkommen können. Meist aber ist die Vulvaoberfläche verdünnt und runzlig. Die Veränderungen treten häufig symmetrisch auf und können sich auf die gesamte Vulva erstrecken. Durch nachfolgende Schrumpfungsprozesse kann es zur



**Abb. 10: Lichen sclerosus.** Weißliche Atrophie der Labia minora mit kratzbedingten Exkorationen [134].

Atrophie der Labien und zur Einengung des Introitus kommen [135,136]. Obwohl die Ursache weitgehend unbekannt ist, legt die Altersverteilung einen Zusammenhang mit Östrogenmangel nahe. Auch autoimmunologische und genetische Faktoren werden diskutiert. Vulvakarzinom und Lichen sclerosus sind, insbesondere im Alter, häufig assoziiert. Zelluläre Atypien kommen bei der reinen Form des Lichen sclerosus nicht vor, und der Lichen an sich ist daher keine Präkanzerose. Im Bereich von Atrophien kann es jedoch zu einer malignen Regeneration kommen, was die Basis von über 25% der Vulvakarzinome sein dürfte [Übersichtsarbeit: 137].

### 1.3 HPV-Nachweisverfahren

Aufgrund der größeren Bedeutung der HPV-Diagnostik für genitale Infektionen sind Verfahren zum Nachweis und zur Typisierung von HPV vor allem für genital auftretende HPV-Typen entwickelt worden. Da die hochspezifischen Entwicklungsbedingungen der HPV in vitro schwer reproduzierbar sind, existiert bis heute kein effizientes in vitro Kultursystem zur Anzucht. HPV-Infektionen können jedoch durch verschiedene direkte und indirekte Verfahren nachgewiesen werden (z.B. Licht- und Elektronenmikroskopie von Abstrichen und Gewebeproben, serologischer Nachweis von Antikörpern, Antigen-nachweis, Southern Blot Hybridisierung, in situ Hybridisierung, Polymerasekettenreaktion) [Übersichtsarbeit: 34]. Serum-Antikörper gegen HPV werden als ein Marker für lang andauernde Infektion und kumulativ hohe Expression von Viruspartikeln angesehen. In vielen Fällen persistieren sie über Jahre mit niedrigen Titern auch nach Abheilung. Da aber nicht alle infizierten Personen Antikörpertiter entwickeln, erreicht die Sensitivität des Antikörper-Nachweises selbst bei HPV-DNA-positiven Patienten nur 50%-60%, weshalb die Serodiagnostik für die Routine nicht geeignet erscheint. Warum eine humorale Immunantwort gegen HPV nur bei jedem zweiten Patienten nachweisbar ist [29], ist nicht geklärt, das Fehlen einer Virämie dürfte jedoch eine Rolle spielen [Übersichtsarbeit: 12]. Ein, aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität, weit verbreitetes Verfahren ist der HPV-DNA Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) [138-147]. Für den Nachweis genitaler Schleimhaut-assoziiertes HPV werden am häufigsten die MY-Primer und die GP-Primer verwendet [Übersichtsarbeit: 34]. Die GP-Primer sind, im Gegensatz den MY-Primern, nicht degeneriert und haben für den Nachweis einzelner HPV-Typen eine höhere Sensitivität [148]. Das Spektrum der erfassten HPV-Typen mit den GP-Primern ist allerdings kleiner als mit den MY-Primern [Übersichtsarbeit: 34]. Eine zweistufige PCR mit beiden Primern erhöht dementsprechend die Sensitivität der HPV-PCR-Analyse [145,149,150].

### 1.4 Immunprophylaxe der HPV-Infektion

Nachdem in Tierexperimenten gezeigt werden konnte, dass Virus-neutralisierende Antikörper gegen die Kapsidproteine L1 bzw. L2 in Serum und Vaginalsekret vor einer Papillomvirus-Infektion schützen [151,152], wurde angenommen, dass diese Proteine sich am ehesten als Antigene für die Herstellung eines prophylaktischen Impfstoffes

eigenen. L1-Proteine können sich selbständig zu kompletten Kapsiden formieren, was die Herstellung sogenannter Virus-ähnlicher Partikel (engl. virus-like particles = VLP) ermöglicht. Hierbei handelt es sich um Strukturen, die äußerlich nicht von echten Viren zu unterscheiden sind, jedoch keine Erbsubstanz zur Replikation beinhalten. Sie sind in der Lage, in Kombination mit einem Adjuvans, das Immunsystem, wie die echten Viren, oder sogar noch effektiver, zu stimulieren [153,154]. Diese VLPs können mit gentechnischen Methoden HPV-Genotyp-spezifisch hergestellt werden.

Zwei auf dieser Basis hergestellte Impfstoffe (Cervarix<sup>®</sup>, bivalent gegen HPV 16/18, GlaxoSmithKline & MedImmune; Gardasil<sup>®</sup>, quadrivalent gegen HPV 6/11/16/18, Sanofi Pasteur & Merck) werden zur Zeit, im Rahmen von doppelblinden Placebo-kontrollierten Studien, klinisch erprobt [Übersichtsarbeiten: 155-157]. Die in den Impfstoffen enthaltenen Genotypen sind für ca. 70% aller Zervixkarzinome (Typen 16 und 18) [13,158-160] und 90% aller Fälle von anogenitalen Warzen (Typen 6 und 11) [44] verantwortlich, spielen aber auch eine Rolle bei anderen Karzinomen (siehe 1.2.3). Bisherige Studienergebnisse zeigten für beide Präparate eine hohe Immunogenität und Nebenwirkungsarmut, und die Impfstoffe wurden, nach den erfolgreichen Phase-II-Studien (Wirksamkeitsstudien), unverändert für den Einsatz in den Phase-III-Studien (Zulassungsstudien) übernommen. Für den bivalenten Impfstoff wurde, nach einem Beobachtungszeitraum von bis zu 4,5 Jahren, bei HPV-negativen Frauen ein nahezu 100%-iger Schutz vor persistierenden HPV-Infektionen und CIN berichtet [161-163]. Bis zu 5 Jahre nach Impfung mit dem quadrivalenten Impfstoff konnte ebenfalls ein nahezu 100%-iger Schutz bei HPV-naiven nachgewiesen werden [164-167]. Zusätzlich bot dieser Impfstoff einen bis zu 100%-igen Schutz vor Kondylomen [165]. Die Schutzwirkung beruht offenbar auf der Induktion von Genotyp-spezifischen neutralisierenden Antikörpern, welche in Serum und Genitalsekret nachgewiesen werden können [168-170]. Gardasil<sup>®</sup> wurde im Juni 2006 in den USA und im September 2006 in Europa, noch vor Beendigung der Phase-III-Studien, zugelassen [171]. Für Cervarix<sup>®</sup> wurde das Zulassungsverfahren für Europa im Oktober 2007 positiv abgeschlossen. Langzeitergebnisse der multizentrischen Studien, welche insgesamt über 50.000 Frauen beobachten, werden bis 2009 erwartet [155,172,173].

## 1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Wie oben erwähnt, ist die Datenlage zur HPV-Prävalenz und Verteilung verschiedener HPV-Typen in intraepithelialen Neoplasien von Vulva, Vagina und Anus, sowie in Vulvakarzinomen sehr spärlich. Es ist daher schwer, den epidemiologischen Effekt einer Impfung gegen bestimmte HPV-Typen auf das Auftreten dieser Läsionen abzuschätzen. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Raten von HPV-Infektionen und die Häufigkeiten verschiedener HPV-Typen in chirurgischen Proben von VIN, VaIN, AIN und Vulvakarzinomen in einem Patientenkollektiv aus 2 Zentren in Düsseldorf zu untersuchen. Hauptziele waren die Bestimmung des Anteils von Hochrisiko-HPV-Typen (insbesondere HPV 16 und 18) und eine daraus abgeleitete Abschätzung des Effektes eines prophylaktischen Impfstoffes auf die Inzidenz dieser Läsionen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Das Protokoll der vorliegenden Studie wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zugelassen. Im Zeitraum von Januar 2000 bis April 2006 wurden 122 Patientinnen in die Studie eingeschlossen, die entweder dem Dysplasie-Zentrum der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf (Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf) oder einer ambulanten Dysplasie-Sprechstunde (Königsallee 64, 40212 Düsseldorf) zugewiesen worden waren. Alle Patientinnen erklärten schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie und unterzogen sich einer chirurgischen Behandlung bestehend aus entweder einer CO<sub>2</sub>-Laser-Vaporisation (Verdampfung) nach Biopsie, einer CO<sub>2</sub>-Laser-Exzision (Entfernung) oder einer Messer-Exzision einer vulvären, vaginalen oder analen intraepithelialen Neoplasie [Leitlinie: 134]. Bei Patientinnen mit der Verdachtsdiagnose eines Vulvakarzinoms wurde, zur präoperativen Diagnosebestätigung, eine kolposkopisch gesteuerte Biopsie durchgeführt. Die chirurgische Intervention bei Vulvakarzinomen umfasste entweder eine weiträumige lokale Exzision oder eine Vulvektomie, inklusive einer kompletten inguinofemorale Lymphadenektomie [Leitlinien: 112,174].

Alle folgenden histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurden unter Blindbedingungen durchgeführt. 148 Proben mit der Diagnose einer intraepithelialen Neoplasie der Vulva (VIN 1-3), Vagina (VaIN 1-3) oder Analregion (AIN 1-3), oder eines invasiven Plattenepithelkarzinoms der Vulva, wurden zunächst in die Studie eingeschlossen. Diese Klassifizierung wurde von gynäkologisch erfahrenen Pathologen an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Serienschnitten dieser Proben, auf Basis von publizierten histomorphologischen Kriterien, vorgenommen [Leitlinie: 175]. Während der Arbeit an dieser Studie wurden neue Leitlinien für die Terminologie vulvärer intraepithelialer Neoplasien von der Internationalen Gesellschaft zur Erforschung vulvovaginaler Erkrankungen (engl. International Society for the Study of Vulvovaginal Disease; ISSVD) publiziert (siehe 1.2.2) [Leitlinie: 56]. Die frühere Einteilung der plattenepithelialen vulvären intraepithelialen Neoplasien in niedriggradige (VIN 1), mittelgradige (VIN 2), oder hochgradige Läsionen inklusive Carcinoma in situ (VIN 3) wurde verlassen. Die Bezeichnung VIN 1 wird in den neuen Leitlinien nicht mehr empfohlen, und die Bezeichnung „hochgradige VIN“ umfasst jetzt die früheren Läsionen VIN 2 und VIN 3. 3 histologisch als VIN 1 klassifizierte Proben bzw. 2 Patientinnen wurden aus der Studie ausgeschlossen, da diese Läsionen nach der neuen Klassifikation nicht mehr als Neoplasien angesehen werden [Leitlinie: 56]. Die 88 Proben mit einer der Diagnosen VIN 2 oder VIN 3 wurden zu einer Gruppe mit der Bezeichnung „VIN 2/3“, entsprechend einer hochgradigen VIN, zusammengefasst. Im Einklang mit dieser Umverteilung wurde eine Probe mit der Diagnose VaIN 1 ausgeschlossen und 9 Proben

der Gruppen VaIN 2 und VaIN 3 als „VaIN 2/3“, sowie 20 Proben der Gruppen AIN 2 und AIN 3 als „AIN 2/3“ zusammengefasst. Insgesamt wurden somit 117 Proben mit histologisch gesicherten intraepithelialen Neoplasien des unteren Genitaltrakts von 95 Patientinnen (18 Patientinnen hatten 2 oder mehr Läsionen), und 27 Proben mit der Diagnose eines oberflächlich invasiven oder invasiven Vulvakarzinoms von 27 Patientinnen (2 Patientinnen hatten zusätzlich eine intraepitheliale Neoplasie) in die Analyse einbezogen.

Für die Analyse von HPV-DNA in den einzelnen Proben wurden Serienschritte (Schnittdicke = 5 µm) aus Regionen mit den jeweils meisten krankheitsspezifischen histologischen Veränderungen selektiert. Einwegskalpells wurden benutzt um eine Übertragung von DNA zwischen den Proben zu vermeiden.

## **2.2 Molekularbiologische Analysemethoden**

### **2.2.1 DNA-Isolation**

Entparaffinierung und Extraktion der genomischen DNA wurden mittels des QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (QIAGEN<sup>®</sup>, Hilden, Deutschland) durchgeführt und es wurde exakt nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen:

Entparaffinierung:

Die paraffinierte Gewebeprobe (maximal 25 mg) wurde mit 1.200 µl Xylol kräftig auf einem Vortex vermischt und 5 min. bei Raumtemperatur und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Um verbliebene Xylolreste zu entfernen wurden 1.200 µl absolutes Ethanol zu dem Gewebepellet gegeben, vorsichtig vermischt, 5 min. bei Raumtemperatur und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Diese Schritte wurden nochmals wiederholt. Das offene Reaktionsgefäß wurde bei 37°C inkubiert, bis das Ethanol vollständig verdunstet war. Schließlich wurde das Gewebepellet in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert.

DNA-Extraktion:

20 µl Proteinase-K-Stammlösung (20 mg/ml entsprechend 600 mAU/ml) wurden zum Ansatz aus der Entparaffinierung pipettiert, kräftig gemischt und bei 56°C für ca. 3 Stunden, unter Verwendung eines Wipp-Schüttelapparates, inkubiert, bis das Gewebe vollständig lysiert war. Das Reaktionsgefäß wurde kurz abzentrifugiert um Kreuzkontaminationen durch Verspritzen von Probenflüssigkeit im Deckelinneren beim Öffnen des Gefäßes zu vermeiden. Anschließend wurden 200 µl AL-Puffer zu der Probe gegeben, kräftig durchmischt, für 10 min. bei 70°C inkubiert und kurz abzentrifugiert. Danach wurden 200 µl Ethanol zur Probe gegeben, kräftig vermischt und kurz abzentrifugiert. Die Mischung wurde dann vorsichtig auf eine QIAamp Spinsäule (in einem 2-ml-

Collection-Tube) gegeben und für 1 min. bei 8.000 rpm zentrifugiert. Die QIAamp Spinsäule wurde anschließend in ein sauberes 2-ml-Collection-Tube gestellt und das benutzte Collection-Tube mitsamt Filtrat verworfen. Nach Zugabe von 500 µl AW1-Puffer wurde die QIAamp Spinsäule für 1 min. bei 8.000 rpm zentrifugiert. Die QIAamp Spinsäule wurde danach in ein sauberes 2-ml-Collection-Tube gestellt und das benutzte Collection-Tube mitsamt Filtrat verworfen. Im Anschluss wurden 500 µl AW2-Puffer zur QIAamp Spinsäule gegeben und für 3 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das benutzte Collection-Tube wurde mitsamt Filtrat verworfen, die QIAamp Spinsäule in ein sauberes 2-ml-Collection-Tube gestellt und für 1 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das benutzte Collection-Tube wurde mitsamt Filtrat verworfen und die QIAamp Spinsäule wurde schließlich in ein sauberes 1,5-ml-Reaktionsgefäß gesetzt. Zur Elution der DNA wurden 200 µl AE-Puffer auf die Spinsäule gegeben, für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und die Spinsäule anschließend für 1 min. bei 8000 rpm zentrifugiert. Dieser Elutionsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und das Eluat bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

### 2.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten DNA wurde mittels spektrophotometrischer Messung bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum doppelsträngiger DNA, ermittelt (Spektrophotometer, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland). Dazu wurde die DNA-Probe mit destilliertem Wasser (A.d.) im Verhältnis 1 : 150 verdünnt. Als Referenz wurde der Leerwert von A.d. verwendet.

Die DNA-Konzentration wurde anschließend mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes berechnet:

$$c = \frac{E \cdot v}{\epsilon \cdot d}$$

$c$  = DNA-Konzentration [ng/µl]

$E$  = Extinktion

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA (0,02 µl · ng<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>)

$d$  = Schichtdicke (1 cm)

$v$  = Verdünnung (150)

Etwaige Proteinverunreinigungen wurden durch eine zusätzliche Messung bei 280 nm erfasst.

### 2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Analyse von HPV-DNA in Probenmaterial mittels PCR kann prinzipiell zwischen der Klassifikation von Proben in HPV-positive und HPV-negative (Screening), und der Identifizierung bestimmter HPV-Typen unterschieden werden. Sogenannte Konsensusprimer (oder Universalprimer) basieren auf der kodierenden Sequenz des HPV-Proteins L1 und sind nicht spezifisch für einen bestimmten HPV-Typ. Sie eignen sich für die Amplifizierung nahezu aller bekannten HPV-Typen und dienen somit der Detektion HPV-DNA-positiver Proben (Screening, hohe Sensitivität) [34,145]. Wird eine Identifikation der Virustypen gewünscht, stehen prinzipiell 2 Methoden zur Verfügung: 1) die erneute Analyse jeder HPV-positiven Probe mittels Typ-spezifischen Primern [139], oder 2) die Sequenzierung der PCR-Produkte aus dem Screening (PCR-Direktsequenzierung; PCR-DS) und Vergleich der Basensequenzen mit den Sequenzen bekannter Virustypen [176]. Die PCR-DS-Methode ist verlässlicher und minimiert Fehlklassifizierungen, und wurde daher in der vorliegenden Studie verwendet [34,145].

Die Vervielfältigung HPV-spezifischer DNA erfolgte mittels zweistufiger Polymerasekettenreaktion (engl. two-tier-PCR; Tab. 1) [145], zunächst unter Verwendung des Konsensusprimerpaares GP5+/GP6+. Negativ getestete Proben, und solche mit nur sehr schwachen Banden, wurden, mittels des Konsensusprimerpaares MY09/MY11, erneut untersucht [144,145]. Die Integrität der genomischen DNA wurde mittels Multiplex-PCR, unter Verwendung eines Interferon- $\gamma$ -(IFN- $\gamma$ )-Primerpaares, verifiziert. Da das IFN- $\gamma$ -Gen in jeder menschlichen Zelle vorhanden ist, eignet es sich als Indikator für die Unversehrtheit der Erbsubstanz.

Als Positivkontrolle wurde eine Suspension von CaSki-Zellen verwendet, welche in einer Monolayer-Kultur gezüchtet worden waren. Bei dieser Zell-Linie handelt es sich um Zervixkarzinomzellen mit ca. 600 Kopien von im Genom integrierter DNA des HPV 16 [177,178]. Sie ist molekularbiologisch gut charakterisiert und findet breite Verwendung als Modell für Studien zur HPV-induzierten Zelltransformation und als Positivkontrolle für den HPV-Infektionsnachweis [179]. In HPV-positiven zervikalen intraepithelialen Neoplasien finden sich im Mittel, je nach HPV-Typ, zwischen 30 und 800 Kopien des HPV-Genoms pro Zelle [180], wobei jedoch eine Schwankungsbreite bis um den Faktor  $10^6$  zu beobachten ist [180,181]. Höhergradige neoplastische Veränderungen weisen tendenziell höhere Viruslasten auf [182-184].

Als Negativkontrolle wurde A.d. verwendet.

Zur Abschätzung der Nachweisgrenze wurde, vor der Analyse des Probenmaterials, eine Verdünnungsreihe der CaSki-Suspension (DNA-Konzentration 10 ng/ $\mu$ l) analysiert. Als Hintergrund-DNA wurde DNA der Zell-Linie MCF12A (10 ng/ $\mu$ l) verwendet. Hierbei handelt es sich um nicht-tumorigene menschliche Brustdrüsenzellen, welche keine HPV-DNA enthalten [185]. Zu jeweils 45 $\mu$ l MCF12A-DNA wurden in jedem Verdünnungsschritt 5  $\mu$ l CaSki-DNA (10 ng/ $\mu$ l –  $10^{-8}$  ng/ $\mu$ l) gegeben (entsprechend einer Verdünnung der Ursprungslösung von 1:10 – 1:10<sup>10</sup>). Diese Lösungen wurden mit der gleichen Nachweismethode wie auch das Probenmaterial analysiert. Hierbei konnte



HPV-DNA mit beiden Konsensusprimerpaaren (GP5+/GP6+ bzw. MY09/MY11) jeweils bis zu einem Verdünnungsverhältnis der CaSki-Ursprungslösung von 1:10<sup>4</sup>, entsprechend einer HPV-Kopienzahl von ca. 10<sup>4</sup>/µg DNA, nachgewiesen werden. Eine Normalisierung der Kopienzahl auf µg DNA ist sinnvoll, da der DNA-Gehalt der Proben, u.a. aufgrund unterschiedlicher Zellzahlen und Aneuploidie, Schwankungen bis um den Faktor 10<sup>7</sup> aufweisen kann und die ermittelte Nachweisgrenze nach Normalisierung unabhängig vom Gehalt zellulärer DNA in der Probe ist [182].

Sequenzen der verwendeten Primer:

GP5+ (forward): 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'

GP6+ (reverse): 5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'

MY09 (forward): 5'-CGTCC(A,C)A(A,G)(A,G)GGA(A,T)ACTGATC-3'

MY11 (reverse): 5'-GC(A,C)CAGGG(A,T)CATAA(C,T)AATGG-3'

IFN  $\gamma$  (forward): 5'-AGTGATGGCTGAACTGTCCG-3'

IFN  $\gamma$  (reverse): 5'-CTGGGATGCTCTTCGACCT-3'

Fragmentgrößen der PCR-Produkte:

GP5+/6+: 139-145 Basenpaare

MY09/11: ca. 450 Basenpaare

IFN  $\gamma$ : 85 Basenpaare

PCR-Ansatz:

10xPCR-Puffer

(0,5 M KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Gelatine, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,3) 1,5 µl

Template-DNA (10 ng/µl) 5,0 µl

dNTPs (10 mM) 3,0 µl

Forward-Primer (GP5+/MY09) (10 pmol/µl) 2,0 µl

Reverse-Primer (GP6+/MY11) (10 pmol/µl) 2,0 µl

A.d. ad 15,0 µl

Taq-DNA-Polymerase-Mix

(0,5 µl 10xPCR-Puffer, 0,4 µl Taq-Polymerase [5 U/µl], A.d. ad 5,0 µl) 5,0 µl

## Multiplex-PCR-Ansatz:

10xPCR-Puffer	
(0,5 M KCl, 25 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1% Gelatine, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,3)	2,0 µl
Template-DNA (10 ng/µl)	5,0 µl
dNTPs (10 mM)	3,0 µl
Forward-Primer GP5+	2,0 µl
Reverse-Primer GP6+	2,0 µl
Forward-Primer IFN γ	2,0 µl
Reverse-Primer IFN γ	2,0 µl
A.d.	ad 20,0 µl
Taq-DNA-Polymerase-Mix	
(0,5 µl 10xPCR-Puffer, 0,4 µl Taq-Polymerase [5 U/µl], A.d. ad 5µl)	5,0 µl

Tab. 1: PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung	94 °C	10 min.
40 Zyklen:		
Denaturierung	94 °C	20 sek.
Primeranlagerung	Anlagerungstemperatur*	20 sek.
Elongation	72 °C	40 sek.
finale Elongation	72 °C	5 min.

\* GP5+/6+: 39 °C; MY09/11: 45 °C; Multiplex: 45 °C

## 2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurden 1,5%ige Agarosegele, mit 1xTBE als Lösungsmittel und Laufpuffer, verwendet. Jeweils 5 µl der aufzutrennenden PCR-Produkte bzw. der Positiv- und Negativkontrollen wurden mit je 5 µl Ladungspuffer in getrennte Bahnen aufgetragen. Zur Quantifizierung der Fragmentlängen wurde in 2 Bahnen 5 µl eines DNA-Fragment Standard Gemisches aufgetragen (SmartLadder, Eurogentec, Seraing, Belgien). Bei 10 V/cm betrug die Laufzeit ca. 30-45 min. Im Anschluss wurde das Gel für ca. 30-60 min. in ein Ethidiumbromid-Bad (0,1 µg/ml) gegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die helikale Struktur der DNA, wodurch sich dessen Anregungsspektrum verändert. Bei Anregung mittels ultravioletten Lichts kann dann Fluoreszenz selektiv innerhalb der aufgetrennten DNA-Banden hervorgerufen werden. Diese Fluoreszenz wurde mittels einer Kamera detektiert und dokumentiert.

### 2.2.5 DNA-Sequenzierung

Die PCR-Produkte der HPV-positiven Proben wurden mittels des High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), gemäß den Anweisungen des Herstellers, aufgereinigt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde im Biomedizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf durchgeführt, unter Verwendung des BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.), mit 3-5 pmol GP6+ oder MY09 als Sequenzierungsprimer, sowie einem automatischen Sequenzierer des Modells ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit der Software GeneScan<sup>®</sup> 2.1.1 anhand der Fluoreszenzkurvenmuster bezüglich ihrer Qualität und Inter- sowie Intra-Ansatz-Konstanz kontrolliert. Multiple Fluoreszenzspitzenmuster wurden als Indikator für Mehrfachinfektionen angesehen. Die entsprechenden Proben wurden in einem solchen Fall mittels spezifischer Einzel-PCRs für die häufigsten HPV-Typen (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 51) erneut untersucht. Bezüglich der entsprechenden Versuchsprotokolle sei auf die Arbeit von van den Brule et al. verwiesen [139]. Die Sequenzen der übrigen Proben wurden mit in der GenBank Datenbank dokumentierten Virusesequenzen verglichen. Für diesen Prozess wurde das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) verwendet [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>; 186-189].

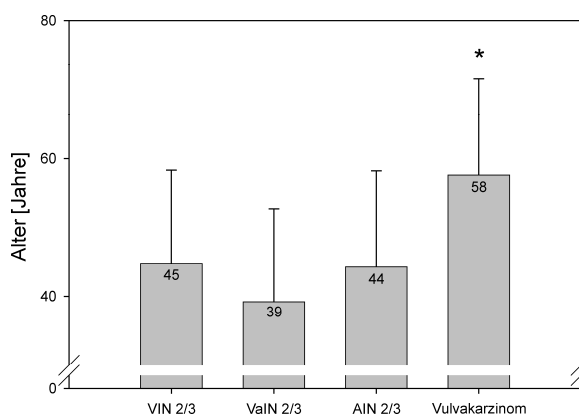
## 2.3 Statistik

Es wurden nach Alter und Histologie geschichtete Stichprobenanalysen durchgeführt. Signifikanztestung (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ) erfolgte mittels zweiseitigen T-Tests, Pearson  $\chi^2$ -Tests bzw. bei Chancenverhältnissen (engl. odds-ratios = OR) durch die Berechnung von 95%-Konfidenzintervallen (KI). Alle Analysen erfolgten mit dem Programm SYSTAT<sup>®</sup> 10.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Struktur der Stichprobe

Da in den letzten Jahren Verschiebungen der Altersverteilung anogenitaler neoplastischer Läsionen festgestellt wurden (siehe 4.2.1) und, weil diesbezügliche Unterschiede bzw. Veränderungen mit pathogenetischen Unterschieden zusammenhängen könnten, wurde zunächst die Altersverteilung in der untersuchten Stichprobe analysiert. Das Durchschnittsalter [Jahre $\pm$ SD] der Patientinnen lag bei 48 $\pm$ 15 Jahren. Bezogen auf die einzelnen Läsionstypen ergaben sich die folgenden Durchschnittsalter: VIN 2/3: 45 $\pm$ 13; VaIN 2/3: 39 $\pm$ 14; AIN 2/3: 44 $\pm$ 14; Vulvakarzinom 58 $\pm$ 14 (Abb. 11). Die Patientinnen mit Vulvakarzinomen waren signifikant älter als die Patientinnen mit intraepithelialen Neoplasien.



**Abb. 11: Durchschnittsalter der Patientinnen getrennt nach Läsionstyp.** Patientinnen mit Vulvakarzinom waren signifikant älter als diejenigen mit intraepithelialen Neoplasien (\* $p < 0,05$ ). Fehlerbalken = SD.

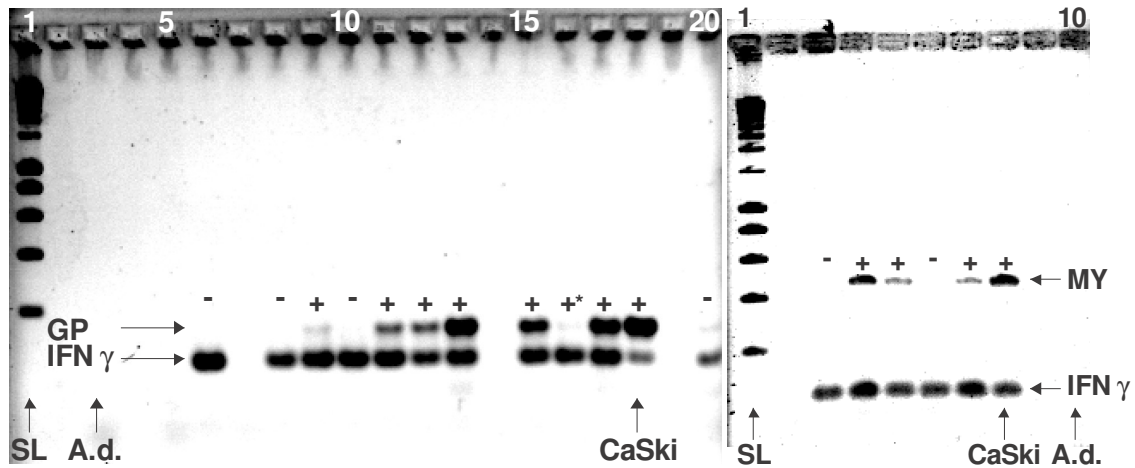
Überdies fanden sich bei 20% der Patientinnen mit intraepithelialen Neoplasien ( $n = 95$ ) multizentrische Erkrankungen (4 mal VIN, VaIN u. AIN, 4 mal VIN u. VaIN, 10 mal VIN u. AIN, 1 mal Vulvakarzinom u. AIN). Bei 2 Patientinnen wurde ein, aus einer umgebenden VIN 2/3 hervorgegangenes, oberflächlich invasives Karzinom diagnostiziert. In einem Fall fanden sich nebeneinander eine VIN 2/3 und ein oberflächlich invasives Vulvakarzinom.

#### 3.2 Nachweis der HPV-Infektion

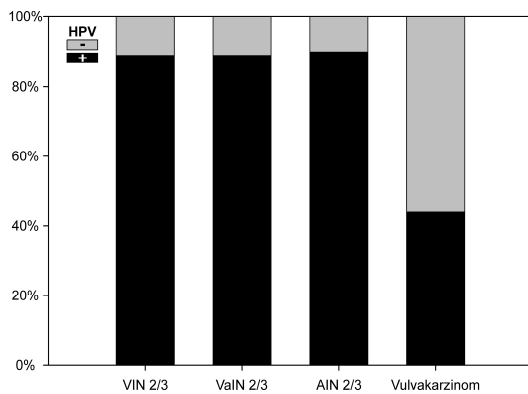
In diesem Untersuchungsabschnitt wurde der Frage nachgegangen, wie hoch die HPV-Infektionsrate in den untersuchten Läsionen ist, um die Relevanz der HPV-Infektion für die Entstehung dieser Läsionen abschätzen zu können. Die molekularbiologischen Methoden zum HPV-Nachweis lieferten qualitativ hochwertige und reproduzierbare Ergebnisse. Die Negativkontrollen (A.d.) erbrachten sämtlich negative und die Positivkontrollen (CaSki-Zellen; HPV 16) positive Ergebnisse in der PCR (Abb. 12).

Bezogen auf die gesamte Stichprobe ( $n = 144$ ) lag der prozentuale Anteil der HPV-positiven Proben bei 81%. Bezogen auf die einzelnen Läsionstypen ergaben sich die folgenden Anteile: VIN 2/3: 89%; VaIN 2/3: 89%; AIN 2/3: 90%; Vulvakarzinom: 44% (Abb. 13). Der Anteil der HPV-positiven Proben war also bei den Vulvakarzinomen

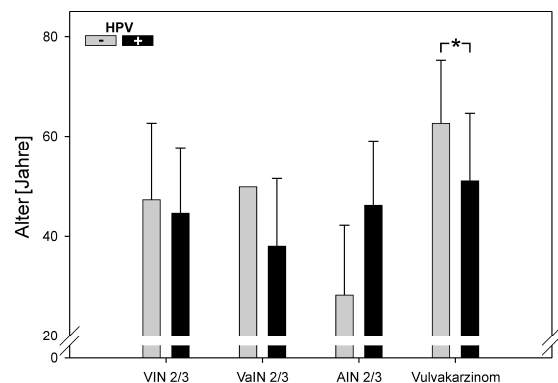
deutlich niedriger als bei den nicht-karzinomatösen Läsionen. Die Wahrscheinlichkeit einer HPV-Infektion war bei den intraepithelialen Neoplasien zehnmal so hoch wie beim Vulvakarzinom (Alle: OR 10,0; 95% KI 3,9 – 25,9; VIN 2/3: 9,8; 95% KI 3,6 – 26,6; Tab. 2).



**Abb. 12: Auftrennung der Multiplex-PCR-Produkte.** Links: GP5+/6+. Rechts: MY09/11. Die fluoreszierenden DNA-Banden im Agarosegel entsprechen den Produkten des IFN- $\gamma$ -Primerpaares (untere Reihe) bzw. des HPV-Primerpaares (obere Reihe). Proben mit eindeutig sichtbarer Bande auf Höhe des HPV-Primerpaares in der GP-PCR wurden als positiv klassifiziert (+). Alle schwach positiven (+\*) und negativen (-) Proben wurden zusätzlich einer MY-PCR unterzogen. Nur, wenn auch in der MY-PCR keine Bande erkennbar war, wurde die entsprechende Probe als negativ klassifiziert. SL = SmartLadder.



**Abb. 13: Prozentualer Anteil HPV-positiver Proben (schwarz) bei den untersuchten Läsionstypen.** Der Anteil war beim Vulvakarzinom deutlich geringer als bei den anderen Läsionen.



**Abb. 14: Durchschnittsalter der Patientinnen, getrennt nach Läsionstyp und HPV-Status.** Patientinnen mit HPV-positiven Vulvakarzinomen sind signifikant jünger als diejenigen mit HPV-negativen Läsionen (\* $p < 0,05$ ). Fehlerbalken = SD.

**Tab. 2: Abhängigkeit des HPV-Status vom Läsionstyp**

Läsionstyp	HPV-positiv	HPV-negativ	Gesamt
Intraepitheliale Neoplasie	104 (89)*	13 (11)	117 (100)
Vulvakarzinom	12 (44)	15 (56)	27 (100)
Gesamt	116 (81)	28 (19)	144 (100)

[n (%)]; \* Intraepitheliale Neoplasien sind signifikant häufiger HPV-positiv als Vulvakarzinome.

Die Patientinnen mit HPV-positiven Vulvakarzinomen ( $51 \pm 13$ ) waren signifikant jünger als diejenigen mit HPV-negativen Tumoren ( $63 \pm 13$ ; Abb. 14). Bei Vulvakarzinom-Patientinnen jünger als 56 Jahre war die Wahrscheinlichkeit einer HPV-Infektion (Anteil infizierter Patientinnen 67%) mehr als fünfmal so hoch (OR 5,5; 95% KI 1,1 – 28,9; Tab. 3) wie bei älteren Patientinnen (Anteil infizierter Patientinnen 27%). Derartige Unterschiede wurden bei den anderen Läsionstypen nicht beobachtet.

**Tab. 3: Altersabhängigkeit des HPV-Status beim Vulvakarzinom**

Alter bei Diagnosestellung	HPV-positiv	HPV-negativ	Gesamt
< 56 Jahre	8 (67)*	4 (33)	12 (100)
≥ 56 Jahre	4 (27)	11 (73)	15 (100)
Gesamt	12 (44)	15 (56)	27 (100)

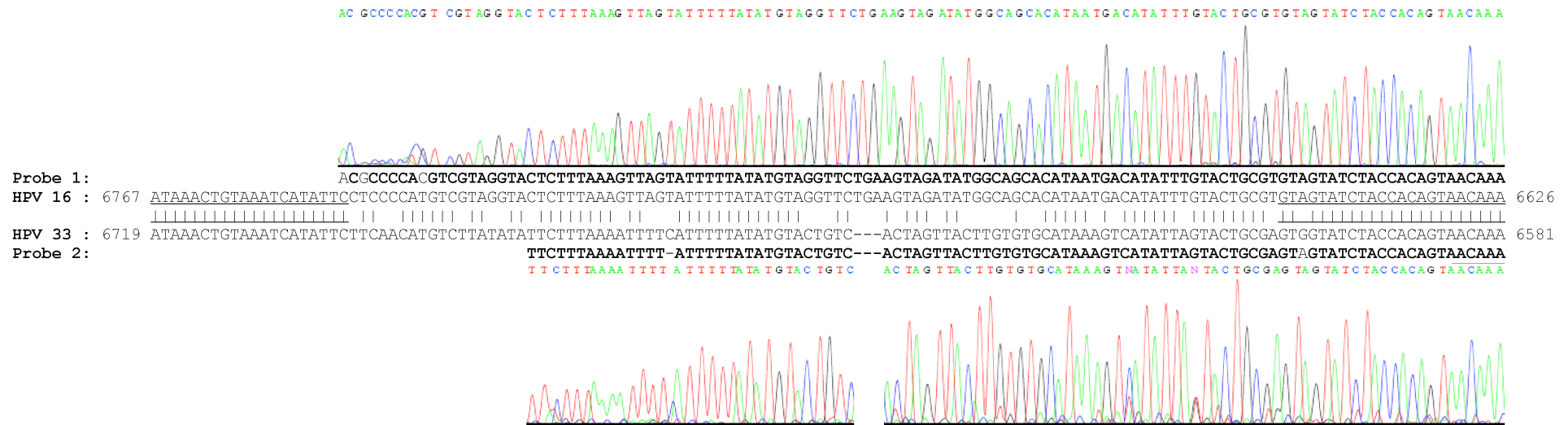
[n (%)]; \* Die Wahrscheinlichkeit einer HPV-Infektion ist bei Vulvakarzinomen jüngerer Frauen signifikant höher als bei denen älterer Frauen.

### 3.3 Verteilung der HPV-Typen

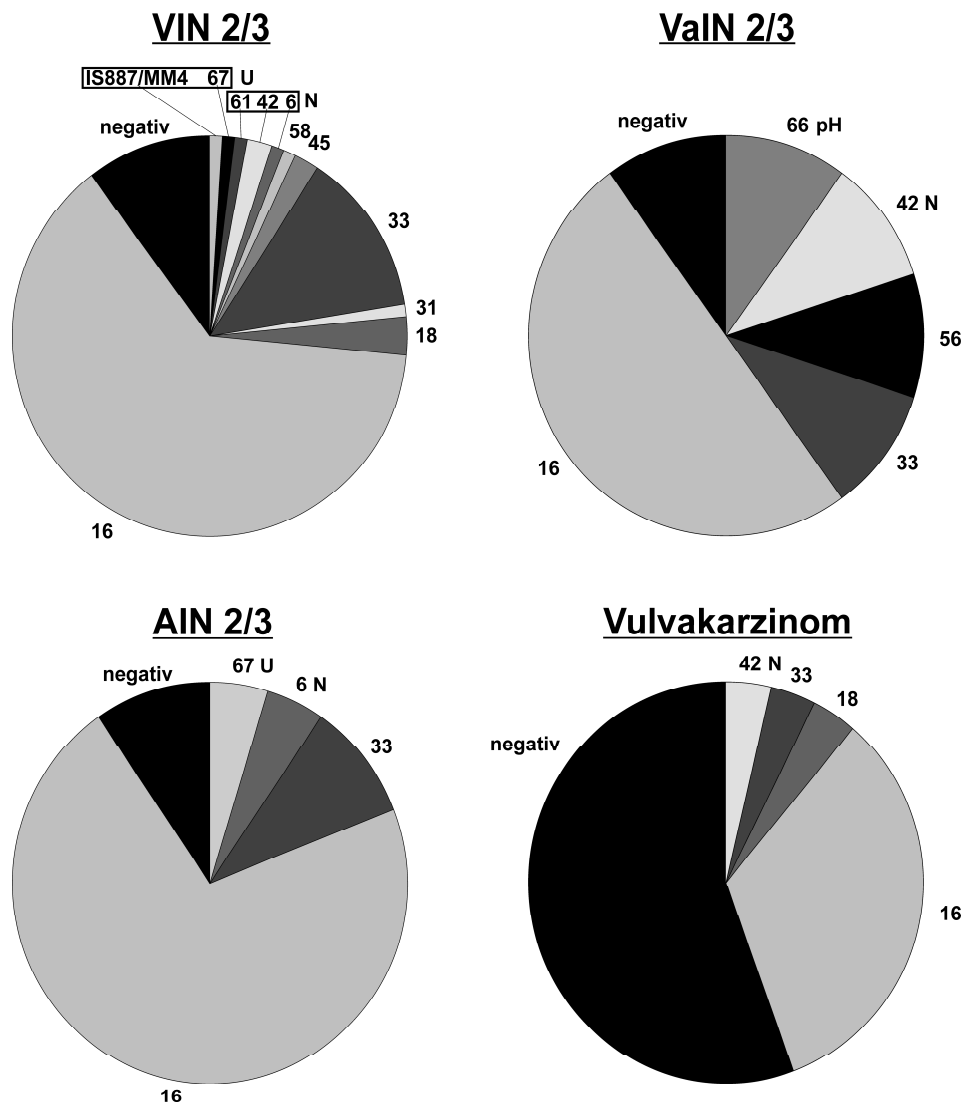
Die Effektivität einer HPV-Impfung, welche nur wenige HPV-Typen abdeckt, hängt nicht nur von der HPV-Infektionsrate, sondern auch von der pathogenetischen Relevanz der verschiedenen Virustypen ab. Um diese Abschätzen zu können, wurde in allen positiv getesteten Proben der vorliegende HPV-Typ, bzw. bei Mehrfachinfektionen die vorliegenden Typen, bestimmt.

Bei jeder HPV-positiven Probe konnte der HPV-Typ, bzw. die Typen, eindeutig identifiziert werden (Abb. 15). Es wurden 13 unterschiedliche HPV-Typen in der Stichprobe nachgewiesen. Die meisten HPV-positiven Proben (entsprechend 94%, 88%, 89% bzw. 92% für VIN 2/3, VaIN 2/3, AIN 2/3 bzw. Vulvakarzinom) beinhalteten Hochrisiko-HPV-Typen (HPV 16, 18, 31, 33, 45, 56, 58).

Niedrigrisiko-HPV-Typen (HPV 6, 42, 61) wurden nur in weniger als 5% der Proben nachgewiesen (Abb. 16). Seltene HPV-Typen, mit potentiell hohem (HPV 66) oder unbekanntem Risiko (HPV 67, IS887/MM4), wurden nur in 4 Proben (3%) gefunden.

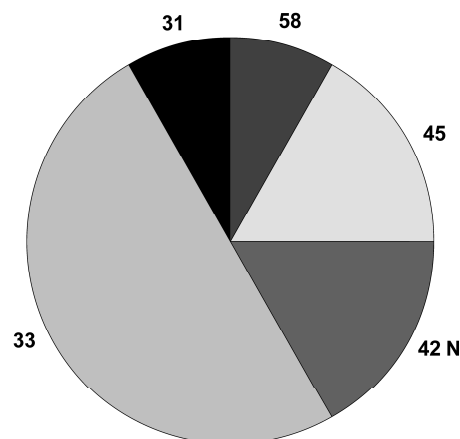


**Abb. 15: Ergebnisse der Sequenzierung und Virustypisierung bei zwei der untersuchten Proben.** Oben und unten sind Fluoreszenzkurven der Sequenzierung zweier PCR-Produkte von Proben aus VIN-2/3-Läsionen zweier Patientinnen dargestellt. Jede der vier farbigen Kurven in beiden Messungen entspricht dem Signal einer untersuchten Base und Spitzen im Kurvenverlauf entsprechen detektierten Fluoreszenzmaxima aus deren Position schließlich die Basensequenz (in denselben Farben über den Kurven angegeben) abgeleitet wird. Im mittleren Teil der Abbildung sind die Sequenzen der PCR-Produkte (Proben 1 u. 2) nochmals aufgetragen. Die Sequenz aus Probe 1 (Spur 15 in Abb. 12) war der von HPV 16 am ähnlichsten und die aus Probe 2 ähnelte am stärksten der von HPV 33 (BLAST) [187]. Die zwischen den Ansatzstellen des GP-Primerpaares (horizontale durchgezogene Linien) liegenden Abschnitte aus dem Genom der HPV-Typen 16 und 33 sind, mit den begrenzenden Basenpositionen, in der Mitte der Abbildung dargestellt und aneinander ausgerichtet [188]. Vertikale Striche markieren identische Basen bei beiden HPV-Typen. Horizontale Striche markieren Deletionen bzw. übersprungene Basen bei der Sequenzierung. Fett geschriebene Basen der Probensequenzen sind identisch mit denjenigen des zu vergleichenden Virusgenoms.



**Abb. 16: Verteilung der HPV-Typen in den verschiedenen Läsionen.** Zahlen entsprechen Virustypen. N = Niedrigrisiko-HPV; U = unbekanntes Risiko; pH = potentiell Hochrisiko-HPV.

**Multiple HPV-Infektion  
(Co-Infektion mit HPV 16)**



**Abb. 17: Verteilung der HPV-Typen, die in Kombination mit HPV 16 bei multiplen Infektionen gefunden wurden.** Zahlen entsprechen Virustypen. N = Niedrigrisiko-HPV.



HPV-Typen 16 (79%) und 33 (17%) waren die am häufigsten identifizierten Typen in HPV-positiven VIN-2/3-Proben (Abb. 16). HPV 16 war auch der häufigste Typ in HPV-positiven VaIN 2/3 (63%), AIN 2/3 (83%) und Vulvakarzinomen (75%). HPV 18 wurde nur in 4 Proben nachgewiesen (3 VIN 2/3 und ein Vulvakarzinom).

Bezogen auf die gesamte Stichprobe waren die durch die entwickelten prophylaktischen HPV-Impfstoffe abgedeckten Hochrisiko-HPV-Typen 16 oder 18 in 66% der Proben nachweisbar. Der Anteil betrug 74% bei VIN 2/3, 56% bei VaIN 2/3, 75% bei AIN 2/3 und 37% bei Vulvakarzinomen (Abb. 16). Bezogen auf die Gesamtzahl der HPV-positiven Proben betrug der Anteil der Hochrisiko-Typen 16 oder 18 82%. Der Anteil betrug 83% bei VIN 2/3, 63% bei VaIN 2/3, 83% bei AIN 2/3 und 83% bei Vulvakarzinomen. In 50% aller Vulvakarzinom-Proben aus der Untergruppe der jüngeren Patientinnen (jünger als 56 Jahre) wurden HPV 16 oder 18 nachgewiesen, bei älteren Patientinnen betrug der Anteil nur 27%. Ein solcher Unterschied wurde bei Patientinnen mit VIN 2/3 nicht beobachtet (74% gegenüber 73%).

Infektionen mit mehr als einem HPV-Typ wurden in 11%, 11%, 5% bzw. 0% der VIN 2/3, VaIN 2/3, AIN 2/3 bzw. Vulvakarzinome detektiert und enthielten ausnahmslos HPV 16 sowie in 83% einen anderen Hochrisiko-Typ (Abb. 17). Nur in 2 Proben (17%) wurde eine Kombination aus Hochrisiko- und Niedrigrisiko-HPV gefunden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodische Aspekte

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse einer umfangreichen Fallserie aus Düsseldorf vorgestellt, welche durch eine HPV-DNA-Nachweismethode mit Hilfe von PCR und DNA-Sequenzierung gewonnen wurden [145]. Es wurden 144 Proben mit den histologisch gesicherten Diagnosen einer intraepithelialen Neoplasie der Vulva, Vagina, oder Analregion, oder eines invasiven Vulvakarzinoms, untersucht. Diese Studie wurde an einem, im Vergleich mit anderen Untersuchungen, umfangreichen Probenkollektiv durchgeführt. Die ermittelte Nachweisgrenze für HPV-DNA (ca.  $10^4$  Kopien/ $\mu\text{g}$  DNA) liegt deutlich unter den für zervikale Läsionen publizierten durchschnittlichen Kopienzahlen der HPV-Typen 16, 18 und 31 (ca.  $10^5$ - $10^8$ / $\mu\text{g}$ ) [182]. Für die hier analysierten Läsionstypen liegen derartige Vergleichsdaten bisher nicht vor. Die mittlere HPV-Kopienzahl pro  $\mu\text{g}$  DNA schwankt zwischen verschiedenen Proben, u.a. abhängig von HPV-Typ und Läsionsart, bis um den Faktor  $10^{12}$  [182], wobei die höchsten Kopienzahlen für HPV 16 gefunden werden und in höhergradigen Läsionen tendenziell höhere Viruslasten vorliegen [181,182]. Aufgrund dieser hohen Schwankungsbreite kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass in einigen Proben, trotz vorliegender HPV-Infektion, der Gehalt an HPV unter der Nachweisgrenze lag. Des Weiteren waren die Proben in Paraffin eingebettet, was die Effizienz der DNA-Extraktion, und somit die Sensitivität der PCR, reduziert haben könnte. Die Ergebnisse der Agarosegel-Elektrophorese wurden, wie in der Originalbeschreibung der Methode [145], visuell ausgewertet. Zwar stellt dies ein prinzipiell subjektives Verfahren dar, jedoch wurde die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse durch die erneute Analyse aller als negativ interpretierten Proben aus der GP-PCR, mittels des MY-Primerpaares, deutlich reduziert. Dieses Verfahren ist um bis zu 25% sensitiver als eine Analyse mit nur einem Primerpaar [145]. Zudem ist die angeschlossene Direktsequenzierung der PCR-Produkte hochspezifisch und bereits eine Sequenz von 34 Basen im Anschluss an den GP-Primer reicht für eine eindeutige HPV-Typisierung aus [145]. Bei der Interpretation der hier vorgestellten Ergebnisse muss somit bedacht werden, dass die Klassifizierung als „HPV-negativ“ eine HPV-Infektion nicht vollständig ausschließt, sondern lediglich besagt, dass die HPV-Kopienzahl in der Probe unterhalb der Nachweisgrenze lag. Jedoch wurden in der vorliegenden Studie ausschließlich hochgradige bzw. maligne Neoplasien untersucht, in denen üblicherweise die höchsten HPV-Kopienzahlen gefunden werden [181,182], was die Wahrscheinlichkeit falsch-negativer Ergebnisse reduziert. Dennoch könnte, aus oben genannten Gründen, die hier verwendete Analysemethode die Prävalenz von HPV in der Stichprobe tendenziell unterschätzen und den Anteil von HPV 16 tendenziell überschätzen. Trotz dieser Einschränkung können Sensitivität und Spezifität der verwendeten Methode als zufriedenstellend angesehen werden. Die so-

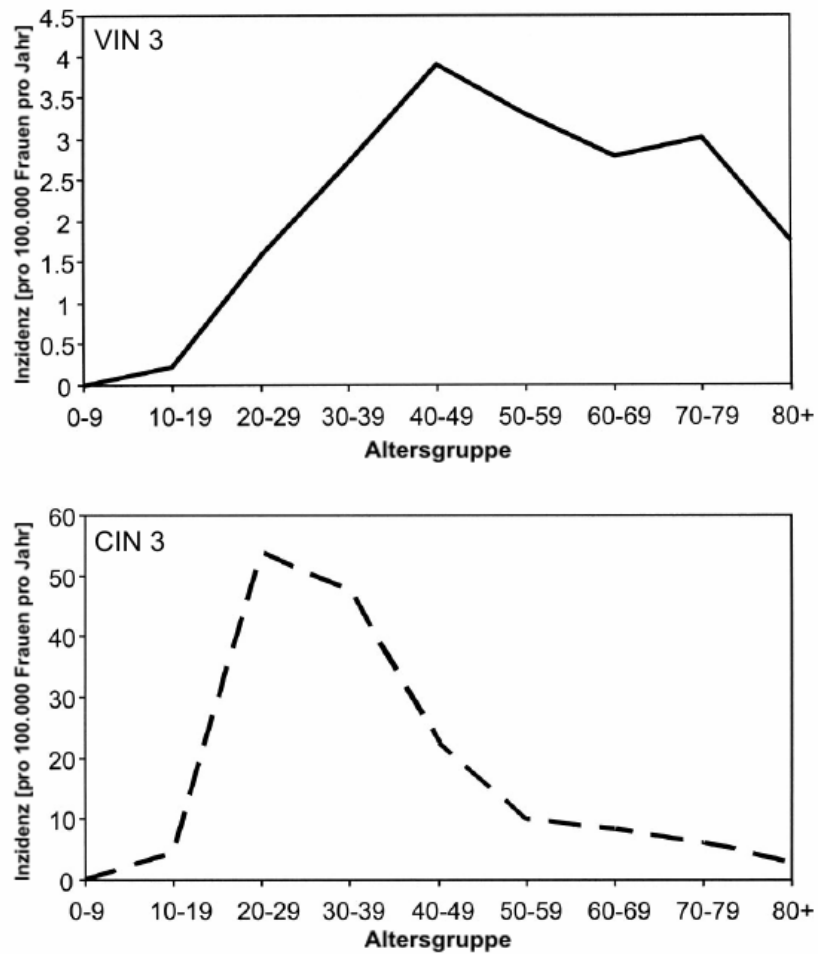
mit aussagekräftigen Ergebnisse [145] bestätigen zudem weitestgehend diejenigen früherer Studien (siehe 4.2.1).

## 4.2 HPV in anogenitalen Neoplasien und Karzinomen

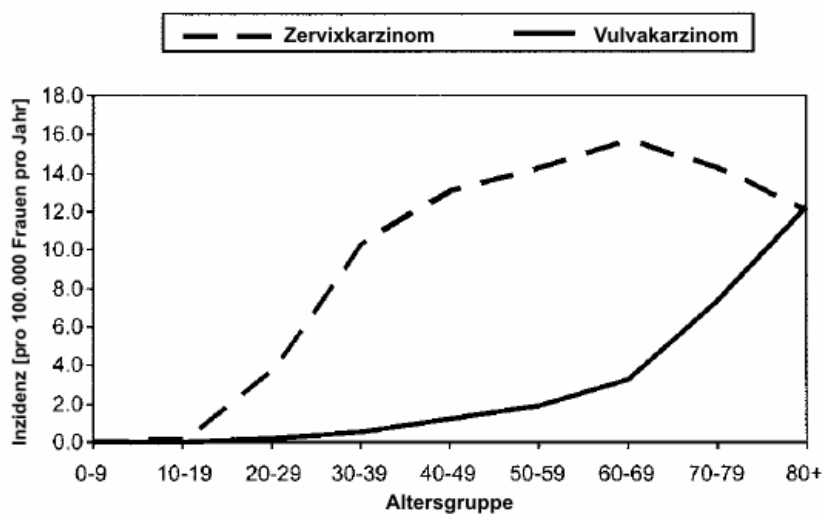
### 4.2.1 Epidemiologische Aspekte

Das mittlere Alter der 120 Patientinnen in der vorliegenden Studie war mit  $48 \pm 15$  Jahren relativ jung. Das Durchschnittsalter von Patientinnen mit Vulvakarzinom ( $58 \pm 14$ ) lag erwartungsgemäß höher als bei denen mit intraepithelialen Neoplasien (Abb. 11), jedoch rund 15 Jahre unter dem Mittelwert der neunziger Jahre [104,111]. Diese Befunde scheinen Angaben über die in den letzten Jahren steigende Häufigkeit anogenitaler neoplastischer Läsionen bei jüngeren Frauen zu bestätigen (Abb. 5) [58-63,84,88,113].

Obwohl die Inzidenz des Vulvakarzinoms in den letzten 30 Jahren gestiegen ist [58,60,62,84,88,104,113], und weiter steigt, ist es immer noch fünfmal seltener als das Zervixkarzinom (2,5 gegenüber 12 : 100.000). Die Altersverteilung der Inzidenz des Vulvakarzinoms ist grundlegend anders als die von zervikalen und vulvären intraepithelialen Neoplasien und Zervixkarzinomen [62]. Bei den intraepithelialen Neoplasien zeigt sich ein Inzidenzgipfel, der bei der hochgradigen VIN ca. 20 Jahre später als bei der entsprechenden zervikalen Läsion liegt (Abb. 18). Eine gipfelnde Verteilung zeigt sich auch beim Zervixkarzinom mit dem Maximum zwischen 60 und 69 Jahren. Die Inzidenz des Vulvakarzinoms steigt jedoch kontinuierlich mit dem Alter an, besonders stark ab dem 50. Lebensjahr, ohne einen Gipfel auszubilden (Abb. 19). Dies impliziert, dass ein erheblicher Teil der Vulvakarzinome nicht auf der Basis HPV-induzierter hochgradiger VIN-Läsionen entsteht [62]. Zusätzliche ätiologische und pathogenetische Faktoren scheinen somit beim Vulvakarzinom eine größere Rolle als beim Zervixkarzinom oder der VIN zu spielen, und die Progressionsrate der hochgradigen VIN zum Karzinom scheint geringer als bei zervikalen Neoplasien zu sein [62,64]. Die niedrigere Prävalenz von HPV in Vulvakarzinomen, und die deutlich geringere Infektionswahrscheinlichkeit im Vergleich zur VIN, in der hier untersuchten Stichprobe korrespondiert mit dieser heterogenen Pathogenese (Abb. 13 u. Tab. 2) [57,89,118-121]. Allerdings hat die Inzidenz invasiver Vulvakarzinome bei jungen Frauen im letzten Jahrzehnt deutlich zugenommen. In dieser Altersgruppe ist ein Großteil der Tumoren durch HPV induziert [58,84,88,126,190]. Damit in Einklang steht die vorliegende Studie, in welcher ein höherer Anteil HPV-positiver Karzinome und eine mehr als fünfmal höhere Infektionswahrscheinlichkeit bei jüngeren Frauen, im Vergleich zu älteren Frauen, sowie ein signifikant jüngeres Durchschnittsalter bei HPV-positiven Vulvakarzinom-Patientinnen nachgewiesen wurden (Abb. 14 u. Tab. 3). Somit scheint die ansteigende Inzidenz von invasiven Vulvakarzinomen bei jüngeren Frauen mit der HPV-Infektion im unteren Genitaltrakt zusammenzuhängen. Es ist zu erwarten, dass sich auch in Zukunft die Altersverteilung der Inzidenz in Richtung jüngerer Patientinnen verschieben wird.



**Abb. 18: Altersverteilung der Inzidenz von VIN 3 und CIN 3 im Zeitraum von 1973 bis 2000.** Beide Kurven zeigen einen gipfförmigen Verlauf, dessen Maximum bei der VIN 3 (40-49 Jahre) ca. 20 Jahre nach dem der CIN 3 (20-29 Jahre) liegt [62].



**Abb. 19: Altersverteilung der Inzidenz des Vulva- und Zervixkarzinoms im Zeitraum von 1973 bis 2000.** Das Risiko an einem Vulvakarzinom zu erkranken steigt kontinuierlich mit dem Lebensalter, wohingegen das Risiko für ein Zervixkarzinom bis zum 60.-69. Lebensjahr ansteigt und danach sinkt [62].

Viele epidemiologische Studien, die das Vorhandensein von HPV-DNA in Karzinomen des unteren Genitaltraktes untersucht haben, waren auf das Zervixkarzinom fokussiert. In diesen Studien wurde HPV-DNA in mehr als 99% der Karzinome nachgewiesen und dadurch die unbestrittene Schlüsselrolle von HPV als ursächlicher Faktor des Zervixkarzinoms etabliert [13,93,191]. Deutlich weniger Studien haben, bis vor kurzem, die Rolle von HPV Infektionen bei Vulvaläsionen erforscht. Eine Literatursuche in PubMed [<http://www.pubmed.com>] mit den Suchbegriffen „vulvar carcinoma“, „HPV“ und „pathogenesis“ im Zeitraum von 1970 bis 3/2007 ohne Spracheingrenzungen liefert Angaben über die Präsenz von HPV-DNA in VIN und vulvären kanzerogenen Läsionen zwischen 0% und 100% [54,58,66,78-80,82-90,98,118-121,123-131,192-194]. Mögliche Gründe für diese große Schwankungsbreite sind die teilweise kleinen Fallzahlen, Unterschiede in der Rekrutierung von Patientinnen, das Jahr der Publikation und, damit teilweise zusammenhängend, unterschiedliche Sensitivitäten der für den HPV-Nachweis benutzten Methoden. In der vorliegenden Studie lag der Anteil HPV-positiver Proben bei 81%, und damit im Vergleich zu früheren Studien hoch. Allerdings liegt das Publikationsdatum vieler Untersuchungen mehr als 10 Jahre zurück. Neuere Publikationen berichten HPV-Positivitäten von 71%-100% für hochgradige VIN [54,89] und bis 85% für Vulvakarzinome [88]. Frühere Studien fanden HPV in 80%-94% hochgradiger VaIN-Proben und bei ca. 60% der Vaginalkarzinome [54,99]. Palefsky et al. wiesen HPV bei 42% von 68 HIV-negativen Frauen im Analkanal nach [195] und in 50%-95% aller Analkarzinome findet sich HPV [71,81,196-198]. Diese Angaben sind vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie (VIN 2/3: 89%, VaIN 2/3: 89%, AIN 2/3: 90%, Vulvakarzinom: 44%; Abb. 13).

Detaillierte, mittels PCR und Sequenzierung erhobene Angaben über HPV-Typ Verteilungen in intraepithelialen Neoplasien der Vulva und Vagina wurden kürzlich von Srodon et al. publiziert [54]. Bei vergleichbaren Anteilen HPV-positiver Proben (91%-100%) fanden sich dort deutlich niedrigere Raten von Hochrisiko-HPV-Typen in niedriggradigen als in hochgradigen HPV-positiven Läsionen (42% gegenüber 100% bei VIN; 76% gegenüber 100% bei VaIN). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit denen der vorliegenden Studie, in welcher Hochrisiko-Typen in 94% der positiv getesteten VIN-2/3-Proben und 88% der positiven VaIN-2/3-Läsionen nachgewiesen wurden (Abb. 16). Es ist noch unklar, ob niedriggradige VIN und VaIN grundlegend unterschiedliche Läsionen sind, und nicht zur hochgradigen Stadien fortschreiten, oder ob die Tendenz zur Progression nur bei Infektion mit Hochrisiko-Typen besteht [54].

Wie in der hier präsentierten Arbeit, so war auch bei kürzlich publizierten anderen Untersuchungen HPV 16 der häufigste Hochrisiko-Typ in hochgradigen VIN-Läsionen [54,91]. In der vorliegenden Studie, sowie auch bei anderen Autoren [83], wurden jedoch im Vergleich zu Srodon et al. [54] höhere Anteile von HPV 33 (17% gegenüber 3%) und niedrige von HPV 18 (4% gegenüber 6%) gefunden (Abb. 16). Eine mögliche Ursache ist die niedrigere Stichprobengröße für hochgradige VIN (n = 34) in der Studie von Srodon et al. [54]. Bei HPV-positiven VaIN 2/3 war in der vorliegenden Studie HPV 16 mit 63% der häufigste Hochrisiko-Typ, gefolgt von HPV 33 und 56, die je einmal

nachgewiesen wurden (je 13%). HPV 16 fand sich bei Srodon et al. in 53% der positiven hochgradigen VaIN (n = 16), gefolgt von HPV 58 (20%) und 31 (13%) [54]. Somit ähneln diese Ergebnisse den hier gezeigten bezüglich HPV 16, jedoch gibt es Unterschiede bei den weniger häufigen HPV-Typen. Srodon et al. [54] zogen die Schlussfolgerung, dass aufgrund des vergleichbaren Anteils von HPV 16 bei VaIN und zervikalen Neoplasien (ca. 50%; [13,158-160]), welcher niedriger als bei den hochgradigen VIN-Läsionen war (91%), Vaginalneoplasien einen engeren Bezug zu zervikalen als zu vulvären Läsionen haben. Auch in der vorliegenden Studie war der Anteil von HPV 16 bei VIN-2/3-Läsionen (79%) höher als bei VaIN-2/3-Läsionen (63%). Die Stichprobengröße für VaIN in beiden Studien lässt jedoch Schlussfolgerungen bezüglich der Beziehung zu zervikalen Läsionen spekulativ erscheinen. Für anale Neoplasien ist die Datenlage spärlich, jedoch wurde bisher meistens HPV 16 nachgewiesen, gefolgt von HPV 18, 33 und 31 [71,81,196-199], was mit den hier präsentierten Ergebnissen vergleichbar ist (Abb. 16).

Bei Patientinnen mit Vulvakarzinomen wurden bisher Hochrisiko-HPV 16, 18, 31 und 33 am häufigsten detektiert, wohingegen Niedrigrisiko-HPV 6 und 11 selten gefunden wurden [66,79,80,82,84-89,98,120,190]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind damit konsistent (Abb. 16), da HPV 16 der häufigste HPV-Typ in Vulvakarzinomen war (75%), gefolgt von HPV 18 und 33 (je 8%). Somit fanden sich bei HPV-positiven präkanzerösen und kanzerösen vulvären Läsionen in der hier vorgestellten Studie deutlich höhere Anteile von HPV 16, als bisher für zervikale Läsionen (ca. 50%; [13,158-160]) berichtet wurde. Dies deutet auf eine bedeutendere Rolle von HPV 16, im Vergleich zu anderen HPV-Typen, für vulväre als für zervikale Läsionen hin [54].

Infektionen mit 2 oder mehr Virustypen fanden Srodon et al. [54] in 12% bzw. 13% der hochgradigen VIN bzw. VaIN, was nahezu identisch mit den hier beschriebenen Häufigkeiten ist (11%; Abb. 17). Eine Untersuchung von 130 multizentrischen HPV-induzierten Läsionen des unteren Genitaltraktes zeigte, dass sowohl identische als auch unterschiedliche HPV-Typen in diesen Läsionen nachzuweisen sind [200]. Synchrone und metachrone Verteilungsmuster von HPV-Typen sind etwa gleich häufig, so dass unterschiedliche Theorien bezüglich der Genese multizentrischer HPV-Infektionen in Betracht gezogen werden müssen [200,201]. Erwähnenswert ist, dass bei Mehrfachinfektionen nur ein Virustyp transkriptionell aktiv und für die Läsion verantwortlich zu sein scheint [202].

#### **4.2.2 Molekularbiologische Aspekte**

Wie bereits zuvor erwähnt, ist die Inzidenz anogenitaler und zervikaler hochgradiger intraepithelialer Neoplasien und Karzinome, in Anbetracht einer Lebenszeit-Infektionswahrscheinlichkeit von bis zu 80%, sehr gering. Der Grund hierfür ist, dass in der weit aus überwiegender Zahl der Fälle das Immunsystem die Infektion erfolgreich bekämpft und HPV eliminiert. In niedriggradigen Neoplasien ist das Muster viraler Genexpression kontrolliert und geordnet und ähnlich dem einer produktiven Infektion mit nachweisbaren Hüllproteinen in den oberflächlichen Zellschichten [Übersichtsarbeit: 38]. Dies trifft

sowohl für Infektionen mit Niedrigrisiko- als auch mit Hochrisiko-HPV zu. Hochgradige intraepitheliale Neoplasien und Karzinome können entstehen, wenn eine persistierende Infektion etabliert wird, welche über Jahre bis Jahrzehnte bestehen kann. In diesen Läsionen findet die Virusreifung nur unzulänglich statt, wohingegen die Proliferationsphase deutlich gesteigert ist. Die Expression viraler Gene ist in diesen Läsionen zunehmend dereguliert was sich unter anderem darin manifestiert, dass die virale Genomamplifikation in hochgradigen Läsionen in oberflächlicheren Zellschichten stattfindet als in niedriggradigen Läsionen. Darüber hinaus ist die Expression viraler Hüllproteine gestört und fertige Viruspartikel werden kaum gefunden. Die molekularen Grundlagen dieser pathologischen Veränderungen sind noch nicht vollständig verstanden, jedoch scheint klar, dass ein Schlüsselereignis für die Entstehung einer Viruspersistenz die Integration der HPV-DNA in das Wirtsgenom ist [Übersichtsarbeit: 38]. Obwohl die Integration der Virus-DNA prinzipiell an einer beliebigen Stelle des Wirtsgenoms erfolgen kann, scheinen bestimmte „fragile Stellen“ zu existieren an denen dies bevorzugt erfolgt. Möglicherweise tragen hierdurch verursachte Änderungen im Expressionsmuster von direkt betroffenen oder benachbarten Wirtsgenen zur onkogenen Transformation bei. Nahezu sicher ist jedoch, dass diese Integration zu einer Deregulation der Expression der viralen Onkogene E6 und E7 führt. Dies geht üblicherweise einher mit einer Störung der Expression von E1, E2 und E4, die antiproliferative Eigenschaften besitzen. Des Weiteren kommt es bei der Integration der Virus-DNA regelmäßig zu einem Verlust von Sequenzen am 3'-Ende der frühen viralen Transkripte, welche die Produktion viraler mRNA für E6 und E7 unterdrücken können, was ebenfalls die Deregulation der Onkogenexpression begünstigt [Übersichtsarbeit: 38].

Das unterschiedliche onkogene Potential der verschiedenen HPV-Typen ist eng mit spezifischen funktionellen Eigenschaften ihrer Onkogene verbunden. Beispielsweise begünstigt die Expression von Genen des HPV 16 die Integration fremder DNA in das Wirtsgenom, was möglicherweise durch eine verstärkte Instabilität des Wirtsgenoms bedingt ist. Die E7-Proteine von Hochrisiko-HPV induzieren zentrosomale Abnormalitäten in Zellkulturen und es wurde postuliert, dass Hochrisiko-E7 die Wahrscheinlichkeit von Replikationsfehlern erhöht. Bei Niedrigrisiko-E7 fanden sich derartige Eigenschaften bisher nicht. Die Gründe für die verstärkte genomische Instabilität sind bisher nicht vollständig verstanden. Die Interaktion von E7 mit pRb, welche einen proliferationsfördernden Effekt hat, ist bei Hochrisiko-HPV effizienter als bei Niedrigrisiko-HPV. Des Weiteren fördert Hochrisiko-E7 die Degradation von pRb [Übersichtsarbeit: 38].

E6 entfaltet seine onkogene Wirkung über die Bindung an p53 und dessen damit verbundene beschleunigte Degradation. Die Affinität von E6 zu p53 ist bei Hochrisiko-HPV deutlich stärker als bei Niedrigrisiko-HPV. Die Inaktivierung von p53 stört zelluläre DNA-Reparaturmechanismen und begünstigt onkogene Mutationen im Wirtszell-Genom. Eine weitere spezifische Eigenschaft der Hochrisiko-E6-Proteine ist ihre PDZ-bindende Domäne am C-Terminus. Sie sind dadurch in der Lage, an zelluläre Zielproteine mit PDZ-Motiven zu binden und deren Degradation zu fördern. Diese Proteine sind möglicherweise an der Regulation von Zellwachstum und interzellulären Kontak-

ten beteiligt. Eine Störung von Zell-Zell-Kontakten könnte mit dem Verlust der Zellpolarität im Rahmen der Krebsentstehung zusammenhängen. Eine weitere wichtige Funktion von Hochrisiko-E6 ist die Fähigkeit, die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase) zu aktivieren, welche Hexamer-Wiederholungen an die Telomere der Chromosome anfügt. Dieser Vorgang hemmt wahrscheinlich die Zellalterung und begünstigt persistierende Infektionen und die Krebsentstehung. Die Proteine E6 und E7 können darüber hinaus die BRCA-medierte Inhibition des hTERT-Promotors antagonisieren [Übersichtsarbeit: 38].

Auch andere Faktoren beeinflussen die Vorgänge zur Entstehung HPV-assoziiierter neoplastischer Läsionen. Hierzu zählen beispielsweise Glukokortikoide und Progesteron, welche die virale Onkogen-Expression beeinflussen. Obwohl eine aberrante Expression der Hochrisiko-Onkogene eine maligne Transformation der Zielzellen klar begünstigt, scheint dies alleine nicht ausreichend zu sein. Zusätzliche genetische Veränderungen müssen mit der Zeit akkumulieren. Diese können prinzipiell zufällig auftreten, jedoch scheint das Vorhandensein von karzinogenen Tabak-Metaboliten, z.B. im Zervikalsekret, ihre Entstehung zu begünstigen [Übersichtsarbeit: 38].

Die oben skizzierten Kenntnisse über die HPV-assoziierte Onkogenese beruhen größtenteils auf Untersuchungen an Probenmaterial von Zervixläsionen. Es scheint jedoch einleuchtend, dass ähnliche Mechanismen auch bei der Entstehung intraepithelialer Neoplasien und Karzinome des äußeren Anogenitalbereiches eine Rolle spielen könnten. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse unterstützen teilweise diese Annahme, z.B. aufgrund des überwiegenden Anteils von Hochrisiko-HPV in den untersuchten Proben. Bei der Entstehung von Vulvakarzinomen scheinen jedoch HPV-unabhängige Faktoren eine bedeutendere Rolle als bei Zervixläsionen zu spielen, da in Vulvakarzinomen nur in ca. der Hälfte der Proben HPV nachgewiesen werden konnte. Dieser Wert liegt deutlich unter den publizierten Infektionsraten von Zervixkarzinomen [Übersichtsarbeit: 96].

### **4.3 Effekt einer HPV-Immunprophylaxe auf die Epidemiologie der untersuchten Läsionen**

Die Behandlung von Vulvaläsionen ist häufig verstümmelnd und traumatisierend für die Patientinnen, und hochgradige, multifokale Läsionen haben ein hohes Rezidivrisiko [49,65,66,134,174]. Daher würde eine Prävention dieser Läsionen die multiplen Therapiesitzungen, verstümmelnden Operationen und die Traumatisierung der Patientinnen vermindern. Erfolgreiche prophylaktische HPV-Impfungen könnten einen beträchtlichen Beitrag zur Beherrschung HPV-assoziiierter menschlicher Krebserkrankungen leisten. Die beiden aus VLPs hergestellten prophylaktischen HPV-Impfstoffe (Cervarix<sup>®</sup> und Gardasil<sup>®</sup>) haben in den bisherigen Studien einen hervorragenden Schutz vor Infektionen mit HPV 16 oder 18, und vor den durch diese Virustypen induzierten zervikalen Präneoplasien vermittelt [155,161-167,170,203]. Der quadrivalente Impfstoff Gardasil<sup>®</sup> verhinderte auch zu 100% anogenitale Warzen und durch HPV 16 oder 18 verursachte



hochgradige VIN- und VaIN-Läsionen [165,203]. Ein „Replacement“ nach Impfung gegen die Typen 16 und 18, d.h. eine Verschiebung des Erregerspektrums hin zu anderen pathogenen HPV-Genotypen, wurde bisher nicht beobachtet. Im Langzeitverlauf von ca. 5.800 Frauen der FUTURE-II-Zulassungsstudie von Gardasil® in Nordeuropa (Nordic Cancer Registry Programme) wird diese Frage, sowie die Effektivität und der Verlauf der Antikörpertiter, weiter untersucht.

Ergebnisse zur Wirksamkeit und Sicherheit der Impfstoffe liegen derzeit aus den Zulassungsstudien für Mädchen und Frauen im Alter von 15 bis 26 Jahren vor. Des Weiteren wurden hohe Serokonversionsraten und Antikörpertiter bei Jugendlichen (10-15 Jahre) erzielt, was erfolgreiche Immunisierungen in dieser Altersgruppe möglich erscheinen lässt [204]. Dies ist von besonderer Wichtigkeit, da mit der Aufnahme der sexuellen Aktivität eine rasche Durchseuchung mit HPV stattfindet [17], weswegen für eine maximal effektive Prophylaxe die Impfung vor der Kohabitarche (ab 12 Jahren; [205]) vorliegen muss. Es wird jedoch eine nicht unerhebliche Anzahl junger Mädchen und Frauen geben, die auch nach Aufnahme der sexuellen Aktivität noch von einer Impfung profitieren könnten. Als Gründe sind zu nennen, dass die Altersspanne der Aufnahme der sexuellen Aktivität mehrere Jahre umfasst, dass es auch Mädchen gibt, die mit 17 Jahren noch nicht sexuell aktiv sind (27%), dass nicht jedes sexuell aktive Mädchen infiziert wird, dass bei 65% der sexuell aktiven Jugendlichen in Deutschland die sexuelle Aktivität auf 1-2 Partner beschränkt bleibt, und dass einige sexuell aktive Mädchen einen zumindest teilweise geschützten Kontakt hatten [156,205]. Zudem scheinen Schutzeffekte gegenüber einer HPV-Infektion für Frauen mit vorangegangener oder persistierender Infektion mit mindestens einem der HPV-Impfgenotypen möglich [164].

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass 87% aller Mädchen bis zum 17. Lebensjahr einen Frauenarzt aufgesucht haben [205], besteht in Deutschland eine realistische Chance, hohe Durchimpfungsraten, insbesondere bei präadoleszenten Mädchen, zu erzielen. Bezüglich des Zervixkarzinoms wurde von der ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch Institut geschätzt, dass etwa 98 Mädchen geimpft werden müssten, um einen Fall zu verhindern. Unter Berücksichtigung einer möglichen Durchimpfungsrate von 70%, würde etwa jedes 140. Mädchen einer Geburtskohorte von der Impfung profitieren [156]. In einer amerikanischen Studie wurde eine Reduktion des Lebenszeiterkrankungsrisikos von 49% für CIN 2/3 und 61% für das Zervixkarzinom errechnet [206]. Ob durch eine Impfung von Jungen, die asymptomatisch infiziert sein können, eine Übertragung wirksam verhindert und Infektketten unterbrochen werden können, ist derzeit Gegenstand weiterer Forschungen. Erste Schätzungen gehen von einer zusätzlichen Möglichkeit der Reduktion der Fälle von Zervixkarzinomen um 2,2% aus [207,208]. Die Impfung mit dem quadrivalenten Impfstoff wird inzwischen von der STIKO für Mädchen im Alter zwischen 12 und 17 Jahren empfohlen [156]. In Deutschland, wo die Impfung inzwischen Kassenleistung ist, ist bereits ein Jahrgang der Zielgruppe durchgeimpft.

Die in den erhältlichen Impfstoffen abgedeckten Hochrisiko-Typen 16 und 18 sind in der vorliegenden Studie in 73% aller hochgradigen anogenitalen intraepithelialen Neoplasien (VIN: 74%; VaIN: 56%; AIN: 75%) nachgewiesen worden (Abb. 16). Bei Vulvakarzinomen betrug dieser Anteil insgesamt nur 37%, bei Patientinnen unter 56 Jahren jedoch 50%. Diese Anteile sind vergleichbar mit intraepithelialen Neoplasien der Zervix (HSIL: ca. 50%-79%) jedoch niedriger als beim Zervixkarzinom (ca. 70%) [13,158-160]. Die in dem quadrivalenten Impfstoff enthaltenen Niedrigrisiko-Typen 6 und 11 waren nur in 2 intraepithelialen Neoplasien enthalten (HPV 6), was weniger als 2% der Proben entspricht (Abb. 16). Anhand der hier präsentierten Ergebnisse kann somit geschätzt werden, dass umfassende und erfolgreiche HPV-Impfkampagnen, einen erheblichen Beitrag zur Reduktion der Inzidenz und Mortalität HPV-assoziiertes anogenitaler (Prä-)Neoplasien leisten könnten. Ungefähr drei Viertel der intraepithelialen Krebsvorstufen im unteren Genitaltrakt (kumulierte Inzidenz > 3 : 100.000; siehe 1.2.2) und ungefähr die Hälfte der Vulvakarzinome bei Frauen unter 56 Jahren (Inzidenz in dieser Altersgruppe ca. 0,6 : 100.000; [104]) könnten verhindert werden. Diese Schätzung ist in guter Übereinstimmung mit kürzlich publizierten Daten zum Schutz vor hochgradigen VIN- bzw. VaIN-Läsionen durch Gardasil®. Dieser Impfstoff verhinderte bei Frauen im Alter von 16 bis 26 Jahren, nach einem Beobachtungszeitraum von durchschnittlich 3 Jahren, 49% aller hochgradigen VIN bzw. VaIN [203]. Somit könnte dem Anstieg des Anteils HPV-assoziiertes anogenitaler Neoplasien und Karzinome, insbesondere bei jungen Frauen, durch eine Impfung effektiv entgegengetreten werden. Es ist jedoch zu betonen, dass konsequente Krebsfrüherkennungsprogramme in absehbarer Zeit nicht vernachlässigt oder abgeschafft werden dürfen. Einerseits sind wir von einer flächendeckenden Durchimpfungsrate noch weit entfernt. Andererseits werden nur ca. 70% der Zervixkarzinome durch die in den Impfstoffen enthaltenen HPV-Typen 16 und 18 verursacht [209]. Obwohl eine Kreuzimmunität gegen andere Virustypen für beide Impfstoffe nachgewiesen wurde [162], werden noch nicht alle onkogenen HPV-Typen erfasst. Zur besseren Prophylaxe vulvärer Läsionen wäre ein möglicher Ansatzpunkt für Weiterentwicklungen der Impfstoffe insbesondere der relativ hohe Anteil von HPV 33 in den intraepithelialen Neoplasien (14%). Bezogen auf das Vulvakarzinom ist jedoch zu bedenken, dass ca. die Hälfte dieser Läsionen unabhängig von HPV aufzutreten und somit einer Impfprophylaxe nicht zugänglich zu sein scheint.

## Abkürzungsverzeichnis

A.d.	destilliertes Wasser (lat. aqua destillata)
Abb.	Abbildung
AIN	anale intraepitheliale Neoplasie
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ca.	ungefähr (lat. circa)
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CIS	Carcinoma in situ
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	und andere (lat. et alii)
FIGO	Internationaler Verband für Gynäkologie und Geburtshilfe (franz. Federation Internationale de Gynekologie et d'Obstetrique)
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HPV	humanes Papillomvirus
HSIL	hochgradige squamöse intraepitheliale Läsion (engl. high-grade squamous intraepithelial lesion)
KI	Konfidenzintervall
LSIL	niedriggradige squamöse intraepitheliale Läsion (engl. low-grade squamous intraepithelial lesion)
n	Stichprobengröße
OR	Chancenverhältnis (engl. odds-ratio)
ORF	Offener Leserahmen (engl. open reading frame)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PCR-DS	PCR-Direktsequenzierung
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
VaIN	vaginale intraepitheliale Neoplasie
VIN	vulväre intraepitheliale Neoplasie
VLP	Virus-ähnlicher Partikel (engl. virus-like particle)
z.B.	zum Beispiel

## Literaturverzeichnis

1. Meisels A, Morin C. Human papillomavirus and cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1981;12:S111-S123.
2. Meisels A, Roy M, Fortier M, Morin C, Casas-Cordero M, Shah KV, Turgeon H. Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. *Acta Cytol* 1981;25:7-16.
3. Morin C, Braun L, Casas-Cordero M, Shah KV, Roy M, Fortier M, Meisels A. Confirmation of the papillomavirus etiology of condylomatous cervix lesions by the peroxidase-antiperoxidase technique. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:831-5.
4. Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci* 1956;63:1245-61.
5. Dun AE, Ogilvie MM. Intranuclear virus particles in human genital wart tissue: observations on the ultrastructure of the epidermal layer. *J Ultrastruct Res* 1968;22:282-95.
6. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976;20:505-9.
7. Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol* 1977;21:379-90.
8. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977;78:1-30.
9. zur Hausen H, de Villiers EM, Gissmann L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol Oncol* 1981;12:S124-S128.
10. zur Hausen H, Gissmann L, Schlehofer JR. Viruses in the etiology of human genital cancer. *Prog Med Virol* 1984;30:170-86.
11. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
12. Hengge UR. Papillomviruserkrankungen. *Hautarzt* 2004;55:841-54.
13. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
14. Villa LL. CHAPTER 1 Biology of genital human papillomaviruses. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;94:S3-S7.
15. Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995;171:1026-30.
16. Brown DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, Vargas M, Tu W, Juliar BE, Breen TE, Fortenberry JD. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis* 2005;191:182-92.
17. Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy DR, Meijer CL. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:101-6.

18. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 2003;157:218-26.
19. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-8.
20. Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 1988;10:122-63.
21. Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol* 2000;151:1158-71.
22. Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:3-13.
23. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PT, Ferreccio C, Hieu NT, Matos E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJ, Franceschi S. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005;366:991-8.
24. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:453-9.
25. Weinstock H, Berman S, Cates W. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Sex Reprod Health* 2004;36:6-10.
26. Manhart LE, Holmes KK, Koutsky LA, Wood TR, Kenney DL, Feng Q, Kiviat NB. Human papillomavirus infection among sexually active young women in the United States: Implications for developing a vaccination strategy. *Sex Transm Dis* 2006;33:502-8.
27. Stone KM, Karem KL, Sternberg MR, McQuillan GM, Poon AD, Unger ER, Reeves WC. Seroprevalence of Human Papillomavirus Type 16 Infection in the United States. *J Infect Dis* 2002;186:1396-402.
28. CDC. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization practices (ACIP). *MMWR Early Release* 2007;56:1-24.
29. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 2000;181:1911-9.
30. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Hrsg. *Fields virology*. 4. Aufl. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001. S. 2197-229.
31. Ong CK, Bernard HU, Villa LL. Identification of genomic sequences of three novel human papillomavirus sequences in cervical smears of Amazonian Indians. *J Infect Dis* 1994;170:1086-8.
32. Fornaciari G, Zavaglia K, Giusti L, Vultaggio C, Ciranni R. Human papillomavirus in a 16th century mummy. *Lancet* 2003;362:1160.

33. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, Meulen J, Villa LL. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 1993;67:6424-31.
34. Meyer T. Diagnostik der HPV-Infektion. In: Hengge UR, Hrsg. HPV-Infektion und Neoplasien der Haut - Diagnostik und Therapie. 1. Aufl. Bremen: UNI-MED. 2003. S. 36-48.
35. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel DM. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004;64:3878-84.
36. Taichman LB, Reilly SS, LaPorta RF. The role of keratinocyte differentiation in the expression of epitheliotropic viruses. *J Invest Dermatol* 1983;81:137s-40s.
37. Laimins LA. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses. In: McCance DJ, Hrsg. Human Tumor Viruses. Washington D.C.: ASM Press. 1998. S. 201-23.
38. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006;110:525-41.
39. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
40. Scott M, Stites DP, Moscicki AB. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:751-5.
41. Vinokurova S, Wentzensen N, von Knebel-Doerberitz M. Analysis of p16INK4a and integrated HPV genomes as progression markers. *Methods Mol Med* 2005;119:73-83.
42. Pfister H, Schegget J. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol* 1997;15:335-47.
43. Hillemanns P, Kimmig R. Condylomata acuminata. In: Kimmig R, Kürzl R, Hrsg. Vulvakarzinom. 1. Aufl. München: Zuckschwerdt. 2001. S. 7-8.
44. Wiley DJ, Douglas J, Beutner K, Cox T, Fife K, Moscicki AB, Fukumoto L. External genital warts: diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Infect Dis* 2002;35:S210-S224.
45. Petersen EE. Infektionen in Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart: Thieme. 1988.
46. Traiman P, Bacchi CE, de Luca LA, Uemura G, Nahas NJ, Nahas EA, Pontes A. Vulvar carcinoma in young patients and its relationship with genital warts. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999;20:191-4.
47. von Krogh G, Lacey CJ, Gross G, Barrasso R, Schneider A. European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sex Transm Infect* 2000;76:162-8.
48. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:14-9.
49. Jones RW, Rowan DM, Stewart AW. Vulvar intraepithelial neoplasia: aspects of the natural history and outcome in 405 women. *Obstet Gynecol* 2005;106:1319-26.
50. WHO. International histological classification of tumours. In: Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkinson EJ, Hrsg. Histological typing of female genital tract tumours. 2. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer. 1994.

51. Wilkinson EJ, Teixeira MR. Epithelial tumours, squamous tumours. In: Tavassoli M, Devilee P, Hrsg. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics: Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press. 2003. S. 230-320.
52. Solomon D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis: an overview. *Int J Gynecol Pathol* 1991;10:323-5.
53. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Jr., Young N. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114-9.
54. Srodon M, Stoler MH, Baber GB, Kurman RJ. The distribution of low and high-risk HPV types in vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia (VIN and VaIN). *Am J Surg Pathol* 2006;30:1513-8.
55. Hillemanns P, Kimmig R. Ätiologische Bedeutung der humanen Papillomviren (HPV) bei vulvären Neoplasien. In: Kimmig R, Kürzl R, Hrsg. Vulvakarzinom. 1. Aufl. München: Zuckschwerdt. 2001. S. 5-6.
56. Sideri M, Jones RW, Wilkinson EJ, Preti M, Heller DS, Scurry J, Haefner H, Neill S. Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, ISSVD Vulvar Oncology Subcommittee. *J Reprod Med* 2005;50:807-10.
57. Diebold J, Mayr D. Histopathologie. In: Kimmig R, Kürzl R, Hrsg. Vulvakarzinom. 1. Aufl. München: Zuckschwerdt. 2001. S. 13-5.
58. Jones RW, Baranyai J, Stables S. Trends in squamous cell carcinoma of the vulva: the influence of vulvar intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1997;90:448-52.
59. Iversen T, Tretli S. Intraepithelial and invasive squamous cell neoplasia of the vulva: trends in incidence, recurrence, and survival rate in Norway. *Obstet Gynecol* 1998;91:969-72.
60. Joura EA, Losch A, Haider-Angeler MG, Breitenecker G, Leodolter S. Trends in vulvar neoplasia. Increasing incidence of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva in young women. *J Reprod Med* 2000;45:613-5.
61. Joura EA. Epidemiology, diagnosis and treatment of vulvar intraepithelial neoplasia. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002;14:39-43.
62. Judson PL, Habermann EB, Baxter NN, Durham SB, Virnig BA. Trends in the incidence of invasive and in situ vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol* 2006;107:1018-22.
63. Sturgeon SR, Brinton LA, Devesa SS, Kurman RJ. In situ and invasive vulvar cancer incidence trends (1973 to 1987). *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1482-5.
64. van Seters M, van Beurden M, de Craen AJ. Is the assumed natural history of vulvar intraepithelial neoplasia III based on enough evidence? A systematic review of 3322 published patients. *Gynecol Oncol* 2005;97:645-51.
65. Herod JJ, Shafi MI, Rollason TP, Jordan JA, Luesley DM. Vulvar intraepithelial neoplasia: long term follow up of treated and untreated women. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:446-52.
66. Hording U, Daugaard S, Junge J, Lundvall F. Human papillomaviruses and multifocal genital neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15:230-4.
67. Burdick B. Clarifying the "Report of the ISSVD Terminology Committee". *J Reprod Med* 1988;33:97-8.

68. van Beurden M, de Craen AJ, de Vet HC, Blaauwgeers JL, Drillenburger P, Gallee MP, de Kraker NW, Lammes FB, Kate FJ. The contribution of MIB 1 in the accurate grading of vulvar intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 1999;52:820-4.
69. Preti M, Mezzetti M, Robertson C, Sideri M. Inter-observer variation in histopathological diagnosis and grading of vulvar intraepithelial neoplasia: results of an European collaborative study. *BJOG* 2000;107:594-9.
70. Hummer WK, Mussey E, Decker DG, Dockerty MB. Carcinoma in situ of the vagina. *Am J Obstet Gynecol* 1970;108:1109-16.
71. Zbar AP, Fenger C, Efron J, Beer-Gabel M, Wexner SD. The pathology and molecular biology of anal intraepithelial neoplasia: comparisons with cervical and vulvar intraepithelial carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:203-15.
72. Palefsky JM. Anal human papillomavirus infection and anal cancer in HIV-positive individuals: an emerging problem. *AIDS* 1994;8:283-95.
73. Abbasakoor F, Boulos PB. Anal intraepithelial neoplasia. *Br J Surg* 2005;92:277-90.
74. Fox PA. Human papillomavirus and anal intraepithelial neoplasia. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19:62-6.
75. Palefsky JM, Holly EA, Hogeboom CJ, Ralston ML, DaCosta MM, Botts R, Berry JM, Jay N, Darragh TM. Virologic, immunologic, and clinical parameters in the incidence and progression of anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;17:314-9.
76. Marfing TE, Abel ME, Gallagher DM. Perianal Bowen's disease and associated malignancies. Results of a survey. *Dis Colon Rectum* 1987;30:782-5.
77. Marchesa P, Fazio VW, Oliart S, Goldblum JR, Lavery IC. Perianal Bowen's disease: a clinicopathologic study of 47 patients. *Dis Colon Rectum* 1997;40:1286-93.
78. Buscema J, Naghashfar Z, Sawada E, Daniel R, Woodruff JD, Shah K. The predominance of human papillomavirus type 16 in vulvar neoplasia. *Obstet Gynecol* 1988;71:601-6.
79. Carson LF, Twigg LB, Okagaki T, Clark BA, Ostrow RS, Faras AJ. Human papillomavirus DNA in adenosquamous carcinoma and squamous cell carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol* 1988;72:63-7.
80. Hording U, Daugaard S, Iversen AK, Knudsen J, Bock JE, Norrild B. Human papillomavirus type 16 in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, and associated cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 1991;42:22-6.
81. Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, Berline J, Ahn DK, Greenspan JS. Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res* 1991;51:1014-9.
82. Park JS, Rader JS, Wu TC, Laimins LA, Currie JL, Kurman RJ, Shah KV. HPV-16 viral transcripts in vulvar neoplasia: preliminary studies. *Gynecol Oncol* 1991;42:250-5.
83. Junge J, Poulsen H, Horn T, Hording U, Lundvall F. Human papillomavirus (HPV) in vulvar dysplasia and carcinoma in situ. *APMIS* 1995;103:501-10.
84. Messing MJ, Gallup DG. Carcinoma of the vulva in young women. *Obstet Gynecol* 1995;86:51-4.



85. Monk BJ, Burger RA, Lin F, Parham G, Vasilev SA, Wilczynski SP. Prognostic significance of human papillomavirus DNA in vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol* 1995;85:709-15.
86. Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the vulva by polymerase chain reaction. *Obstet Gynecol* 1997;89:81-4.
87. Kagie MJ, Kenter GG, Zomerdijk-Nooijen Y, Hermans J, Schuurin E, Timmers PJ, Trimpos JB, Fleuren GJ. Human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva, in various synchronous epithelial changes and in normal vulvar skin. *Gynecol Oncol* 1997;67:178-83.
88. Al-Ghamdi A, Freedman D, Miller D, Poh C, Rosin M, Zhang L, Gilks CB. Vulvar squamous cell carcinoma in young women: a clinicopathologic study of 21 cases. *Gynecol Oncol* 2002;84:94-101.
89. van der Avoort I, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte JM, de Hullu JA, de Wilde PC, Bulten J, Melchers WJ, Massuger LF. Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *Int J Gynecol Pathol* 2006;25:22-9.
90. Jones RW, Park JS, McLean MR, Shah KV. Human papillomavirus in women with vulvar intraepithelial neoplasia III. *J Reprod Med* 1990;35:1124-6.
91. Hillemanns P, Wang X. Integration of HPV-16 and HPV-18 DNA in vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2006;100:276-82.
92. Scholefield JH, Hickson WG, Smith JH, Rogers K, Sharp F. Anal intraepithelial neoplasia: part of a multifocal disease process. *Lancet* 1992;340:1271-3.
93. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
94. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:690-8.
95. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006;24:S42-S51.
96. Engel J, Schubert-Fritschle G. Epidemiologie des Zervixkarzinoms. In: Hillemanns P, Hrsg. *Zervixkarzinom*. 3. Aufl. München: Zuckschwerdt. 2004. S. 1-14.
97. Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H. *Krebs in Deutschland*. 5. Aufl. Saarbrücken: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. 2006.
98. Madeleine MM, Daling JR, Carter JJ, Wipf GC, Schwartz SM, McKnight B, Kurman RJ, Beckmann AM, Hagensee ME, Galloway DA. Cofactors with human papillomavirus in a population-based study of vulvar cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1516-23.
99. Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM, Shera KA, Carter JJ, McKnight B, Porter PL, Galloway DA, McDougall JK, Tamimi H. A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *Gynecol Oncol* 2002;84:263-70.
100. Frisch M. On the etiology of anal squamous carcinoma. *Dan Med Bull* 2002;49:194-209.
101. Partridge JM, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis* 2006;6:21-31.

102. Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet* 2004;363:1488-9.
103. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1944-56.
104. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003, based on November 2005 SEER data submission. National Cancer Institute Bethesda, MD. 2006. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2003/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003/)
105. Maggard MA, Beanes SR, Ko CY. Anal canal cancer: a population-based reappraisal. *Dis Colon Rectum* 2003;46:1517-23.
106. Goedert JJ, Cote TR, Virgo P, Scoppa SM, Kingma DW, Gail MH, Jaffe ES, Biggar RJ. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet* 1998;351:1833-9.
107. Chin-Hong PV, Palefsky JM. Natural history and clinical management of anal human papillomavirus disease in men and women infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2002;35:1127-34.
108. Henson D, Tarone R. An epidemiologic study of cancer of the cervix, vagina, and vulva based on the Third National Cancer Survey in the United States. *Am J Obstet Gynecol* 1977;129:525-32.
109. Mardh PA. The vaginal ecosystem. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1163-8.
110. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. Vaginalkarzinom. Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen. 2006.
111. Engel J, Schubert-Fritschle G, Hölzel D. Epidemiologie. In: Kimmig R, Kürzl R, Hrsg. Vulvakarzinom. 1. Aufl. München: Zuckschwerdt. 2001. S. 1-4.
112. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. Vulvakarzinom. Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen. 2006.
113. Carter J, Carlson J, Fowler J, Hartenbach E, Adcock L, Carson L, Twiggs LB. Invasive vulvar tumors in young women--a disease of the immunosuppressed? *Gynecol Oncol* 1993;51:307-10.
114. Kürzl R. Stadieneinteilung. In: Kimmig R, Kürzl R, Hrsg. Vulvakarzinom. 1. Aufl. München: Zuckschwerdt. 2001. S. 16-7.
115. UICC. TNM Klassifikation maligner Tumoren. Berlin Heidelberg New York: Springer. 1997.
116. Wilkinson EJ, Rico MJ, Pierson KK. Microinvasive carcinoma of the vulva. *Int J Gynecol Pathol* 1982;1:29-39.
117. Statistisches Bundesamt. Fachserie 12, Reihe 4: Todesursachenstatistik in Deutschland. Stuttgart: Metzler Poeschel. 1999.
118. Andersen WA, Franquemont DW, Williams J, Taylor PT, Crum CP. Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: two separate entities? *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:329-35.
119. Bloss JD, Liao SY, Wilczynski SP, Macri C, Walker J, Peake M, Berman ML. Clinical and histologic features of vulvar carcinomas analyzed for human papillomavirus status: evidence that squamous cell carcinoma of the vulva has more than one etiology. *Hum Pathol* 1991;22:711-8.
120. Hording U, Junge J, Daugaard S, Lundvall F, Poulsen H, Bock JE. Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: indications for two different etiologies. *Gynecol Oncol* 1994;52:241-6.

121. Trimble CL, Hildesheim A, Brinton LA, Shah KV, Kurman RJ. Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol* 1996;87:59-64.
122. Leibowitch M, Neill S, Pelisse M, Moyal-Baracco M. The epithelial changes associated with squamous cell carcinoma of the vulva: a review of the clinical, histological and viral findings in 78 women. *Br J Obstet Gynaecol* 1990;97:1135-9.
123. Toki T, Kurman RJ, Park JS, Kessis T, Daniel RW, Shah KV. Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Int J Gynecol Pathol* 1991;10:107-25.
124. Husseinzadeh N, DeEulis T, Newman N, Wesseler T. HPV changes and their significance in patients with invasive squamous cell carcinoma of the vulva: a clinicopathologic study. *Gynecol Oncol* 1991;43:237-41.
125. Kurman RJ, Toki T, Schiffman MH. Basaloid and warty carcinomas of the vulva. Distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. *Am J Surg Pathol* 1993;17:133-45.
126. Losch A, Joura EA. Vulvar neoplasia in young women. *Gynecol Oncol* 1999;75:519.
127. Sutton GP, Stehman FB, Ehrlich CE, Roman A. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in lesions of the female genital tract: evidence for type 6/11 in squamous carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol* 1987;70:564-8.
128. Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N, Martin WJ, Fitzgibbons PL. Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1989;13:221-4.
129. Venuti A, Marcante ML. Presence of human papillomavirus type 18 DNA in vulvar carcinomas and its integration into the cell genome. *J Gen Virol* 1989;70:1587-92.
130. Rusk D, Sutton GP, Look KY, Roman A. Analysis of invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vulvar intraepithelial neoplasia for the presence of human papillomavirus DNA. *Obstet Gynecol* 1991;77:918-22.
131. Brandenberger AW, Rudlinger R, Hanggi W, Bersinger NA, Dreher E. Detection of human papillomavirus in vulvar carcinoma. A study by in situ hybridisation. *Arch Gynecol Obstet* 1992;252:31-5.
132. Ansink A. Vulvar squamous cell carcinoma. *Semin Dermatol* 1996;15:51-9.
133. Edwards CL, Balat O. Characteristics of patients with vulvar cancer: an analysis of 94 patients. *Eur J Gynaecol Oncol* 1996;17:351-3.
134. Kürzl R, Hillemanns P. Behandlung präneoplastischer Vulvaläsionen. In: Kimmig R, Kürzl R, Hrsg. *Vulvakarzinom*. 1. Aufl. München: Zuckschwerdt. 2001. S. 18-9.
135. Berth-Jones J, Graham-Brown RA, Burns DA. Lichen sclerosus et atrophicus--a review of 15 cases in young girls. *Clin Exp Dermatol* 1991;16:14-7.
136. Lawrence WD. Non-neoplastic epithelial disorders of the vulva (vulvar dystrophies): historical and current perspectives. *Pathol Annu* 1993;28:23-51.
137. Pfliederer A. Entzündliche Erkrankungen. In: Pfliederer A, Breckwoldt M, Martius G, Hrsg. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme. 2001. S. 117-37.
138. Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 1990;71:173-81.

139. van den Brule AJ, Meijer CJ, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JM. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:2739-43.
140. Gravitt PE, Manos MM. Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA. *IARC Sci Publ* 1992;121-33.
141. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawler P, Sherman ME. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994;169:235-40.
142. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057-62.
143. Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. 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* 1995;33:901-5.
144. Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 1997;35:791-5.
145. Feoli-Fonseca JC, Oligny LL, Filion M, Brochu P, Simard P, Russo PA, Yotov WV. A two-tier polymerase chain reaction direct sequencing method for detecting and typing human papillomaviruses in pathological specimens. *Diagn Mol Pathol* 1998;7:317-23.
146. Finan RR, Irani-Hakime N, Tamim H, Sharide HE, Daccache JL, Almawi WY. Detection of human papillomavirus (HPV) genotypes in cervico-vaginal scrapes of women with normal and abnormal cytology. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:688-92.
147. Villa LL, Denny L. CHAPTER 7 Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;94:S71-S80.
148. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, Burk RD. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 1997;35:1304-10.
149. Evander M, Edlund K, Boden E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 1992;30:987-92.
150. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, Johansson B, Hagmar B. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1996;34:2095-100.
151. Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT, Lowy DR. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 1995;69:3959-63.
152. Mahdavi A, Monk BJ. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist* 2005;10:528-38.

153. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 1991;185:251-7.
154. Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jenson AB, Schlegel R. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11553-7.
155. Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. *Rev Med Virol* 2006;16:139-49.
156. Ständige Impfkommission (STIKO) am Robert Koch Institut. Impfung gegen humane Papillomaviren (HPV) für Mädchen von 12 bis 17 Jahren - Empfehlung und Begründung. *Epidemiologisches Bulletin* 2007;12:97-103.
157. Hampf M. Prevention of human papilloma virus-induced preneoplasia and cancer by prophylactic HPV vaccines. *Minerva Med* 2007;98:121-30.
158. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;89:101-5.
159. Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Lu Y, Mattu R, Dunn ST. Distribution of HPV genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. *Mod Pathol* 2007;20:167-74.
160. Lai CH, Huang HJ, Hsueh S, Chao A, Lin CT, Huang SL, Chao FY, Qiu JT, Hong JH, Chou HH, Chang TC, Chang CJ. Human papillomavirus genotype in cervical cancer: A population-based study. *Int J Cancer* 2007;120:1999-2006.
161. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis B, Naud P, de Carvalho NS, Roteli-Martins CM, Teixeira J, Blatter MM, Korn AP, Quint W, Dubin G. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004;364:1757-65.
162. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens SA, Dubin G. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 2006;367:1247-55.
163. Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler C, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsague X, de Carvalho NS, Skinner SR, Harper DM, Hedrick JA, Jaisamrarn U, Limson GAM, Dionne M, Quint W, Spiessens B, Peeters P, Struyf F, Wieting SL, Lehtinen MO, Dubin G. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369:2161-70.
164. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, Wheeler CM, Koutsky LA, Malm C, Lehtinen M, Skjeldestad FE, Olsson SE, Steinwall M, Brown DR, Kurman RJ, Ronnett BM, Stoler MH, Ferenczy A, Harper DM, Tamms GM, Yu J, Lupinacci L, Railkar R, Taddeo FJ, Jansen KU, Esser MT, Sings HL, Saah AJ, Barr E. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005;6:271-8.

165. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, Olsson SE, Hoyer J, Steinwall M, Riis-Johannessen G, Andersson-Ellstrom A, Elfgrén K, Krogh G, Lehtinen M, Malm C, Tamms GM, Giacoletti K, Lupinacci L, Railkar R, Taddeo FJ, Bryan J, Esser MT, Sings HL, Saah AJ, Barr E. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 2006;95:1459-66.
166. The FUTURE II Study Group. Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Cervical Lesions. *N Engl J Med* 2007;356:1915-27.
167. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GWK, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA. Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent Anogenital Diseases. *N Engl J Med* 2007;356:1928-43.
168. Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, Booy FP, Jessie J, Lowy DR, Schiller JT. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J Virol* 1996;70:5875-83.
169. White WI, Wilson SD, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA. In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *J Virol* 1998;72:959-64.
170. Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Brown DR, Ferenczy A, Harper DM, Koutsky LA, Kurman RJ, Lehtinen M, Malm C, Olsson SE, Ronnett BM, Skjeldestad FE, Steinwall M, Stoler MH, Wheeler CM, Taddeo FJ, Yu J, Lupinacci L, Railkar R, Marchese R, Esser MT, Bryan J, Jansen KU, Sings HL, Tamms GM, Saah AJ, Barr E. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine* 2006;24:5571-83.
171. Koutsky LA, Harper DM. Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine* 2006;24:S114-S121.
172. Lehtinen M, Idanpaan-Heikkilä I, Lunnas T, Palmroth J, Barr E, Cacciatore R, Isaksson R, Kekki M, Koskela P, Kosunen E, Kuortti M, Lahti L, Liljamo T, Luostarinen T, Apter D, Pukkala E, Paavonen J. Population-based enrolment of adolescents in a long-term follow-up trial of human papillomavirus vaccine efficacy. *Int J STD AIDS* 2006;17:237-46.
173. Lehtinen M, Apter D, Dubin G, Kosunen E, Isaksson R, Korpivaara EL, Kyhä-Osterlund L, Lunnas T, Luostarinen T, Niemi L, Palmroth J, Petaja T, Rekonen S, Salmivesi S, Siitari-Mattila M, Svartsjö S, Tuomivaara L, Vilkki M, Pukkala E, Paavonen J. Enrolment of 22,000 adolescent women to cancer registry follow-up for long-term human papillomavirus vaccine efficacy: guarding against guessing. *Int J STD AIDS* 2006;17:517-21.
174. Kürzl R. Operative Behandlung des Vulvakarzinoms. In: Kimmig R, Kürzl R, Hrsg. *Vulvakarzinom*. 1. Aufl. München: Zuckschwerdt. 2001. S. 20-2.
175. Ridley CM, Frankman O, Jones IS, Pincus SH, Wilkinson EJ, Fox H, Friedrich EG, Jr., Kaufman RH, Lynch PJ. New nomenclature for vulvar disease: International Society for the Study of Vulvar Disease. *Hum Pathol* 1989;20:495-6.
176. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. 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* 1994;170:1077-85.

177. Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987;61:962-71.
178. Wu TC, Hsieh ST, Purow BW, Kurman RJ. Demonstration of human papillomavirus (HPV) genomic amplification and viral-like particles from CaSki cell line in SCID mice. *J Virol Methods* 1997;65:287-98.
179. Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene* 2002;21:6041-8.
180. Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, Giuliano AR. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2006;118:1187-93.
181. Fiander AN, Hart KW, Hibbitts SJ, Rieck GC, Tristram AJ, Beukenholdt RW, Powell NG. Variation in human papillomavirus type-16 viral load within different histological grades of cervical neoplasia. *J Med Virol* 2007;79:1366-9.
182. Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* 1999;37:1030-4.
183. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer* 2004;112:854-9.
184. Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Rodriguez AC, Burk RD. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer* 2007;121:2787-93.
185. Paine TM, Soule HD, Pauley RJ, Dawson PJ. Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. *Int J Cancer* 1992;50:463-73.
186. Altschul SF, Gish W. Local alignment statistics. *Methods Enzymol* 1996;266:460-80.
187. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389-402.
188. Tatusova TA, Madden TL. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 1999;174:247-50.
189. McGinnis S, Madden TL. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 2004;32:W20-W25.
190. Hording U, Kringsholm B, Andreasson B, Visfeldt J, Daugaard S, Bock JE. Human papillomavirus in vulvar squamous-cell carcinoma and in normal vulvar tissues: a search for a possible impact of HPV on vulvar cancer prognosis. *Int J Cancer* 1993;55:394-6.
191. Schiffman MH, Castle P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:E2.
192. Neill SM, Lessana-Leibowitch M, Pelisse M, Moyal-Barracco M. Lichen sclerosus, invasive squamous cell carcinoma, and human papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:1633-4.

193. Nuovo GJ, Darfler MM, Impraim CC, Bromley SE. Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. Analysis by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1991;138:53-8.
194. Almeida G, do Val I, Gondim C, Lima R, Takiya C, Carvalho G. Human papillomavirus, Epstein-Barr virus and p53 mutation in vulvar intraepithelial neoplasia. *J Reprod Med* 2004;49:796-9.
195. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, da Costa M, Greenblatt RM. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Infect Dis* 2001;183:383-91.
196. Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Meijer CJ, Walboomers JM, Goldman S, Svensson C, Adami HO, Melbye M. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med* 1997;337:1350-8.
197. Frisch M, Fenger C, van den Brule AJ, Sorensen P, Meijer CJ, Walboomers JM, Adami HO, Melbye M, Glimelius B. Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomaviruses. *Cancer Res* 1999;59:753-7.
198. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, Carter JJ, Porter PL, Galloway DA, McDougall JK. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* 2004;101:270-80.
199. Critchlow CW, Surawicz CM, Holmes KK, Kuypers J, Daling JR, Hawes SE, Goldbaum GM, Sayer J, Hurt C, Dunphy C. Prospective study of high grade anal squamous intraepithelial neoplasia in a cohort of homosexual men: influence of HIV infection, immunosuppression and human papillomavirus infection. *AIDS* 1995;9:1255-62.
200. Hampl M, Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel-Doeberitz M, Poremba C, Bender HG, Kueppers V. Comprehensive analysis of 130 multicentric intraepithelial female lower genital tract lesions by HPV typing and p16 expression profile. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:235-45.
201. Vinokurova S, Wentzensen N, Eienkel J, Klaes R, Ziegert C, Melsheimer P, Sartor H, Horn LC, Höckel M, von Knebel-Doeberitz M. Clonal history of papillomavirus-induced dysplasia in the female lower genital tract. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1798-9.
202. Stoler MH, Srodon M, Baber GB. The frequency and biology of multiple HPV infection in vulvar neoplasia. *Mod Pathol* 2005;18:205A.
203. Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Garland SM, Harper DM, Tang GWK, Ferris DG, Steben M, Jones RW, Bryan J, Taddeo FJ, Bautista OM, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego JW, Sattler C, Barr E, Paavonen J. Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet* 2007;369:1693-702.
204. Block SL, Nolan T, Sattler C, Barr E, Giacoletti KE, Marchant CD, Castellsague X, Rusche SA, Lukac S, Bryan JT, Cavanaugh PF, Jr., Reisinger KS. Comparison of the immunogenicity and reactogenicity of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in male and female adolescents and young adult women. *Pediatrics* 2006;118:2135-45.



205. Heßling A. Jugendsexualität. Wiederholungsbefragung von 14- bis 17-Jährigen und ihren Eltern, Ergebnisse der Repräsentativbefragung 2005. Köln: BZgA. 2006.
206. Van de Velde N, Brisson M, Boily MC. Modeling human papillomavirus vaccine effectiveness: quantifying the impact of parameter uncertainty. *Am J Epidemiol* 2007;165:762-75.
207. Taira AV, Neukermans CP, Sanders GD. Evaluating human papillomavirus vaccination programs. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1915-23.
208. Elbasha EH, Dasbach EJ, Insinga RP. Model for Assessing Human papillomavirus vaccination strategies. *EID* 2007;13:28-41.
209. Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJ. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004;111: 278–85.


## Zusammenfassung

Humane Papillomviren (HPV) sind die am häufigsten sexuell übertragenen Viren weltweit. 70%-80% aller sexuell aktiven Menschen machen in ihrem Leben eine HPV Infektion durch. Meistens verlaufen diese Infektionen asymptomatisch oder führen zu harmlosen Erkrankungen, wie beispielsweise anogenitalen Warzen oder leichtgradigen Veränderungen des Zervixepithels, welche üblicherweise folgenlos ausheilen. Insbesondere bei Infektionen mit sogenannten Hochrisiko-Typen kann es jedoch zu einer Viruspersistenz und nachfolgend zu einer onkogenen Transformation der Zielzellen kommen. Die pathogenetische Schlüsselrolle von HPV ist für das Zervixkarzinom gesichert und ungefähr 70% dieser Läsionen enthalten DNA der Hochrisiko-HPV 16 oder 18. Für andere anogenitale intraepitheliale Neoplasien und Karzinome ist die Datenlage zur Rolle von HPV weitaus spärlicher. Das Vulvakarzinom ist nach dem Zervixkarzinom die zweithäufigste anogenitale Krebserkrankung der Frau. In Deutschland erkranken jährlich über 1.600 Frauen und 650 sterben an Vulvakarzinomen. In den letzten Jahrzehnten hat die Inzidenz von hochgradigen anogenitalen intraepithelialen Neoplasien und von Vulvakarzinomen, insbesondere bei jungen Frauen, stark zugenommen. Hierbei dürfte die HPV-Infektion eine entscheidende Rolle spielen. Derzeit stehen ein quadrivalenter (gegen HPV 6, 11, 16 und 18) und ein bivalenter (gegen HPV 16 und 18) prophylaktischer HPV-Impfstoff zur Verfügung. Diese könnten die Inzidenz zervikaler und vulvärer neoplastischer Läsionen in Zukunft deutlich reduzieren. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die HPV-Infektionsrate und -Typenverteilung in extrazervikalen anogenitalen intraepithelialen Neoplasien und Vulvakarzinomen zu untersuchen. Besonderes Augenmerk lag auf der Bestimmung des Anteils von Hochrisiko-Typen und auf einer Abschätzung des epidemiologischen Effektes der Impfstoffe.

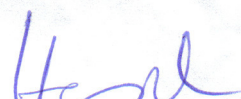
144 Proben histologisch gesicherter Neoplasien des unteren Genitaltrakts von 122 Patientinnen wurden in der vorliegenden Studie untersucht. Die HPV-Detektion und Typisierung erfolgte mittels eines PCR-Direktsequenzierungsprotokolls. Es wurden nach Alter und Histologie geschichtete Stichprobenanalysen durchgeführt.

Patientinnen mit Vulvakarzinomen waren signifikant älter als Patientinnen mit intraepithelialen Neoplasien, jedoch rund 15 Jahre jünger als noch in den neunziger Jahren. Eine HPV-Infektion war bei den intraepithelialen Neoplasien zehnmal wahrscheinlicher als bei Vulvakarzinomen. Patientinnen mit HPV-positiven Vulvakarzinomen waren signifikant jünger als diejenigen mit HPV-negativen Tumoren und bei Vulvakarzinom-Patientinnen jünger als 56 Jahre war eine HPV-Infektion fünfmal wahrscheinlicher als bei älteren. Der Anteil von Hochrisiko-Typen lag bei 88%-94%. HPV 16 wurde am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von HPV 33. Die durch die Impfstoffe abgedeckten Hochrisiko-Typen 16 oder 18 waren in 56%-75% der intraepithelialen Neoplasien nachweisbar. Sie fanden sich in 50% aller Vulvakarzinome jüngerer Patientinnen, wohingegen bei älteren Patientinnen der Anteil nur 27% betrug.

Diese Ergebnisse untermauern Angaben über die steigende Häufigkeit anogenitaler neoplastischer Läsionen bei jüngeren Frauen und sprechen für einen Zusammenhang mit der HPV-Infektion. Eine Durchimpfung vor der Kohabitarache könnte ungefähr drei Viertel der intraepithelialen Krebsvorstufen im unteren Genitaltrakt und die Hälfte der Vulvakarzinome bei Frauen unter 56 Jahren verhindern. Konsequente Krebsfrüherkennungsprogramme bleiben jedoch auf absehbare Zeit unverzichtbar, da einerseits nicht alle onkogenen HPV-Typen durch die Impfungen erfasst werden und andererseits ungefähr die Hälfte der Vulvakarzinome unabhängig von HPV aufzutreten scheint.



Heidi Sarajuuri



PD Dr. med. Monika Hampf

## Anhang

### Ergebnistabellen

**Tab. 4: Einzelergebnisse der HPV-Detektion und -Typisierung**

Die untersuchten Proben sind in der Tabelle nach Läsionstypen und Alter sortiert. Die nachgewiesenen HPV-Typen sind ebenfalls aufgeführt (bei Doppelinfektionen sind beide HPV-Typen nebeneinander eingetragen). Ebenso sind Fälle, in denen keine HPV-DNA nachgewiesen werden konnte, sowie solche mit multizentrischen Läsionen, entsprechend gekennzeichnet.

Alter	Läsion	HPV-Typ	multizentrisch	Alter	Läsion	HPV-Typ	multizentrisch
19	VIN 2/3	18		40	VIN 2/3	16	+
21	VIN 2/3	16		40	VIN 2/3	33	
22	VIN 2/3	negativ		41	VIN 2/3	16 45	
22	VIN 2/3	887		41	VIN 2/3	16	
25	VIN 2/3	negativ		41	VIN 2/3	16	
25	VIN 2/3	16	33 +	41	VIN 2/3	61	
26	VIN 2/3	16		42	VIN 2/3	16 33	
27	VIN 2/3	16		42	VIN 2/3	16	
28	VIN 2/3	16		42	VIN 2/3	16	
28	VIN 2/3	33	+	43	VIN 2/3	16 31	
29	VIN 2/3	16		43	VIN 2/3	16 33	
30	VIN 2/3	16		43	VIN 2/3	16	+
31	VIN 2/3	16	+	43	VIN 2/3	33	
32	VIN 2/3	16		44	VIN 2/3	16	+
32	VIN 2/3	42		45	VIN 2/3	negativ	
33	VIN 2/3	16		45	VIN 2/3	16	
33	VIN 2/3	16		46	VIN 2/3	16	
34	VIN 2/3	negativ	+	47	VIN 2/3	16	
34	VIN 2/3	16		47	VIN 2/3	16	
35	VIN 2/3	16	42 +	47	VIN 2/3	16	
35	VIN 2/3	33		48	VIN 2/3	16	
36	VIN 2/3	16		49	VIN 2/3	16 33	
36	VIN 2/3	16		49	VIN 2/3	16	
36	VIN 2/3	16		49	VIN 2/3	16	+
37	VIN 2/3	16	58	50	VIN 2/3	negativ	+
37	VIN 2/3	16		50	VIN 2/3	16	
37	VIN 2/3	16	+	51	VIN 2/3	16 45	
38	VIN 2/3	16	+	51	VIN 2/3	16	+
38	VIN 2/3	16		51	VIN 2/3	33	
38	VIN 2/3	16		52	VIN 2/3	negativ	
38	VIN 2/3	18		52	VIN 2/3	16	
39	VIN 2/3	16	+	53	VIN 2/3	6	+
39	VIN 2/3	33		53	VIN 2/3	33	
40	VIN 2/3	16	33	53	VIN 2/3	67	+

Alter	Läsion	HPV-Typ	multizentrisch	Alter	Läsion	HPV-Typ	multizentrisch	
54	VIN 2/3	16	+	40	AIN 2/3	16	+	
54	VIN 2/3	16		43	AIN 2/3	6	+	
54	VIN 2/3	16		44	AIN 2/3	16	+	
54	VIN 2/3	16		49	AIN 2/3	16	33	+
55	VIN 2/3	negativ		51	AIN 2/3	16	+	
57	VIN 2/3	negativ		53	AIN 2/3	67	+	
61	VIN 2/3	16		54	AIN 2/3	16	+	
61	VIN 2/3	16	+	55	AIN 2/3	16		
63	VIN 2/3	16		61	AIN 2/3	16	+	
64	VIN 2/3	16	+	63	AIN 2/3	16		
65	VIN 2/3	negativ		76	AIN 2/3	16		
65	VIN 2/3	16		31	Vulvakarzinom	42		
66	VIN 2/3	negativ		34	Vulvakarzinom	16	+	
67	VIN 2/3	16		40	Vulvakarzinom	33	+	
67	VIN 2/3	33		40	Vulvakarzinom	negativ		
68	VIN 2/3	16		41	Vulvakarzinom	negativ		
70	VIN 2/3	16		46	Vulvakarzinom	16		
73	VIN 2/3	16		46	Vulvakarzinom	16		
77	VIN 2/3	18		47	Vulvakarzinom	18		
81	VIN 2/3	16		48	Vulvakarzinom	negativ		
25	VaIN 2/3	16	+	52	Vulvakarzinom	16		
28	VaIN 2/3	33	+	53	Vulvakarzinom	16		
28	VaIN 2/3	66		55	Vulvakarzinom	negativ		
31	VaIN 2/3	16	+	57	Vulvakarzinom	negativ		
35	VaIN 2/3	16	42	58	Vulvakarzinom	16		
39	VaIN 2/3	16	+	61	Vulvakarzinom	negativ		
50	VaIN 2/3	negativ	+	62	Vulvakarzinom	16		
53	VaIN 2/3	56	+	63	Vulvakarzinom	negativ		
64	VaIN 2/3	16	+	63	Vulvakarzinom	negativ		
18	AIN 2/3	negativ		65	Vulvakarzinom	negativ		
25	AIN 2/3	16	+	68	Vulvakarzinom	negativ		
28	AIN 2/3	33	+	70	Vulvakarzinom	16		
31	AIN 2/3	16	+	72	Vulvakarzinom	negativ		
37	AIN 2/3	16	+	73	Vulvakarzinom	negativ		
38	AIN 2/3	negativ		75	Vulvakarzinom	16		
39	AIN 2/3	16	+	77	Vulvakarzinom	negativ		
39	AIN 2/3	16	+	77	Vulvakarzinom	negativ		
40	AIN 2/3	16	+	79	Vulvakarzinom	negativ		

**Tab. 5: Zusammenfassende tabellarische Übersicht der ermittelten Altersverteilung bzw. Fallzahlen, zerlegt entsprechend der im Ergebnisteil bearbeiteten Fragestellungen.**

	VIN 2/3	VaIN	AIN 2/3	Vulvakarzinom
<b>Zahl der Proben insgesamt</b>	88	9	20	27
<b>davon HPV-positive</b>	78	8	18	12
<b>Mittleres Alter bei Diagnosestellung [Jahre±SD]</b>				
Gesamte Stichprobe	45±13	39±14	44±14	58±14*
HPV-positive	44±13	38±14	46±13	51±13 <sup>+</sup>
HPV-negative	47±16	50	28±14	63±13
<b>Infektion mit nur einem HPV-Typ</b>	68	7	17	12
Hochrisiko-Typ	63	6	15	11
Niedrigrisiko-Typ	3	0	1	1
<b>Multiple HPV-Infektion</b>	10	1	1	0
<b>Nachweis von</b>				
Hochrisiko-HPV-Typ(en)	73	7	16	11
HPV 16	62	5	15	9
HPV 33	13	1	2	1
HPV 18	3	0	0	1
HPV 31	1	0	0	0
Niedrigrisiko-HPV-Typ	4	1	1	1
seltenem HPV-Typ oder mit unbekanntem Risiko	2	1	1	0
<b>Multizentrische Erkrankung</b>	18	8	15	1

\* Patientinnen mit Vulvakarzinom sind signifikant älter als solche mit intraepithelialen Neoplasien.

<sup>+</sup> Patientinnen mit HPV-positiven Vulvakarzinomen sind signifikant jünger als solche mit HPV-negativen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Heidi Barbro Marianne Sarajuuri  
Geburtsdatum / -ort: 12.3.1977 in Helsinki, Finnland  
Nationalität: Finnisch  
Familienstand: Ledig

## Beruflicher Werdegang

Allgemeinmedizinische Tätigkeit: Gesundheitszentrum der Stadt Tuusula, Finnland (2007-2008)  
Assistenzärztin: Gynäkologie und Geburtshilfe  
Regionalkrankenhaus der Stadt Porvoo, Finnland (2008-)

## Ausbildung

Abitur: Töölön Yhteiskoulun lukio, Helsinki, Finnland (1996)  
Hochschulstudium: Pharmazie, Universität Helsinki, Finnland (1996-1997)  
Humanmedizin, Universität Düsseldorf (1998-2006)  
Ärztliche Prüfung: 09.11.2006, Gesamtnote: gut  
Ärztliche Approbation: 24.11.2006  
Auslandsaufenthalte: Universität Helsinki, Finnland (2004)  
Praxis Dr. von Lutterotti, Bozen, Italien (2004)  
Mount Sinai School of Medicine, New York City, NY, USA (2005-2006)  
Regionalkrankenhaus der Stadt Porvoo, Finnland (2006)

## Publikation

HAMPL M, SARAJUURI H, WENTZENSEN N, BENDER HG, KUEPPERS V.  
Effect of human papillomavirus vaccines on vulvar, vaginal, and anal intraepithelial lesions and vulvar cancer.  
*Obstet Gynecol* 2006;108:1361-8.